


**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**



**ESTUDO DOS GENES QUE CODIFICAM AS
PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES EM POPULAÇÕES
DO *Trypanosoma cruzi* SENSÍVEIS E
RESISTENTES AO BENZONIDAZOL**

por

FERNANDA BARBOSA NOGUEIRA

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2009**

TESE DBCM-CPqRR F.B. NOGUEIRA 2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
CENTRO DE PESQUISA RENÉ RACHOU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ESTUDO DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS
ANTIOXIDANTES EM POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL.**

por

Fernanda Barbosa Nogueira

**Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular
Orientação: Dr^a. Silvane M Fonseca Murta
Co-orientação: Dr. Alvaro José Romanha**

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2009**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

N778e Nogueira, Fernanda Barbosa
2009

Estudo dos genes que codificam as proteínas antioxidantes em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol / Fernanda Barbosa Nogueira – Belo Horizonte - 2009

xviii, 133 f: il.: 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 135 - 151

Tese de doutorado – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

1. Doença de Chagas/quimioterapia 2. *Trypanosoma cruzi*/efeitos de drogas 3. Antioxidantes/análise 4. Resistência a medicamentos/genética I. Título II. Murta, Silvane M. Fonseca (Orientação). III. Romanha, Alvaro José (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
CENTRO DE PESQUISA RENÉ RACHOU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ESTUDO DOS GENES QUE CODIFICAM AS PROTEÍNAS
ANTIOXIDANTES EM POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi*
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL.**

por

Fernanda Barbosa Nogueira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Silvane M Fonseca Murta (Presidente)

Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

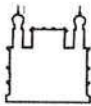
Prof. Dr. Elio Hideo Babá

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos

Suplente: Dr. Rodrigo Pinto Soares

Tese defendida e aprovada em 27/ 02/ 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

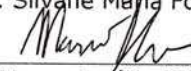
Centro de Pesquisa René Rachou

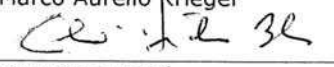
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

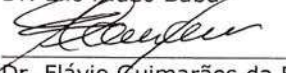
Ata da vigésima quarta defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Fernanda Barbosa Nogueira, sob a orientação da Dra. Silvane Maria Fonseca Murta e co-orientação do Dr. Alvaro José Romanha.

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e nove, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, a defesa da vigésima quarta tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular. A tese da aluna Fernanda Barbosa Nogueira intitula-se "Estudo dos Genes que codificam as proteínas antioxidantes em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta - CPqRR/FIOCRUZ (orientadora e presidente da banca), Dr. Marco Aurélio Krieger - INPA /FIOCRUZ (membro titular), Dr. Elio Hideo Babá - UFOP (membro titular), Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular), Dr. Marco Antônio Silva Campos - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular) e Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares - CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após argüir a aluna e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Silvane Maria Fonseca Murta, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e sete de fevereiro de dois mil e nove.


Dra. Silvane Maria Fonseca Murta


Dr. Marco Aurélio Krieger


Dr. Elio Hideo Babá


Dr. Flávio Guimarães da Fonseca


Dr. Marco Antônio Silva Campos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me acompanhar sempre. Por permitir alcançar mais este objetivo, guiando meus passos e pensamentos. Por ser presença marcada na minha vida.

Agradeço, em especial, aos meus pais Sonia Maria Barbosa Nogueira e Evaldo Nogueira e a minha irmã Flávia Babosa Nogueira, pelo apoio nos momentos difíceis, carinho, amor, compreensão e dedicação sempre, apesar da distância. Ao meu avô Jayme pelos conselhos e por passar experiências de vida. E a todos da minha família que de forma direta ou indireta colaboraram para mais essa conquista na minha vida.

Agradeço ao meu marido Toni, pelo apoio, paciência, compreensão e amor, durante os quatro anos de doutorado e principalmente nestes meses finais da tese.

Agradeço a Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, por ter me orientado durante esse período, pelo apoio e dedicação. Ao meu co-orientador Dr. Alvaro José Romanha, que por um tempo foi orientador, pela assistência, confiança, carinho e pelos ensinamentos durante toda minha tese. Agradeço a vocês pelo ensinamento profissional e pessoal.

Agradeço aos participantes da banca examinadora por terem aceitado meu convite; o Dr. Marco A Krieger, Dr. Elio Hideo Babá, Dr. Flávio Guimarães da Fonseca, Dr. Marco Antônio da Silva Campos e Dr. Rodrigo Pinto Soares.

A todos os colegas que pertencem ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular: Rosana, Fátima, Flávio, Guilherme, Ângela, Marcilene, Jerônimo, Luciana, Patrícia, Raul, Kelly, Rafael, Gabriela, Karla, Rosiane, Simone, Joyce, Policarpo, Márcia, Elisângela, Luiza, Regina, Fernanda Ludolf e Mariana. Em especial aos amigos Daniel, Maureen, Marcela, Maíra e Kenia pelo apoio, agradável convívio, conversas e conselhos.

Aos meus eternos alunos e amigos Marcos Messias Corrêa (aluninho), Alexandre Oliveira e Gabriela Rúbia agradeço o agradável convívio, conversas, risadas e dedicação. Foi uma ótima caminhada, em que eu ganhei amizades preciosas, além da experiência profissional. Vocês me ensinaram muito e fico muito feliz por poder ter contribuído, pelo menos um pouco, na formação profissional de vocês.

As amigas que já não estão no laboratório Paula Santos, Sara Lopes, Simara Semíramis e Lorenza pelo apoio, carinho, conversas, risadas e saídas. Em especial a Paulinha, por me acompanhar diretamente por dois anos, sofrendo, chorando e sorrindo com os experimentos, resultados e responsabilidades extras que a vida nos proporcionou durante um tempo.

Às meninas da limpeza, Silvia, Rosilene e Florença, pelo agradável convívio, carinho e brincadeiras.

Agradeço a amiga Flavinha, pela ótima convivência, pelo apoio, amizade, conversas, valiosas sugestões, boa-vontade e disposição sempre quando solicitada.

À amiga Juciane pelo apoio, carinho e amizade mesmo a distância, por telefonemas.

Agradeço às minhas amigas Karlla e Gabriela, e aos amigos e primos Sílvia e Douglas que mesmo estando longe sempre estiveram presentes por e-mails ou telefonemas, agradeço pelo apoio e sincera amizade.

A todos os colegas do Centro de Pesquisas René Rachou.

À antiga coordenadora do curso de pós-graduação Dra. Cristiana Brito e o atual coordenador Dr. Paulo Pimenta e ao diretor do Centro de Pesquisas René Rachou, Dr. Alvaro José Romanha.

Às secretárias Carol e Michele pela paciência, atenção e disposição sempre quando solicitadas.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

À CAPES, CNPQ, FAPEMIG, PRONEX e PAPES 3/FIOCRUZ, pelo financiamento deste projeto.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a conquista de mais essa vitória na minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 A Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.2 Características genômicas do <i>T. cruzi</i>	22
1.3 Diversidade genética do <i>T. cruzi</i>	24
1.4 Quimioterapia da Doença de Chagas	25
1.5 Resistência Natural e Seleção de resistência do <i>T. cruzi</i> a drogas	28
1.6 Mecanismos de resistência a drogas	31
1.7 O metabolismo oxidativo e a defesa antioxidante do <i>T. cruzi</i>	32
1.7.1 Triparedoxina peroxidase (TXNPx)	35
1.7.2 Ascorbato peroxidase (APX)	41
1.7.3 Tripanotiona redutase (TR)	44
2 OBJETIVO GERAL	51
2.1 Objetivos específicos	51
3 MÉTODOS	52
3.1 Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
3.2 Extração de RNA Total	52
3.3 Extração de DNA	52
3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	53
3.5 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida	54
3.6 Purificação do produto de PCR	54
3.7 RT-PCR quantitativo em tempo real	54
3.8 Análise de Northern blot	56
3.9 Southern blot	56
3.10 Sondas e ensaios de hibridização	56

3.11 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes	57
3.12 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	59
3.13 Teste de solubilidade das proteínas recombinantes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX.....	59
3.14 Dosagem de proteínas.....	61
3.15 Obtenção de anticorpos policlonais anti-proteína rcTcTXNPx e rTcAPX.....	61
3.16 Extração de proteínas totais do <i>T. cruzi</i>	61
3.17 Western blot.....	62
3.18 Análise Densitométrica	62
3.19 Análises de bioinformática dos genes	63
3.20 Análises filogenéticas	64
4 RESULTADOS	65
4A Triparedoxina Peroxidase	65
4A.1 Nível de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao benzonidazol	65
4A.2 Organização genômica e número de cópias dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx.....	67
4A.3 Análises de bioinformática dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx.....	70
4A.4 Análise filogenética	74
4A.5 Localização cromossômica do gene cTcTXNPx	74
4A.6 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes cTcTXNPx e mTcTXNPx.....	78
4A.7 Teste de solubilidade e purificação das proteínas recombinantes rcTcTXNPx e rmTcTXNPx.....	80
4A.8 Nível de expressão das proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx.....	80
4B Ascorbato Peroxidase	83
4B.1 Tamanho do transcrito e nível de mRNA do gene TcAPX nas populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	83

4B.2	Organização genômica, número de cópias e análises de bioinformática do gene TcAPX.....	84
4B.3	Análise filogenética	88
4B.4	Localização do gene TcAPX nos cromossomas do <i>T. cruzi</i>	89
4B.5	Clonagem e expressão da proteína recombinante rTcAPX.....	90
4B.6	Solubilidade e purificação da proteína recombinante rTcAPX	91
4B.7	Nível de expressão da proteína TcAPX	92
4C	Tripanotona Redutase	95
4C.1	Nível de mRNA e organização genômica do gene TcTR.....	95
4C.2	Número de cópias e análises de filogenética do gene TcTR	98
5	DISCUSSÃO	100
6	CONCLUSÕES	115
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
8	ANEXOS.....	117
9	REFERÊNCIAS.....	135

LISTA DE FIGURAS

Figura da capa. Estrutura tridimensional da enzima Triparedoxina peroxidase	I
Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2. Metabolismo antioxidante dos tripanosomatídeos.....	35
Figura 3. Níveis de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	67
Figura 4. Análises de Southern blot dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx de populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	69
Figura 5. Saída gráfica do programa Artemis, exemplificando anotação estrutural e funcional dos contigs do <i>T. cruzi</i> contendo cópias dos genes em estudo	72
Figura 6. Alinhamento múltiplo global das sequências de aminoácidos dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx dos contigs caracterizados.....	73
Figura 7. Relações filogenéticas entre as proteínas TcTXNPx dos tripanosomatídeos.....	75
Figura 8. Localização cromossômica do gene cTcTXNPx em populações do <i>T. cruzi</i> com diferentes zimodemas e resistência a drogas.....	76
Figura 9. Indução com IPTG da expressão das proteínas recombinantes rcTcTXNPx e rmTcTXNPx do <i>T. cruzi</i> , pelas bactérias <i>E. coli</i> BL21 transformadas.....	79
Figura 10. Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas de populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ e Western blot.....	82
Figura 11. Nível de mRNA do gene TcAPX em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	84
Figura 12. Southern blot do gene TcAPX de populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	86
Figura 13. Saída gráfica do programa Artemis, exemplificando anotação estrutural e funcional dos contigs do <i>T. cruzi</i> contendo cópias do gene TcAPX.....	87
Figura 14. Alinhamento múltiplo global das sequências de aminoácidos do gene TcAPX dos contigs caracterizados.....	88
Figura 15. Relações filogenéticas entre a proteína TcAPX dos tripanosomatídeos e uma espécie de planta.....	89

Figura 16. Localização cromossômica do gene TcAPX em populações do <i>T. cruzi</i> com diferentes zimodemas e resistência a droga.....	90
Figura 17. Indução com IPTG da expressão da proteína recombinante rTcAPX do <i>T. cruzi</i> , pelas bactérias <i>E. coli</i> BL21 transformadas e purificação da proteína.....	92
Figura 18. Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas de populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ por Western blot da proteína TcAPX.....	94
Figura 19. Nível de mRNA do gene TcTR em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	95
Figura 20. Southern blot do gene TcTR em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	97
Figura 21. Saída gráfica da anotação estrutural e funcional do contig AAHK01004636, que possui o gene TcTR do <i>T. cruzi</i> feita pelo programa Artemis.....	98
Figura 22. Relações filogenéticas entre a proteína TcTR dos tripanosomatídeos.....	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Razão do número de cópias dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx nas populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e com resistência induzida <i>in vitro</i> ao BZ.....	70
TABELA 2: Contigs do gene cTcTXNPx encontrados no genoma do <i>T. cruzi</i>	71
TABELA 3: Contigs genômicos contendo o gene mTcTXNPx encontrados no genoma do <i>T. cruzi</i>	71
TABELA 4: Populações e clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas neste trabalho, a localização cromossômica dos genes cTcTXNPx e TcAPX.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP** – Ampicilina
- AP** – Fosfatase alcalina
- APS** – Persulfato de amônio
- APX** – Ascorbato peroxidase
- ATP** – Adenosina trifosfato
- BCIP** - 5-bromo-4chloro-3-indolyphosphate
- BSA** – Albumina bovina sérica
- BZ** – Benzonidazol
- cDNA** – DNA complementar
- CIAP** – Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
- C_T** - Cycle threshold
- cTXNPx** – Triparedoxina peroxidase citosólica
- DHA** - Dehidroascorbato
- DHFR-TS** – Dihidrofolato redutase -timidilato sintetase
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP** – Deoxinucleotídeos trifosfatos
- DTT** – Ditioneitol
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- GAPDH** – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GPx** - glutationa peroxidase dependente de cisteína
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- HGPRT** – Hipoxantina guanina fosforribosil transferase
- IPTG** – Isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside
- Kb** – Kilobases
- kDNA** – DNA do quinetoplasto
- LB** – Meio Luria-Bertani
- LIT** – Liver infusion triptose
- M** – Molar
- Mb** – Megabases
- MDR** – Resistência a múltiplas drogas (Multiple resistance drugs)
- mg** – Miligrama
- ml** – Mililitro

MM – Marcador de massa molecular

mM – Milimolar

MOPS – Ácido 3-N-morfolino propanosulfônico

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

mTXNPx - Triparedoxina peroxidase mitocondrial

NBT - Nitro blue tetrazolium

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

NFX – Nifurtimox

Ni²⁺-NTA – Resina de ácido nitriloacético com níquel

NTRI – nitroreductase

O₂⁻ - Ânion superóxido

OH⁻ - Radical hidroxila

ONOO⁻ - Peroxinitrito

pb – Pares de bases

PBS – Salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFGE - Eletroforese de campo alternado (Pulse Field Gel Electrophoresis)

PGP – Fosfoglicoproteína de membrana

pmoles - Picomoles

PSG – Tampão fosfato de sódio, cloreto de sódio e glicose

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

RT – Transcriptase reversa

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase conjugada com a transcriptase reversa

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

SL – Splice leader (seqüência líder ou mini-exon)

SMS – Sítio de manipulação de seqüência (Sequence Manipulation Suíte)

SOD – Superóxido dismutase



SSC – Tampão citrato de sódio

Real time PCR – PCR em tempo real

TBE – tampão tris-borato EDTA, pH 8,0

TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina

TIGR – Instituto de pesquisa genômica (The Institute for Genomic Research)

TS₂ - Tripanotiona disulfeto
TR – Tripanotiona redutase
T(SH)₂ - Dihidrotipantonona
UTR – Região não traduzida (Untranslated region)
V – Volts
xg - Gravidade
Z1 – Zimodema 1
Z2 – Zimodema 2
ZB – Zimodema B
 – Micrograma
 – Microlitro
³²P – Fósforo radioativo

Resumo

O sistema de defesa antioxidante nos tripanosomatídeos é um potencial alvo para quimioterapia. Este sistema é baseado no tiol de baixa massa molecular “tripanotiona”, que mantém o ambiente intracelular reduzido pela ação da tripanotiona redutase (TR). As vias que metabolizam o peróxido de hidrogênio em moléculas de água envolvem as enzimas triparedoxina peroxidase citosólica (cTcTXNPx) e mitocondrial (mTcTXNPx) e a ascorbato peroxidase (APX). No presente trabalho, os genes que codificam as enzimas antioxidantes cTcTXNPx, mTcTXNPx, APX e TR foram caracterizados em 18 populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol (BZ). Nossos resultados mostraram que os níveis de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx foram duas vezes maior na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER), do que seu par sensível (17WTS). No entanto, estes genes não estão amplificados no genoma do parasito. Os genes cTcTXNPx e mTcTXNPx podem apresentar oito e duas cópias, respectivamente, dispersas ao longo do genoma do parasito. Análises de western blot, utilizando anticorpos policlonais anti-cTcTXNPx e anti-mTcTXNPx, mostraram que o nível de expressão destas proteínas nativas foi similar para todas as amostras, exceto na população 17LER que apresentou um aumento de duas vezes na expressão. Além disto, a proteína oxidada mTcTXNPx demonstrou uma expressão 5.5 vezes maior na população 17LER, comparada ao par sensível. Análises filogenéticas das proteínas do *T. cruzi* cTcTXNPx e mTcTXNPx com outros tripanosomatídeos mostraram que elas estão estreitamente relacionados com seus homólogos em *T. brucei*. A enzima APX do *T. cruzi* pode ser considerada um bom alvo para drogas, uma vez que ela não é encontrada em hospedeiros mamíferos. O nível de mRNA e número de cópias do gene TcAPX não apresentaram diferenças significativas entre as populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. O gene TcAPX pode apresentar duas cópias dispersas ao longo do genoma do parasito e está localizada em uma banda cromossômica em todas as cepas do parasito analisadas. A proteína TcAPX apresentou maior similaridade com a APX de espécies de *Leishmania*, quando comparada com plantas. Observamos que o nível de expressão da proteína TcAPX foi duas vezes maior na população do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao BZ (BZR), do que seu par sensível (BZS). A tripanotiona redutase é a enzima chave do parasito que mantém o ambiente intracelular reduzido. O nível de mRNA e o número de cópias do gene TR não apresentaram diferenças significativas nas amostras analisadas. Este gene apresenta uma única cópia no genoma do parasito e está mais relacionado com a TR de *T. brucei*, comparado com outros tripanosomatídeos. Baseado nos nossos resultados, sugerimos que a população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ exibe um aumento no nível da proteína TXNPx juntamente com outras enzimas associadas com o sistema de defesa antioxidante, como a TcFeSOD-A previamente descrita (Nogueira et al., 2006), protegendo estes parasitos resistentes contra o estresse oxidativo.

Abstract

Antioxidant defense in trypanosomatids have been indicated as a potential target for chemotherapy. This system is based on low molecular weight thiol trypanothione, which maintain the reduced intracellular environment by the action of trypanothione reductase (TR). The pathways that metabolize the hydrogen peroxide to water molecules surrounding the cytosolic (cTXNPx) and mitochondrial (mTXNPx) tryparedoxin peroxidase enzymes and ascorbate peroxidase (APX). In the present work, the genes that encode cTXNPx, mTXNPx, APX and TR antioxidants enzymes were characterized in 18 *T. cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole (BZ). Our results showed that the levels of cTcTXNPx and mTcTXNPx mRNA were two-fold higher in the *T. cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to BZ (17LER) than its sensitive pair (17WTS). However, these genes are not amplified in the parasite genome. cTcTXNPx and mTcTXNPx genes can have eight and two copies, respectively, dispersed throughout of the parasite genome. Western blot analysis using anti-cTcTXNPx and anti-mTcTXNPx polyclonal antibodies showed that the expression level of native proteins was similar for all samples, except the 17LER population that showed the expression two-fold more. In addition, the oxidized mTcTXNPx protein demonstrated 5.5-fold greater expression in the 17LER population than 17WTS. Phylogenetic analysis of cTcTXNPx and mTcTXNPx proteins from *T. cruzi* and other trypanosomatids showed that they are closely related to their homolog in *T. brucei*. The *T. cruzi* APX enzyme is considered a good target for drug because it is not found in mammalian hosts. The mRNA level and copy number of the TcAPX gene showed no significant difference between *T. cruzi* populations susceptible and resistant to BZ. The TcAPX gene presents two copies dispersed throughout of the parasite genome and it is located in one chromosomal band in all *T. cruzi* strains analyzed. TcAPX protein showed greater similarity to APX from *Leishmania* than plants. The expression level of TcAPX protein was two-fold more in *T. cruzi* population with *in vivo*-selected resistance to BZ (BZR), than its susceptible counterpart BZS. Trypanothione reductase is the key enzyme of the parasite to maintain a reduced intracellular environment. The mRNA level and copy number of the TR gene showed no significant difference in the samples analyzed. This gene presents a single copy in the parasite genome and it is more related to TR from *T. brucei* than other trypanosomatids. Based on our results, we suggest that the *T. cruzi* population with *in vitro* resistance to BZ exhibits an increase in TcTXNPx protein levels together with other enzymes associated with peroxide metabolism, such as the previously described TcFESOD (Nogueira et al., 2006), protecting these resistant parasites against oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas, que é causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi*, constitui um problema de saúde pública da América Latina. Estima-se que cerca de 8 a 11 milhões de pessoas estão infectadas com o *T. cruzi* e mais de 100 milhões vivem em regiões endêmicas, sendo que 3 a 5 milhões destas pessoas vivem no Brasil (CDC 2007; Massad, 2007). O impacto da doença de Chagas não está limitado apenas às áreas rurais da América Latina em que ocorre a transmissão pelo inseto vetor. Movimentos da população em grande escala de regiões rurais para áreas urbanas e outras regiões do mundo está expandindo a distribuição geográfica e alterando a epidemiologia da doença de Chagas (CDC 2007).

Descoberta há cem anos e descrita pela primeira vez em 1909, a doença de Chagas envolve o parasito *T. cruzi*, animais domésticos como reservatórios e hospedeiros humanos em áreas rurais e peri-urbanas do México, América Central e do Sul. O *T. cruzi*, normalmente, é transmitido pelo inseto triatomíneo da família Reduviidae, podendo também ocorrer transmissão congênita (Bittencourt, 1963; Gurtler *et al.*, 2003; Dorn *et al.*, 2007), através de transfusão sanguínea (Young *et al.*, 2007) ou transplante de órgãos (CDC, 2006) e pela ingestão de alimentos ou fluidos contaminados (Benchimol Barbosa, 2006).

O *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Membros desta família são amplamente distribuídos em diferentes áreas geográficas e causam doenças ao homem como a doença de Chagas, a doença do sono e as Leishmanioses (Vickerman, 1994).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo, apresentando três formas evolutivas distintas, entre o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado (Figura 1). Na porção final do trato digestivo do inseto vetor, as formas epimastigotas flageladas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. Após um período aproximado de quatro dias, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberados no meio extracelular. Os tripomastigotas livres podem infectar as células vizinhas ou caírem na

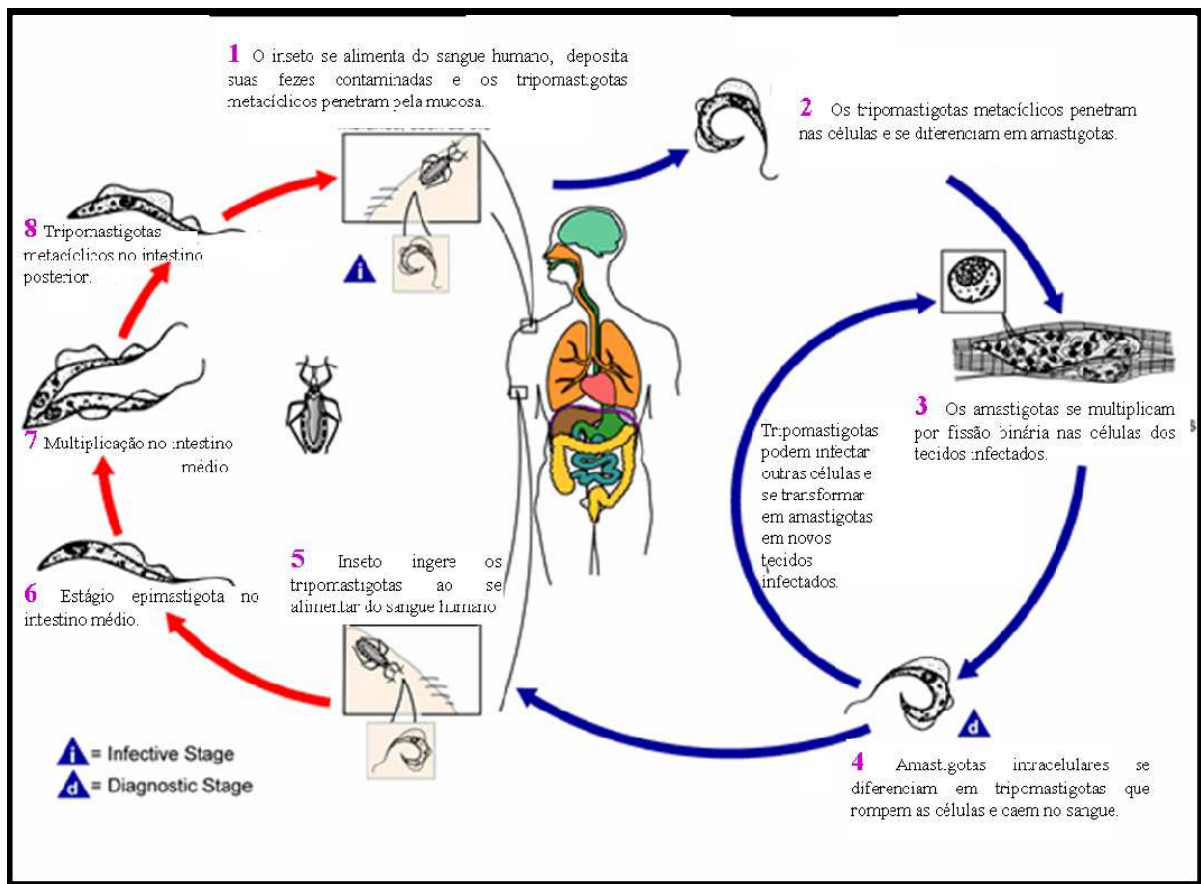


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: CDC, 2000.

circulação sanguínea, onde serão ingeridos pelo inseto vetor durante a alimentação, ou ainda infectarem células de outros tecidos do hospedeiro vertebrado (Tanowitz et al., 1992).

As células infectadas com os amastigotas além de liberarem os tripomastigotas para infectar outras células, liberam produtos que ativam enzimas, polipeptídeos, prostaglandinas, citocinas, enfim, diversos mediadores potenciais da inflamação, que também podem funcionar como antígenos ou gerar novos antígenos, assim provocando variadas e complexas respostas do sistema imune do hospedeiro. O indivíduo, uma vez infectado, permanece como tal por toda a vida, embora dados clínicos, sorológicos e parasitológicos sugestivos de auto-cura, em humanos, já tenham sido apresentados (Zeledón et al., 1988; Brener et al., 2000).

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, com um alto parasitismo sanguíneo e tecidual nos primeiros meses de infecção (dois a quatro). O período de incubação do parasita varia entre 4 a 10 dias, sendo que na maioria das vezes o período inicial da infecção não é identificado. Nesta fase os pacientes podem apresentar uma sintomatologia que varia de assintomática até, em raros casos em crianças, uma miocardite grave que pode levar à morte. Quando sintomática, a fase aguda é caracterizada por febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A porta de entrada dos tripanosomas pode ser a conjuntiva ocular, ocorrendo um edema bupalpebral, unilateral, denominado "sinal de Romana" ou em outros locais da superfície corporal, o "chagoma de inoculação". Com frequência, a fase aguda passa despercebida, pois seus sintomas podem confundir-se com os de diversas outras infecções (Rassi *et al.*, 2000). Entretanto, em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeprimidos, quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca podem estar associados e ocorrer óbito. A gravidade da infecção depende também de outros fatores, entre os quais a virulência do parasita, o tamanho do inóculo e a suscetibilidade do paciente afetado (Rassi *et al.*, 2000).

A fase subsequente, conhecida como de latência ou indeterminada, não apresenta sintomatologia importante do ponto de vista clínico e pode durar vários anos. Um paciente nessa fase pode desconhecer sua condição de portador assintomático da doença de Chagas e transmitir involuntariamente a infecção por mecanismos diversos. É aceita a idéia de que a maior parte dos chagásicos persiste nessa fase pelo resto de suas vidas. Dentre os pacientes infectados, uma proporção pequena de indivíduos evolui para a fase crônica da doença (20-30%), durante a qual são identificados sintomas de comprometimento cardíaco (miocardite grave) (forma cardíaca), com aumento do volume do coração (cardiomegalia) ou digestivo (forma digestiva), aumento do diâmetro de regiões do trato digestivo, os "megas": megaesôfago, megacolo, etc (Brener, 1987). Há, nesta fase, gradativa redução da qualidade de

vida e da capacidade de trabalho dos doentes, que passam a necessitar de atenção médica constante.

1.2 Características genômicas do *T. cruzi*

O genoma diplóide da cepa CL Brener do *T. cruzi* apresenta um tamanho estimado entre 106.4 e 110.7 Megabases (Mb) (El-Sayed et al., 2005a). Este tamanho é maior do que o previamente estimado (87 Mb), baseado em análises densitométricas do DNA cromossômico separado por PFGE (Cano et al., 1995 e El-Sayed et al., 2005a). O tamanho do genoma do *T. cruzi* é relativamente maior comparado ao tamanho dos genomas de outros protozoários parasitos, como, por exemplo, *Leishmania major* (genoma haplóide tem 33 Mb) e *T. brucei* (genoma haplóide possui 26 Mb). No genoma haplóide, o *T. cruzi* possui aproximadamente 12,000 genes e cerca de 28 cromossomos, que apresentam significativa variação no tamanho de acordo com a cepa. Além disso, os cromossomos homólogos podem se diferenciar consideravelmente no tamanho. O número preciso destes é difícil determinar devido à heterogeneidade no tamanho e recombinação dos cromossomos (El-Sayed et al., 2005a; El-Sayed et al., 2005b).

A organização dos genes dos tripanosomatídeos difere daquela conhecida em outros eucariotos. Sequências repetitivas representam cerca de 50% do genoma nuclear do *T. cruzi* e podem estar agrupadas ou dispersas no genoma, de acordo com o mecanismo responsável pela sua amplificação e dispersão no genoma (Castro et al., 1981; El-Sayed et al., 2005a). Muitas sequências repetitivas e a maioria dos genes do *T. cruzi* que codificam proteínas estão presentes em múltiplas cópias na célula. Genes que codificam tubulinas, calmodulinas, ubiquitinas, antígenos de superfície de membrana e enzimas da via glicolítica estão organizadas em arranjos em “tandem” no genoma deste parasito (aproximadamente 5000 cópias de genes estão em tandem) (Ullu & Nilsen, 1995; El-Sayed et al., 2005a).

A tendência do *T. cruzi* em duplicar os seus genes e agrupá-los em “tandem” pode estar relacionada com vários fatores e necessidades do parasita. O genoma do parasita parece ser bastante flexível, ocorrendo constantes modificações devido à amplificação e translocação das sequências gênicas. A presença de múltiplas cópias gênicas pode ser uma maneira encontrada pelo parasita de compensar eventuais perdas de genes essenciais durante essas constantes mudanças do genoma. Essa organização em “tandem” também pode estar relacionada com a transcrição policistrônica existente nos tripanosomas, o que facilitaria a síntese e manutenção dos níveis de mRNAs na célula (Silveira, 2000; Liang et al., 2003).

Os tripanosomatídeos apresentam mecanismos de controle da expressão gênica diferente dos outros eucariotos como transcrição policistrônica, processamento especial de

pré-mRNA (*trans-splicing*), edição do mRNA mitocondrial e transcrição de genes que codificam proteínas através da RNA polimerase I (Donelson et al., 1999; Campos et al., 2008). A transcrição policistrônica ocorre quando os cromossomos são transcritos em longos mRNAs, que devem ser processados em mRNAs monocistrônicos (individuais) antes de serem traduzidos. A maturação dos mRNAs individuais, a partir dos policistrônicos, envolve dois eventos acoplados de processamento de mRNA co-transcricional. O processo de *trans-splicing* consiste em adicionar na extremidade 5' de cada RNA que codifica proteína, uma sequência de 39 a 41 nucleotídeos chamada "splice leader" (SL). Adicionalmente, na porção 3' do mRNA ocorre a poliadenilação, que promove a adição da cauda poli(A). Ambos os eventos são dependentes dos motivos ricos em polipirimidina (poli(Y)) localizados nas regiões intergênicas (Haile e Papadopoulou, 2007; Campos et al., 2008).

A adição do SL pode ocorrer como uma forma de individualizar os mRNAs, juntamente com a poliadenilação; ou promover a adição de uma capa (cap) para completar o processo de maturação dos mRNAs (Liang et al., 2003). Existem evidências de que a SL confere estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação, auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomas. Transcritos desprovidos da SL perdem a sua estabilidade e não são traduzidos (Ullu et al., 1996). Além deste processamento diferencial do mRNA, alguns tripanosomatídeos não possuem introns nos genes (Liang et al., 2003).

Os mRNAs dos tripanosomatídeos apresentam na sua extremidade 3' uma cauda de resíduos de adenina (cauda poli A). Porém, ao contrário dos eucariontes superiores, os mRNAs dos tripanosomatídeos não apresentam uma sequência consenso para adição de resíduos de adenina (Vanhame & Pays, 1995; Liang et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, os tripanosomatídeos apresentam uma transcrição policistrônica e os promotores da RNA polimerase II são ausentes em todos os genes que codificam proteínas. Baseado nestes fatos, estes organismos promovem a regulação da expressão gênica pelo controle a nível pós-transcricional. Essa regulação ocorre no nível do processamento de transcritos primários (*trans-splicing* e poliadenilação), da estabilidade do mRNA ou da estabilidade dos produtos da tradução (Vanhame & Pays, 1995; Teixeira, 1998; Ávila et al., 2001; Bringaud et al., 2007). Sabe-se que os mRNAs do *T. cruzi* podem ser estocados no citoplasma numa forma de reprimir a transcrição (Goldenberg et al., 1985), sugerindo que a mobilização do mRNA pelos polissomas pode ser um mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão de alguns genes em tripanosomatídeos (Ávila et al., 2001).

Os genes dos eucariotos apresentam segmentos nas porções 5' e 3' que são transcritos em RNA mas não são traduzidos, chamadas regiões não-traduzidas ou 5' e 3' UTR. O

tamanho, em média, das regiões 5' e 3' UTR em *T. cruzi* é 35 e 264 nucleotídeos, respectivamente (Campos *et al.*, 2008). Ambos os segmentos não-traduzidos influenciam a expressão e função dos genes, no entanto a região 3' UTR possui um papel maior nesta regulação pela presença de elementos cis nos genes do *T. cruzi* (D'Orso *et al.* 2003). Este fato pode ser resultado de diferenças estruturais, na qual a 3' UTR, em média, é 7-8 vezes maior que a 5' UTR aumentando as possibilidades de influenciar o processamento de mRNA (mais elementos na sequência, sítios de ligação de proteína e estruturas secundárias) (Brandão, 2006; Campos *et al.*, 2008).

Experimentos com parasitas transfectados com o gene amastina mostraram a presença na região 3' UTR de sequências específicas capazes de regular a expressão gênica de maneira estágio-específica (Teixeira *et al.*, 1995; Nozaki & Cross, 1995; Silveira, 2000). Além disso, Zafra e colaboradores (2007) sugerem que polimorfismos na região 3' UTR do gene IL12B pode influenciar a susceptibilidade de pacientes para o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica.

Análises das sequências do *T. cruzi* mostraram que as regiões UTRs em alguns genes podem funcionar como marcadores funcionais e moleculares de populações do *T. cruzi*. Pequenas variações em cada UTR (inserções ou deleções) podem ser pontos de partida para estabelecer relações entre expressão de genes e estrutura de populações. Dessa forma, pequenas mudanças nas UTRs podem afetar a expressão de genes (Teixeira *et al.*, 1999). Isto pode ser uma estratégia evolucionária do parasito para adquirir uma vantagem funcional sem grandes mutações em seus genes. O resultado destas alterações em protozoários parasitos é representado por uma maior habilidade de sobrevivência em diferentes ambientes (Brandão, 2006).

1.3 Diversidade genética do *T. cruzi*

O *T. cruzi* é uma população heterogênea, composta por um grupo de cepas que apresentam origem e características diferentes. Esta surpreendente variação intra-específica está sendo documentada por caracterização biológica e molecular, que incluem morfologia de formas sanguíneas, curva de parasitemia, virulência, patogenicidade, sensibilidade a drogas, perfil antigênico, taxa de crescimento, metaciclogênese e tropismo por tecidos (Murta & Romanha, 1999; Macedo *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006).

O primeiro método experimental que demonstrou a extensão da diversidade genética do *T. cruzi* foi à análise eletroforética de variantes de enzimas celulares (isoenzimas). Baseado na variabilidade das isoenzimas, Miles e colaboradores (1977, 1978, 1980) propuseram a existência de três clusters isoenzimáticos do *T. cruzi*, chamados zimodemas Z1, Z2 e Z3.

Estudos epidemiológicos demonstraram que os zimodemas 1 e 3 estavam associados com o ciclo silvestre, enquanto que o zimodema 2 estava associado com o ciclo doméstico de transmissão (Miles *et al.*, 1978, 1980). Posteriormente outras metodologias foram utilizadas para a caracterização do *T. cruzi* e demonstraram a grande diversidade genética desse parasita.

Estudos utilizando marcadores nucleares, como genes que codificam o RNA ribossomal 24S e o miniexon, permitiram a divisão das cepas de *T. cruzi* em dois grupos distintos chamados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996, Buscaglia & Di Noia, 2003). Em abril de 1999, durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, no Rio de Janeiro, foi adotada a subdivisão da espécie de *T. cruzi* em duas linhagens principais (Anonymous, 1999). Foi oficializada a nomenclatura *T. cruzi* I referente ao parasita do ciclo silvestre na América Central e *T. cruzi* II associado a cepas do ciclo doméstico da doença. Os dois grupos de *T. cruzi* (I e II) definidos por marcadores genotípicos apresentam grande correlação com os zimodemas Z1 e Z2, anteriormente descritos na literatura baseado no perfil de isoenzimas, critério fenotípico (Miles *et al.*, 1978). O zimodema Z3 pode constituir um “cluster” independente com uma diversidade genética baixa intra-grupo, de acordo com análises de variação do tamanho dos cromossomos (Pedroso *et al.*, 2007).

O grupo *T. cruzi* I é relativamente homogêneo e raramente encontrado em pacientes humanos vivendo em áreas endêmicas. Além disso, este não está associado com os sintomas patológicos da doença de Chagas. Por outro lado, o grupo *T. cruzi* II foi dividido em cinco sub-grupos (IIa – IIe) e apresenta associação preferencial por mamíferos placentários, em particular, infecções humanas (Brisse *et al.*, 2000; Buscaglia e Di Noia, 2003; Vargas *et al.*, 2004). Além destas divisões de grupos de *T. cruzi*, alguns autores classificaram a cepa CL Brener como um híbrido, derivado de mudanças genéticas entre cepas do sub-grupo *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Machado e Ayala, 2001; Sturm *et al.*, 2003, Vargas *et al.*, 2004). Fampa e colaboradores (2008) mostraram que proteases de *T. cruzi*, incluindo a cruzipaina, podem contribuir na diversificação da infecção no hospedeiro entre os genótipos *T. cruzi* I e II.

1.4 Quimioterapia da Doença de Chagas

A quimioterapia da doença de Chagas apresenta alguns problemas e tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de drogas eficientes contra o *T. cruzi*, principalmente para ser utilizado na fase crônica da doença.

As drogas usadas no tratamento da doença de Chagas são dois nitroaromáticos heterocíclicos, Nifurtimox (NFX – comercializado pela Bayer, mas atualmente descontinuado no Brasil) e Benzonidazol (BZ), (comercializado pelo Laboratório do Estado de Pernambuco,

Brasil) introduzidos ao longo de três décadas atrás (Boiani et al., 2008; www.lafepe.pe.gov.br). No entanto, estas drogas possuem baixa eficácia de cura principalmente na fase crônica da doença (apenas 8%). O NFX e BZ são efetivos na cura da infecção na fase aguda, levando 76% dos pacientes tratados à cura parasitológica (Cançado, 2002). Em crianças de baixa idade com infecção crônica recente foi demonstrado cerca de 55,8% de cura após o tratamento com benzonidazol (Andrade *et al.*, 1996). Além da baixa eficácia, ambos compostos apresentam diversos efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, vômito, emagrecimento, leucopenia, neuropatia e dermatopatia alérgica (Rassi & Luquetti, 1992).

O NFX é um derivado 5-nitrofurano e o BZ, um derivado 2-nitroimidazólico, ambos fazem parte de uma mesma família, a dos nitroheterocíclicos, mas possuem diferentes grupos químicos e apresentam diferentes mecanismos de ação contra o *T. cruzi*. O grupo nitro de ambas as drogas é reduzido por nitroredutases, com a formação de vários radicais livres e metabólitos eletrofílicos (Maya et al., 2006; Wilkinson et al., 2008). O radical nitroânion produzido sofre ciclagem redox com o oxigênio molecular, sendo parcialmente reduzido e podendo regenerar a droga (Mason & Holtzman, 1975; Maya et al., 2007).

O radical gerado pela redução do NFX pode reagir com o oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido (O_2^-) e este produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer a interação do H_2O_2 com o O_2^- produzindo o radical hidroxila (OH \cdot). Este radical hidroxila é um dos radicais de baixa massa molecular mais tóxico produzido por radiações ionizantes. Todos esses passos podem causar danos ao DNA (Olive, 1978) e lipídeos e formar peróxido orgânico (Tappel, 1973; Docampo et al., 1981).

O mecanismo de ação do benzonidazol ainda não está claro. Sabe-se que o BZ inibe o crescimento do *T. cruzi* sem estimular a produção de O_2^- e H_2O_2 . Provavelmente metabólitos reduzidos do BZ estão envolvidos no mecanismo, através de ligações covalentes com componentes do parasita ou ligando ao DNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (Diaz de Toranzo et al., 1988; Aldunate & Morello, 1993; Maya et al., 1997 e 2003). O BZ e seus metabólitos podem também afetar o metabolismo de tripanotona em *T. cruzi* (Maya et al., 1997).

Os pacientes chagásicos na fase crônica tratados com os compostos nitroheterocíclicos apresentam falha na cura ou melhora da doença (Urbina, 1999a; Braga et al., 2000). Um grande problema para a obtenção da cura está relacionado com a grande variabilidade genética das populações de parasitas (Brener & Chiari, 1967) e a existência de cepas naturalmente resistentes a drogas (Murta *et al.*, 1998), além da farmacocinética das drogas.

Maya e colaboradores (2003) mostraram o efeito e o modo de ação dos nitroimidazoles (BZ e megazol) e derivados nitrofuranos (NFX) em *T. cruzi*. Em testes de atividade, o megazol foi três vezes mais potente do que o NFX, dependendo da cepa do parasita usada. O modo de ação do megazol consiste na inibição da respiração mitocondrial, não aumentando o oxigênio livre e na depleção da enzima tripanotiona, essencial para os processos de detoxificação do parasita. O megazol é um composto extremamente ativo contra o *T. cruzi*, mesmo em cepas do parasita que são altamente resistentes ao BZ e NFX (Filardi & Brener, 1982). Apesar da eficácia terapêutica, este composto apresenta graves efeitos colaterais, como surgimento de linfomas e outros tipos de tumores (Filardi & Brener, 1982). Outro composto testado no *T. cruzi* foi a amiodarona, que apresentou uma atividade efetiva contra os estágios proliferativos do parasita. Esta droga age interferindo na biossíntese de esterol na membrana dos parasitas (Benaim et al., 2006).

Vários compostos já foram testados contra o *T. cruzi*, mas a maioria deles foram ineficazes e/ou tóxicos para os camundongos (Revisado por Brener, 1984; De Castro, 1993). Estudos de bioquímica básica em *T. cruzi* têm identificado novos alvos para a quimioterapia que incluem enzimas como a Tripanotiona Redutase (TR), a Superóxido Dismutase (SOD) (Nogueira et al., 2006), a Cisteína Protease de 51 a 57 kDa ou GP51/57 (Cruzipaína), a Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferase (HGPRT), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), DNA Topoisomerases, a Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintetase (DHFR-TS), a Farnesilpirofosfato Sintase (Docampo, 2001; Rodriguez, 2001; Coura & de Castro, 2002) e Pteridina redutase (Senkovich et al., 2003). Além do estudo de enzimas alvo para a quimioterapia da doença de Chagas, pesquisas têm sido realizadas com inibidores da biossíntese de esterol, bloqueadores do canal de cálcio, combinação de drogas usadas no tratamento da doença de Chagas experimental, uso de citocinas recombinantes interleucina 12 (IL-12) e interferon gamma (IFN- γ) para ativar as funções efetoras do sistema imune. Outras vias metabólicas do parasito também têm sido exploradas como alvos terapêuticos, como a biossíntese de purina, a cadeia respiratória, análogos de fosfolipídeos e miltefosina (Maya et al., 2007).

Entre outras estratégias para a descoberta de drogas, a procura na biodiversidade local por produtos naturais bioativos usando bioensaios apropriados é uma interessante alternativa para pesquisadores em áreas afetadas, especialmente em países com uma rica biodiversidade. Dados da literatura descrevem que produtos naturais produzidos por plantas, fungos ou outros organismos são a fonte direta para medicamentos disponíveis (Newman & Cragg, 2007; Cota et al., 2008a; b). Extratos de plantas e fungos foram testados em ensaios de inibição da atividade da tripanotiona redutase (TR). Cota e colaboradores (2008a) apresentaram dois

metabólitos, panepoxidona e hipnofilina, isolados de um fungo tropical basidiomiceto *Lentinus strigosus* com significativa atividade inibitória da TR. A hipnofilina mostrou uma significativa atividade anti-*T. cruzi* associada com uma menor atividade imunomodulatória não tóxica em leucócitos humanos, sugerindo um bom candidato para o desenvolvimento de novas drogas (Cota et al., 2008a). Estes autores (Cota et al., 2008b) também isolaram de uma espécie de *Alternaria* um derivado de bifenil, capaz de inibir a enzima TR em concentrações micromolares.

1.5 Resistência Natural e Seleção de resistência do *T. cruzi* a drogas

A maior limitação do tratamento da doença de Chagas, além da baixa eficácia e toxicidade dos compostos, é a existência de cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes a drogas e a resistência cruzada entre o BZ e o NFX. É interessante observar que a eficácia do tratamento específico da doença de Chagas difere entre as cepas, nos diversos países e em diferentes áreas geográficas dentro de um mesmo país.

Desde 1949, diferenças na susceptibilidade a drogas por cepas de *T. cruzi* tem sido relatada (Hauschka, 1949; Bock et al., 1969; Haberkorn & Gonnert, 1972; Brener et al., 1976; Andrade et al., 1985 e Neal & Van Bueren, 1988). Em um estudo da diversidade de resposta aos nitrocompostos a infecções experimentais em camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*, foi observado que a resistência ao NFX e ao BZ pode ocorrer em cepas que nunca tiveram contato prévio com os dois compostos, isto é, cepas que apresentam resistência natural (Brener et al., 1976; Andrade et al., 1985 e Filardi & Brener, 1987). Algumas destas cepas foram isoladas de vetores silvestres do estado de Santa Catarina, onde não existe doença de Chagas humana autóctone (Filardi & Brener, 1987). Este fato sugere que a resistência natural do *T. cruzi* a derivados nitroheterocíclicos pode ser um fator importante para explicar as baixas percentagens de cura detectadas em pacientes chagásicos tratados, somado às variações individuais da farmacocinética da droga. Vários autores demonstraram que diferenças geográficas podem interferir na eficácia terapêutica da doença de Chagas (Rassi & Luquetti, 1992). Além disto, um fato importante descrito pelos autores Pontes & Andrade (1984), Filardi & Brener (1987) e Neal & Van Bueren (1988), foi o comportamento de resistência cruzada entre NFX e BZ. Ambos os compostos apesar de pertencerem a uma mesma família, possuem diferentes grupos químicos e diferentes mecanismos de ação contra o parasita.

Em um estudo realizado em nosso laboratório, 45 cepas do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao BZ e NFX foram analisadas em relação a seis diferentes marcadores moleculares. O perfil heterozigoto (ZB) agrupou exclusivamente cepas sensíveis e

ocorreu predominantemente em áreas geográficas onde o tratamento da doença de Chagas tem sido relatado como mais eficaz, sugerindo que este zimodema esteja associado com o fenótipo de sensibilidade a drogas (Murta et al., 1998). No entanto, os zimodemas 1 e 2 foram encontrados em populações de *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes a drogas.

Toledo e colaboradores (2003) demonstraram a relação da diversidade filogenética entre as cepas do *T. cruzi* e a sua susceptibilidade *in vivo* a agentes quimioterapêuticos. Os dados indicaram que a falha no tratamento clínico, mesmo durante a fase aguda da infecção, está relacionada à cepa do parasita e a sua resistência a drogas específicas. No entanto, durante a fase crônica da doença, não foi possível correlacionar a cepa do parasita e a resistência a droga devido à baixa taxa de cura obtida.

A resistência à droga é um problema importante em protozoários parasitas. Por exemplo, em *Leishmania* spp., que é da mesma família Kinetoplastidae do *T. cruzi*, foi observada a resistência a drogas de uso clínico, antimônios pentavalente, em 5 a 70% dos indivíduos tratados em áreas endêmicas (Ullman, 1995). *Trypanosoma brucei*, o agente da doença do sono na África, tem também apresentado aumento na resistência às drogas como a tubercidina, melarsoprol, diamidina, entre outras (Bacchi, 1993; de Koning, 2008). A resistência a drogas também foi observada em *Plasmodium falciparum* (Schapira et al., 1993; Ogbonna & Uneke, 2008), em *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* (Johnson, 1993; Upcroft & Upcroft, 1993; Buckner et al., 1998; Nanda et al., 2006).

Veloso e colaboradores (2001), analisando a eficácia de cura com BZ em camundongos infectados com *T. cruzi*, observaram uma mudança na susceptibilidade ao BZ em alguns isolados da cepa Berenice, considerada 100% sensível. Este fato pode ser devido à seleção de alguns mutantes resistentes ao BZ que surgiram nesta população. Considerando que as características genéticas pode ser um dos fatores que modulam o processo de sensibilidade ou resistência, a variação na susceptibilidade a droga pode refletir a plasticidade genética observada no *T. cruzi* (Veloso et al., 2001; 2005). Em um estudo realizado por McDaniel e Dvorak (1993) foi demonstrado que sob condições de estresse, ou pressões seletivas, os cromossomas e minicírculos mostraram evidências de plasticidade genética em *T. cruzi* e *Leishmania*.

A indução de resistência de cepas do *T. cruzi* ao BZ através da infecção por longo tempo em hospedeiro vertebrado, na ausência do estresse da droga foi realizado por Caldas e colaboradores (2008). Os autores utilizaram diferentes isolados da cepa sensível Berenice. Estes parasitos foram isolados de diferentes cães previamente infectados com a cepa Berenice do *T. cruzi* (2-10 anos atrás) e submetidos a sucessivas passagens em camundongos. Ao determinar a susceptibilidade das cepas mantidas no camundongo, os autores observaram

diferentes níveis de resistência ao BZ, no qual foram classificadas em parcialmente resistentes ou resistentes. A resistência induzida por longo tempo de infecção em cães pode estar relacionada à adaptabilidade genética do parasita no hospedeiro mamífero. Este alto nível de adaptabilidade permite o parasita selecionar estratégias para evadir os efeitos letais do sistema imune do hospedeiro, podendo ser importante também no desenvolvimento dos mecanismos de resistência a drogas (Caldas et al., 2008).

Com a finalidade de estudar o fenótipo de resistência a drogas em *T. cruzi*, vários autores obtiveram cepas de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ ou NFX. Abdo (1991), conseguiu selecionar *in vitro* uma população de *T. cruzi* 8 vezes mais resistente ao BZ e outra 3 vezes mais resistente ao NFX, do que a cepa selvagem. Nozaki e colaboradores (1996) também conseguiram induzir *in vitro* uma cepa de *T. cruzi* 4 vezes mais resistente ao NFX. Em 1995, Nirdé e colaboradores conseguiram obter *in vitro* uma população (17LER) de *T. cruzi* 23 vezes mais resistente ao BZ do que a população sensível (17WTS). Os autores observaram que o fenótipo de resistência foi estável mesmo após diferenciação de epimastigotas para amastigotas.

Para investigar o mecanismo de resistência ao NFX, Wilkinson e colaboradores (2008) induziram a resistência *in vitro* do *T. cruzi*. Os parasitas foram mantidos na presença da droga (10 µM) por 8 meses e todos os clones foram 4 vezes mais resistentes ao NFX do que os controles. Os autores realizaram a exposição destes parasitas a outras drogas do grupo dos nitroheterocíclicos e observaram uma resistência cruzada ao BZ, megalzol e nitrofurazona.

Em nosso laboratório, com o objetivo de estudar o mecanismo de resistência do *T. cruzi* a drogas, uma população (BZR) e clones resistentes ao BZ foram selecionados *in vivo* a partir da cepa Y do *T. cruzi*. Foi utilizada a cepa Y do *T. cruzi*, por ser uma cepa medianamente resistente *in vivo* ao BZ e NFX e apresentar um alto pico de parasitemia, no 7^o dia após a infecção. O protocolo foi baseado em 25 tratamentos sucessivos dos camundongos, com uma dose única e alta de BZ. Na ausência de pressão do BZ, o fenótipo da população resistente BZR foi estável após 6 meses de manutenção em meio de cultura LIT, após 20 passagens em camundongos e uma passagem pelo vetor invertebrado, *Triatoma infestans* (Murta & Romanha, 1998).

Dos Santos e colaboradores (2008) utilizaram isolados da cepa sensível (Berenice) do *T. cruzi* para induzir a resistência *in vivo* ao BZ, com a pressão da droga. O fenótipo de resistência permaneceu estável após 12 passagens em camundongos e em cultivo acelular. No entanto, a manutenção do parasita resistente em cultura acelular induziu a redução nos níveis da resistência ao BZ, enquanto que nenhuma alteração foi detectada em parasitas mantidos pelo mesmo tempo em camundongos.

1.6 Mecanismos de resistência a drogas

Os mecanismos de resistência a droga diferem entre organismos procariotos e eucariotos, mas alguns princípios gerais podem ser identificados. O primeiro efeito para morte da célula é a interação da droga com um ou mais alvos. Assim, a alteração nos níveis intracelulares da droga ou a habilidade da droga afetar o alvo é normalmente observada em vários organismos. Níveis da droga no sítio alvo podem ser diminuídos por uma variedade de mecanismos, incluindo a diminuição da entrada, aumento da sua eliminação e inativação por metabolismo ou sequestro. Além disto, alterações nos níveis do alvo primário podem ocorrer devido à diminuição da afinidade do alvo pela droga ou perda completa do alvo (Croft et al., 2006).

Estes mecanismos também já foram descritos em protozoários parasitas, mas eles ainda não estão bem esclarecidos (Ullman, 1995; Engel et al., 2000). No caso de muitas drogas antiparasíticas ocorre um mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio que podem causar danos nos lipídeos de membrana, proteínas ou DNA (Fries & Fairlamb, 2003). Provavelmente, múltiplos mecanismos estão envolvidos na resistência a drogas. No entanto, vários autores desenvolvem estudos e investigam os mecanismos de resistência a determinadas drogas em vários parasitas resistentes.

Nozaki e colaboradores (1996) induziram *in vitro* a resistência ao NFX em epimastigotas e tripomastigotas de várias cepas do *T. cruzi*. Os autores observaram que a resistência ao NFX foi acompanhada por uma variedade de mudanças no DNA do parasita, incluindo o rearranjo cromossômico e a aneuploidia. Os autores mostraram a ocorrência de deleções ou translocações nas bandas cromossômicas entre as cepas sensíveis e resistentes a droga.

Buckner e colaboradores (1998) observaram que cepas do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao fluconazol apresentaram resistência cruzada a outros azoles antifúngicos, como cetoconazol, miconazol e itraconazol. Isto sugere que o mecanismo de resistência não é único para a estrutura molecular do fluconazol, mas que é um mecanismo seletivo de resistência aos azoles.

Engel e colaboradores (2000) descreveram o mecanismo de resistência ao inibidor da enzima cisteína protease, cruzipaina, em epimastigotas de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* a esse inibidor. Os autores observaram um aumento da regulação da via secretora nestes parasitas resistentes. Ocorreu um aumento das vesículas entre o complexo de Golgi e a bolsa flagelar e um aumento das cisternas do Golgi. Os parasitas resistentes ao inibidor da cruzipaina foram sensíveis ao NFX e ao BZ, sugerindo que estas drogas são mediadas por mecanismos diferentes.

Uma grande limitação no sucesso do tratamento quimioterápico de muitos tipos de tumores é a emergência e o crescimento de subpopulações de células resistentes a drogas, que apresentam pouca ou nenhuma similaridade estrutural e funcional (Gros & Buschman, 1993). A resistência a múltiplas drogas (MDR) em linhagens de células tumorais e em protozoários como *Leishmania*, *Plasmodium* e *Entamoeba*, está associada com a superexpressão de uma fosfoglicoproteína de membrana (PGP) de 170-180 kDa. A PGP funciona como uma bomba de efluxo de drogas, dependente de ATP, que reduz o acúmulo de compostos citotóxicos dentro da célula (Ullman, 1995). Entretanto, um estudo realizado em nosso laboratório (Murta et al., 2001), mostrou que a resistência do *T. cruzi* a drogas não está associada com a amplificação ou superexpressão da PGP.

Recentemente, Wilkinson e colaboradores (2008) descobriram que a enzima nitroredutase (NTRI) é responsável pela ativação dos compostos NFX e BZ no *T. cruzi*. Eles sugerem que o mecanismo de resistência a drogas desenvolvido neste parasita está associado à redução nos níveis de expressão da NTRI. Enquanto que a superexpressão da NTRI pode resultar na hipersensibilidade e morte do parasita.

1.7 O metabolismo oxidativo e a defesa antioxidante do *T. cruzi*

A maioria dos protozoários parasitas são organismos aeróbicos e vivem em ambientes oxigenados. O metabolismo aeróbico utiliza oxigênio molecular como acceptor de elétrons, que é reduzido de quatro elétrons para duas moléculas de água. Entretanto, o oxigênio molecular pode ser parcialmente reduzido por espécies estáveis, aceitando um, dois ou três elétrons, com a formação do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, respectivamente (Chance et al., 1979; Turrens, 2003). Algumas dessas espécies (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) também podem ser produzidas por processos específicos incluindo atividade antimicrobiana e sinalização intracelular (Droge, 2002; Turrens, 2003).

O ânion superóxido não é muito reativo por si, mas ele é um precursor de dois fortes oxidantes. O superóxido pode reagir com o óxido nítrico para produzir peroxinitrito, um agente gerado por macrófagos como sendo a primeira linha de defesa durante a fagocitose. Adicionalmente, o ânion superóxido é um precursor do peróxido de hidrogênio e na presença de metais, as duas espécies reativas de oxigênio são responsáveis pela formação de radicais hidroxila (Turrens, 2004).

Os radicais livres (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o ânion hidroxila) são produzidos como intermediários de muitos processos fisiológicos e principalmente quando os organismos são expostos a condições ambientais como radiação, compostos ativos e agentes

químicos. No caso de protozoários parasitas estes radicais podem ser produzidos pelo próprio processo de respiração celular, ou por agentes externos como o sistema imune do hospedeiro e o metabolismo de drogas (Turrens, 2004; Irigoín et al., 2008).

Em geral, enzimas antioxidantes são essenciais para a sobrevivência das células, promovendo a proteção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos oxidativos a estruturas celulares. A oxidação de macromoléculas biológicas, se não reparadas, coloca o organismo sob risco e pode resultar no surgimento de várias doenças neurodegenerativas (Olanow, 1997), mutações, carcinogênese, apoptose (Jacobson, 1997), morte celular (Harman, 1982), entre outros (Goulielmos et al., 2003).

Por muitos anos, pesquisadores estudam novos alvos para o desenvolvimento de drogas farmacêuticas. Estes alvos são baseados na identificação de componentes celulares e vias metabólicas e estruturais encontrados no parasito alvo, que não estão presentes no hospedeiro ou que são suficientemente diferentes para atingir apenas os parasitos. No caso dos tripanosomatídeos um dos alvos mais promissores é o sistema de defesa antioxidante mediado por tripanotiona (Fairlamb et al., 1986).

Os membros da ordem Kinetoplastida, incluindo o *T. cruzi*, apresentam um mecanismo de detoxificação diferente daquele encontrado no hospedeiro vertebrado. Estes parasitos não apresentam as enzimas glutatona peroxidase dependente de selênio e catalase, responsáveis pela detoxificação do peróxido de hidrogênio. Para compensar a ausência destas enzimas, os tripanosomatídeos utilizam um sistema antioxidante dependente de “tiol”, que elimina o peróxido de hidrogênio (Turrens, 2004). O metabolismo de peróxido dependente de tripanotiona envolvendo uma única cascata de enzimas foi proposto primeiramente em *Crithidia fasciculata*, um tripanosomatídeo de inseto (Nogoceke et al., 1997). Participam do mecanismo de defesa antioxidante destes tripanosomatídeos as enzimas ferro-superóxido dismutase (FeSOD), triparedoxina peroxidase (TXNPPx), ascorbato peroxidase (APX), tripanotiona redutase (TR) e glutatona peroxidase dependente de cisteína (GPx). Elas estão distribuídas em compartimentos celulares diferentes e são ativas contra vários oxidantes (Turrens, 2004; Irigoín et al., 2008).

A partir da reação desencadeada pela FeSOD, que acarreta a produção de peróxido de hidrogênio, ocorrem duas reações não enzimáticas que são vitais para o processo antioxidante dos tripanosomatídeos. Em *T. cruzi*, a dehidroascorbato é produzida durante a redução do peróxido de hidrogênio catalizado pela enzima ascorbato peroxidase (Docampo et al., 1976; Boveris et al., 1980; Wilkinson et al., 2000a), e a tripanotiona pode regenerar o ácido ascórbico. Adicionalmente, o mais importante sistema de detoxificação de peróxido, comum em todos os tripanosomatídeos, envolve a enzima triparedoxina peroxidase. Esta enzima

utiliza a triparedoxina (uma tiol-dissulfeto oxidoreductase, homóloga a tioredoxina) como doador de elétrons e reduz substratos como o peróxido de hidrogênio em água. A triparedoxina é reduzida pela enzima tripanotiona (dihidrotripanotiona) e é regenerada pela tripanotiona redutase (Turrens, 2004) (Figura 2).

No genoma do *T. cruzi* foram identificadas quatro genes da glutathione peroxidase (GPx), sendo dois de cada, TcGPxI e TcGPxII. TcGPxI foi localizada no citosol e em glicossomos, enquanto a TcGPxII foi encontrada no retículo endoplasmático (Wilkinson et al., 2002b; 2002c). Ambas as peroxidases decompõem peróxido orgânico, especialmente aqueles derivados de fosfolípidos e ácidos graxos, mas elas não são capazes de decompor H₂O₂ (Wilkinson et al., 2002b). Esta especificidade ao substrato sugere que sua função pode ser uma forma de prevenir o dano celular, devido à peroxidação de lípidos (Irigoín et al., 2008).

É interessante ressaltar que a transformação do *T. cruzi* da forma epimastigota para a forma infectiva, foi acompanhada pelo aumento da expressão de algumas enzimas antioxidantes (Irigoín et al., 2008). Atwood e colaboradores (2005) através do proteoma das formas de desenvolvimento do *T. cruzi* mostraram que a transição de epimastigota para tripomastigota metacíclico foi acompanhada do elevado nível de expressão das proteínas triparedoxina peroxidase mitocondrial, ascorbato peroxidase, ferro-superóxido dismutase, triparedoxina (substrato da TXNPx) e tripanotiona sintase (síntese de tripanotiona). Isto pode ser interpretado como uma pré-adaptação do parasita para a infecção do hospedeiro vertebrado a ambientes onde ele pode ser exposto a oxigênio reativo e espécies de nitrogênio, como aqueles gerados por células do sistema imune (Irigoín et al., 2008).

Em nosso laboratório (Nogueira et al., 2006) caracterizamos a isoforma FeSOD-A em populações do *T. cruzi* sensíveis, com resistência induzida *in vitro*, selecionada *in vivo* e naturalmente resistentes ao benzonidazol. Os resultados mostraram a amplificação do gene TcFeSOD-A e um aumento no nível de mRNA, a superexpressão da proteína TcFeSOD-A e um aumento da atividade enzimática da TcFeSOD em uma população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ. A partir destes resultados, neste projeto de tese nos propusemos investigar se também ocorre uma superexpressão das outras enzimas envolvidas na defesa antioxidante das populações do *T. cruzi* resistentes ao BZ.

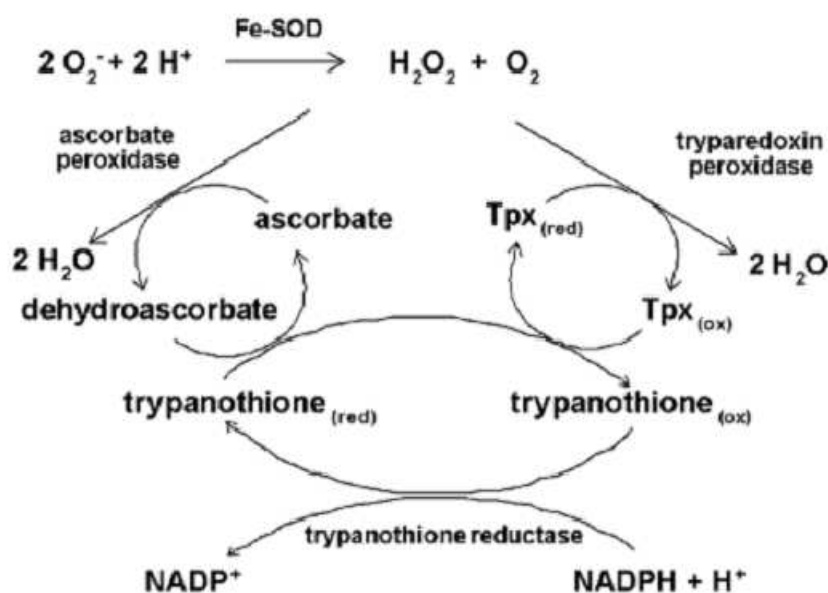


Figura 2: Metabolismo antioxidante dos tripanosomatídeos. Fonte: Turrens, 2004.

1.7.1 Triparedoxina peroxidase (TXNPx)

A enzima triparedoxina peroxidase (TXNPx) pertence a família das proteínas peroxidoredoxinas. Esta família inclui um grande número de moléculas encontradas em organismos diferentes e com funções distintas como detoxificação de células e sinalização para proliferação ou processos de diferenciação celular. As peroxidoredoxinas também estão presentes em parasitos e possuem um papel crucial na defesa contra o estresse oxidativo (Hofmann et al., 2002). Esta família de proteínas reduz o peróxido pela oxidação preferencial de grupos sulfidril dos resíduos conservados de cisteína, de maneira dependente de tioredoxina ou “tiol” (Levick et al., 1998). Além disso, a TXNPx pode decompor peroxinitrito e com menor eficiência peróxido orgânico (Piñeyro et al., 2008; Irigoín et al., 2008).

As peroxidoredoxinas são caracterizadas pela presença de dois domínios conservados contendo cisteína (região I e II), o que pode promover a formação de dímeros, além de uma massa molecular altamente preservada (cerca de 20-30kDa) (Rhee et al., 2001; Wilkinson et al., 2000a; Turrens, 2004). Elas são normalmente proteínas solúveis (Tetaud et al., 2001). Além disso, os dois motivos conservados (VCP) são encontrados no sítio ativo destas proteínas (Tetaud et al., 2001).

Algumas peroxiredoxinas apresentam função relacionada à regulação redox da transcrição de genes em mamíferos (Sen e Packer, 1996; Tetaud e Fairlamb, 1998). Por exemplo, por regular a concentração intracelular de peróxido de hidrogênio estas proteínas podem participar da cascata de sinalização de alguns fatores de crescimento e fator de necrose tumoral- α , regulando a atividade do fator de transcrição NF- κ B (Jin et al., 1997) e inibindo a apoptose (Zhang et al., 1997; Tetaud e Fairlamb, 1998). No entanto, em mamíferos cinco diferentes genes peroxiredoxinas foram identificados, mostrando que estas proteínas podem desempenhar funções múltiplas (Jin et al., 1997; Tetaud e Fairlamb, 1998).

Na maioria dos eucariotos, as peroxiredoxinas fazem parte de uma via de três componentes que inclui a tioredoxina e tioredoxina redutase. No entanto, a peroxiredoxina dos tripanosomatídeos difere daquela encontrada nos mamíferos, pois ela é dependente de tripanotiona. A TXNPx tem sido estudada em vários protozoários parasitos como *C. fasciculata* (Montemartini et al., 1998), *T. cruzi* (Lopez et al., 2000; Wilkinson et al., 2000a), *T. brucei* (Tetaud et al., 2001) e em espécies de *Leishmania* (Flohé et al., 2002; Castro et al., 2002; Lin et al., 2005; Walker et al., 2006). A triparedoxina peroxidase pode estar localizada no citosol (cTXNPx) ou na mitocôndria (mTXNPx) desses tripanosomatídeos. Inicialmente, estas enzimas foram consideradas como “peroxidases pobres” porque sua reatividade contra o H_2O_2 foi substancialmente menor que as peroxidases clássicas como catalase e glutathione peroxidase dependente de selênio (Hofmann et al., 2002). Essa baixa eficácia pode ser compensada pela abundância das peroxiredoxinas nos tripanosomatídeos, na qual elas representam 0.1 a 0.8% das proteínas totais solúveis (Nogoceke et al., 1997).

A existência da proteína cTXNPx no *T. cruzi* foi evidenciada por ensaios de imunohistoquímica. Os autores expressaram a proteína recombinante e esta foi sequenciada para confirmar sua identidade com a proteína cTXNPx. Além disso, eles mostraram uma alta reatividade desta proteína com o anticorpo anti-TXNPx de *C. fasciculata*, que reconheceu um polipeptídeo de 21 kDa. Assim, a defesa antioxidante do *T. cruzi* depende dos mesmos componentes que constituem o sistema de detoxificação de peróxido em *C. fasciculata* (TXNPx, triparedoxina e tripanotiona redutase) (Lopez et al., 2000).

Wilkinson e colaboradores (2000) caracterizaram o gene que codifica a enzima triparedoxina peroxidase citosólica (cTcTXNPx) em *T. cruzi*. A sequência de nucleotídeos correspondente a região codificante (ORF) do cTXNPx apresenta 600 pb e codifica uma proteína de aproximadamente 20 kDa. Trujillo e colaboradores (2004) observaram que a enzima cTXNPx do *T. cruzi* and *T. brucei* possuem a capacidade de decompor peroxinitrito. Dessa forma, a atividade oxidoreductase da cTXNPx pode ser um fator importante para a sobrevivência e proliferação de tripanosomatídeos na presença de macrófagos ativados. Em

2007, Piacenza e colaboradores realizaram a transfecção dos genes cTXNPx e mTXNPx em *T. cruzi* e observaram sua resposta a vários ensaios com peroxinitrito. Os autores mostraram que a superexpressão de cTXNPx e mTXNPx confere altos níveis de proteção a epimastigotas contra diferentes concentrações de peroxinitrito. Este dado sugere que as peroxiredoxinas detoxificam peroxinitrito nas células eficientemente e protege os parasitas dos efeitos deletérios desse oxidante.

Finzi e colaboradores (2004) investigaram o envolvimento da enzima triparedoxina peroxidase do *T. cruzi* frente a uma injúria mediada por oxidantes. Os autores observaram que em baixas concentrações de H₂O₂ ocorre a proliferação das células e o aumento da resistência do parasito a doses sub-letais de H₂O₂ (100 μ M), se previamente tratados com concentrações não tóxicas de H₂O₂ (20 μ M). Os resultados também mostraram que o tratamento das células com diferentes concentrações de H₂O₂ em um tempo máximo de 30 minutos, induz um aumento dos níveis de triparedoxina peroxidase de maneira dose-dependente. Eles realizaram a superexpressão da enzima triparedoxina peroxidase em *T. cruzi*, mostrando um aumento no nível de mRNA (129%), sem o correspondente aumento na expressão da proteína, sugerindo que a regulação da expressão do gene ocorre ao nível pós-transcricional. Os altos níveis de mRNA associados com os níveis da proteína foram observados apenas em incubações com H₂O₂ por um longo período (1-2h), sugerindo que a tradução da proteína triparedoxina peroxidase ocorre de acordo com a necessidade do parasito. Os parasitos que superexpressam a triparedoxina peroxidase foram duas vezes mais resistentes ao estresse oxidativo comparado com os parasitos selvagens (Wilkinson et al., 2000a; Finzi et al., 2004). Wilkinson e colaboradores (2000a) testaram os níveis da enzima cTXNPx no *T. cruzi* transfectado tratado com BZ ou NFX. Os autores observaram que a susceptibilidade das linhagens transfectadas a estas drogas foi igual a do controle não transfectado. Este fato pode também ser explicado por um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante do parasito.

Piñeyro e colaboradores (2008) mostraram que a triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial são expressas em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, incluindo os estágios infectivos. Além disso, os autores observaram que, ao contrário das peroxiredoxinas que são abundantes, as proteínas TXNPx citosólica e mitocondrial são expressas em baixos níveis em *T. cruzi*. As TXNPx do *T. cruzi* podem ser consideradas como fatores de virulência relevante para sobrevivência, replicação e diferenciação dos parasitas no interior da célula hospedeira. Adicionalmente, as TXNPx do parasita podem contribuir na infectividade sem afetar a invasão na célula alvo (Piñeyro et al., 2008). Assim, as peroxiredoxinas do *T. cruzi* constituem excelentes candidatos para o desenho de inibidores, que podem ser usados no tratamento da doença de Chagas.

A triparedoxina peroxidase de *C. fasciculata* é um componente essencial do metabolismo de hidroperóxidos dependente de tripanotiona (Nogoceke et al., 1997). O gene cTXNPx de *C. fasciculata* apresenta 564 pb e codifica uma proteína de 188 resíduos de aminoácidos. A proteína recombinante da cTXNPx possui uma massa molecular de 22 kDa e apresenta duas isoformas com diferenças no ponto isoelétrico, 6,2 e 6,3. A comparação de sequências da cTXNPx demonstrou a presença de aproximadamente 21 resíduos de aminoácidos altamente conservados em posições homólogas. Tetaud e Fairlamb (1998) caracterizaram o gene triparedoxina peroxidase de *C. fasciculata* e mostraram que este gene está organizado em “tandem” correspondendo no mínimo cinco cópias no genoma deste parasito. A TXNPx de *C. fasciculata* está localizada no citosol (Steinert et al., 1999). Além disso, esta proteína apresentou a capacidade de reduzir diferentes hidroperóxidos, como hidroperóxidos lipídicos ou orgânicos, com atividade similar a redução do peróxido de hidrogênio (Tetaud e Fairlamb, 1998).

Levick e colaboradores (1998) identificaram e caracterizaram a enzima triparedoxina peroxidase em *L. major*. A sequência de cDNA encontrada correspondeu a um polipeptídeo de 199 aminoácidos, com uma massa molecular de 22 kDa. A triparedoxina peroxidase de *L. major* está localizada em duas bandas cromossômicas, de 640 e 660 Kb, em cromossomos homólogos. A atividade enzimática desta enzima em *L. major* demonstrou que o catabolismo do peróxido de hidrogênio depende da ação combinada de três enzimas: triparedoxina peroxidase, triparedoxina e tripanotiona redutase. Os compostos t-butil hidroperóxido e cumene hidroperóxido foram pobres substratos para a triparedoxina peroxidase de *L. major*, ao contrário da enzima TXNPx de *C. fasciculata* (Levick et al., 1998). Análise proteômica de promastigotas de *L. guyanensis* mostraram que o sistema de defesa antioxidante é um modulador central da virulência em *Leishmania* em relação a sobrevivência e persistência, que são pré-requisitos para o desenvolvimento da doença metastática (Walker et al., 2006).

A enzima triparedoxina peroxidase mitocondrial (mTXNPx) foi caracterizada na população Cl Brener do *T. cruzi* (Wilkinson et al., 2000a). Este parasito e outros tripanosomatídeos apresentam uma única mitocôndria que contém o cinetoplasto, uma região elétron densa situada entre o núcleo e a bolsa flagelar, onde o genoma mitocondrial está localizado. O DNA mitocondrial constitui aproximadamente 20% do DNA celular total do *T. cruzi*. Wilkinson e colaboradores (2000a) mostraram que o gene mTXNPx possui uma região codificante de 681 pb com um potencial para codificar um peptídeo de aproximadamente 25 kDa. Eles observaram também que este gene apresenta uma única cópia no genoma do *T. cruzi* e que ele está localizado em duas bandas cromossômicas homólogas, 1600 e 1000 kb. A proteína mTXNPx apresenta uma extensão de 30 aminoácidos na porção amino-terminal, que

corresponde a um peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria. Com esta extensão, a sequência de aminoácidos da mTXNPx é maior do que a sequência da enzima cTXNPx. No entanto, ambas as proteínas apresentam similar tamanho, sugerindo que na mTXNPx pode ocorrer alterações pós-traducionais.

As enzimas cTXNPx e mTXNPx pertencem a família das peroxiredoxinas e possuem resíduos de cisteína são responsáveis pela atividade peroxidase destas enzimas (região I e II). Ambas as triparedoxinas peroxidases apresentam similaridade na região I, mas a região II diverge entre elas. Outras peroxiredoxinas, incluindo a tioredoxina peroxidase de leveduras, também apresentam diferenças na região II, mas isto provavelmente não afeta a atividade antioxidante destas enzimas (Chae et al., 1994; Wilkinson et al., 2000a). Estudos estruturais destas proteínas mostraram que a Cys52 possui um papel na redução do peróxido (Alphey et al., 2000), enquanto a Cys173 pode participar da interação da enzima com o doador de elétrons triparedoxina (Tetaud et al., 2001). Além disso, as peroxiredoxinas cTXNPx e mTXNPx possuem uma estrutura quaternária decamérica (Alphey et al., 2000).

Ensaio de transfecção dos genes cTXNPx e mTXNPx em epimastigotas de *T. cruzi* mostraram que ambas as linhagens de células transfectadas aumentam 2 vezes a resistência do parasito contra o peróxido de hidrogênio exógeno, comparado com as células controle (Wilkinson e colaboradores, 2000a). Os autores observaram também que a atividade peroxidásica das enzimas cTXNPx e mTXNPx foi especificamente dependente de tripanotona. Eles testaram a atividade peroxidase destas enzimas utilizando glutationa redutase e tioredoxina redutase de *E. coli* e não observaram diferenças na oxidação do NADPH.

O peróxido de hidrogênio é uma molécula não carregada e pode atravessar a membrana plasmática ou membranas de organelas. A compartimentalização das peroxidases em *T. cruzi* protege a célula dos efeitos tóxicos do peróxido exógeno, indicando que estes oxidantes penetram no citosol e na mitocôndria. Nas células que superexpressam as enzimas peroxidases, o metabolismo de peróxido aumenta em ambos os compartimentos conferindo proteção contra danos celulares.

Em *T. brucei*, Tetaud e colaboradores (2001) observaram que o gene cTXNPx pertence a uma família multigênica organizada em “tandem” como descrito em *Leishmania*, *C. fasciculata* e *T. cruzi*. Já o gene mTXNPx apresenta uma única cópia por genoma haplóide do *T. brucei*. Análises da atividade específica das enzimas cTXNPx e mTXNPx mostraram que a mTXNPx possui atividade 7 vezes menor do que a cTXNPx. Esta diferença na atividade pode refletir uma baixa interação entre a triparedoxina e a mTXNPx, sugerindo a presença de outro doador de elétrons para a mTXNPx (Tetaud et al., 2001). Os autores

observaram a expressão da proteína em ambas as formas sanguíneas e procíclicas do parasito. Assim como *T. cruzi*, o *T. brucei* apresenta uma triparedoxina peroxidase localizada no citosol e outra na mitocôndria. No entanto, *C. fasciculata* possui apenas o sistema de detoxificação de peróxido localizado no citoplasma (Steinert et al., 1999).

Castro e colaboradores (2002) observaram que o gene cTXNPx em *Leishmania* apresenta múltiplas cópias, provavelmente localizadas no mesmo cromossomo. Enquanto que o gene mTXNPx apresenta uma única cópia no genoma deste parasito. Ensaio de Northern blot utilizando sondas específicas, demonstraram a presença de quatro transcritos diferentes para o gene cTXNPx (2,1; 1,7; 1,5 e 1,2 kb) e apenas um transcrito para o gene mTXNPx (1,4 kb). Estes autores observaram também a presença de dois polipeptídeos com massa molecular menor que a mTXNPx, que possivelmente representam produtos de degradação e detectaram formas diméricas e tetraméricas da proteína mTXNPx de *L. infantum*. Além disso, eles determinaram a atividade específica da mTXNPx e observaram uma especificidade restrita ao substrato e a sensibilidade ao hidroperóxido lipídico não está limitada a TXNPx mitocondrial. A TXNPx citosólica encontrada em *L. major* (Levick et al., 1998), *L. donovani*, *T. brucei* e *T. cruzi* também mostrou uma especificidade restrita ao substrato (Castro et al., 2002). A transfecção do gene cTXNPx em promastigotas de *L. infantum* mostrou que os parasitos transfectados aumentam a resistência ao peróxido de hidrogênio, enquanto que os parasitos superexpressando o gene mTXNPx não demonstraram alterações significantes na resistência a este composto.


Em *Leishmania amazonensis* resistentes ao arsenato, Lin e colaboradores (2005) observaram que o gene cTXNPx apresenta 600 pb e o mTXNPx possui 681 pb, com grande similaridade (98%) aos genes de *L. infantum*. A expressão do gene cTXNPx produziu um polipeptídeo de 25 kDa, enquanto que o mTXNPx apresentou dois polipeptídeos, 30 e 27 kDa. Esta banda menor foi um produto de degradação devido à quebra de um pequeno fragmento de aminoácidos na região C-terminal da proteína. Os autores observaram um aumento de 5 vezes na expressão do gene cTXNPx na população de *L. amazonensis* resistente ao arsenato. Ensaio de transfecção mostraram que os parasitos transfectados com a cTXNPx foram mais resistentes ao peróxido de hidrogênio, comparado com as células controle não transfectadas.

Recentemente, Wyllie e colaboradores (2008) mostraram que a superexpressão da TXNPx ativa contribui diretamente no mecanismo de resistência multifatorial ao antimônio trivalente (Sb^{III}) em *L. tarentolae*. A superexpressão desta enzima pode conferir resistência por dois mecanismos: sequestro de Sb^{III} por esta proteína abundante (1-4% da proteína total em *L. major*); ou pela atividade enzimática aumentada para reduzir os níveis de ROS

induzidos pela exposição ao Sb^{III}. Os autores observaram que a atividade peroxidásica da TXNPx foi essencial para conferir resistência a linhagem de células não mutadas, que apresentaram perda na atividade enzimática (Wyllie et al., 2008).

1.7.2 Ascorbato peroxidase (APX)

Alguns tripanosomatídeos, como *T. cruzi* e *Leishmania*, apresentam uma via alternativa para metabolizar o peróxido de hidrogênio proveniente do metabolismo de drogas ou gerado pelo sistema imune do hospedeiro. Esta via está localizada no retículo endoplasmático e é catalisada pela enzima ascorbato peroxidase (APX).

O ácido ascórbico está envolvido em muitos processos biológicos. Ele é um cofator de vários passos enzimáticos na síntese de colágeno, neurotransmissores, hormônios e carnitina; participa da absorção de íons e possui um papel importante na defesa antioxidante (Levine et al., 1999; Halliwell, 2001). O ascorbato pode metabolizar diretamente espécies reativas de oxigênio (ROS), manter o  (vitamina E) na sua forma reduzida e mediar a transferência de elétrons para peroxidases dependentes de ascorbato (Halliwell, 2001; Wilkinson et al., 2005). Em plantas, ele possui um papel na defesa oxidativa, agindo como um doador de elétrons para uma família de proteínas que detoxificam peróxido de hidrogênio, chamada ascorbato peroxidase que apresenta heme ligado na sua estrutura (Wilkinson et al., 2005). Estas enzimas foram localizadas em todos os compartimentos das plantas que geram radical -oxi, apresentando múltiplas isoformas (Jespersen et al., 1997). Níveis significativos de ascorbato e sua forma oxidada, dehidroascorbato (DHA), foram detectados em *T. cruzi* e estudos anteriores identificaram uma atividade peroxidase dependente de ascorbato associado ao microssomo (Docampo et al., 1976; Clark et al., 1994).

A enzima ascorbato peroxidase é uma hemoperoxidase. As hemoperoxidasas podem ser divididas em três classes de acordo com a sequência de aminoácidos e a localização subcelular (Wilkinson et al., 2002a). A classe I inclui as peroxidases intracelulares que podem ser subdivididas em catalase-peroxidases de bactérias e APX de plantas. As peroxidases secretadas por fungos e plantas compõem as outras classes. Análises estruturais das hemoperoxidasas da classe I revelaram uma estrutura tri-dimensional conservada, sugerindo que um mecanismo similar é usado para mediar a redução de peróxido de hidrogênio (Patterson & Poulos, 1995). Esta estrutura conservada está situada em duas regiões, uma que permite a ligação do cofator heme e outra que constitui a parte redox do centro ativo da enzima. A comparação das sequências da APX mostrou que em *T. cruzi* todos os seis aminoácidos estão presentes em posições equivalentes (resíduos distais R89, W92, H93;

resíduos proximais H217, W233 e D278), sugerindo que esta enzima funciona de forma similar a APX de plantas (Wilkinson et al., 2002a).

Wilkinson e colaboradores (2002a) caracterizaram uma hemoperoxidase dependente de ascorbato em *T. cruzi* (TcAPX) similar a APX de planta, com atividade associada ao sistema tripanotiona. O gene TcAPX completo apresenta um fragmento de 987 pb que codifica uma proteína de 33 kDa. Análises da sequência de aminoácidos indicaram que a TcAPX apresenta de 30-35% de identidade com a APX de planta. Quando comparada com as APXs citosólicas, a TcAPX apresentou uma extensão de 55 resíduos na região amino-terminal. Muitas APXs apresentam uma extensão de aminoácidos que equivale a um peptídeo sinal de endereçamento para uma organela, normalmente para o cloroplasto. Outras APXs possuem um domínio transmembrana na porção carboxi-terminal, sendo uma proteína associada à membrana (Jespersen et al., 1997). Os autores encontraram a TcAPX localizada no retículo endoplasmático do parasito. Adicionalmente, a TcAPX apresenta três regiões conservadas entre as APXs de plantas. Estas sequências são responsáveis por formar uma superfície de interação com o ascorbato adjacente ao sítio de ligação do heme, permitindo que o ascorbato esteja próximo ao motivo heme. Um fato que distingue a TcAPX das enzimas de plantas é a presença de 17 aminoácidos carregados positivamente na porção carboxi-terminal com função desconhecida. Além disso, sabe-se que mamíferos não apresentam a enzima ascorbato peroxidase, o que torna esta enzima um potencial alvo para a quimioterapia da doença de Chagas (Wilkinson et al., 2002a). Esta enzima foi caracterizada apenas na cepa CL Brener do *T. cruzi* (Wilkinson et al., 2002a) e ainda não se sabe o envolvimento da APX com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas.

Wilkinson e colaboradores (2002a) determinaram também a organização genômica e a expressão do DNA e RNA da APX de *T. cruzi*. Eles observaram que o gene TcAPX apresenta uma única cópia no genoma do parasito e está localizado em um cromossomo de 1,7 Kb. O gene TcAPX possui um transcrito de 1,9 Kb nas formas epimastigotas do parasito. A proteína recombinante TcAPX apresenta 30 kDa e os testes de especificidade do substrato mostraram que esta enzima usa o ascorbato como doador de elétrons e que sua atividade foi restrita ao peróxido de hidrogênio. Mas esta atividade não foi detectada na ausência de tripanotiona, sugerindo que a redução da dihidroascorbato ocorre devido ao gasto de tripanotiona por um processo não-enzimático. Ainda com relação a atividade da enzima, os autores demonstraram que o peróxido de hidrogênio e azida de sódio inibem a atividade da TcAPX de maneira dependente da concentração e do tempo, na ausência de ascorbato. Estes compostos inativam o grupo heme, mostrando assim que a enzima TcAPX apresenta o grupo prostético heme.

O papel da vitamina C na biologia dos tripanosomatídeos é pouco conhecido. Em outros organismos, ela captura radicais livres e pode estar envolvida em outras reações fisiológicas. Em *T. cruzi*, a ascorbato age como uma molécula que transfere equivalentes reduzidos da tripanotiona para a TcAPX hemoperoxidase localizada no retículo endoplasmático. Genes relacionados a TcAPX estão presentes em espécies de *Leishmania*, mas não em *T. brucei*. Esta ausência pode estar relacionada com o ambiente da célula hospedeira, no qual *T. cruzi* e *Leishmania* são parasitos intracelulares enquanto os tripanosomas africanos são extracelulares. Como resultado, a defesa antioxidante dependente de ascorbato durante a infecção pode ser mais crucial para *T. cruzi* e *Leishmania*, do que para *T. brucei* (Wilkinson et al., 2005).

Adak e Datta (2005) estudaram a enzima ascorbato peroxidase em *L. major*. Os autores clonaram, expressaram e caracterizaram uma proteína similar a APX de outros parasitos. A enzima ascorbato peroxidase apresentou 63% de identidade e 87% de similaridade com a APX de *T. cruzi*, enquanto que 35% de identidade e 61% de similaridade foram observados com a APX de planta. Uma característica observada entre a APX de *L. major* e a APX citosólica de soja está relacionada a uma extensão de aminoácidos na porção N-terminal da proteína. Análises de bioinformática demonstraram que a extensão N-terminal da APX codifica uma região carregada positivamente (com 12 aminoácidos) seguida de um alongamento de 22 aminoácidos, que apresenta uma região hidrofóbica com potencial para formar um domínio transmembrana. No entanto, os autores mostraram que a sequência da APX de *L. major* foi altamente compatível com a estrutura da APX citosólica de soja. Eles expressaram dois tipos de APX, uma com a extensão do domínio transmembrana (massa molecular de 35 kDa) e outra APX sem esta região N-terminal (massa molecular de 33 kDa). A APX com domínio transmembrana apresentou maior tendência a oligomerização; na ausência de ascorbato a APX de 35 kDa teve sua atividade catalítica inativada; a taxa de oxidação foi maior quando comparada a APX sem o domínio transmembrana e a taxa de inativação pelo peróxido de hidrogênio foi 480 vezes maior do que na APX de 33 kDa, na ausência de doadores de elétrons. Estas propriedades do domínio transmembrana da APX permite relacionar a estrutura e a função da APX de *L. major*.

Quando a sequência de aminoácidos da LmAPX foi comparada com a superfamília Classe I, Classe II e Classe III bem como guaiacol peroxidase, a identidade da sequência LmAPX é maior com Classe I (~35%) comparado com outras classes (<18%). A LmAPX é um híbrido funcional entre a citocromo c peroxidase e a ascorbato peroxidase. Este híbrido mostrou propriedades catalíticas comum com estas duas peroxidases, sendo capaz de oxidar citocromo c e usar ascorbato como substrato (Dolai et al., 2007; Yadav et al., 2008).

Recentemente, Dolai e colaboradores (2008) mostraram que a LmAPX de *L. major* está localizada na mitocôndria. Os autores observaram também que os níveis de LmAPX em células que crescem na presença de 250 μM de H_2O_2 foi seis vezes maior comparado as células que cresceram na ausência deste composto. Este dado sugere que a expressão do gene LmAPX é super-regulada em resposta a níveis de H_2O_2 celular. Os parasitas foram transfectados com o gene LmAPX e quando foram expostos ao H_2O_2 celular, estes mostraram um aumento na resistência de 2.5 vezes, comparado com os parasitas controles. A LmAPX diminui os níveis de ROS, predominantemente, localizados na mitocôndria (Dolai et al., 2008). O possível papel antioxidante da LmAPX mitocondrial em *Leishmania* (ausente em catalase) é que a LmAPX pode detoxificar H_2O_2 na presença de citocromo c reduzido. A redução do citocromo c ocorre pela via NADH-citocromo b5 redutase ou pelo ânion superóxido, que é gerado pelos complexos I e II da cadeia respiratória. Assim, o sistema LmAPX-citocromo c parece metabolizar simultaneamente ambos H_2O_2 e ânion superóxido (Dolai et al., 2008).

1.7.3 Tripanotiona redutase (TR)

Os tripanosomatídeos diferem principalmente dos seus hospedeiros mamíferos pela sua habilidade de conjugar duas moléculas do tripeptídeo glutationa com uma molécula de espermidina para formar o ditiol N,N-bis(glutationil)-espermidina, conhecida como tripanotiona (Fairlamb et al., 1985). A tripanotiona junto com a tripanotiona redutase (TR) apresenta funções fisiológicas importantes como manter o ambiente intracelular reduzido e promover a defesa da célula contra metais pesados, oxidantes e xenobióticos (Fairlamb & Cerami, 1992), papel descrito para o sistema glutationa da maioria dos organismos.

A TR pertence à família das flavoproteínas oxiredutases e é enzimaticamente ativa como um homodímero com dois sítios ativos, sendo cada um formado por resíduos de ambas subunidades (Shames et al., 1986). Esta enzima utiliza o NADPH como co-substrato e FAD como cofator flavina (Mittal et al., 2005).

Desde a sua descoberta em 1985, inúmeras funções biológicas foram diretamente ou indiretamente atribuídas a tripanotiona, que são homeostase redox, síntese de desoxiribonucleotídeos pela ribonucleotídeo redutase, conjugação e exportação de metais e drogas, remoção glioxal e metabolismo de peróxido (Krauth-Siegel et al., 2007; Castro & Tomás, 2008). Estas reações consomem equivalentes redutores derivados de dihidrotriptanotiona [$\text{T}(\text{SH})_2$], a forma reduzida da tripanotiona, e gerada pela tripanotiona disulfeto (TS_2). A regeneração do ditiol é possível pela atividade da tripanotiona redutase (TR), uma enzima presente em todos os kinetoplastídeos (Castro & Tomás, 2008).

A tripanotiona redutase de *C. fasciculata* e do *T. cruzi* foram purificadas (Shames et al., 1986; Krauth-Siegel et al., 1987) e os autores encontraram propriedades químicas e físicas similares com a glutaciona redutase humana. A tripanotiona e glutaciona redutase pode reduzir seus respectivos substratos fisiológicos pelo mesmo mecanismo catalítico. No entanto, as enzimas do parasito e do humano diferem na especificidade ao substrato, no qual a glutaciona não é um substrato ou inibidor da tripanotiona redutase e a tripanotiona não é substrato para a glutaciona redutase. Esta especificidade ao substrato é um ponto importante para a pesquisa de inibidores seletivos contra a tripanotiona redutase, sendo, portanto um alvo racional para o desenvolvimento de drogas tripanosomicidas (Henderson et al., 1988).

A tripanotiona redutase pode catalisar a redução de um elétron dos derivados de naftoquinona e nitrofuranos sintéticos. A redução destes compostos promove sua auto-oxidação, com a produção de ânion superóxido. Henderson e colaboradores (1988) mostraram que estes compostos podem ser substratos para a tripanotiona redutase do *T. cruzi* na presença de oxigênio, sem inativar a proteína. No entanto, esta redução produz radicais livres, inibe a redução da tripanotiona e causa o consumo de NADPH. Os autores sugerem que a atividade tripanosomicida dos compostos testados foi especificamente devido a sua redução pela tripanotiona redutase do *T. cruzi*.

A enzima tripanotiona redutase (TR) foi clonada, sequenciada e purificada em *T. cruzi* (Sullivan & Walsh, 1991). Eles amplificaram um fragmento de 1,2 Kb que consiste aproximadamente a 80% do gene TR, comparado com a sequência de *C. fasciculata* e *T. congolense*. A sequência da TR apresentou 492 aminoácidos, com uma massa molecular de 54 kDa e 79% de identidade com as sequências da TR de outros parasitos. Além disso, o sequenciamento da TR mostrou que os resíduos relacionados com o reconhecimento específico da glutaciona estão ausentes na TR do *T. cruzi*.

Estudos para determinar a localização da TR em *T. cruzi* apresentam resultados conflitantes. Experimentos usando anticorpo contra um peptídeo derivado da TR indicaram que a enzima está localizada no citosol e na mitocôndria (Meziane-Cherif et al., 1994). Por outro lado, estudos de fracionamento bioquímico sugerem que a TR é encontrada principalmente no citosol, com uma porção significativa (15-25%) presente no glicossomo (Wilkinson et al., 2002b; 2005). A TR de vários tripanosomatídeos, incluindo *T. cruzi* e *T. brucei*, possui uma extensão carboxi-terminal com um pequeno peptídeo sinal glicossomal que pode ser devido à localização citosólica/glicossomal (Sommer et al., 1994). No entanto, em *T. brucei* a TR foi detectada exclusivamente em frações citosólicas (Schlecker et al., 2005). Ensaio de imunolocalização em *L. amazonensis* sugerem a presença da TR também

em regiões da bolsa flagelar e em outra estrutura intracelular no final posterior de células promastigotas (Castro-Pinto et al., 2008).

Para investigar o papel da TR, Kelly e colaboradores (1993) realizaram a transfecção deste gene em *T. cruzi* e *L. donovani*. *L. donovani* transformadas com o gene LdTR apresentaram uma atividade enzimática 14 vezes maior que as controles, enquanto que *T. cruzi* superexpressando a TcTR mostraram atividade 10 vezes maior que os parasitos não transfectados. Em ensaios de susceptibilidade a nitrofuranos, violeta genciana e ao metabolismo de peróxido de hidrogênio, os autores não observaram diferenças significativas entre as células que superexpressam a TR e as não transfectadas. Este resultado pode ser devido ao fato de que estes compostos podem não ser catalisados diretamente pela TR para produzir radicais livres tóxicos.

A estrutura, composição do sítio ativo e propriedades catalíticas da TR de tripanosomatídeos estão sendo estudadas por vários autores com o objetivo de encontrar um inibidor desta enzima nos parasitos. Alguns compostos como nifurtimox, derivados de naftoquinona, ácido ditiobis-nitrobenzóico (DTNB), DMSO, amido derivado de lunarina (PK43), inibidores competitivos (por exemplo poliaminas), conjugados poliaminas-peptídeo, kukoamina, lunarina, nitrofuranos entre outros estão sendo investigados por vários autores (Jockers-Scherubl et al., 1989; Hamilton et al., 2003; Krauth-Siegel e Inhoff, 2003). No entanto, a maioria dos inibidores da TR testados *in vitro* não apresenta uma correlação clara com a atividade tripanosomicida. Isto pode ser devido ao próprio metabolismo celular dos compostos que provavelmente desenvolvem papéis importantes nesta atividade. Os efeitos de inibidores nitrofuranos no balanço redox dos parasitos podem ser um promissor candidato a droga.

Tovar e Fairlamb (1996) investigaram a possibilidade de modular os níveis de TR intracelular em *T. cruzi* através da transfecção sense e antisense deste gene nos parasitos. As células superexpressando a forma sense da TR mostrou uma aumento de 4-10 vezes dos níveis de mRNA, proteína e atividade enzimática. Ao contrário, os parasitos transfectados com a forma antisense da TR não apresentaram diferenças significativas nos níveis de proteína e atividade enzimática, comparado com as células controle. O mRNA do gene TR apresentou um transcrito de 2,1 Kb para todos os parasitos transfectados. Mas a presença de uma banda de 3,9 Kb nas células com orientação antisense do gene sugere que o processamento de mRNA antisense é ineficiente nestes parasitos. Assim, análises de rearranjo de plasmídeos revelaram que o evento de inversão de um gene específico está associado com a deleção de pequenas regiões que flanqueiam o DNA.

Em *T. cruzi*, os níveis de dihidrotriptanotona variam entre os estágios de vida do parasita, na qual cerca de 1.5-2.1 mM em epimastigotas de cultura na presença de poliaminas (Piacenza et al., 2007) e 0.5 e 0.12 mM em tripomastigotas e amastigotas, respectivamente (Ariyanayagam et al., 2003). Embora a biossíntese de dihidrotriptanotona ocorra no citosol, a presença desta molécula em outros compartimentos celulares está sendo sugerida devido a presença de enzimas que utilizam a tripanotona reduzida como doador de elétrons (Castro & Tomás, 2008).

A fim de investigar o papel fisiológico da TR em *T. brucei*, Krieger e colaboradores (2000) geraram células contendo o gene da TR controlado pelo promotor do gene induzido tetraciclina. Eles mostraram que na ausência de tetraciclina não ocorre a transcrição dos genes, mas na presença desta as células aumentam de 4 a 5 vezes a produção da TR. Entre 48h e 72h após a retirada de tetraciclina do meio, os parasitos sobreviveram com baixos níveis de TR. Mas após 96h, a cultura apresentou uma mistura de células mortas e debilitadas. Outro dado importante demonstrado pelos autores foi que os parasitos com o gene TR deletado podem sobreviver com apenas 10% da sua atividade normal. Além disso, em parasitos depletados da TR crescendo em meio livre de tiol, não foram capazes de detoxificar eficientemente o peróxido de hidrogênio e mostraram uma capacidade reduzida em infectar camundongos quando comparado as células selvagens (Krieger et al., 2000). Assim, estes autores mostraram que a TR é essencial para a viabilidade do *T. brucei*, sendo um bom alvo para droga.

Experimentos de nocaute mostraram que o gene TR é essencial para a sobrevivência de promastigotas e amastigotas em cultura *in vitro* de *Leishmania*. Além disso, mutantes de *L. major* e *L. donovani* com metade da atividade normal da TR não apresentaram alterações na taxa de crescimento, no conteúdo de “tiol” e na susceptibilidade ao estresse oxidativo *in vitro* (Dumas et al., 1997; Tovar et al., 1998). Estes autores mostraram também que a redução em 50% ou menos da atividade da TR reduz a capacidade de várias espécies de *Leishmania* se multiplicarem no interior de macrófagos ativadas (Dumas et al., 1997; Tovar et al., 1998). Embora os parasitos *Leishmania* deficientes em TR pareçam ser hipersensíveis ao estresse oxidativo em macrófagos, nenhum estudo demonstrou alterações na taxa de metabolismo ou sensibilidade ao peróxido de hidrogênio adicionado na cultura extracelular de parasitos. Isto pode ocorrer devido à impossibilidade de se obter parasitos com níveis suficientemente baixos de TR, para produzir uma taxa limitante no metabolismo de peróxido. Como esperado, os parasitos deficientes em TR tornaram-se altamente sensíveis ao peróxido de hidrogênio exógeno (Tovar et al., 1998; Krieger et al., 2000).

Taylor e colaboradores (1994) caracterizaram o gene TR em *L. donovani*. Eles observaram que este gene apresenta uma única cópia no genoma do parasito, está localizado em um cromossomo de 1,1 Mb, possui um transcrito de 2,6 Kb e uma proteína de 52 kDa. A sequência de 491 aminoácidos da TR apresentou cerca de 76% de similaridade com *C. fasciculata* e 67% de similaridade com a TR de *T. cruzi*, *T. brucei* e *T. congolense*. Os resíduos de aminoácidos envolvidos no reconhecimento do motivo adenosina pirofosfato de NADPH e FAD e resíduos do sítio catalítico, envolvidos na transferência de elétrons da TR para tripanotona, estão completamente conservados. O gene TR foi clonado no vetor de expressão pTEX e os parasitos foram transfectados. Os autores determinaram um aumento no número de cópias do gene TR, um aumento no nível de mRNA e 14 vezes maior a atividade enzimática da TR nos parasitos transfectados, comparados com o controle.

A expressão, purificação e caracterização da tripanotona redutase em *L. donovani* foi realizada por Mittal e colaboradores (2005). O sequenciamento do gene TR mostrou que a região codificante deste gene possui 1473 nucleotídeos, 491 aminoácidos e codifica uma proteína com massa molecular de 54,6 kDa e ponto isoelétrico de 8,92. Enquanto, que a TR de *T. cruzi* e *T. congolense* codifica uma proteína de 492 aminoácidos, com massa molecular de 53,4 kDa. Com relação à expressão da proteína recombinante, os autores conseguiram expressar a TR na forma solúvel diminuindo a temperatura da cultura (22°C) e aumentando o tempo de indução (18h). A enzima TR purificada foi visualizada em uma gel de poliacrilamida sob condições nativas com massa molecular de 110 kDa, mostrando que a TR é um homodímero como descrito anteriormente. Os autores também testaram drogas anti-leishmania e inibidores do metabolismo de glutatona em ensaios de atividade enzimática. O composto melarsênico inibiu mais que 95% da TR, enquanto que o melarsoprol não apresentou inibição significativa. O nifurtimox e a nitrofurazona promoveram a inibição de 20-60% da TR de *L. donovani* e o antimônio trivalente inibiu cerca de 60% da atividade da TR. Isto indica que a inibição da TR pode ser um dos mecanismos de ação do antimônio.

Mittal e colaboradores (2007) realizaram a caracterização de populações de *L. donovani* com resistência natural ao antimônio. Neste estudo, eles observaram um aumento de 2.0-2.5 vezes na amplificação do gene TR dos parasitas resistentes, comparado com os sensíveis. Esta amplificação foi acompanhada pelo aumento da atividade específica da TR. Níveis aumentados da TR podem ajudar a manter níveis maiores de tripanotona reduzida, que é necessária para a conjugação com antimônio por efluxo e supera o efeito inibitório do SbIII. Estes dados indicam um possível envolvimento da TR na resistência a droga.

O alinhamento da sequência de aminoácidos da TR de diferentes espécies de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos mostrou que estas sequências são altamente

conservadas, particularmente próximo ao sítio ativo e aos sítios de ligação de cofator (Castro-Pinto et al., 2008). Além disso, a grande conservação na sequência e na estrutura dos sítios de ligação disulfeto encontrada na TR de *L. amazonensis* e *T. cruzi*, sugere que inibidores da enzima de *L. amazonensis* podem também efetivamente inibir a TR de outros tripanosomatídeos patogênicos, produzindo um modelo usado para teste de novas drogas anti-tripanosomatídeos (Castro-Pinto et al., 2008).

Tamayo e colaboradores (2005) demonstraram a presença da enzima TR em *Entamoeba histolytica*. O gene da TR possui 1476 pb, que corresponde a 491 aminoácidos, apresenta a sequência redutora conservada do sítio catalítico e domínios de ligação de NADPH, FADI e FADII, que são únicos para a TR. A sequência da proteína apresenta 86% de identidade com a TR de *T. cruzi* e está claramente distinta das outras redutases por análises filogenéticas.

Deste modo, a quimioterapia da doença de Chagas apresenta alguns problemas como: a baixa eficácia de cura dos compostos usados no tratamento clínico (BZ e NFX), principalmente na fase crônica da doença; a considerável toxicidade dos compostos; a existência de cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes a drogas e a resistência cruzada entre o BZ e o NFX. Diante disto é de fundamental importância a pesquisa de novos alvos para o desenvolvimento de drogas eficientes contra o *T. cruzi*

O sistema de defesa antioxidante do *T. cruzi* difere daquele encontrado nas células de mamíferos, o que torna as enzimas envolvidas neste sistema potenciais alvos para a quimioterapia da doença de Chagas. Este sistema é baseado no tiol de baixa massa molecular “tripanotiona”, que mantém o ambiente intracelular reduzido pela ação da tripanotiona redutase (TR). Fazem parte das vias que metabolizam o peróxido de hidrogênio em moléculas de água, as enzimas triparedoxina peroxidase citosólica (cTcTXNPx) e mitocondrial (mTcTXNPx) e a ascorbato peroxidase (APX).

Em um estudo prévio, nosso grupo demonstrou que a enzima ferro-superóxido dismutase-A (FeSOD-A) do *T. cruzi* está superexpressa em uma população do parasito com resistência induzida *in vitro* ao BZ (Nogueira et al., 2006). Esta enzima participa da defesa antioxidante do parasita removendo o excesso de ânion superóxido em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio. Como a defesa antioxidante é uma via metabólica que funciona sequencialmente em um mecanismo de cascata, nossa hipótese é que os parasitas resistentes poderiam também apresentar um aumento no nível de expressão das peroxidases para metabolizar o peróxido de hidrogênio gerado em excesso. Diante disto, no presente trabalho, os genes que codificam as enzimas antioxidantes cTcTXNPx, mTcTXNPx, TcAPX e TcTR foram caracterizados em 18 populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol

(BZ). O estudo dos genes da defesa antioxidante em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol é de grande importância para o entendimento dos mecanismos de resistência do parasito a esta droga.

2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os genes que codificam as enzimas triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial (cTcTXNPx, mTcTXNPx), ascorbato peroxidase (TcAPX) e tripanotiona redutase (TcTR), em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar o nível de mRNA e tamanho dos transcritos dos genes cTXNPx, mTXNPx, APX e TR em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Determinar a organização gênica e o número de cópias desses genes.
- Verificar a localização desses genes nos cromossomas do *T. cruzi*
- Clonar, expressar e caracterizar as proteínas recombinantes.
- Avaliar o nível de expressão dessas proteínas nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Estudar o contexto genômico destes genes no genoma do parasita
- Realizar análises filogenéticas destes genes com outros organismos, a partir de sequências depositadas em banco de dados.

3 MÉTODOS

3.1 Cepas do *Trypanosoma cruzi*

Neste estudo utilizamos uma população do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol (BZR), seu par sensível (BZS), um par de clones dessas populações (clone 9S e clone 27R) (Murta & Romanha, 1998), e uma população 17LER com resistência induzida *in vitro* ao BZ, e seu par sensível 17WTS (Nirdé *et al.*, 1995), gentilmente cedidas pelo Dr. Philippe Nirdé (Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs- Montpellier/ France). Além disso, utilizamos 12 cepas do *T. cruzi*, sendo 3 naturalmente resistentes: Colombiana; VL-10; Noel (Filardi & Brener, 1987) e 9 sensíveis: CL Brener; Buriti; Berenice; Quaraizinho; Gilmar; Romano; Ernane; MR e Luna. .

3.2 Extração de RNA total

O RNA total das diferentes cepas do *T. cruzi* foi extraído com TRIZOL de acordo com o protocolo do fabricante (INVITROGEN). O sedimento de parasitas (cerca de 1×10^9 epimastigotas) foi ressuspensionado no TRIZOL (vol/vol). Após adição de 200 μ l de clorofórmio, a suspensão foi homogeneizada e incubada por 15 min no gelo e posteriormente centrifugada a 13.400 xg por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo contendo o mesmo volume de isopropanol 95% e incubado a -20°C por 12-18h. O RNA assim precipitado foi então lavado com etanol 70%, seco e ressuspensionado em água autoclavada, estéril e livre de RNase. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorvância $260_{\text{nm}} = 40 \mu\text{g/ml}$.

3.3 Extração de DNA

O sedimento de epimastigotas das populações sensíveis e resistentes foi ressuspensionado em tampão de extração contendo 50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0 e incubado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteinase K por 12h a 37°C . Posteriormente, o DNA foi extraído com fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 1:1:24 e clorofórmio/álcool isoamílico 1:24 e precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 100% e acetato de sódio 0,3 M a -20°C por 12h. O DNA foi então lavado 2X com etanol 70% e ressuspensionado em 100 μ l de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM, pH 8,0). A concentração do DNA obtido foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, comparado com um padrão de DNA de concentração conhecida.

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para amplificação do fragmento dos genes cTcTXNPx, mTcTXNPx, TcAPX e TcTR utilizado para vários ensaios. Para o preparo das sondas, PCR de colônia, PCR quantitativo em tempo real e PCR para clonagem e expressão utilizamos os iniciadores listados no quadro abaixo.

Tabela: Lista com os iniciadores dos genes da defesa antioxidante utilizados neste trabalho.

GENE	Iniciador Forward	Iniciador Reverse	Tamanho do amplicon	Número de acesso GenBank
cTXNPx sonda	5'GAGGTGCTTGCAT GCTCCA 3'	5'ACACCTCGCCATGC TTCTCC 3'	446 pb	AJ012101
cTXNPx real time	5'GTTGAGACGTGCG GTGAATA 3'	5'GGCGGTTTTCAAA GTCCTTG 3'	214 pb	
cTXNPx expressão	5'CGCGTCGCACATGT CCTGCGGAGACGCA AA 3'	5'CGCAAGCTTTCTAC GCGACAGCACCAAA GT 3'	599 pb	
mTXNPx sonda	5'AAATACACGGCC ACTGTGT 3'	5'GTCCAGGTTAAGA AGTCGCA 3'	360 pb	AJ006226
mTXNPx real time	5'CGACAGCCAATAT TCACACCT 3'	5'CGCAGAATCCCTTT ATCGTCAA 3'	187 pb	
mTXNPx expressão	5'CGCGGATCCCCAT GTTTCGTCTGATGG CCGT 3'	5'CGCAAGCTTTTCTC AAAATATTCATTTGC 3'	680 pb	
APX sonda	5'CGCGGATCCCCAT GGCTTTTTGTTTTGG TTC 3'	5'CCGGAATTCCTATT TT ACTCTGCTGGGA 3'	987 pb	AJ457987
APX expressão	5'CGCGGATCCCCAT GGCTTTTTGTTTTGG TTC 3'	5'CCGGAATTCCTATT TTGACTCTGCTGGGA 3'	987 pb	
TR	5'CGCGGATCCCCAT GGTTCACGGGCCCC CGTT 3'	5'CCGGAATTCGGCTT TTCCATCTTCTCACC 3'	1346 pb	M38051

Cada reação continha tampão de reação (50mM KCl; e 10mM de Tris-HCl pH 8,5); 1,5 mM MgCl₂; dNTPs (200mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos); 10 pmoles de cada iniciador; enzima Taq DNA Polimerase; DNA de *T. cruzi* (1 ng/μl), em volume final de 10μl.

As reações foram realizadas no termociclador Mastercycle Eppendorf® utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial 95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento 65°C por 1 min e extensão 72°C por 1 min, e ao final dos 30 ciclos foi feita uma extensão final por 5 min a 72°C. Entretanto, a temperatura de anelamento variou de acordo com cada gene, sendo 65°C para os genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX; e 60°C para o gene TcTR.

3.5 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

Após a PCR, 3 μl do produto de PCR foi submetido à análise em gel de poliacrilamida a 6%. Para a polimerização do gel foram utilizados persulfato de amônio (APS) 10% (v/v) e TEMED (N,N,N',N' –tetrametil-etilenodiamina) 0,05% v/v. O gel foi fixado em 150 ml de solução de etanol a 10% (v/v) com 0,5% de ácido acético (v/v), e impregnados por nitrato de prata a 0,3%. Finalmente, o gel foi lavado em água deionizada e revelado em solução aquosa de hidróxido de sódio 3% (p/v) com 0,5% de formaldeído (v/v), até o aparecimento das bandas (Sanguinetti *et al.*, 1994).

3.6 Purificação do produto de PCR

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick, de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). Inicialmente foi adicionado um tampão com detergente PB ao produto de PCR, para a ligação do DNA na coluna. O DNA permaneceu ligado na coluna e os outros componentes da reação de PCR (magnésio, tampão de reação e outros) foram lavados com o tampão PE contendo etanol por centrifugação a 17900 xg por 1 min. O DNA foi eluído após a adição de 50 μl de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min e centrifugação da coluna.

3.7 RT-PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para quantificar o nível de mRNA dos genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX. Para determinar o número de cópias dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx, utilizamos DNA genômico. Inicialmente foi realizado um RT-PCR utilizando a enzima transcriptase reversa e o oligonucleotídeo dT para converter os mRNAs em cDNA. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi preparado um mix nas seguintes condições: 2 μg de RNA total, 0,5 μg de oligo d(T), 1X tampão RT, 10 mM DTT,

0.5 mM dNTP, 40 U RNase e 200 U de transcriptase reversa Superscript II, em um volume final de 20 μ l. Todos os reagentes usados foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA). A reação do cDNA foi incubada a 42°C por 60 min. Após a síntese da primeira fita, a reação foi inativada a 70°C por 20 min, e o cDNA foi diluído 15X em água deionizada.

O cDNA foi submetido ao PCR em tempo real para amplificação e quantificação das sequências dos genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX. A amplificação foi realizada pelo Sistema de Detecção da Sequência Gene-Amp 7000 (PE Applied Biosystems). Os iniciadores dos genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX (ver quadro item 3.4) foram desenhados a partir da sequência completa de nucleotídeos depositada no banco de dados (GenBank, accession numbers AJ012101, AJ006226 e AJ457987, respectivamente). O gene constitutivo hipoxantina guanina fosforibosil transferase do *T. cruzi* (TcHGPRT) foi usado para normalizar a quantidade de amostra analisada. Os iniciadores TcHGPRT1 forward: 5' CTACAAGGGAAAGGGTCTGC 3', e o iniciador TcHGPRT2 reverse: 5'ACCGTAGCCAATCACAAAGG 3', foram desenhados a partir da sequência completa de nucleotídeos do gene (GenBank, accession number L07486).

As reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador, tampão 1X SYBR GREEN (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 1 U AmpliTaq Gold DNA polymerase, 5 μ l de DNA diluído 15X e água deionizada para completar o volume final da reação de 20 μ l. O corante SYBR GREEN intercala na fita dupla de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Os componentes da reação foram homogeneizados e os 20 μ l foram adicionados em cada poço da placa. Após aplicar as amostras, a placa foi vedada com um selante e embrulhada em papel alumínio até ser colocada no equipamento.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, e o anelamento/extensão a 60°C por 1 min. Curvas padrão foram utilizadas para cada experimento utilizando quantidades conhecidas dos plasmídeos TOPO PCR 2.1 (Invitrogen) contendo os genes clonados cTcTXNPx (10^5 a 10^9 moléculas), mTcTXNPx (10^8 a 10^{11} moléculas) e TcHGPRT (10^4 a 10^8 moléculas). Para o gene TcAPX, realizamos o mesmo programa de amplificação e utilizamos a quantificação relativa, que não utiliza curva padrão.

Os resultados foram analisados utilizando o programa "Sequence Detection System" (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e quantificar o número de cópias conforme a curva padrão.

3.8 Análise de Northern blot

O RNA das diferentes cepas foi submetido à eletroforese em gel de agarose-formaldeído e transferido para uma membrana de náilon. Inicialmente, foi preparado um gel de agarose 1% tipo EEO (Sigma, St Louis, MO, E.U.A) em tampão MOPS 1X (0,04M MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM acetato de sódio pH 7,0) contendo 7,7% de formaldeído. As amostras contendo de 10 a 20 µg de RNA foram aplicadas nas canaletas do gel e submetidas à eletroforese 20V por 4h em tampão MOPS 1X acrescido de formaldeído 18,7% (vol/vol). O gel contendo as amostras foi transferido para membranas de náilon, durante 20h, usando tampão SSC 10X concentrado. Posteriormente, as membranas foram hibridizadas com as sondas dos genes cTcTXNPx, mTcTXNPx, TcAPX e TcTR marcadas com fósforo radioativo (³² P), segundo protocolo descrito por Dos Santos & Buck (1999).

3.9 Southern Blot

A análise da organização e estimativa do número de cópias dos genes cTcTXNPx, mTcTXNPx, TcAPX e TcTR no genoma de *T. cruzi* foi feita através da análise do perfil de restrição gerado por diferentes endonucleases. Aproximadamente 5 µg de DNA total das diferentes cepas de *T. cruzi* foi digerido com enzimas de restrição específicas para cada gene. A digestão foi realizada a 37°C durante 16h. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente corados com brometo de etídio (0.5 µg/ml). O gel foi fotografado no aparelho EAGLE EYE (STRATAGENE) e transferido para membrana de náilon (Hybond- Amersham Biosciences) em tampão SSC 10X concentrado. A membrana foi hibridizada com a sonda marcada com ³²P correspondente aos genes.

3.10 Sondas e Ensaios de Hibridização

As sondas utilizadas nos ensaios de Southern e Northern blot foram preparadas a partir da amplificação por PCR do DNA da cepa 17LER de *T. cruzi* com os iniciadores específicos para os genes TcTXNPc, TcTXNPm, TcAPX e TcTR (ver quadro item 3.4). Depois da amplificação, os produtos da PCR foram precipitados, purificados e marcados com [³²P] dCTP conforme protocolo descrito por Feingberg & Vogelstein (1983). A pré-hibridização das membranas foram feitas em 15 ml da solução G (1% BSA, 500 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA e 7% SDS) (Church & Gilbert, 1984) durante 2h a 50°C. Posteriormente, as sondas desnaturadas (95°C durante 5 min e logo após 5 min no gelo) foram adicionadas à solução G e incubadas durante 14h à 60°C para Northern blot e 65°C para Southern blot. Após a hibridização, as membranas foram lavadas 4 vezes com SSC 2 X (SSC 1X 150 mM NaCl, 15

mM citrato de sódio) e 0,1% SDS a temperatura ambiente. Após a lavagem, as membranas foram expostas ao filme de raio X e incubadas a -70°C . Após três dias, os filmes de raio X (Kodak) foram revelados e fixados.

3.11 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes

Para a clonagem dos genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX em bactérias, inicialmente realizamos uma busca da sequência completa desses genes em banco de dados (GenBank, accession number AJ012101, AJ006226 e AJ457987, respectivamente). Em seguida, desenhamos iniciadores específicos para a região codificante do gene cTcTXNPx (ver quadro item 3.4). Na sequência dos iniciadores foram adicionadas sequências correspondentes ao sítio de reconhecimento das endonucleases de restrição *SalI* e *HindIII* (sublinhadas na sequência de nucleotídeos dos iniciadores). Para o gene cTcTXNPx utilizamos o vetor de expressão pQE 31 (QIAGEN) que apresenta sítios de restrição para estas mesmas enzimas. Para o gene mTcTXNPx, desenhamos iniciadores específicos acoplados ao sítio reconhecido pelas enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI* (ver quadro item 3.4). A clonagem e expressão desta proteína foi realizada no vetor de expressão pGEX.

Inicialmente amplificamos por PCR a região codificante dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx. Os produtos de PCR purificados e os plasmídeos pQE31 e pGEX (200 ng/ \square) foram digeridos com as enzimas de restrição *SalI* e *HindIII*, *BamHI* e *EcoRI*, respectivamente, a 37°C durante 3h. Após a digestão, as extremidades dos vetores pQE e pGEX foram desfosforiladas com a enzima fosfatase alcalina (CIAP- PROMEGA) a 37°C por 1h.

Os iniciadores do gene TcAPX foram desenhados para ligação do gene no vetor pGEX contendo as sequências correspondentes ao sítio de reconhecimento das enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI* (ver quadro com iniciadores no item 3.4). Os plasmídeos e a sequência codificante do gene TcAPX foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição, como descrito anteriormente.

Para a purificação, os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. As bandas correspondentes ao produto de PCR e plasmídeo, na relação de quantidade 3:1, foram excisados do gel e purificados em uma mesma coluna, de acordo com o protocolo do fabricante (Kit Qiaquick- QIAGEN). Após cortar a banda do gel, foi adicionado o tampão QG (1:5 v/v) e o tubo foi aquecido a 50°C para dissolver completamente a agarose. Em seguida, foi adicionado isopropanol para purificação do DNA, e todo volume foi colocado em uma coluna. Após centrifugação o DNA permaneceu ligado, e foi adicionado novamente o tampão QG para remover todo o resto da

agarose. Para a lavagem, foi adicionado o tampão PE com etanol e a amostra foi centrifugada a 17.900 xg por 1 min. A eluição do DNA foi feita com 50 μ l de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min, seguido da centrifugação da coluna.

O vetor pQE ou pGEX e o inserto foram submetidos à reação de ligação utilizando 3 unidades/ μ l da enzima T4 DNA ligase (BioLabs), durante 40 min a temperatura ambiente. O vetor contendo o inserto foi inserido em bactérias da linhagem TOP 10F' através de choque térmico nas seguintes condições: 5 μ l do plasmídeo pQE31/ pGEX foi incubado com 100 μ l de células cálcio competentes durante 30 minutos no gelo. Em seguida a amostra foi incubada a 42°C por 30 seg para o choque térmico. A amostra foi adicionada em 1 mL de meio LB sem antibiótico e incubada a 37°C por 1h com agitação. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar com 100 μ g/ml de ampicilina e incubadas a 37°C durante 12h. As colônias de bactérias foram submetidas a PCR com os iniciadores específicos para os genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX, para a confirmação da clonagem. Após a confirmação, as bactérias foram crescidas sob agitação (Shaker – Forma Scientific) durante 14h em 5 ml de meio LB com 100 μ g/ml de ampicilina. Posteriormente, uma alíquota de 400 μ l foi criopreservada em glicerol 50% e o restante da cultura foi utilizada para purificação do plasmídeo utilizando o Kit mini-prep, de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). O sedimento de bactérias foi ressuscitado em 250 μ l de tampão de ressuspensão. Posteriormente, foi adicionado ao tubo 250 μ l de tampão de lise e 350 μ l de tampão de neutralização. A suspensão foi aplicada na coluna, centrifugada por 10 min e o eluato descartado. A coluna foi lavada e o plasmídeo com o inserto foi eluído em 50 μ l de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min e por centrifugação da coluna.


Os plasmídeos contendo os genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX foram inseridos em bactérias *E. coli* da cepa BL-21, com a finalidade de induzir a expressão da proteína recombinante. A transformação foi feita através de choque térmico como descrito anteriormente neste item. Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 100 μ g/ml de ampicilina e 10 μ g/ml de cloranfenicol e incubadas na estufa a 37°C por 12h.

Uma colônia de bactéria positiva para os genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX foi incubada em meio LB com 100 μ g/ml de ampicilina (AMP) e 10 μ g/ml de cloranfenicol, durante 14h a 37°C. Posteriormente, utilizamos 200 μ l desse pré-inóculo para 100 ml de meio LB com os antibióticos. As bactérias foram incubadas a 37°C por 3h sob agitação. Quando as bactérias atingiram OD_{600nm} de 0,5 a 0,7, foi retirado 1 ml da amostra não induzida para análise em SDS-PAGE. Foi adicionado ao meio 5 mM IPTG (isopropyl-beta-D-

thiogalactopyranoside) para induzir a expressão da proteína. As bactérias transformadas com o gene cTcTXNPx foram incubadas a 30°C, enquanto que as bactérias contendo os genes mTcTXNPx e TcAPX foram incubadas a 37°C, por 4 horas sob agitação. Após a indução da expressão, foi coletado 1 ml da amostra induzida para análise em SDS-PAGE. O restante da amostra foi centrifugado a 4000 xg por 20 min, o sobrenadante descartado e o sedimento armazenado a -20°C para purificação da proteína recombinante.

3.12 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para verificar a eficiência da expressão da proteína recombinante, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Inicialmente foi preparado um gel a partir da mistura de 0,8% de N,N'-metileno-bis-acrilamida e 30% de acrilamida (p/v). O gel de separação (12%) foi feito adicionando-se a esta mistura Tris-HCl pH 8,8 e SDS nas concentrações finais de 1,5 M e 0,01%, respectivamente. O gel foi polimerizado pela adição de persulfato de amônio a 10% em água destilada (0,5% v/v) e TEMED (N,N,N',N' -tetrametil-etilenodiamina 0,05% v/v). O gel de concentração (4% de acrilamida), foi preparado como descrito anteriormente para o gel de separação, porém utilizando-se o tampão Tris-HCl pH 6,8 na concentração final de 0,5 M (Laemmli, 1970).

Para a eletroforese, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (SDS 10%, 0,5 mM Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 1%, 2-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%), fervidas em banho maria por 5 min e aplicadas as canaletas do gel de concentração. A eletroforese foi realizada a 50V para o gel de concentração e a 120V para o gel de separação, sendo a corrida acompanhada pelo azul de bromofenol presente no tampão da amostra. O tampão de corrida continha 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3. Após a eletroforese, o gel foi corado durante 2 horas pelo azul de Coomassie (azul de Coomassie brilhante R-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) à temperatura ambiente e em seguida descorado com várias trocas de solução descorante (metanol 10% e ácido acético 5%) até o fundo do gel se tornar incolor.

3.13 Teste de solubilidade e purificação das proteínas recombinantes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX

Para determinar a solubilidade das proteínas rcTcTXNPx, rmTcTXNPx e rTcAPX, as bactérias da cepa BL-21 contendo os respectivos genes foram crescidas em meio LB com antibióticos (AMP e cloranfenicol) e IPTG e centrifugadas à 4000 xg por 20 min. O sedimento resultante foi ressuspensado em tampão de lise pH 8.0 contendo 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl e 8 M uréia. Em seguida a amostra foi congelada a -70°C durante 10 min.

Após o descongelamento foi adicionada na amostra 1 mg/mL de lisozima e a mistura foi incubada no gelo por 30 min. Posteriormente, a amostra foi sonicada 3 x por 15 seg, com pausas de 15 seg no gelo e centrifugada a 10.000 xg a 4°C por 30 min. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado e o sedimento foi ressuscitado em tampão de lise, sonicado 3 x por 15 seg e centrifugado a 10.000 xg por 30 min. Este segundo sobrenadante foi transferido para outro tubo e ao sedimento restante foi adicionado 50 μ l de tampão de amostra 1X. Em cada uma dessas etapas foi retirado 50 μ l de amostra para análise em gel SDS-PAGE.

A purificação da proteína rTcTXNPx sob condições nativas foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Qiagen). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna contendo uma resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni²⁺- NTA) (Qiagen), que se associa à cauda de 6 histidinas presente na proteína recombinante rTcTXNPx. As bactérias induzidas com IPTG foram centrifugadas à 4000 xg por 20 min. O sedimento foi ressuscitado em tampão de lise pH 8.0 (tampão B) contendo 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl e 100 mM imidazol. A partir do tampão B, foram preparados os tampões C, D e E, com diferentes pH: 6.3, 5.9 e 4.5, respectivamente. A lise das bactérias foi realizada a temperatura ambiente por 1 hora com agitação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 xg por 20 min. O sobrenadante foi coletado e uma pequena fração (50 μ l) retirada para análise em gel SDS-PAGE. Para cada 4 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL da resina 50% Ni-NTA (Qiagen). A mistura foi submetida à agitação a temperatura ambiente por 1h. Após ligação da proteína na resina, a mistura foi adicionada à coluna (BIORAD) para o empacotamento da resina. O eluato foi coletado para análise em gel SDS-PAGE. A resina foi lavada por 2 vezes com 4 mL de tampão C (pH 6.3), e suas frações foram coletadas. Em seguida, 500 μ l do tampão D (pH 5.9) foi adicionado à resina por 4 vezes e suas frações foram coletadas. Posteriormente, a proteína foi eluída da resina com 200 μ l de tampão E (pH 4.5) por 5 vezes e todas as frações foram coletadas. Uma alíquota de 20 μ l de cada fração foi submetida à eletroforese SDS-PAGE.

A purificação das proteínas rTcTXNPx e rTcAPX foi realizada pela técnica de eletroeluição. Submetemos cada proteína recombinante à eletroforese em gel de poliacrilamida. Posteriormente, incubamos o gel com uma solução de KCl 0,1M a 4°C que precipita as proteínas do gel tornando-as esbranquiçadas e cortamos na região correspondente as proteínas rTcTXNPx e rTcAPX. Colocamos o fragmento do gel em membranas de diálise com 3 mL de tampão de corrida 1x filtrado (25mM de Tris-HCL, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3) com extremidades fechadas. Submetemos as membranas à eletroforese

horizontal contendo tampão de corrida de proteína 1x, durante 3h à 100V. Depois invertemos a corrente por 10 seg para que as proteínas se desprendam da parede da membrana de diálise. Coletamos o tampão contendo as proteínas e armazenamos a 20°C.

3.14 Dosagem de proteínas

A dosagem das proteínas recombinantes rcTcTXNPx, rmTcTXNPx, rTcAPX e das proteínas totais do *T. cruzi* foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Foi utilizada uma placa de ELISA com 96 poços para realizar este experimento. Uma curva padrão foi feita com a albumina de soro bovino (BSA), em triplicatas nas seguintes concentrações: 0.4; 0.8; 1.2 e 1.6 μg de BSA por poço. Para a dosagem das proteínas rcTcTXNPx, rmTcTXNPx e rTcAPX, foram utilizados os volumes de 5, 10 e 15 μL da proteína concentrada e diluições de 5 e 10 vezes. Já para a dosagem das proteínas totais do *T. cruzi*, foram utilizadas as diluições 5, 10 e 50 vezes da proteína concentrada. Após pipetar 20 μL das amostras na placa, foi adicionado 180 μL do reagente de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 50 ml etanol 95% e 100 ml ácido fosfórico 85%). A placa foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min e posteriormente submetida à leitura a 595 nm em um leitor de ELISA (BIO-RAD). A concentração das proteínas foi calculada com base na curva padrão de BSA.

3.15 Obtenção de anticorpos policlonais anti-proteína rcTcTXNPx e rTcAPX

Para produção de soro policlonal específico, as proteínas recombinantes cTcTXNPx e TcAPX foram inoculadas em coelhos provenientes da fazenda da UFMG em Igarapé. Foram utilizados 2 coelhos para cada proteína com 3 meses de idade e pesando cerca de 2,5-3 Kg. Os coelhos receberam 3 inoculações subcutâneas nos dias 0, 7 e 21. Antes das imunizações 1mL de sangue dos coelhos foi coletado para servir como controle pré-imune.

No primeiro dia de inoculação foi utilizado o adjuvante completo de Freund e nos dias subsequentes o adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). O sangue foi coletado 15 e 30 dias após a última inoculação. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 4170 xg à 4°C por 5 min e o soro aliquoteado e armazenado a -20°C. O anticorpo policlonal anti-mTcTXNPx foi gentilmente cedido pelo Dr. Carlos Robello (Piñeyro et al., 2008).

3.16 Extração de proteínas totais do *T. cruzi*

As formas epimastigotas das cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e obtidas na fase exponencial de crescimento. Os parasitas foram lavados em PBS por 3 vezes e o sedimento congelado a -

70°C. Posteriormente as massas de parasitas foram submetidas à extração de proteínas de acordo com protocolo descrito por Steindel *et al.* (1993). O sedimento de parasitas foi ressuspensionado no tampão de lise pH 8.0 contendo 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, detergente NONIDET P-40 (SIGMA) 1% e coquetel de inibidores de proteases (1000 μ g/ml Leupeptina, 2 μ g/ml aprotinina e 5 mM EDTA). Após incubação por 10 min no gelo, os parasitas foram lisados através de choque térmico (3 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio (N₂) líquido (-196°C) e banho à 37°C). Em seguida foram centrifugados a 350 xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante com as proteínas totais foi dosado, aliquoteado e armazenado à -70°C.

3.17 Western blot

A análise da expressão das proteínas cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcAPX no parasito foi feita por Western blot, utilizando soro de coelho imunizado específico para cada proteína. O perfil das proteínas totais foi resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% (Laemmli, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979) a 100V por 2h no gelo em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM Glicina; Metanol 20%; pH 8.3).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por 1h e lavadas em PBS-T por 3x. Em seguida, foram incubadas com o soro de coelho imunizado com a proteína recombinante rcTcTXNPx, rmTcTXNPx ou rTcAPX, diluído a 1:5000, 1:1000 e 1:500, respectivamente, a temperatura ambiente por 1h. As membranas foram lavadas e incubadas por 30 min com o conjugado anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina, diluído a 1:6000 (Promega). Depois de lavadas, as membranas foram reveladas com 35 μ l e 70 μ l dos substratos 5-bromo-4chloro-3-indolyphosphate (BCIP) e nitro blue tetrazolium (NBT), respectivamente, em tampão fosfatase alcalina (AP), de acordo com o protocolo do fabricante (Bio-Rad).

3.18 Análise Densitométrica

A análise densitométrica da intensidade das bandas dos genes e das proteínas cTcTXNPx, mTcTXNPx, TcAPX e TcTR visualizadas nos ensaios de Northern blot, Southern blot, localização cromossômica e Western blot foi realizada através do aparelho ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech), utilizando o programa “ImageMaster VDS software”. A imagem foi capturada pelo aparelho VDS e as análises realizadas pelo programa, sendo que foi considerado como significativo os valores de densidade ótica das bandas superiores ou iguais a 2,0.

3.19 Análises de bioinformática dos genes

A sequência do genoma do *T. cruzi*, cepa CL Brener, usada nas análises *in silico* descritas neste trabalho foram obtidas do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/>). Cópias locais dos bancos de dados não redundantes de proteínas e nucleotídeos do NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/>), GeneDB (<http://www.genedb.org>) e TIGR (The Institute for Genomic Research) foram usadas para buscas por similaridades de sequências, através do algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990). As sequências dos genes cTcTXNPx (Wilkinson et al., 2000a; AJ012101), mTcTXNPx (Wilkinson et al., 2000a; AJ006226.1), TcAPX (Wilkinson et al., 2002a; AJ457987) e TcTR (Sullivan & Walsh, 1991; M38051) foram utilizadas na seleção dos contigs que apresentaram similaridade contra as sequências alvo. Os melhores alinhamentos obtidos dentro de um critério de corte de 100 nucleotídeos apresentando uma identidade mínima de 90% constituíram nosso conjunto de dados inicial e foram selecionados para posterior anotação estrutural e funcional manual. Para o gene cTcTXNPx, foram identificados 9 contigs potenciais (AAHK01017795; AAHK01001715; AAHK01006290; AAHK01005376; AAHK01003652; AAHK01001127; AAHK01005566; AAHK01002353; AAHK01003652) e para o gene mTcTXNPx 4 contigs (AAHK01005244; AAHK01001562; AAHK01017300; AAHK01001473). Já para o gene TcAPX selecionamos 2 contigs (AAHK01002212 e AAHK01001145) e para o gene TcTR 3 potenciais contigs (AAHK01004636, AAHK01005034 e AAHK01004332).

A anotação dos contigs foi realizada pela utilização da ferramenta de anotação genômica Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>). O processo de anotação estrutural esteve centrado na correta identificação da metionina inicial e do codon de terminação. O processo de anotação funcional esteve centrado na identificação por similaridade de sequência com os domínios funcionais associados a cada um dos genes em estudo. O programa Clustal-W (Thompson et al., 1994) foi usado para realização dos alinhamentos múltiplos globais das sequências. Utilizamos para tanto os parâmetros default do programa. A restrição *in silico* foi realizada pela utilização dos programas Gene Tool Lite Launcher (DoubleTwist, USA) e SMS (Sequence Manipulation Suite - <http://www.bioinformatics.org/sms2/>), que permitiram que os contigs fossem cortados com as mesmas enzimas de restrição utilizadas nos ensaios de Southern blot para cada gene.

3.20 Análises filogenéticas

As sequências de aminoácidos das proteínas cTcTXNPx (EAN86901.1), mTcTXNPx (EAN84888.1), TcAPX (EAN86798.1) e TcTR (AAA63547.1) do *T. cruzi* foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados não redundante de proteínas (nr) do NCBI através do algoritmo BLASTP. Para as proteínas cTcTXNPx foram selecionadas do banco nr 10 sequências de aminoácidos (*T. brucei*-XP826969.1; *L. guyanensis*-AAV31765.1; *L. braziliensis*-CAM42125.1; *L. aethiopica*-AAZ23602.1; *L. major*-CAJ03334.1; *L. major*-AAC79432.1; *L. infantum*-AAL25847.1; *L. donovani*-AF225212.1; *L. donovani*-ABP68405.1 e *C. fasciculata*-AAC15095.1) e para a proteína mTcTXNPx foram selecionadas 7 sequências (*T. brucei*-XP847032.1; *L. major*-CAJ03825.1; *L. amazonensis*-AAX47429.1; *L. infantum*-CAM68108.1; *L. donovani*-ABP68406.1; *L. donovani*-AAX73294.1 e *L. braziliensis*-CAM36512.1). Como critério de corte, selecionamos proteínas com identidade mínima de 70%.

Na análise das proteínas TcAPX e TcTR selecionamos 7 e 9 sequências de aminoácidos, respectivamente, com identidade mínima de 60%. As sequências selecionadas para a enzima TcAPX foram *L. braziliensis*-CAM38361.1; *L. major*-CAJ07706.1; *L. infantum*-CAM71478.1; *A. thaliana*-CAA67425.1; *A. thaliana*-CAA67426.1; *A. thaliana*-Q05431.1 e *A. thaliana*-CAA66640.1. Para a enzima TcTR, selecionamos as sequências de aminoácidos dos tripanosomatídeos *T. brucei*-P39051.1; *T. brucei*-XP823260.1; *L. braziliensis*-XP001561849.1; *L. infantum*-XP001462998.1; *L. major*-XP001687512.1; *L. amazonensis*-ABQ57410.1; *L. amazonensis*-ABF74601.1; *L. donovani*-P39050.1 e *C. fasciculata*-P39040.1.

Adicionalmente, as sequências de aminoácidos das peroxiredoxinas (*H. sapiens*-NP002565.1; NP857634.1), mieloperoxidase (*H. sapiens*-NP000241.1) e glutathione redutase (*H. sapiens*-NP000628.2) de *Homo sapiens* foram obtidas do GenBank, e utilizadas como outgroup.

Posteriormente, utilizamos as sequências descritas acima, acrescidas das respectivas sequências de *T. cruzi* e do outgroup, em análises de alinhamento múltiplo global realizadas pelo programa Clustal-W (Thompson et al., 1994). Os alinhamentos gerados foram utilizados para cálculos de inferência filogenética realizados pelo programa MEGA3, pelo método Neighbor-Joining (Kumar et al., 2004).

4 RESULTADOS

4A Triparedoxina peroxidase

4A.1 Nível de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

Com o objetivo de determinar se as enzimas responsáveis pelo metabolismo de peróxido de hidrogênio apresentam um aumento do nível de transcrição nos parasitos resistentes, analisamos o nível de mRNA dos genes triparedoxina peroxidase citosólica (cTcTXNPx) e mitocondrial (mTcTXNPx) em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, através de ensaios de Northern blot. Para isto, o RNA total, depois de separado em gel de agarose e transferido para membrana de náilon, foi hibridizado com as sondas específicas dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx marcada com ³²P.

O perfil de hibridização do gene cTcTXNPx nas amostras do *T. cruzi* revelou a presença de dois transcritos, um de 1.1 e outro de 1.4 Kb, nas populações do *T. cruzi* que pertencem ao zimodema 1 (Z1) ou grupo *T. cruzi* I: 17WTS, 17LER e Colombiana (Figura 3A). As outras amostras analisadas pertencentes ao zimodema Z2 e ZB, grupo *T. cruzi* II, apresentaram apenas um transcrito de 1.4 Kb. O perfil de hibridização utilizando a sonda específica para o gene mTcTXNPx foi similar em todas as amostras, apresentando um transcrito de 0.85 Kb (Figura 3B).

A sonda específica para o gene do RNA ribossomal foi hibridizada com a mesma membrana anteriormente utilizada com as sondas cTcTXNPx e mTcTXNPx, para servir como controle quantitativo (Figuras 3A e 3B). Análises densitométricas da intensidade das bandas normalizadas com o RNA ribossomal indicou um aumento de duas vezes no nível de mRNA de ambos os genes cTcTXNPx e mTcTXNPx na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ, 17LER, comparado com seu par sensível 17WTS. As outras amostras do *T. cruzi* analisadas não apresentaram diferenças significativas no nível de transcrição destes genes, independente do fenótipo de resistência a drogas.

Com o propósito de complementar os dados obtidos pelo Northern blot quantificamos dos níveis de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx entre as cepas de *T. cruzi* 17WTS e 17LER através da análise de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O número de moléculas de cDNA das diferentes amostras foi normalizada utilizando o gene TcHGPRT do parasito, que é constitutivo e apresenta apenas uma cópia por genoma do parasito. Inicialmente foi obtido uma curva padrão utilizando diluições do plasmídeo ao décimo (10^7 a 10^4 ; 10^{11} a 10^8 e 10^8 a 10^4 cópias) contendo os genes clonados cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcHGPRT, respectivamente. Para todos os genes, a intensidade de fluorescência de cada

amostra, que é proporcional a quantidade de DNA, foi expresso pelo valor do ciclo do PCR tomado como base de análise o C_T (cycle threshold). Podemos observar que as curvas apresentaram uma linearidade muito boa ($r^2= 0.999$ para cTcTXNPx, $r^2= 0.998$ para mTcTXNPx e $r^2 = 0.9995$ para TcHGPRT) para uma ampla faixa de concentração de plasmídeos utilizados.

A detecção das moléculas de DNA amplificadas na qPCR foi determinada pelo SYBR green I. Ele é um composto fluorescente que intercala preferencialmente em DNA dupla fita detectando não apenas alvos específicos, mas também produtos de PCR não específicos ou dímeros de iniciadores. Para comprovar a especificidade da PCR analisamos também a curva de dissociação das amostras de cada gene analisado. O gráfico de dissociação gerado para os produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcHGPRT, mostrou apenas um pico, demonstrando que somente um produto específico foi amplificado (resultados não mostrados).

A quantidade de moléculas de cDNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx para as cepas de *T. cruzi* foi determinada por interpolação na curva padrão. Foram usados os valores de C_T obtidos pela curva padrão gerada com as quantidades conhecidas dos plasmídeos do cTcTXNPx e mTcTXNPx, normalizado com os valores de TcHGPRT. As Figuras 3C e 3D mostram um aumento de duas vezes no nível de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx na população 17LER, comparada com a 17WTS comprovando os resultados obtidos por Northern blot. Nas outras cepas do *T. cruzi* analisadas, não observamos diferenças significativas no número de moléculas de cDNA dos genes, independente do fenótipo de resistência ou zimodema da cepa.

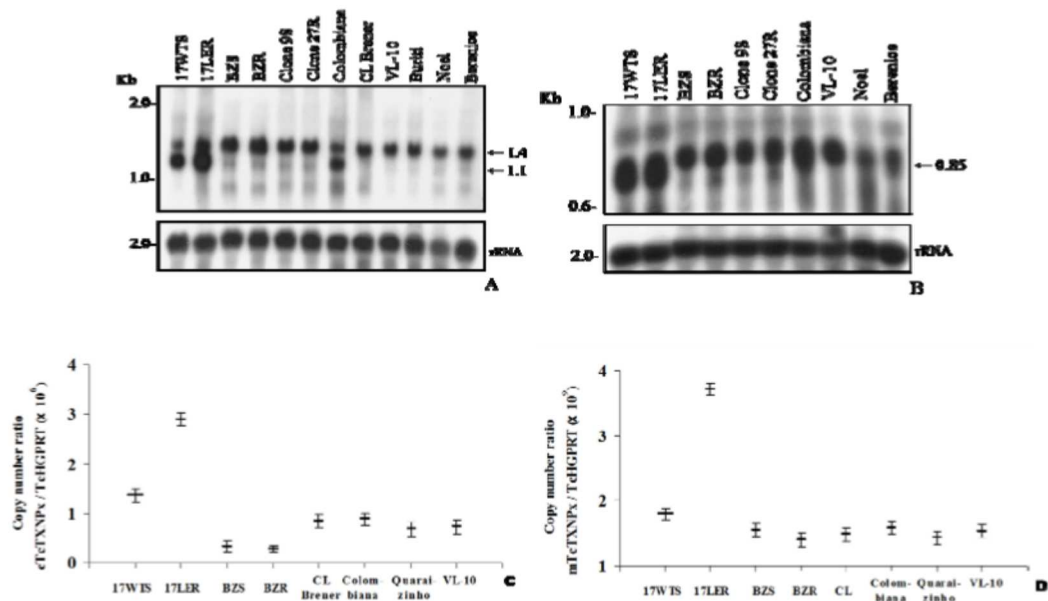


Figura 3. Níveis de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Perfil do northern blot de populações do *T. cruzi* obtido usando as sondas marcadas com ^{32}P , específica para cTcTXNPx (A) e mTXNPx (B). Número de moléculas de cDNA (razão do número de cópias do gene/HGPRT) dos genes cTcTXNPx ($\times 10^6$) (C) e mTcTXNPx ($\times 10^9$) (D) em cada população do *T. cruzi* testada. Os valores da quantidade de moléculas de cDNA foram normalizados com o gene TcHGPRT. Os dados do RT-PCR quantitativo em tempo real foram obtidos em triplicata de três experimentos independentes.

4A.2 Organização genômica, número de cópias e análises de bioinformática dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx

Para investigar a ocorrência de amplificação dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx no genoma da população do *T. cruzi* resistente ao BZ, avaliamos o número de cópias desses genes por ensaios de Southern blot. O DNA genômico de 6 populações do *T. cruzi* foi digerido com as endonucleases de restrição *Bgl*II e *Kpn*I para o gene cTcTXNPx e as enzimas *Hin*I e *Xho*I para o mTcTXNPx.

Ensaio de Southern blot utilizando a enzima *Bgl*II, que apresenta um único sítio de restrição no gene cTcTXNPx, hibridizado com uma sonda específica para esse gene revelaram a presença de três fragmentos de 6.7, 2.9 e 1.9 Kb nas populações 17WTS, 17LER e Colombiana (Figura 4A). Já nas populações BZS e BZR foram observados fragmentos de 6.7, 2.9 e 2.4 Kb (Figura 4A). É importante ressaltar que a cepa CL Brener, pertencente ao

zimodema B do *T. cruzi*, considerada um híbrido, apresentou o perfil do zimodema Z1 e Z2 (Figura 4A). Estes resultados indicam a presença de polimorfismos nas cepas do *T. cruzi* entre os zimodemas mas que não está relacionado ao fenótipo de resistência do parasito a drogas. Quando a sonda cTcTXNPx foi hibridizada com o DNA genômico digerido com *KpnI*, que não possui sítio de restrição na sequência do gene, observamos apenas uma banda de 6.7 Kb para todas as amostras analisadas (Figura 4B). Além disso, observamos que a intensidade das bandas específicas do gene cTcTXNPx foi igual em todas as amostras de *T. cruzi* analisadas, mostrando ausência de amplificação.

O Southern blot para o gene mTcTXNPx foi realizado com as enzimas de restrição (*HinfI* e *XhoI*). A enzima *HinfI* apresenta um sítio de restrição no interior do gene. Devido à presença de polimorfismos, observamos a presença de três fragmentos de 0.77, 0.56 e 0.3 Kb em todas as populações do *T. cruzi* (Figura 4C). De acordo com análises densitométricas, não houve diferenças na intensidade das bandas específicas, sugerindo que o gene mTcTXNPx não está amplificado no genoma do *T. cruzi*. Quando o DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição *XhoI*, que não apresenta sítio de clivagem no interior do gene observamos que a sonda mTcTXNPx reconheceu apenas um fragmento de 8.6 Kb em todas as amostras (Figura 4D). A mesma quantidade de DNA genômico foi utilizada para cada cepa. As cepas analisadas apresentaram a mesma intensidade da banda independente do fenótipo de resistência a drogas. Este resultado confirma a hipótese de que o gene mTcTXNPx não está amplificado nas populações do *T. cruzi*.

Com o objetivo de confirmar e quantificar o número de cópias dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx no genoma do *T. cruzi*, as amostras de DNA genômico dos parasitos foram submetidas a PCR quantitativa em tempo real (qPCR). A quantidade de DNA total das populações do parasito com resistência induzida *in vitro* e seu par sensível (17LER e 17WTS) foi normalizada utilizando o gene TcHGPRT do parasita. Este gene é constitutivo e apresenta apenas uma cópia por genoma do parasita. Inicialmente foi obtido uma curva padrão utilizando diluições do plasmídeo ao décimo (10^7 a 10^4 , 10^{11} a 10^8 e 10^8 a 10^4 cópias) contendo os genes clonados cTcTXNPx, mTcTXNPx e TcHGPRT, respectivamente. As curvas padrão apresentaram uma boa linearidade ($r^2 = 0.9106$ para cTcTXNPx, $r^2 = 0.9213$ para mTcTXNPx e $r^2 = 0.9151$ para TcHGPRT) para diferentes concentrações de plasmídeos.

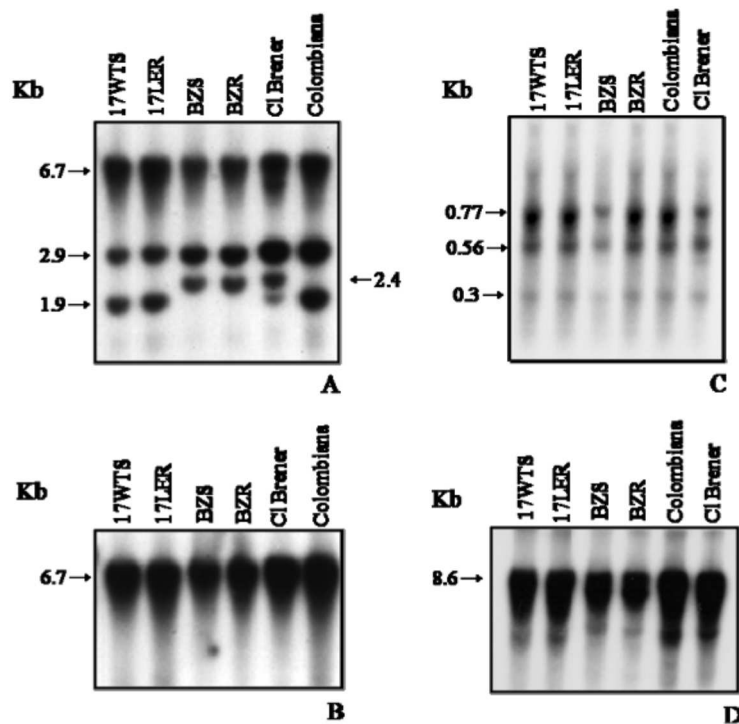


Figura 4. Análises de Southern blot dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. O DNA total foi digerido com as endonucleases BglII (A), KpnI (B) para o gene cTXNPx e HinfI (C) e XhoI (D) para mTcTXNPx. Southern blot foram hibridizados com a sonda específica dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx marcadas com ^{32}P .

A quantidade de moléculas de DNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx para as cepas de *T. cruzi* foi determinada por interpolação na curva padrão. A Tabela 1 mostra várias concentrações do DNA genômico (200, 100, 50 e 25 ng) das populações 17WTS e 17LER. Não observamos diferença no número de cópias destes genes nas populações do *T. cruzi* analisadas. Este dado corrobora com os resultados obtidos por ensaio de Southern blot, em que os genes cTcTXNPx e mTcTXNPx não estão amplificados nas populações sensíveis e resistentes do *T. cruzi*, independente do fenótipo de resistência a droga.

Tabela 1. Razão do número de cópias dos genes cTXNPx e mTXNPx nas populações do *T. cruzi* sensíveis e com resistência induzida *in vitro* ao BZ.

DNA <i>T. cruzi</i> (ng)	Razão número de cópias cTcTXNPx / TcHGPRT	Razão número de cópias mTcTXNPx / TcHGPRT
	17WTS/17LER	17WTS/17LER
200	1,2	1,0
100	1,2	1,1
50	1,2	1,0
25	1,3	1,0

* O DNA total do parasito foi usado em diferentes concentrações e o valor do número de cópias de cada gene normalizado com o gene TcHGPRT. Os dados do RT-PCR quantitativo em tempo real foram obtidos em triplicata de três experimentos independentes.

4A.3 Análises de bioinformática dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx

Análises *in silico* de bioinformática foram realizadas para complementar a caracterização molecular dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx. Inicialmente, as sequências dos genes alvo foram comparadas contra um banco de dados local (descrito de acordo com a secção 3.20 da parte Métodos) sendo 13 contigs identificados. Como alguns contigs apresentaram anotação incompleta no banco de dados GeneDB (www.genedb.org) essas sequências passaram posteriormente por um processo de anotação estrutural e funcional manual. Nossas análises revelaram a existência de cópias completas dos genes cTcTXNPx em 7 contigs (AAHK01017795; AAHK01001715; AAHK01006290; AAHK01003652; AAHK01001127; AAHK01005566; AAHK01002353) e do gene mTcTXNPx em 2 contigs (AAHK01005244; AAHK01001562) (Tabela 2 e 3). O contig AAHK01001127 possui duas cópias do gene cTcTXNPx. O processo de anotação estrutural e funcional manual foi realizado utilizando a ferramenta de anotação genômica Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>). No processo de re-anotação genômica, as sequências dos genes em estudo foram corretamente ancoradas nos respectivos contigs e a metionina inicial e codon de terminação corretamente identificados e anotados (Figura 5A e 5B). A identidade observada entre os 8 genes cTcTXNPx e 2 mTcTXNPx foi 100% e 99%, respectivamente (Figura 6).

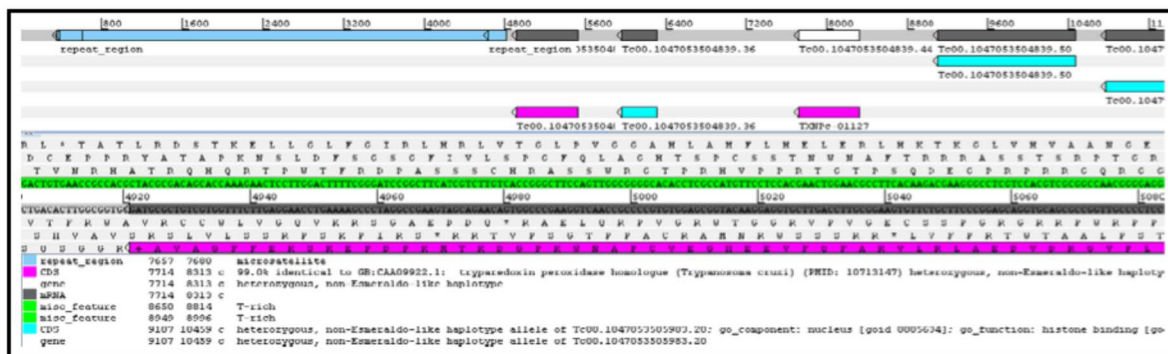
As análises *in silico* mostraram que os genes cTcTXNPx e mTcTXNPx possuem 8 e 2 cópias completas, respectivamente, dispersas ao longo do genoma haplóide do *T. cruzi*. As análises do mapa de restrição *in silico* realizado com as enzimas de restrição *Bgl*III, *Kpn*I e *Eco*RI para o gene cTcTXNPx e *Hinf*I, *Xho*I e *Eco*RI para mTcTXNPx foram confirmadas por experimentos de Southern blot utilizando DNA genômico digerido com as mesmas endonucleases.

Tabela 2. Contigs contendo pelo menos 8 cópias completas do gene cTcTXNPx encontrados no genoma do *T. cruzi*.

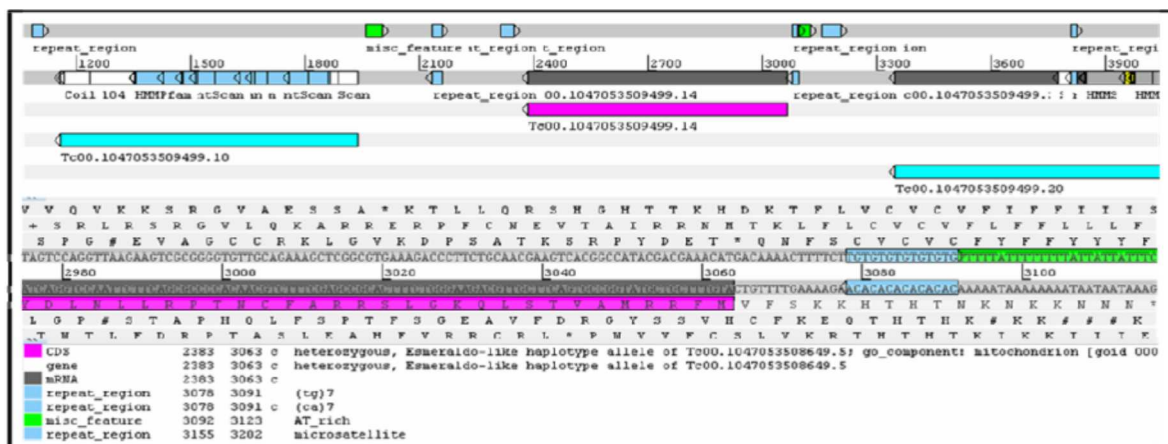
Query id	Subject id	Anotação completa	Anotação manual	% identidade	Tamanho fragmento	e-value
cTcTXNPx	AAHK01017795	Não	Metionina inicial e stop codon	98	895	0.0
cTcTXNPx	AAHK01001715	Sim	-	98	895	0.0
cTcTXNPx	AAHK01006290	Não	Metionina inicial e stop codon	99	791	0.0
cTcTXNPx	AAHK01003652	Sim	-	97	716	0.0
cTcTXNPx	AAHK01001127	Sim	-	97	716	0.0
cTcTXNPx	AAHK01005566	Sim	-	99	712	0.0
cTcTXNPx	AAHK01002353	Sim	-	99	649	0.0

Tabela 3. Contigs genômicos contendo pelo menos 2 cópias completas do gene mTcTXNPx encontrados no genoma do *T. cruzi*.

Query id	Subject id	Anotação completa	Anotação manual	% identidade	Tamanho fragmento	e-value
mTcTXNPx	AAHK01005244	Não	Metionina inicial e stop codon	100	720	0.0
mTcTXNPx	AAHK01001562	Sim	-	98	718	0.0



A



B

Figura 5. Saída gráfica do programa Artemis, exemplificando anotação estrutural e funcional dos contigs de *T. cruzi* contendo cópias dos genes em estudo. (A) Contig AAHK01001127 com o gene cTcTXNPx anotado e (B) contig AAHK01001562 contendo o gene mTcTXNPx anotado. Os genes em estudo foram destacados na cor rosa em cada um dos contigs.

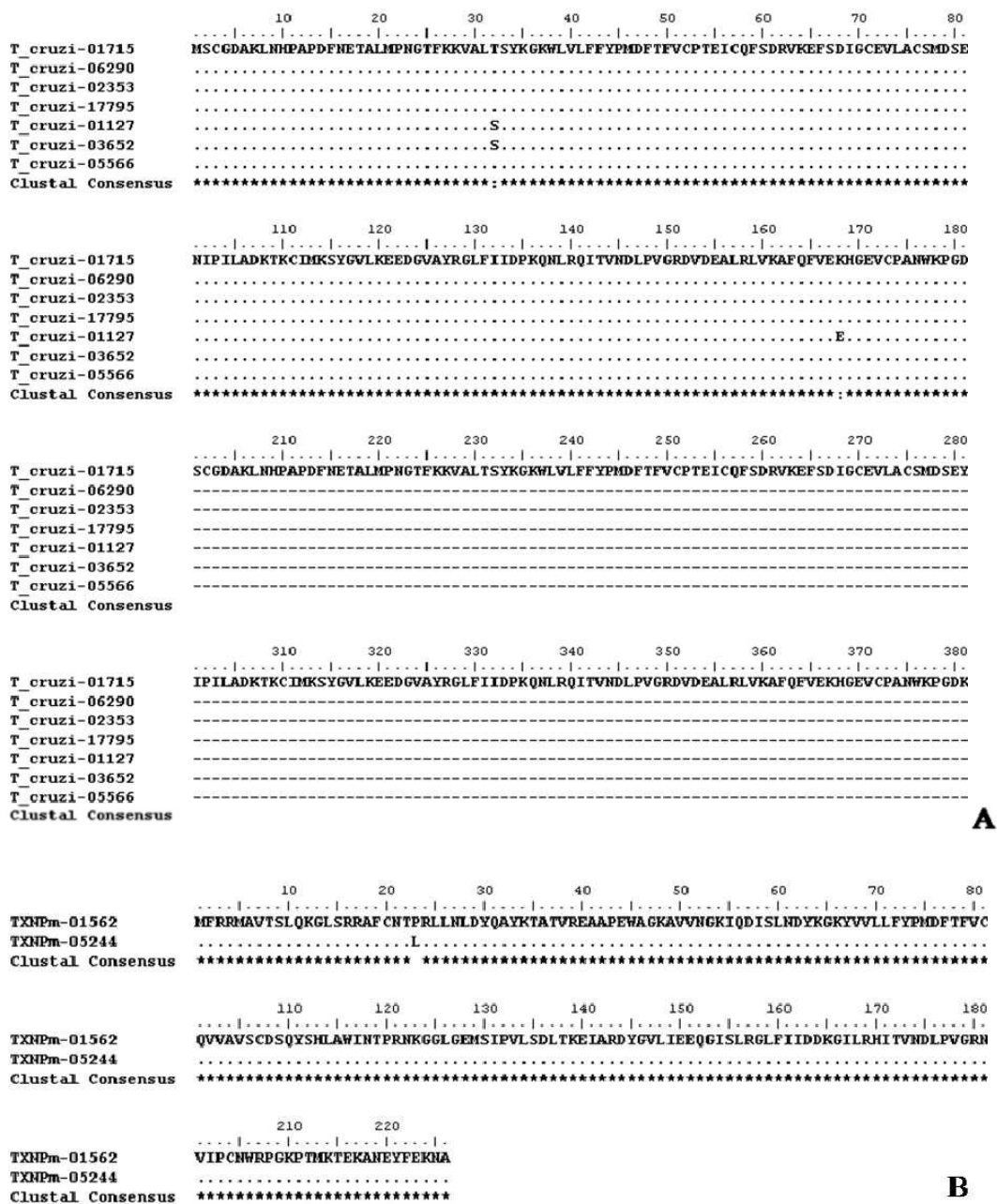


Figura 6. Alinhamento múltiplo global das seqüências de aminoácidos do gene cTXNPx encontrada nos contigs (A) e do gene mTXNPx dos contigs caracterizados (B). O alinhamento foi realizado no programa ClustalW.

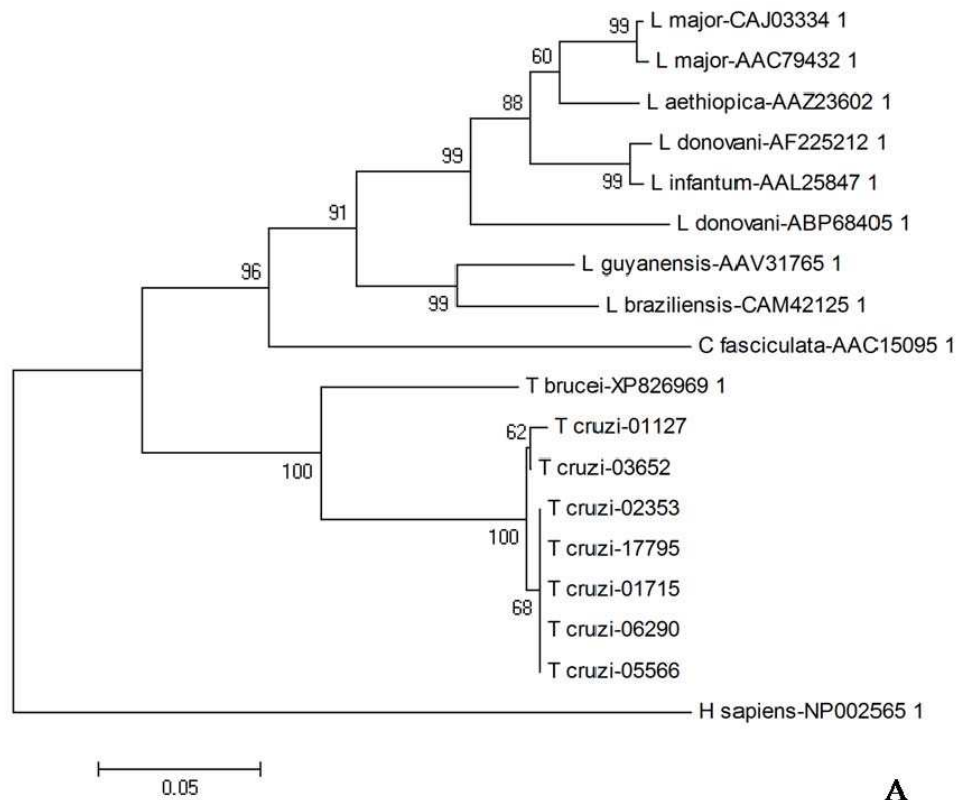
4A.4 Análise filogenética

As inferências evolutivas entre as peroxiredoxinas do *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos como *T. brucei*, outras espécies de *Leishmania* e *C. fasciculata* foram determinadas pela utilização do software MEGA3 (Kumar et al., 2004). As árvores (dendogramas) foram calculadas pelo método Neighbor-Joining com análise de Bootstrap feita com 1000 réplicas. Além disso, foi utilizado a sequência de aminoácidos da peroxiredoxina encontrada em *Homo sapiens* como outgroup.

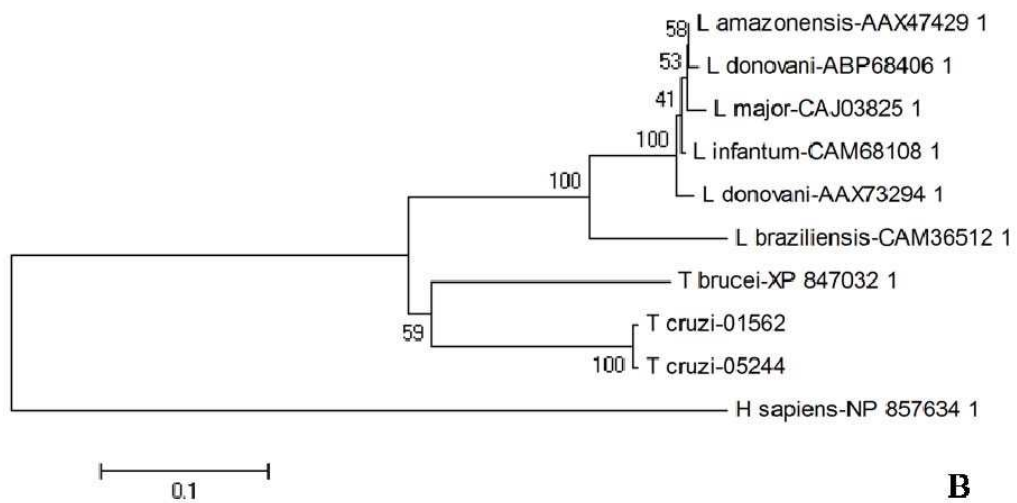
A construção do dendograma foi baseada nas sequências de aminoácidos apresentadas na Figura 7. Para o gene cTXNPx foram usadas 18 sequências diferentes e para o gene mTXNPx foram utilizadas 10 sequências. Na Figura 7A podemos observar uma identidade de 83% entre as sequências dos genes cTXNPx de *T. cruzi* e *T. brucei* que permaneceram agrupadas em um mesmo ramo, fato que também é observado para as sequências de *Leishmania* e *C. fasciculata*. A similaridade de sequência dos genes cTXNPx do *T. cruzi* entre as espécies de *Leishmania* e *C. fasciculata* foi 69 e 67%, respectivamente. Estes dados sugerem que as cTXNPx de *T. cruzi* e *T. brucei* estão mais estreitamente relacionadas, mostrando a monofilia do trypanosoma. No caso da mTXNPx, também podemos observar um alto nível de similaridade entre os trypanosomas (75%), comparado com as espécies de *Leishmania* (71%) (Figura 7B). A mTXNPx do *T. cruzi* e *T. brucei* estão agrupadas no mesmo ramo, observação que sugere um grupo monofilético.

4A.5 Localização cromossômica do gene cTcTXNPx

A fim de avaliar a localização do gene cTcTXNPx nos cromossomas do *T. cruzi*, cromossomas das diferentes cepas foram separados por eletroforese de pulso alternado (PFGE). Os cromossomas foram transferidos do gel de agarose para a membrana de náilon, conforme descrito em Materiais e Métodos. O tamanho e o número dos cromossomas do gene cTcTXNPx entre as diferentes cepas do *T. cruzi* mostrou uma grande heterogeneidade (Figura 8A). A hibridização dos cromossomas com a sonda cTcTXNPx, mostrou que este gene pode estar localizado em diferentes cromossomas, dependendo da cepa do parasita (Tabela 4). O perfil de hibridização dos cromossomas com a sonda cTcTXNPx mostrou que este gene está presente em bandas cromossômicas que variam de 745 a 2.100 Kb (Figura 8B). Não observamos correlação entre a localização cromossômica do gene cTcTXNPx e o fenótipo de resistência a droga. No entanto, este gene apresentou a mesma localização para as cepas do *T. cruzi* pertencentes ao zimodema ZB (Buriti, Romano e CL Brener) (Figura 8B).



A



B

Figura 7. Relações filogenéticas entre as proteínas TXNPx dos tripanosomatídeos. Os dendogramas das proteínas cTXNPx (A) e mTXNPx (B) foram calculadas pelo método Neighbor-Joining com análise de Bootstrap feita com 1000 réplicas. Como outgroup, foi utilizada a sequência de aminoácidos de uma peroxiredoxina de *Homo sapiens*. A barra de escala representa a distância genética de 0.05 e 0.1, respectivamente, por sítio de substituição de nucleotídeo.

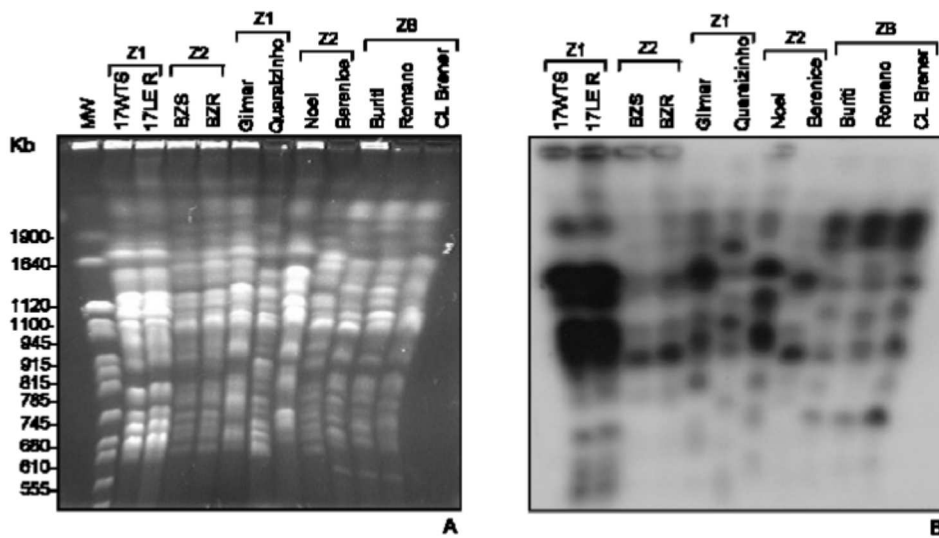


Figura 8. Localização cromossômica do gene cTXNPx em populações do *T. cruzi* com diferentes zimodemas e resistência a droga. Bandas cromossômicas do *T. cruzi* separadas por PFGE e coradas com brometo de etídio (A). Southern blot dos pares de cromossomas do *T. cruzi* hibridizados com a sonda específica do gene cTXNPx marcada com ^{32}P (B). Marcador de massa molecular corresponde aos cromossomas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 4

Populações e clones do *Trypanosoma cruzi* utilizadas neste trabalho. a localização cromossômica dos genes cTcTXNPx e TcAPX.

<i>T. cruzi</i>	Origem ¹	Hospedeiro	Sus. ²	Z ³	cTcTXNPx	TcAPX
					Localização cromossômica (Kb)	Localização cromossômica (Kb)
17 WT	Mex	Triatomíneo	S	1	2.100; 1.700; 1.756; 1.120; 922	2.000
17 LE	Mex	Triatomíneo	R	1	2.100; 1.700; 1.756; 1.120; 922	2.000
Colombiana	Col	Humano F.C.	R	1	ND	2.000
Quaraizinho	RGS	<i>T. infestans</i>	S	1	1.990; 1.500	2.000
Gilmar	MG	Humano F.A.	S	1	1.700; 1.170	ND
BZS	SP	Humano F.A.	S	2	922	2.000
BZR	SP	Humano F.A.	R	2	922	2.000
Clone 9S	SP	Humano F.A.	S	2	ND	ND
Clone 27R	SP	Humano F.A.	R	2	ND	ND
Ernane	Go	Humano F.C.	S	2	ND	2.000
Berenice	MG	Humano F.A.	S	2	1.700; 922	ND
VL-10	MG	Humano F.C.	R	2	ND	2.000
Noel	MG	Humano F.A.	R	2	1.720; 1.756; 1.170	ND
Cl Brener	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	2.100; 1.990; 1.700; 922; 745	2.000
Romano	Arg	Humano F.A.	S	B	2.100; 1.990; 1.700; 922; 745	ND
MR	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	ND	2.000
Luna	Arg	Humano F.A.	S	B	ND	2.000
Buriti	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	2.100; 1.990; 1.700; 922; 745	ND

1- Origem das cepas: Mex- México; SP- São Paulo; Ba- Bahia; SC- Santa Catarina; Arg- Argentina; Go- Goiás; RGS- Rio Grande do Sul; Col- Colômbia; MG- Minas Gerais.

2- Susceptibilidade *in vivo* das cepas de *T. cruzi* a droga (Filardi & Brener. 1987);

3- Zimodema das cepas de *T. cruzi* (Murta *et al.*. 1998).

ND- não determinado

F.A.- Fase aguda e F.C.- Fase crônica.

4A.6 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes cTcTXNPx e mTcTXNPx

Com o objetivo de estudar os níveis de expressão das proteínas triparedoxina peroxidase citosólica (cTcTXNPx) e mitocondrial (mTcTXNPx) nas cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas, clonamos e expressamos as proteínas recombinantes rcTcTXNPx e rmTcTXNPx. Para a clonagem da proteína rcTcTXNPx foi utilizado o plasmídeo pQE, que apresenta um peptídeo com 6 histidinas na sua região N-terminal. A região codificante do gene e o vetor pQE foram digeridos com as enzimas de restrição *SalI* e *HindIII*. A proteína mTcTXNPx foi inserida no vetor de expressão pGEX, que possui o gene da glutationa-S-transferase (GST). A região codificante do gene mTcTXNPx e o plasmídeo pGEX foram digeridos com as endonucleases *BamI* e *EcoRI*. Os plasmídeos contendo os genes de interesse foram inseridos em bactérias *E. coli* linhagem TOP 10F' para a clonagem. A PCR de colônia mostrou uma ótima eficiência da clonagem pela presença dos fragmentos de 600 pb e 680 pb, correspondente à sequência codificante dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx, em todas as colônias de bactérias analisadas (resultados não mostrados).

Após a clonagem, realizamos a expressão das proteínas recombinantes em bactérias *E. coli* cepa BL-21 através da indução com IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside). O IPTG é um análogo da lactose que promove a retirada da proteína repressora do sítio de início da síntese de RNA e induz a transcrição e expressão da proteína recombinante. Os extratos bacterianos, depois da indução, foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE. O perfil eletroforético dos extratos bacterianos mostrou uma banda com massa molecular de 25 kDa (canaletas 2, 3, 4, 7, 8 e 9) com maior intensidade (Figura 9A). Esta banda corresponde à proteína recombinante rcTcTXNPx ligada ao peptídeo de 6 histidinas, conferindo essa massa molecular. Por outro lado, a proteína recombinante não foi expressa nas bactérias na ausência de IPTG (canaleta 6, Figura 9A). Na Figura 9B observamos uma banda de massa molecular de 54 kDa (canaletas 4 a 9), correspondente a proteína recombinante rmTcTXNPx (25 kDa) associada a GST (29 kDa) do vetor pGEX.

Ferramentas de bioinformática, como os softwares PSORT II e SignalP, foram utilizadas para prever e confirmar a localização da proteína mTcTXNPx. Estes programas indicaram que a mTcTXNPx possui uma localização mitocondrial, com uma probabilidade de 87%.

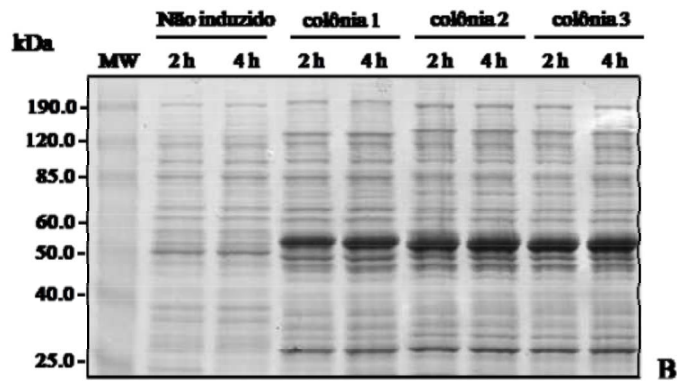
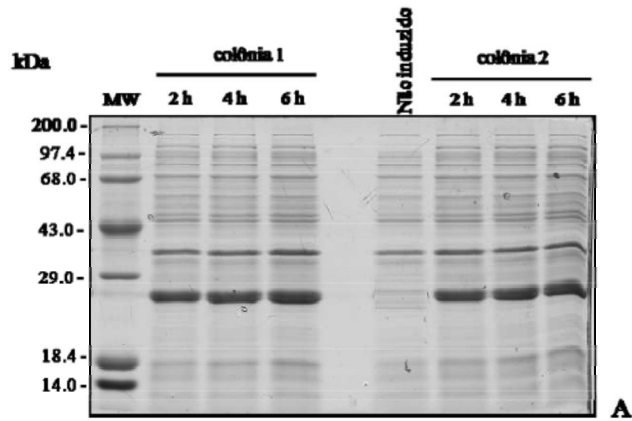


Figura 9. Expressão das proteínas recombinantes rcTXNPx (A) e rmTXNPx (B) do *T. cruzi*, pelas bactérias *E. coli* BL21 transformadas induzidas com IPTG em diferentes tempos. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue. MW- Marcador de massa molecular.

4A.7 Teste de solubilidade e purificação das proteínas recombinantes rcTcTXNPx e rmTcTXNPx

Para determinar a solubilidade das proteínas recombinantes rcTcTXNPx e rmTcTXNPx e posteriormente realizar a purificação e produção de anticorpos policlonais, realizamos o teste de solubilidade como descrito em Materiais e Métodos. Os extratos de proteínas solúveis (sobrenadante) e insolúveis (sedimento) foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE. A proteína recombinante rcTcTXNPx de 25 kDa foi solúvel, enquanto que a proteína mTcTXNPx foi visualizada sob a forma insolúvel com a formação de corpúsculos de inclusão.

A purificação da proteína rcTcTXNPx foi realizada em uma coluna de ácido nitriloacético com níquel (Ni-NTA) que apresenta afinidade pelo peptídeo de 6 histidinas ligado a proteína recombinante. Como a proteína foi solúvel, realizamos a sua purificação sob condições nativas utilizando um tampão contendo 100 mM imidazol, com pHs decrescentes (8,0; 6,3; 5,9 e 4,5). Observamos que a proteína rcTcTXNPx foi eluída da resina com eficiência no tampão com pH 4,5, na segunda e terceira eluição. A proteína recombinante rcTcTXNPx purificada foi quantificada pelo método de Bradford e apresentou uma concentração de 0,3 $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$. A partir de 1,6 L de cultura de bactérias, conseguimos obter 9 mg (30 mL) de proteína recombinante purificada (dados não mostrados).

Por outro lado, a proteína recombinante rmTcTXNPx foi purificada pela metodologia de eletroeluição. Esta metodologia consiste em eluir a proteína de interesse do gel de poliacrilamida em tampão de corrida, utilizando a transferência de corrente elétrica. A proteína eluída foi visualizada em eletroforese SDS-PAGE como um polipeptídeo de 54 kDa, (25 kDa rmTcTXNPx + 29 kDa GST do vetor pGex), sem contaminantes de outras proteínas. A dosagem da proteína rmTcTXNPx demonstrou uma concentração de 0,5 $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$ mostrando a eficiência deste método de purificação (dados não mostrados).

4A.8 Nível de expressão das proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx

A proteína recombinante rcTcTXNPx purificada foi utilizada no ensaio de imunização dos coelhos para a produção de anticorpos policlonais. O anticorpo policlonal contra a proteína rmTcTXNPx foi, gentilmente, cedido pelo nosso colaborador Carlos Robello. Os anticorpos foram utilizados em ensaios de Western blot para determinar o nível de expressão das proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

Extratos de proteínas totais das formas epimastigotas de diferentes cepas do *T. cruzi* foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE (Figura 10). O perfil eletroforético demonstrou a presença de proteínas com massa molecular variando de 10 a 100 kDa (Figura 10A). As proteínas totais foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose e esta incubada com o anticorpo policlonal anti-cTcTXNPx na diluição 1:5000 e anti-mTcTXNPx diluído 1:1000. Os resultados de Western blot mostraram que o anticorpo anti-cTcTXNPx reconheceu um polipeptídeo de aproximadamente 23 kDa para todas as amostras analisadas do *T. cruzi* (Figura 10B). A proteína recombinante purificada foi aplicada no gel como um controle positivo. Ela apresentou uma massa molecular de 25 kDa, cerca de 2 kDa maior devido a presença de seis histidinas.

Adicionalmente, o anticorpo anti-cTcTXNPx reconheceu um polipeptídeo de 46 kDa em algumas amostras. Este polipeptídeo provavelmente corresponde a proteína cTcTXNPx oxidada na sua forma homodimérica. As análises de western blot utilizando o anticorpo anti-mTcTXNPx reconheceu os polipeptídeos de 25 e 50 kDa em todas as amostra do *T. cruzi*. Esses polipeptídeos correspondem à proteína nativa e na forma homodimérica oxidada, respectivamente (Figura 10C). A proteína recombinante mTcTXNPx associada a GST (54 kDa) foi utilizada como controle positivo.

Com o objetivo de quantificar o nível de expressão das proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx em cada cepa do parasito, a mesma membrana foi incubada com o anticorpo policlonal anti-rTcHSP-70. Estudos prévios mostraram que o nível de expressão da proteína TcHSP-70 foi igual entre as populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ (Murta et al., 2008). Análises densitométricas da banda cTcTXNPx e mTcTXNPx normalizadas com a TcHSP-70, mostrou que o nível de expressão de ambas as proteínas foi similar em todas as amostras analisadas exceto na população resistente 17LER, na qual observamos um aumento de 2 vezes comparada ao seu par sensível 17WTS (Figuras 10B e 10C). Além disso, a proteína mTcTXNPx de 50 kDa, reconhecida pelo anticorpo específico, demonstrou um aumento no nível de expressão de 5,5 vezes na população 17LER comparada com seu par 17WTS.

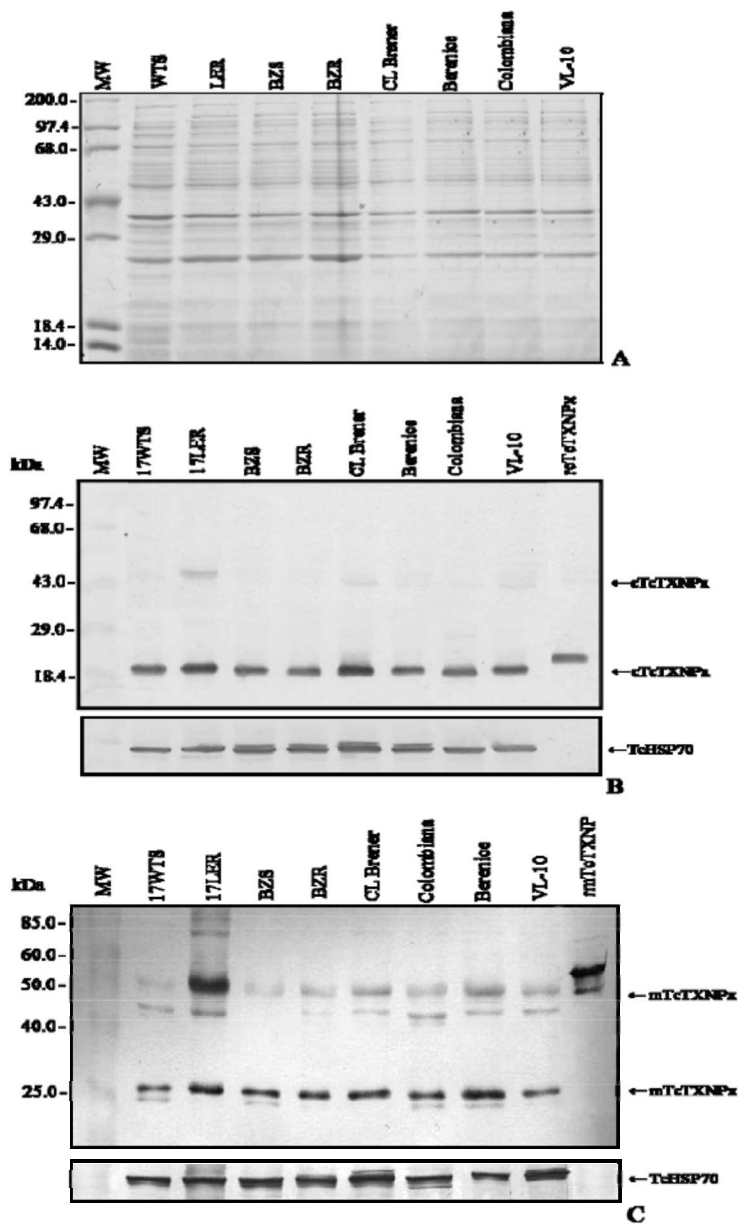


Figura 10. Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ (A). SDS-PAGE 12% corado por Coomassie blue; MW- Marcador de massa molecular; Western blot usando o anticorpo policlonal de coelho contra a proteína recombinante rTcTXNPx (B) e o anticorpo policlonal anti-rmTcTXNPx (C). Ambas as membranas foram incubadas com o anticorpo policlonal da proteína HSP-70, que foi usada como normalizador. Como controle positivo, utilizamos as proteínas recombinantes rTcTXNPx e rmTcTXNPx.

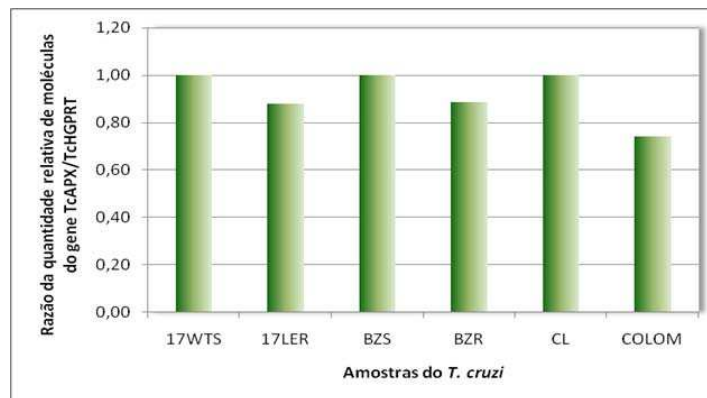
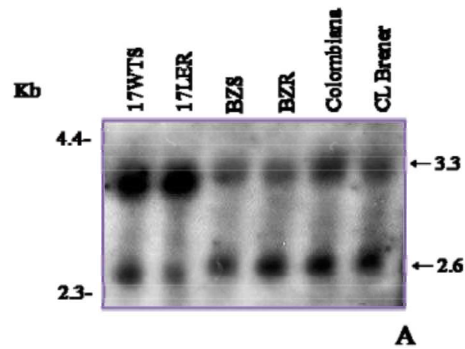
4B Ascorbato Peroxidase

4B.1 Tamanho do transcrito e nível de mRNA do gene TcAPX nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

A fim de determinar o tamanho do transcrito do gene TcAPX nas diferentes populações do *T. cruzi*, realizamos ensaios de Northern blot. Para isto, os RNAs totais das populações 17WTS, 17LER, BZS, BZR, CL Brener e Colombiana do *T. cruzi* foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de náilon e hibridizados com a sonda específica do gene TcAPX marcada com ^{32}P . A sonda do gene TcAPX reconheceu dois transcritos em todas as amostras do *T. cruzi* analisadas, sendo um de 2.6 e outro de 3.3 Kb (Figura 11A).

A quantificação do nível de mRNA do gene TcAPX das amostras de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foi realizada utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O qPCR utilizando a quantificação relativa determina a relação entre o número de moléculas em diferentes amostras considerando o ciclo da reação. Quanto menor o ciclo da quantificação, maior o número de moléculas de cDNA produzidas e vice-versa. Dessa forma, a intensidade de fluorescência de cada amostra, que é proporcional a quantidade de cDNA, foi expresso pelo valor do ciclo do PCR tomado como base de análise o Ct (cycle threshold). Antes de utilizar o método de delta-delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$), é necessário realizar um experimento de validação que permita demonstrar que a eficiência da amostra alvo e da amostra de referência são aproximadamente iguais. A curva de eficiência foi realizada para o gene TcAPX e TcHGPRT com diluições da amostra, apresentando um valor abaixo de 0.1. A quantidade do alvo, normalizado com o controle endógeno e relativo ao calibrador é dado pela fórmula final $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. O Ct do alvo subtraído ao Ct do controle endógeno (HGPRT) determina o valor do delta Ct e este valor subtraído ao Ct do calibrador (amostra sensível) determina o $\Delta\Delta\text{Ct}$. A partir deste valor, a razão relativa do número de moléculas do gene TcAPX foi calculado na fórmula final.

Como normalizador, usamos o gene HGPRT do *T. cruzi* que é constitutivo e apresenta apenas uma cópia no genoma do parasita. Na Figura 11B podemos observar a razão relativa do número de moléculas das amostras sensíveis e resistentes do gene TcAPX, normalizadas pelo TcHGPRT. O gene TcAPX não apresentou diferenças significativas no nível de mRNA entre as populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ testadas (Figura 11B).



B

Figura 11. Nível de mRNA do gene TcAPX em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Perfil do northern blot das cepas do *T. cruzi* hibridizadas com uma sonda específica do gene TcAPX marcada com ^{32}P (A). A quantidade relativa de moléculas de cDNA do gene TcAPX foi determinada pela PCR quantitativa em tempo real (B), utilizando o método de quantificação relativa. Os valores da quantidade de moléculas de cDNA foram normalizados com o gene TcHGPRRT. Os dados do RT-PCR quantitativo em tempo real foram obtidos em triplicata de três experimentos independentes.

4B.2 Organização genômica, número de cópias e análises de bioinformática do gene TcAPX

O estudo da organização genômica e número de cópias do gene TcAPX no *T. cruzi* envolveu ensaios de Southern blot e análises de bioinformática. Dentre as análises de bioinformática, realizamos restrição *in silico*, anotação das cópias do gene encontradas no genoma do *T. cruzi*, alinhamento destas cópias e a construção da árvore filogenética comparando a distância evolutiva do gene TcAPX entre os tripanosomatídeos.

Os ensaios de Southern blot foram realizados para determinar a organização genômica do gene TcAPX. O DNA total de populações do *T. cruzi* foi digerido com duas enzimas de

restrição, a *AvaI* e *XhoI*, transferido para membrana de náilon e hibridizado com a sonda específica do gene TcAPX marcada com P³².

A enzima de restrição *AvaI* apresenta um único sítio de clivagem no interior do gene TcAPX. O perfil do Southern blot com essa enzima e hibridizado com a sonda TcAPX mostrou a presença de um fragmento de 0.85 Kb em todas as amostras analisadas (Figura 12A). Como a endonuclease corta o interior da sequência do gene TcAPX, deveríamos observar a presença de dois fragmentos no southern blot. No entanto, não observamos a presença do outro fragmento, pois este provavelmente apresentou um tamanho pequeno (159 nucleotídeos) e não foi reconhecido pela sonda específica. Esta hipótese foi confirmada por análises de restrição *in silico* de um contig contendo o gene TcAPX com a enzima *AvaI*, na qual seriam gerados dois fragmentos (Figura 12C). As análises de densitometria mostraram que a intensidade da banda foi similar em todas as amostras analisadas, independente do fenótipo de resistência a drogas. Este resultado sugere que o gene TcAPX não está amplificado nas populações do *T. cruzi* analisadas.

O Southern blot utilizando a enzima *XhoI*, que não possui sítio de restrição no interior da sequência do gene TcAPX, hibridizado com a sonda específica deste gene revelou apenas um fragmento de 4.6 Kb em todas as populações do *T. cruzi* (Figura 12B1 e B2). De acordo com análises densitométricas, nenhuma diferença significativa foi observada na intensidade da banda entre as populações sensíveis e resistentes do parasito. Também não visualizamos a presença de polimorfismos deste gene nas amostras analisadas.

A sequência do gene TcAPX foi usada para realizar uma análise comparativa das sequências depositadas no banco de dados, conforme descrito em Métodos. Após selecionar as sequências com identidade maior que 95% e E-value de 0.0, identificamos 2 contigs contendo a sequência do gene TcAPX. Os contigs AAHK01002212 e AAHK01001145 foram submetidos ao software Artemis para anotação manual. Observamos que as sequências do gene TcAPX estavam completas e foram corretamente anotadas (Figura 13).

A identidade entre as duas sequências TcAPX encontradas nos contigs, determinada pelo alinhamento, foi de 98% (Figura 14). Além disso, podemos sugerir que o gene TcAPX apresenta duas cópias dispersas ao longo do genoma haplóide do *T. cruzi*.

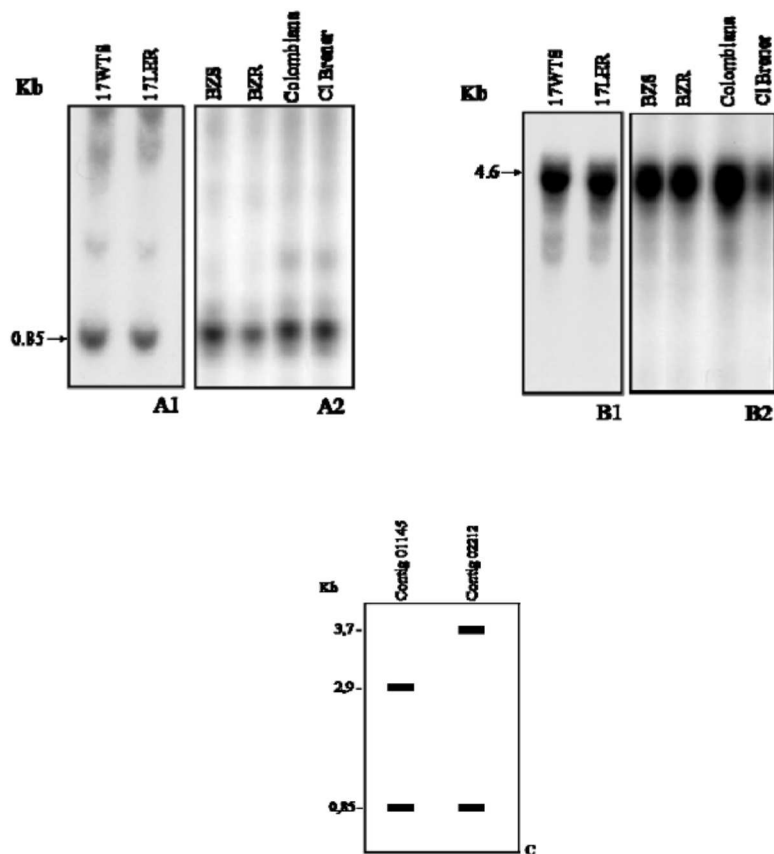
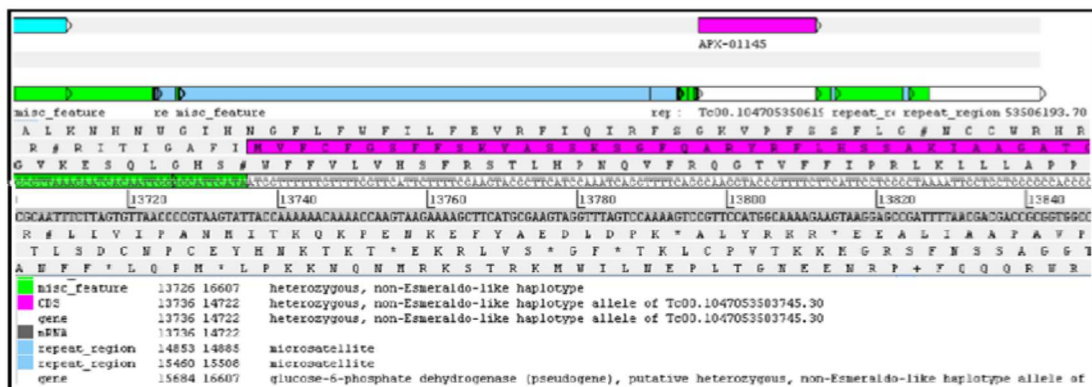
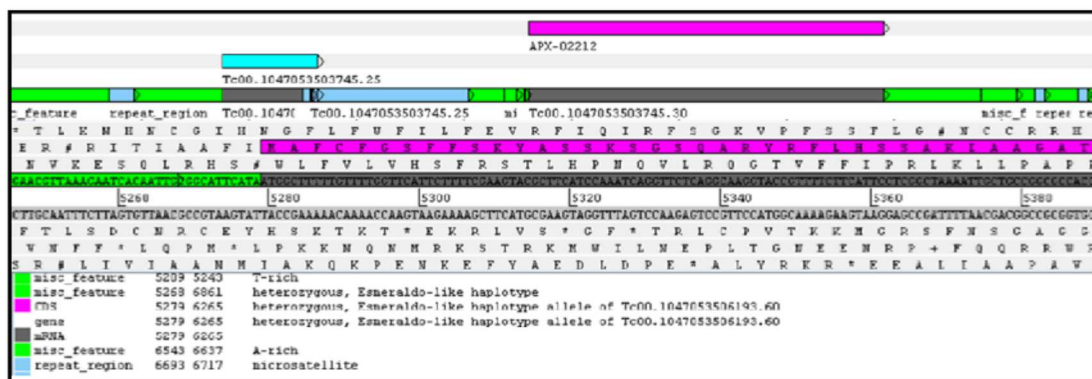


Figura 12. Southern blot do gene TcAPX de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. O DNA total de cada cepa foi digerido com *Ava*I (A), *Xho*I (B) e hibridizado com a sonda do gene TcAPX marcada com 32 P. Análise de restrição in silico (C), na qual os contigs que apresentam o gene TcAPX foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição usadas anteriormente.



A



B

Figura 13. Saída gráfica do programa Artemis, exemplificando anotação estrutural e funcional dos contigs de *T. cruzi* contendo cópias do gene em estudo. Contigs AAHK01001145 (A) e AAHK01002212 (B) do gene TcAPX. O gene de interesse foi destacado na cor rosa em cada um dos contigs.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
APX-01145  MVVCFGSEFFSKYASKSGFQARYRFLMSSAKIAAGATGALLLGGATVALCYFPSGQKYTEAPPFDVNSLRRTIEEILSEDM
APX-02212  .A.....S.....R.....
Clustal Consensus  *.*****;*****

      110     120     130     140     150     160     170     180
APX-01145  RKKD GSPNSASMRFPCECSYAGNKGLDKGRNALESLKKEYPKISYADLWSFAAVVSIEMGGPEIPWRWGRVDAKDGVCVG
APX-02212  .....
Clustal Consensus  *****

      210     220     230     240     250     260     270     280
APX-01145  SRLGFNDEEIVALIGAHTCGECHLENTGYVGPWTHDKYGFDNSEFFTELF GNEWMLNPNVKKMQFMDKTTNRLMMLPADVSI
APX-02212  .....
Clustal Consensus  *****

      310     320
APX-01145  FCNAFSKAYQKLELVGTTNLKSLPAESK
APX-02212  .....D.....
Clustal Consensus  *****;*****

```

Figura 14. Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos do gene TcAPX encontrada nos contigs caracterizados. O alinhamento foi realizado no programa ClustalW.

4B.3 Análise filogenética

As sequências do gene APX de *T. cruzi*, *Leishmania spp.* e *Arabidopsis thaliana* depositadas no GenBank - NCBI foram utilizadas para a análise filogenética. O alinhamento das sequências selecionadas foi realizado no software Mega3. Posteriormente, uma árvore filogenética foi construída usando o método Neighbor-Joining com 10 sequências de aminoácidos, dentre elas: *Trypanosoma cruzi* Tc-APX-001145 e Tc-APX-002212; *Leishmania major* Lm-CAJ07706.1, *Leishmania infantum* Li-CAM71478.1 e *Leishmania brazilienses* Lb-CAM38361.1; *Arabidopsis thaliana* At-CAA67425.1, At-CAA67426.1, At-Q05431 e At-CAA66640.1. Uma peroxidase dependente de heme de *H. sapiens*, mieloperoxidase, foi utilizada como outgroup já que esta espécie não possui enzima peroxidase dependente de ascorbato. Os tripanosomatídeos *Trypanosoma brucei* e *Crithidia fasciculata* não foram incluídos na análise filogenética, pois o gene ascorbato peroxidase está aparentemente ausente nestas espécies. Analisando a árvore filogenética podemos observar que as seqüências de *T. cruzi* e *Leishmania* (similaridade APX entre os parasitos foi 57%) foram agrupadas na mesma clade, enquanto que a APX de *A. thaliana* foram agrupadas em outra clade (similaridade APX *T. cruzi* e *A. thaliana* foi 25%) (Figura 15). A estrutura da árvore filogenética revela uma clara divergência entre APX de tripanosomatídeos e planta, representando uma ramificação dicotômica.

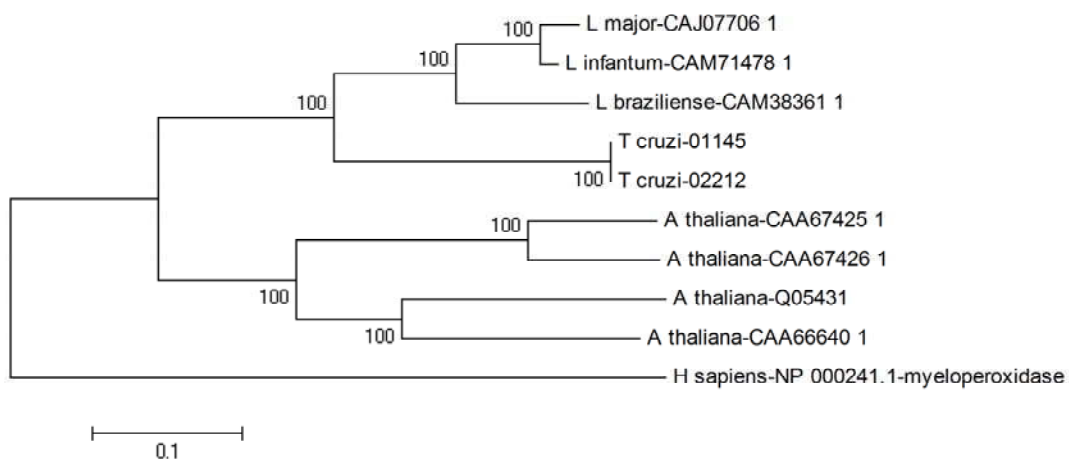


Figura 15. Relações filogenéticas entre a proteína TcAPX dos tripanosomatídeos e uma espécie de planta. O dendograma da proteína TcAPX foi calculado pelo método Neighbor-Joining com análise de Bootstrap feita com 1000 réplicas. Como outgroup, foi utilizada a sequência de aminoácidos de uma peroxidase dependente de heme (mieloperoxidase) de *Homo sapiens*. A barra de escala representa a distância genética 0.1 por sítio de substituição de nucleotídeo.

4B.4 Localização do gene TcAPX nos cromossomas do *T. cruzi*.

Com a finalidade de determinar a localização cromossômica do gene TcAPX no genoma do *T. cruzi*, os cromossomas das diferentes cepas foram separados por eletroforese de pulso alternado (PFGE). Os cromossomas foram transferidos do gel de agarose para a membrana de náilon, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Na Figura 16A observamos um perfil heterogêneo de bandas cromossômicas entre as diferentes cepas do parasita, variando de 0.6 a 1.9 Mb. A sonda específica do gene TcAPX reconheceu uma banda cromossômica de aproximadamente 2000 Kb em todas as amostras de *T. cruzi* analisadas (Figura 16B). A localização do gene TcAPX no genoma do *T. cruzi* não apresentou diferenças, de acordo com o fenótipo de resistência a drogas ou o zimodema da cepa.

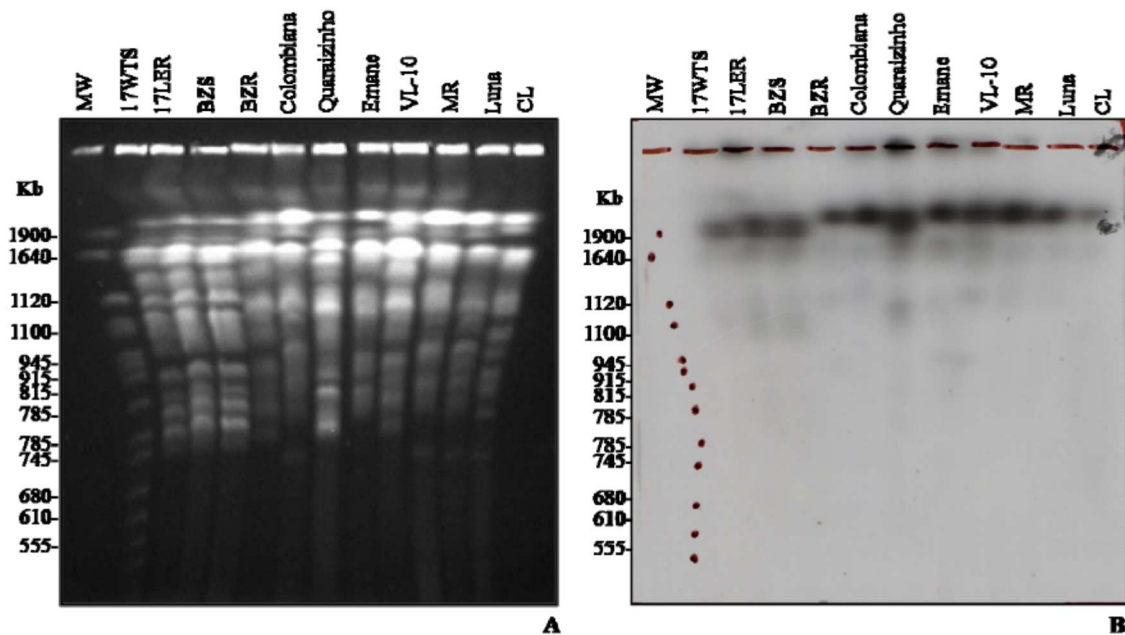


Figura 16. Localização cromossômica do gene TcAPX em populações do *T. cruzi* com diferentes zimodemas e resistência a droga. Bandas cromossômicas do *T. cruzi* separadas por PFGE e coradas com brometo de etídio (A). Southern blot dos pares de cromossomas do *T. cruzi* hibridizados com a sonda específica do gene TcAPX marcada com ^{32}P (B). Marcador de massa molecular corresponde aos cromossomas de *Saccharomyces cerevisiae*.

4B.5 Clonagem e expressão da proteína recombinante rTcAPX

Para determinar os níveis de expressão da proteína TcAPX nas populações do *T. cruzi* foi necessário obter a proteína recombinante para produção de anticorpos policlonais. Assim, realizamos a clonagem e expressão da proteína recombinante rTcAPX. Para a clonagem, utilizamos o plasmídeo pGEX, que possui o gene GST (Glutathione-S-Transferase). A região codificante do gene TcAPX foi digerida com as enzimas BamHI e EcoRI para a ligação no plasmídeo pGEX. O plasmídeo pGEX foi digerido com as mesmas enzimas de restrição, para formar extremidades coesivas e promover a ligação entre o fragmento e o vetor. Após a ligação, o plasmídeo recombinante foi transformado em bactérias *E. coli* e a clonagem confirmada através do PCR de colônia (descrito em Métodos). O PCR de colônia mostrou uma ótima eficiência da clonagem pela presença do fragmento de 987 pb, correspondente à sequência codificante do gene TcAPX, em todas as colônias de bactérias analisadas (resultados não mostrados).

A expressão da proteína recombinante rTcAPX foi realizada em bactérias *E. coli* linhagem BL-21, induzida por um análogo da lactose o IPTG. Na presença do IPTG as

bactérias expressaram a proteína rTcAPX. Os extratos bacterianos, após a indução das proteínas por 6 horas, foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE (Figura 17A). O perfil da eletroforese mostrou a presença de uma banda forte com massa molecular de aproximadamente 62 kDa. Este polipeptídeo corresponde a proteína recombinante rTcAPX (33KDa) fusionada com a GST (Glutathione-S-Transferase) (29 KDa), conferindo essa massa molecular. Na ausência de IPTG, a proteína recombinante não foi expressa pelas bactérias (canaletas 1, 2 e 3).

4B.6 Solubilidade e purificação da proteína recombinante rTcAPX

Os extratos bacterianos contendo a proteína recombinante rTcAPX foram submetidos ao teste de solubilidade. As proteínas do sobrenadante (parte solúvel) e do sedimento (parte insolúvel) foram separadas em gel SDS-PAGE 12%. O perfil eletroforético apresentou uma banda forte de aproximadamente 62 kDa no sedimento, mostrando que ela está insolúvel nas condições utilizadas na expressão, provavelmente sob a forma de corpúsculos de inclusão. Na fração solúvel, observamos uma banda muito fraca da rTcAPX e as proteínas específicas das bactérias (dados não mostrados).

Posteriormente, purificamos a proteína rTcAPX através da metodologia de eletroeluição. Este método foi utilizado pela dificuldade de purificar a proteína em coluna que reconhece a GST e clivar a GST que está associada a proteína recombinante. A purificação da rTcAPX em coluna não ficou muito boa e apresentou um rendimento muito baixo (dados não mostrados). Já a purificação pela eletroeluição apresentou uma eficiência boa. A Figura 17B representa uma eletroforese SDS-PAGE mostrando que a proteína de aproximadamente 62 kDa equivalente a rTcAPX fusionada a GST foi eficientemente purificada. Após a purificação, a proteína rTcAPX foi quantificada pelo método de Bradford e apresentou uma concentração de 0,5 $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$. A partir de 1,6 L de cultura de bactérias, conseguimos obter 15 mg (30 mL) de proteína recombinante purificada.

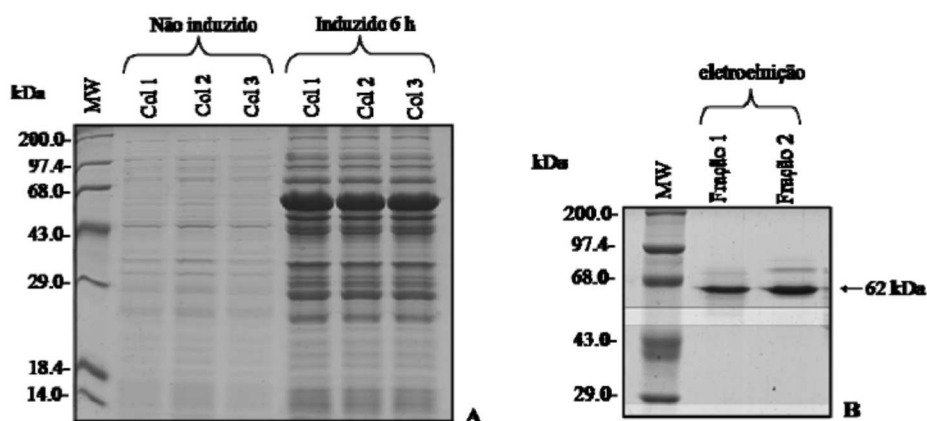


Figura 17. Indução com IPTG da expressão da proteína recombinante rTcAPX (A) do *T. cruzi*, pelas bactérias *E. coli* BL21 transformadas. Purificação da proteína recombinante rTcAPX pelo método de eletroeluição (B). SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue. MW- Marcador de massa molecular.

4B.7 Nível de expressão da proteína TcAPX

Após ensaios de purificação e dosagem, a proteína rTcAPX foi utilizada para a imunização de coelhos, a fim de promover a produção de anticorpos policlonais contra esta proteína. Os anticorpos policlonais anti-rTcAPX foram utilizados para determinar o nível de expressão dessa proteína nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas.

Ensaio de Western blot foram realizados utilizando proteínas totais do parasito em eletroforese SDS-PAGE 12% (Figura 18A). O gel mostrou o perfil das proteínas totais do parasito que possuem variação de massa molecular entre 10 e 100 kDa. As proteínas totais foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e esta foi incubada com o anticorpo policlonal anti-rTcAPX na diluição 1:500. Após a revelação pelo método colorimétrico, podemos observar que o anticorpo anti-TcAPX reconheceu um polipeptídeo com massa molecular de 33 kDa correspondente a proteína TcAPX do *T. cruzi* (Figura 18B). A proteína recombinante utilizada como controle apresentou 62 kDa devido a GST fusionada à proteína.

Como controle quantitativo, incubamos a mesma membrana com o anticorpo policlonal anti-TcHSP-70. Esta proteína previamente caracterizada em nosso laboratório apresenta igual nível de expressão entre as amostras do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a droga.

Análise densitométrica, após a normalização com TcHSP-70, mostrou um aumento de 2 vezes na intensidade do polipeptídeo TcAPX da população com resistência selecionada *in vivo* ao BZ (BZR), comparado com seu par BZS. As outras amostras não apresentaram diferenças significativas na intensidade da banda, independente do fenótipo de resistência a droga. Para confirmar este resultado, realizamos um ensaio de Western blot utilizando diluições seriadas ao dobro (2, 4 e 8 vezes) dos extratos protéicos da população resistente BZR e seu par sensível (BZS). Na Figura 18C podemos visualizar um aumento de 2 vezes na intensidade da proteína TcAPX da população BZR, em relação a BZS. Este resultado confirma um aumento do nível de expressão da proteína TcAPX na população com resistência selecionada *in vivo* ao BZ (BZR).

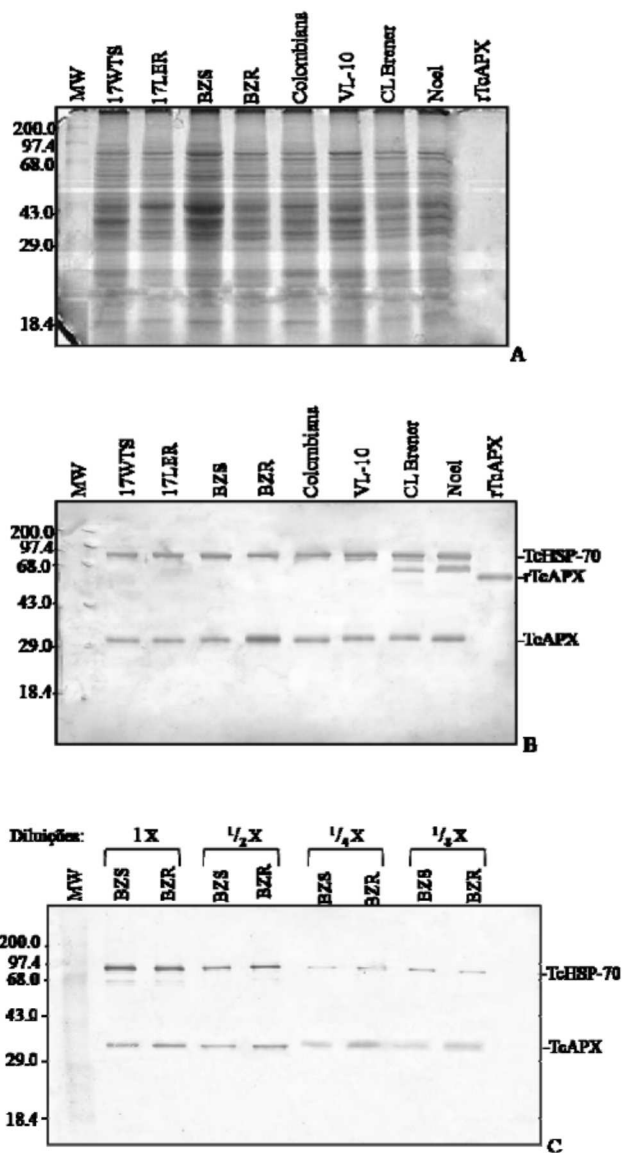


Figura 18. Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ (A). SDS-PAGE 12% corado por Coomassie blue; MW- Marcador de massa molecular; Western blot usando o anticorpo policlonal de coelho contra a proteína recombinante rTcAPX (B) e análises de western blot das populações BZS e BZR do *T. cruzi* em diluições sucessivas ao dobro (C). A membrana foi hibridizada com o anticorpo policlonal da proteína HSP-70, que foi usada como normalizador. Como controle positivo, utilizamos a proteína recombinante rTcAPX.

4C Tripanotiona Redutase (TR)

4C.1 Nível de mRNA e organização genômica do gene TcTR

Com o objetivo de investigar o tamanho do transcrito do gene TcTR nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, realizamos ensaios de Northern blot. Os RNAs totais de 6 populações deste parasito foram extraídos, submetidos a eletroforese em gel de agarose, transferidos para membrana de náilon e hibridizados com a sonda específica do gene TcTR marcada com ^{32}P .

Ensaio de Northern blot hibridizados com a sonda específica do gene TcTR mostrou a presença de um único transcrito de 1.0 Kb em todas as populações do *T. cruzi* analisadas, independente do fenótipo de resistência a drogas (Figura 19). Como controle quantitativo, foi utilizado o gene do RNA ribossomal para mostrar que a mesma quantidade de mRNA foi aplicada no gel (Figura 19). Análises de densitometria mostraram o transcrito da população BZR foi 1,5 vezes mais expresso, comparado com a população BZS. Valores abaixo de 2 vezes foram considerados como não significativos. No entanto, análises de PCR quantitativo em tempo real serão realizadas para quantificar o nível de expressão deste gene nas amostras do *T. cruzi*.

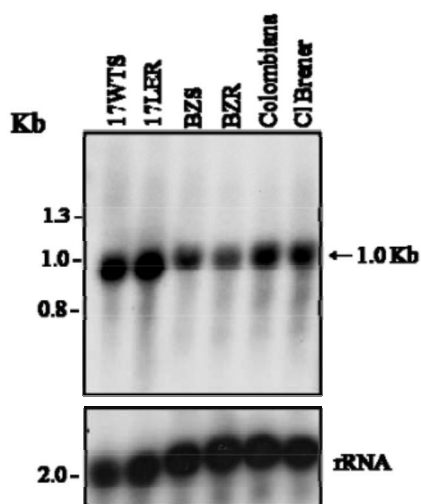


Figura 19. Nível de mRNA do gene TcTR em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Perfil do northern blot das cepas de *T. cruzi* hibridizadas com uma sonda específica do gene TcTR marcada com ^{32}P (A). Como controle quantitativo a mesma membrana foi marcada com uma sonda do gene do RNA ribossomal do *T. cruzi* (B).

A fim de investigar a organização genômica e o número de cópias do gene TcTR em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, realizamos ensaios de Southern blot e análises de bioinformática. O DNA genômico de 6 populações do parasito foi digerido com as endonucleases de restrição *AvaI* e *XhoI* e o produto da digestão foi submetido a análise por Southern blot. A membrana com o DNA digerido foi hibridizada com a sonda específica para o gene TcTR.

A enzima de restrição *AvaI* apresenta um único sítio de clivagem no interior do gene TcTR. Quando utilizada no ensaio de Southern blot, a sonda específica para o gene TcTR reconheceu apenas um fragmento com tamanho de 3.2 Kb (Figura 20A). Em análises de restrição *in silico* utilizando o programa GeneTool (DoubleTwist, USA), observamos que a enzima *AvaI* corta a seqüência alvo em dois fragmentos. No entanto, um destes fragmentos possui um tamanho muito pequeno (42 nucleotídeos) e provavelmente a sonda não o reconheceu. Esta teoria foi confirmada por análises de restrição *in silico* de um contig contendo o gene TcTR com a enzima *AvaI*, na qual seriam gerados dois fragmentos, um de 2.9 e outro 3.2 Kb (Figura 20C).

Análise densitométrica mostrou que este o fragmento apresenta a mesma intensidade entre as amostras de *T. cruzi* analisadas. Este resultado sugere que o gene TcTR não está amplificado em nenhuma das populações do parasito analisadas, independente do fenótipo de resistência a drogas ou cepa específica.

Quando a enzima *XhoI*, que não apresenta nenhum sítio de restrição no interior da seqüência do gene TcTR, foi utilizada em ensaio de Southern blot observamos a presença de um fragmento de 6.2 Kb em todas as amostras utilizadas (Figura 20B). As análises de densitometria mostraram que o gene TcTR não está amplificado nas amostras do parasito, pois não observamos nenhuma diferença significativa na intensidade da banda específica.

Quando a enzima *XhoI*, que não apresenta nenhum sítio de restrição no interior da seqüência do gene TcTR, foi utilizada em ensaio de Southern blot observamos a presença de um fragmento de 6.2 Kb em todas as amostras utilizadas (Figura 20B). As análises de densitometria mostraram que o gene TcTR não está amplificado nas amostras do parasito, pois não observamos nenhuma diferença significativa na intensidade da banda específica.

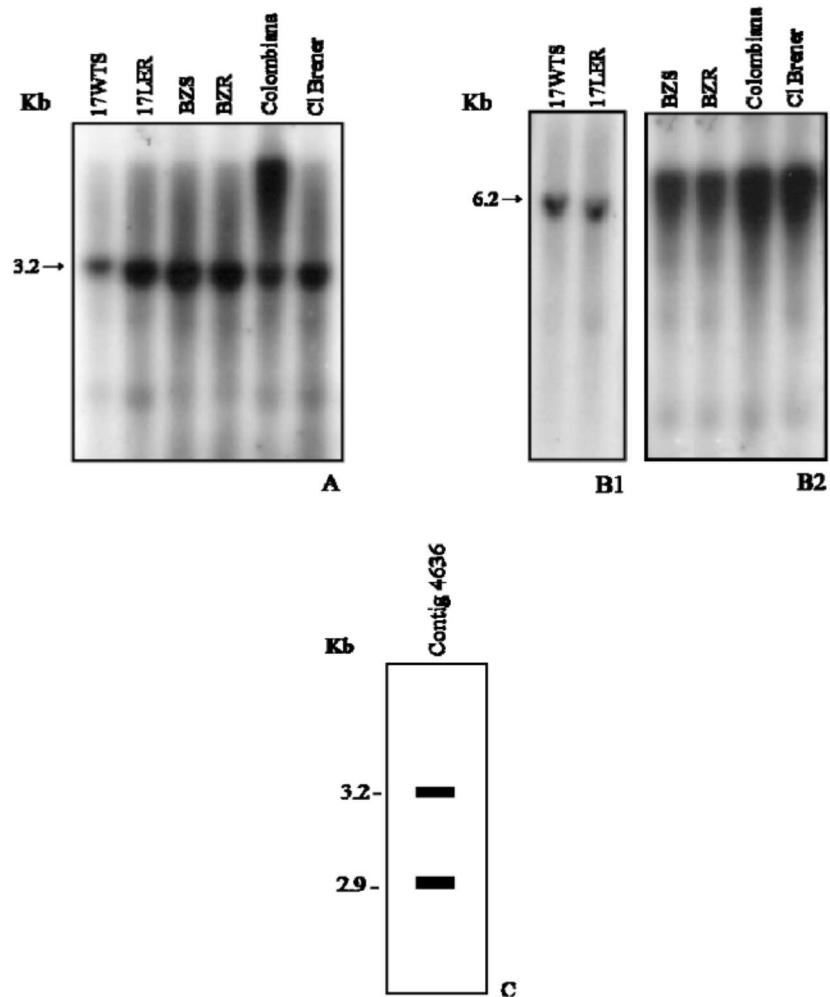


Figura 20. Southern blot do gene TcTR de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. O DNA total de cada cepa foi digerido com *Ava*I (A), *Xho*I (B) e hibridizado com a sonda do gene TcTR marcada com ^{32}P . Análise de restrição in silico (C), na qual o contig que possui o gene TcTR foi digerido com as mesmas enzimas de restrição usadas anteriormente.

4C.2 Número de cópias e análises filogenéticas do gene TcTR

A sequência de nucleotídeos do gene TcTR (número de acesso M38051.1) foi utilizada para uma análise comparativa com as sequências do genoma do *T. cruzi* depositadas no GeneDB, conforme descrito em Materiais e Métodos. Após selecionar as sequências com identidade maior que 95% e E-value de 0.0, identificamos 3 contigs (AAHK01004636, AAHK01005034 e AAHK01004332) contendo a sequência do gene TcTR. Os contigs foram analisados através da ferramenta da anotação genômica Artemis. Como resultado, apenas 1 contig (AAHK01004636) apresentou cópia completa do gene TcTR (Figura 21). Além disso, podemos sugerir que o gene TcTR apresenta uma cópia dispersa ao longo do genoma haplóide do *T. cruzi*.

Para a análise filogenética do gene TR, foram utilizadas 11 sequências de aminoácidos de diferentes tripanosomatídeos como *T. cruzi*, *T. brucei* e *C. fasciculata*. Como não existe tripanotona redutase em humanos, o gene glutationa redutase de *Homo sapiens* foi utilizado como outgroup. Podemos observar na Figura 22 que a TR do *T. cruzi* e *T. brucei* estão mais estreitamente relacionadas (82%), do que as espécies de *Leishmania* e *C. fasciculata* (63 e 67%) (Figura 22). Este fato sugere a presença de um grupo monofilético, já que a TR de *T. cruzi* e *T. brucei* estão no mesmo agrupamento. Assim, a proteína TR apresenta maior similaridade entre o gênero *Trypanosoma*, em relação aos outros tripanosomatídeos.

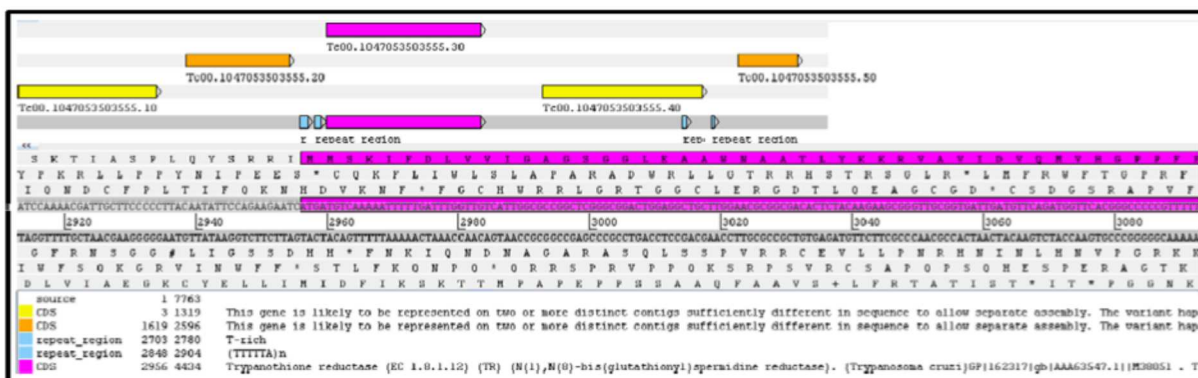


Figura 21. Saída gráfica da anotação estrutural e funcional do contig AAHK01004636, que possui o gene TcTR do *T. cruzi*, feita pelo programa Artemis. O gene de interesse TcTR corresponde ao retângulo na cor rosa.

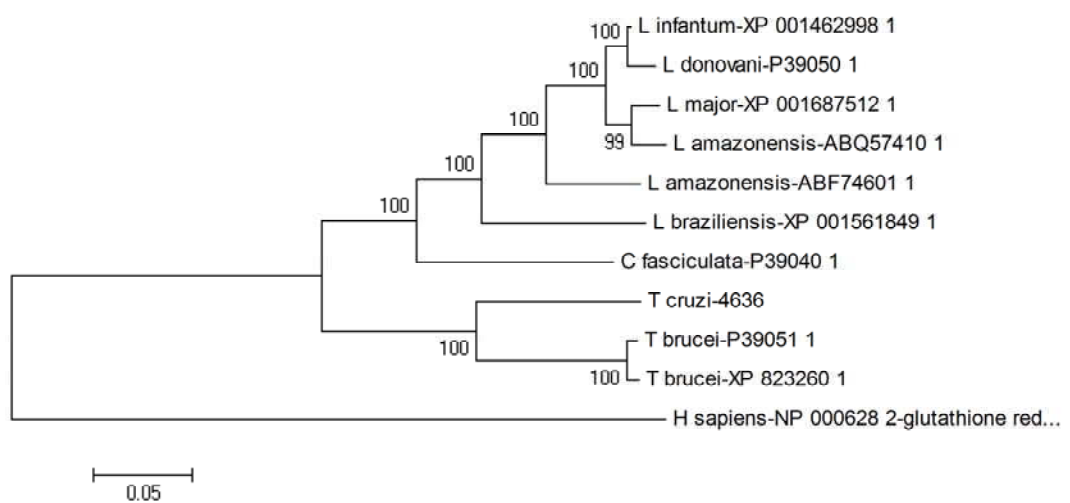


Figura 22. Relações filogenéticas entre a proteína TcTR dos tripanosomatídeos. O dendograma da proteína TcTR foi calculado pelo método Neighbor-Joining com análise de Bootstrap feita com 1000 réplicas. Como outgroup, foi utilizada a sequência de aminoácidos de uma glutathione redutase de *Homo sapiens*, já que esta espécie não possui tripanotona redutase. A barra de escala representa a distância genética 0.05 por sítio de substituição de nucleotídeo.

5 DISCUSSÃO

A quimioterapia específica da doença de Chagas, limitada ao BZ e ao NFX, apresenta baixa eficiência de cura, principalmente na fase crônica da doença e considerável toxicidade (Urbina & Docampo, 2003). Além disso, podemos citar a existência de cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes a estes compostos e o fenótipo de resistência cruzada entre BZ e NFX, agravando ainda mais a eficácia do tratamento clínico. É importante salientar também que não existe vacina contra a doença de Chagas. Todos estes pontos são de extrema relevância e direcionam para a busca de novos alvos para a quimioterapia da doença de Chagas (Castro et al., 1988; Piñeyro et al., 2005).

A habilidade de protozoários parasitas, como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* spp., *T. cruzi* e *T. brucei*, desenvolver resistência às drogas utilizadas para o seu tratamento demonstra a adaptabilidade genética destes parasitos. Provavelmente, o estresse da droga promove a seleção de estratégias apropriadas para escapar dos efeitos letais dos compostos. A ocorrência de resistência natural a diferentes drogas tem sido descrita em populações do *T. cruzi* (Brener et al., 1976; Filardi e Brener, 1987; Neal & Van Bueren, 1988). Alguns autores têm sugerido a seleção de parasitas resistentes, para explicar a persistência do parasita no hospedeiro vertebrado após um tratamento prolongado (Andrade et al., 1977, Veloso et al., 2001). Estudos mostraram também que a resistência a drogas pode ser selecionada *in vivo* durante a manutenção do parasita em camundongos tratados com BZ (Murta e Romanha, 1998) ou induzida *in vitro* sob pressão de droga (Nirdé et al., 1995; Villarreal et al., 2005; Wilkinson et al., 2008). Recentemente, Caldas e colaboradores (2008) demonstraram que a indução de resistência de cepas do *T. cruzi* ao BZ também pode ocorrer durante a infecção por longo tempo no hospedeiro vertebrado, na ausência do estresse da droga. Isto pode explicar, em parte, a baixa eficácia de cura observada em indivíduos com doença de Chagas crônica tratados com BZ.

Os mecanismos de resistência a drogas em protozoários parasitas já descritos (Ullman, 1995; Engel et al., 2000; Pradines et al., 2005), incluem: a diminuição da entrada da droga na célula, o aumento da sua eliminação, a diminuição da sua ativação e alterações na enzima alvo para diminuir a interação enzima-droga. Entretanto, estes mecanismos ainda não estão bem esclarecidos.

Dados da literatura mostraram que bombas de efluxo de drogas dependente de ATP como a fosfoglicoproteína de membrana (PGP), estão relacionadas com os mecanismos de resistência a drogas em alguns protozoários parasitas (Ullman, 1995). A associação da superexpressão dessa proteína na resistência a drogas foi descrita em *Leishmania* resistente ao arsenato e antimoniais (Legare et al., 2001) e em *P. falciparum* resistente a cloroquina

(Cowman et al., 1991). Entretanto, Murta e colaboradores (2001) observaram que o fenótipo de resistência do *T. cruzi* ao BZ não está associado com a amplificação ou superexpressão dos genes PGP. Além deste mecanismo, a resistência de *Leishmania* ao metotrexato pode ser explicada por vários mecanismos, incluindo a redução da entrada da droga na célula mediada pela modulação da expressão de uma série de transportadores de folato (Guimond et al., 2003). Os autores observaram que o gene do transportador de ácido fólico FT5 foi deletado na linhagem de parasitas resistentes ao metotrexato.

A expressão diferencial de genes como mecanismo de resistência a drogas também foi observada em outros tripanosomatídeos. Em *T. brucei*, a superexpressão do gene transportador ABC tipo MRPA resultou em um aumento de 10 vezes na resistência *in vitro* do parasita ao melarsoprol (Koning, 2008). Enquanto que em *L. tropica* resistente ao metotrexato, o gene DHFR-TS (Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintetase) estava amplificado no genoma do parasita. Assim, existem 3 mecanismos de resistência a drogas que normalmente ocorrem em *Leishmania* que são: a formação de amplicons extracromossômicos circular ou linear; eventos de deleção de genes que resulta na diminuição da expressão destes e o envolvimento da aneuploidia no genótipo de resistência a droga (Ubeda et al., 2008). Nestes parasitas pode ocorrer também a modulação dos níveis de RNA de um gene, sem mudanças no número de cópias de DNA. Mas este processo foi observado com pouca frequência (Ubeda et al., 2008).

Guimond e colaboradores (2003) estudaram a modulação da expressão de vários genes em mutantes de *Leishmania* resistentes a droga. Eles encontraram genes superexpressos, amplificados ou deletados nesses mutantes e descobriram novos genes nos parasitas resistentes ao metotrexato. Esses dados permitem que estudos sejam realizados para a descoberta de novos alvos para a quimioterapia e conseqüentemente o desenvolvimento de drogas eficazes contra os parasitas resistentes.

Estudos sobre os mecanismos de ação do NFX e do BZ em *T. cruzi* sugerem que estes compostos agem como pró-drogas, no qual o grupo nitro de ambos os compostos é reduzido para grupo amino por intermédio de nitroredutases, com a formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos (Wilkinson et al., 2008). O NFX pode agir como um agente da ciclagem redox, produzindo ânion superóxido (O_2^-) e este produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer a interação do H_2O_2 com o O_2^- produzindo o radical hidroxila (OH^\cdot). Todos estes radicais podem causar danos ao DNA (Olive, 1978), lipídeos e formar peróxido orgânico (Tappel, 1973; Docampo et al., 1981). No caso do BZ, provavelmente, seus metabólitos reduzidos estão envolvidos no mecanismo de ação através de ligações covalentes com componentes do parasita ou ligando ao DNA,

lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (Diaz de Toranzo et al., 1988; Aldunate & Morello, 1993; Maya et al., 1997 e 2003). O BZ pode atuar principalmente através da formação de conjugados proteína-droga ou tiol-droga (Maya et al., 2007; Irigoín et al., 2008). No entanto, é importante re-analisar este mecanismo para avaliar a concentração e localização da produção de O_2^- e o local onde estas drogas estão presentes. Além disso, é necessário utilizar novas metodologias para detecção de oxidantes e conhecer a biologia redox do *T. cruzi*.

Como anteriormente descrito, os compostos nitroheterocíclicos, como o BZ e NFX, são pró-drogas e necessitam de ativação para mediar a atividade citotóxica. Desta forma, fatores que reduzem/previnem este processo podem desencadear a resistência. Recentemente, Wilkinson e colaboradores (2008) mostraram que uma nitroredutase dependente de NADH (NTRI) apresenta um papel na ativação da droga. Os autores sugerem que o mecanismo de resistência do *T. cruzi* ao BZ e NFX pode ocorrer pela redução nos níveis de NTRI nos parasitos resistentes, enquanto que a superexpressão desta nitroredutase pode resultar na hipersensibilidade do parasito. Em concordância com este estudo, em nosso laboratório, Murta e colaboradores (2006) mostraram que a deleção de cópias do gene que codifica outra nitroredutase tipo I TcOYE (Old Yellow Enzyme, também chamada Prostaglandina Sintetase) está associada com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* ao BZ. Os autores observaram também uma redução de 7 vezes no nível de expressão desta enzima na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ. Estas nitroredutases podem ser responsáveis pela ativação do BZ. Nos parasitos resistentes que apresentam diminuição na expressão destas enzimas, a droga é pouco ativada e, portanto não é tóxica fazendo com que os parasitos resistentes sobrevivam mesmo sobre a pressão de droga.

Durante a infecção, o *T. cruzi* invade diferentes tipos de células e os parasitos são expostos a espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) e radical hidroxila (HO^\cdot), produzidos pelo próprio processo de respiração celular, ou por agentes externos como o sistema imune do hospedeiro e o metabolismo de drogas (Irigoín et al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio podem causar danos a vários componentes celulares, incluindo lipídeos de membrana e ácidos nucleicos, levando a morte do parasita. Para escapar deste dano celular por ROS, todos os organismos apresentam diferentes enzimas antioxidantes (Piñeyro et al., 2005). Existem diferentes vias de detoxificação de hidroperóxidos, com diferente especificidade ao substrato e em diferentes compartimentos como mitocôndria, glicossomo, retículo endoplasmático e citosol. No caso dos tripanosomatídeos, eles perderam as enzimas catalase e glutathione peroxidase dependente de selênio, que metabolizam rapidamente H_2O_2 (Flohé et al., 1999). Por outro lado, estes apresentam um sistema particular

de defesa antioxidante contra hidroperóxidos, caracterizados em diversos parasitas do gênero *Crithidia*, *Trypanosoma* e *Leishmania*, baseado no tiol de baixa massa molecular tripanotiona (Nogoceke et al., 1997; Krauth-Siegel et al., 2003). Em *T. cruzi*, as enzimas envolvidas no metabolismo de hidroperóxido dependente de tripanotiona estão sendo caracterizadas: glutaciona peroxidases dependente de cisteína, uma hemoperoxidase dependente de ascorbato e duas triparedoxina peroxidases (Wilkinson et al., 2000a, b; 2002).

Existe uma ampla evidência de que a sobrevivência e a virulência do parasita dependem do sistema de defesa antioxidante endógeno, que pode ser semelhante ou não a defesa antioxidante do hospedeiro. Dependendo do grau de parentesco dos sistemas do hospedeiro e parasito, as enzimas envolvidas na defesa antioxidante do parasito podem ser consideradas como alvos potenciais para drogas. Este conceito tem sido amplamente validado para o sistema tripanotiona em tripanosomatídeos (Flohé et al., 1999; Cota et al., 2008a; b).

Os membros da ordem Kinetoplastida, incluindo o *T. cruzi*, apresentam um mecanismo de detoxificação diferente daquele encontrado no hospedeiro vertebrado. Estes parasitos não apresentam as enzimas glutaciona peroxidase dependente de selênio e catalase, responsáveis pela detoxificação do peróxido de hidrogênio. Para compensar a ausência destas enzimas, os tripanosomatídeos utilizam um sistema antioxidante dependente de “tiol”, que elimina o peróxido de hidrogênio (Turrens, 2004). Participam do mecanismo de defesa antioxidante destes tripanosomatídeos as enzimas ferro-superóxido dismutase (FeSOD), triparedoxina peroxidase (TXNPx), ascorbato peroxidase (APX), tripanotiona redutase (TR) e glutaciona peroxidase dependente de cisteína (GPx). Elas estão distribuídas em compartimentos celulares diferentes e são ativas contra vários oxidantes (Turrens, 2004; Irigoín et al., 2008).

Em 2006, nosso grupo (Nogueira et al.) demonstrou um aumento no nível de expressão da proteína ferro-Superóxido dismutase-A (TcFeSOD-A) na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER), comparado com seu par sensível. Esta enzima participa da defesa antioxidante do parasita removendo o excesso de ânion superóxido em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio (Bannister et al., 1987). Como a defesa antioxidante é uma via metabólica que funciona sequencialmente em um mecanismo de cascata, nossa hipótese era que os parasitas resistentes poderiam também apresentar um aumento no nível de expressão das peroxidases para metabolizar o peróxido de hidrogênio gerado em excesso. Nossos resultados confirmaram esta hipótese, pois observamos um aumento no nível de expressão das proteínas triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial e ascorbato peroxidase em populações do *T. cruzi* resistentes ao BZ.

Dados da literatura mostraram que enzimas peroxidases podem ser essenciais para a sobrevivência de parasitas submetidos à pressão de drogas. *Entamoeba histolytica* resistente ao metronidazol apresentou um aumento de 3 vezes no nível de mRNA do gene TXNPx (Wassmann et al., 1999). Adicionalmente, quando parasitas foram transfectados simultaneamente com os genes ferro-superóxido dismutase e TXNPx, o nível de mRNA do gene TXNPx foi 20-30% maior comparado com os parasitas superexpressando apenas o gene TXNPx. Similarmente, Lin e colaboradores (2005) observaram em *L. amazonensis* resistente ao arsenato um aumento de 5 e 4 vezes no nível de transcrição dos genes cTXNPx e mTXNPx, respectivamente. Wyllie e colaboradores (2008) observaram um aumento de 6.5 e 1.8 vezes nas enzimas TXNPx citosólica e mitocondrial, respectivamente, em *L. tarentolae* resistente ao antimônio trivalente. Estes estudos corroboram com nossos resultados, que mostraram um nível de mRNA dos genes TXNPx citosólica e mitocondrial duas vezes maior na população resistente 17LER, comparada ao seu par sensível (17WTS).

Em *T. cruzi*, alguns estudos mostraram que a superexpressão das enzimas cTXNPx e mTXNPx protegem os parasitos dos danos causados pelo peróxido de hidrogênio, t-butil hidroperóxido e peroxinitrito (Wilkinson et al., 2000a; Finzi et al., 2004; Piacenza et al., 2008). No entanto, estudos demonstraram que o *T. cruzi* superexpressando estas peroxidases ou outras enzimas antioxidantes foram igualmente susceptíveis as drogas NFX e BZ, similar ao controle não-transfectado (Kelly et al., 1993; Wilkinson et al., 2000a, 2002). Este resultado pode refletir um desequilíbrio na defesa antioxidante dos parasitos transfectados, que superexpressam apenas uma das enzimas envolvidas na via de detoxificação de ROS. Além disso, outro possível fator que influencia os parasitos transfectados a serem susceptíveis a drogas pode ser a compartimentalização das enzimas responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante.

A compartimentalização das peroxiredoxinas em *T. cruzi* protege a célula contra os efeitos tóxicos do peróxido exógeno, indicando que estes oxidantes podem penetrar o citosol e a mitocôndria. Em células superexpressando enzimas peroxidases, o metabolismo de peróxido aumenta em ambos os compartimentos, protegendo contra o dano celular (Turrens, 2004). Devido a sua localização, a cTXNPx pode ser importante durante o estresse oxidativo gerado por fontes externas similar ao dano oxidativo de macrófagos, pois o primeiro produto de estresse oxidativo produzido no parasito deve ser no citosol. Enquanto que, no processo de estresse oxidativo gerado pela própria mitocôndria da célula, a mTXNPx pode ser mais ativa (Lyer et al., 2008).

Nossos dados mostraram que ambas cTcTXNPx e mTcTXNPx apresentam um nível de expressão de proteína duas vezes maior na população resistente 17LER, comparado com a

sensível 17WTS. Uma maior expressão de 5.5 vezes foi observada na forma homodimérica da proteína mTcTXNPx também na população resistente 17LER. Estes dados sugerem que o nível de expressão aumentado das proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx pode estar relacionado com o mecanismo de resistência do *T. cruzi* ao BZ. Em *L. amazonensis* resistente ao arsenato, Lin e colaboradores (2005) descreveram também um concomitante aumento do nível de expressão destas duas peroxiredoxinas. Outro estudo demonstrou um maior aumento na expressão da proteína cTXNPx em *L. tarentolae* resistente ao antimônio trivalente (Wyllie et al., 2008).

Estudos demonstraram que o *T. cruzi* superexpressando o gene cTXNPx foi mais infectante para macrófagos e camundongos produzindo peroxinitrito, do que os controles (Irigoin et al., 2008). Resultados similares foram obtidos em *L. donovani* transfectado com cTXNPx, que foram mais resistentes a oxidantes e mais virulentos a macrófagos, que células controle (Lyer et al., 2008). Piñeyro e colaboradores (2007) mostraram que a superexpressão de ambas as proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx tornam o *T. cruzi* mais resistente a defesa oxidativa de macrófagos. Além disso, a proteína recombinante TXNPx citosólica pode funcionar como um antígeno candidato a marcador da infecção sintomática ou assintomática de *L. infantum* na Leishmaniose canina visceral (Silvestre et al., 2008).

As peroxiredoxinas cTcTXNPx e mTcTXNPx estão expressas em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*, incluindo as formas infectantes (Piñeyro et al., 2007). O nível de expressão de ambas as enzimas é similar, indicando uma expressão constitutiva que pode ser essencial para o sucesso da infecção. Além disso, estes autores sugerem que as TXNPx podem ser consideradas como fatores de virulência relevante para a sobrevivência, replicação e diferenciação dos parasitos no interior da célula hospedeira. Jirata e colaboradores (2006) mostraram em *L. aethiopica* que a peroxiredoxina 1 (citosólica) foi predominantemente expressa na forma amastigota, enquanto que a peroxiredoxina 2 (mitocondrial) apresentou uma expressão constitutiva nos diferentes estágios de desenvolvimento deste parasito.

Nossos dados demonstraram a presença de dois transcritos do gene cTcTXNPx em amostras de *T. cruzi* do zimodema 1. Em contraste, as outras cepas do *T. cruzi* apresentaram apenas um transcrito, mostrando uma associação entre o número de transcritos e o zimodema, mas não com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a droga. Os dois transcritos observados para o gene cTcTXNPx pode ser devido a diferentes níveis de maturação do mRNA, diferenças no tamanho das regiões 5' e 3' UTR ou diferenças no tamanho da cauda poli-A do mRNA (Teixeira e DaRocha, 2003). Em *L. major* foi observado um transcrito de 1,6 Kb nas formas promastigotas e promastigotas metacíclicos de *L. major*. A detecção de um único transcrito sugere que não existem genes adicionais relacionados com as peroxiredoxinas. No entanto,

este fato não exclui a possibilidade de que genes transcreveram um mRNA com o mesmo tamanho ou genes que são quiescentes sob determinadas condições (Levick et al., 1998).

TXNPx pertence a família das peroxiredoxinas, apresentando domínios conservados com resíduos de cisteína na sua sequência de aminoácidos, responsáveis pela redução de peróxido. Em *T. cruzi*, a TXNPx possui uma estrutura decamérica organizada como um pentâmero de dímeros simétricos (Piñeyro et al., 2005). Nossas análises de western blot usando anticorpos policlonais anti-cTcTXNPx ou anti-mTcTXNPx mostraram a presença de dois polipeptídeos para cada anticorpo específico da TXNPx. Estes polipeptídeos correspondem as formas oxidadas (homodimérica) e reduzidas (monomérica) das proteínas cTcTXNPx ou mTcTXNPx. Alguns autores demonstraram a ocorrência de dois ou três polipeptídeos por SDS-PAGE, provavelmente representando dímeros ou tetrâmeros destas proteínas (Guerrero et al., 2000; Wilkinson et al., 2000a; Piñeyro et al., 2005; Piñeyro et al., 2008). Guerrero e colaboradores (2000) clonaram e expressaram a enzima cTcTXNPx de *T. cruzi*. Os autores observaram a presença de dois polipeptídeos, 23 kDa e 40 kDa, que foram reconhecidos em ensaios de western blot utilizando o anticorpo contra cTXNPx de *C. fasciculata*. O polipeptídeo de 40 kDa representa, provavelmente, um produto de dimerização que é observado em outras proteínas da família peroxiredoxina sob condições reduzidas (Flohé et al., 1999; Montemartini et al., 1999; Guerrero et al., 2000). No entanto, estes dois polipeptídeos não foram encontrados por Lopez e colaboradores (2000). Estes autores observaram uma banda polipeptídica de 21 kDa correspondente a cTXNPx.

Recentemente, nosso grupo descreveu uma análise proteômica de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ (Andrade et al., 2008). Dentre algumas proteínas selecionadas como diferencialmente expressas, os autores observaram que a triparedoxina peroxidase apresentou uma grande diferença de expressão (15 vezes) na população resistente. Esta diferença no nível de expressão da triparedoxina peroxidase obtida por nossas análises de western blot, de 2 e 5.5 vezes aumentada na população 17LER, comparado as análises de proteoma pode ser explicada pela especificidade e sensibilidade do anticorpo policlonal quando comparado com a metodologia de eletroforese bidimensional e também as formas reduzidas e oxidadas da proteína.

Análises da organização genômica do gene cTcTXNPx por Southern blot usando enzimas de restrição e análises de bioinformática sugerem que este gene está presente em sete contigs diferentes e possui múltiplas cópias (provavelmente oito) dispersas ao longo do genoma do parasito. Wilkinson e colaboradores (2000a) sugeriram que o gene cTcTXNPx do *T. cruzi* apresenta múltiplas cópias organizadas em tandem. Em *L. major*, este gene possui 8 a 13 cópias no genoma que estão organizadas em tandem como arranjos imperfeitos de

unidades repetidas, incluindo sequências intergênicas polimórficas e genes (Levick et al., 1998). Similar ao observado em *L. major*, a organização genômica do cTcTXNPx do *T. cruzi* pode apresentar também arranjos imperfeitos de repetição. Ávila e colaboradores (2001) mostraram que o gene metaciclogenina do *T. cruzi* está flanqueado por duas sequências em repetições em “tandem”. A expressão sincrônica de ambos os genes durante a metaciclogênese sugere uma interação funcional entre eles. Dados da literatura sugerem que o gene mTcTXNPx pode apresentar apenas uma cópia no genoma do *T. cruzi* (Wilkinson et al., 2000a). Entretanto, nossos dados de Southern blot e análises de bioinformática indicaram que o gene completo mTcTXNPx está presente em dois contigs diferentes, sugerindo a presença de duas cópias dispersas ao longo do genoma do parasito.

Alguns autores demonstraram que parasitos resistentes a drogas podem superexpressar genes como resultado da sua amplificação no genoma (Guimond et al., 2003; Nogueira et al., 2006). Por outro lado, alguns genes apresentaram um elevado nível de mRNA e proteína, sem amplificação no genoma (Guimond et al., 2003). Nossos resultados mostram que os genes c- e mTcTXNPx apresentam um nível de mRNA aumentado na população resistente 17LER, mas não estão amplificados no genoma do *T. cruzi*. Este aumento da transcrição pode ser explicado pela presença de mudanças nas regiões 3' ou 5' UTR ou mutações nos fatores *trans* (Guimond et al., 2003). É importante salientar que como esperado observamos uma relação positiva entre o aumento do nível de transcrição e tradução das proteínas c- e mTcTXNPx na população do *T. cruzi* resistentes ao BZ.

Estudos filogenéticos envolvendo genomas de tripanosomatídeos e que utilizam exclusivamente sequências de genes preditos *in silico* tem se mostrado bastante elucidativos com relação a diferentes aspectos da biologia desses organismos (El-Sayed et al., 2005b). Alvarez e colaboradores (1996) em seus estudos produziram árvores filogenéticas usando três genes que codificam proteínas (α tubulina, gliceraldeído-3-fosfato e tripanotiona redutase) e sugerem que tais genes pertencem a grupos monofiléticos distintos em *T. cruzi*. Tal constatação está associada à maior similaridade de sequências (sequência completa e/ou domínios) observada entre os genes de *T. cruzi* e *T. brucei* que não acontece com relação aos genes presentes, por exemplo, em *Leishmania* ou *C. fasciculata*.

Análises filogenéticas das proteínas preditas para os genes cTXNPx e mTXNPx foram realizadas comparando-se as sequências do *T. cruzi* com outros tripanosomatídeos. Nossos resultados sugerem que as cTXNPx e mTXNPx apresentam um alto nível de similaridade entre os trypanosomas (83 e 75%) quando comparado com as espécies de *Leishmania* e *C. fasciculata* (>69 e 67%). O fato das espécies *T. cruzi* e *T. brucei* estarem no mesmo agrupamento, sugere a monofilia do gênero *Trypanosoma*. Estes dados corroboram com os

resultados obtidos por Castro e colaboradores (2002) que mostraram a presença de grupos monofiléticos entre trypanosomas para ambas as proteínas cTXNPx e mTXNPx.

Nogoceke e colaboradores (1997) construíram uma árvore filogenética das proteínas da família peroxiredoxina. Eles observaram que a evolução molecular da peroxiredoxina envolveu todos os filos de bactérias até vertebrados, mas isto não reflete simplesmente a divergência filogenética das espécies. Provavelmente, algumas peroxiredoxinas de *T. brucei* e *L. mexicana*, por exemplo, foram adquiridas por endossimbiose de bactérias e integradas no genoma nuclear dos tripanosomatídeos. A evolução molecular demonstrou uma diversidade funcional da família peroxiredoxina, mostrando que estas proteínas não desempenham apenas a função de peroxidases ou proteínas antioxidantes (Montemartini et al., 1998).

Uma das particularidades observadas no *T. cruzi* é que seus cromossomas não se condensam durante a divisão nuclear (Solari, 1980). Entretanto, com a utilização da técnica de eletroforese de campo pulsado (pulse field gel electrophoresis - PFGE), foi possível verificar que o genoma do *T. cruzi* está organizado em pelo menos 20-25 bandas cromossômicas, variando de 0,45 a 1,6 Mb (Gibson & Miles, 1986; Henriksson et al., 1990, 1995 e 1996). Em 2005, El-Sayed e colaboradores ao realizarem o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* observaram que este parasita possui aproximadamente 28 cromossomas.

Em nossos estudos, utilizamos o PFGE para separar os cromossomas e fazer estudo de localização de genes. O resultados demonstraram que o gene cTcTXNPx está localizado em diferentes bandas cromossômicas, variando de 745 a 2.100 Kb dependendo da cepa do parasita. No entanto, a localização cromossômica deste gene não apresentou correlação com o fenótipo de resistência a droga. Na cepa CL Brener, observamos que este gene está localizado em cinco bandas cromossômicas (2.100, 1.990, 1.700, 922, 745 Kb). Entretanto, Wilkinson e colaboradores (2000a) sugerem que o gene cTcTXNPx está localizado em uma única banda cromossômica de 800 Kb na população CL Brener do *T. cruzi*. A diferença encontrada entre a localização cromossômica do gene cTcTXNPx entre Wilkinson e colaboradores (2000a) e os nossos dados podem ser explicados por diferenças metodológicas, tamanho da sonda utilizada na hibridização do Southern blot e as diferenças entre as cepas analisadas.

A pesquisa básica por vias metabólicas que são cruciais para a viabilidade ou infectividade do parasito e que são distintas daquelas encontradas no hospedeiro mamífero, pode promover um desenho racional de drogas (Irigoin et al., 2008). Os tripanosomatídeos apresentam duas enzimas no sistema de defesa antioxidante que não são encontradas em mamíferos, ascorbato peroxidase e tripanotiona redutase. Estas enzimas estão sendo estudadas e são essenciais para a sobrevivência de tripanosomatídeos expostos a ROS (Irigoin et al., 2008).

A superexpressão de componentes do sistema de defesa oxidativo dos tripanosomatídeos pode alterar a sensibilidade aos agentes tripanocidas e hidroperóxidos exógenos. Wilkinson e colaboradores (2002a) demonstraram que células do *T. cruzi* transfectadas com o gene TcAPX foram duas vezes mais resistentes a exposição de H₂O₂ exógeno, do que a linhagem selvagem. Em *L. major* superexpressando LmAPX, Dolai e colaboradores (2008) também observaram um aumento de 2,5 vezes na resistência ao H₂O₂ exógeno, diminuindo os níveis de ROS na mitocôndria. Em nosso estudo mostramos que a proteína TcAPX apresenta um nível de expressão duas vezes maior na população do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao BZ (BZR), comparada com seu par sensível (BZS). Nosso estudo mostra pela primeira vez uma associação da proteína TcAPX com o fenótipo de resistência de um parasito a drogas.

A expressão aumentada da TcAPX pode prevenir potencialmente danos letais que resultam da interação do H₂O₂ com componentes do retículo endoplasmático, onde a proteína está localizada. É interessante salientar que a APX de *L. major* apresenta uma região hidrofóbica de 22 aminoácidos na porção N-terminal da proteína que pode desempenhar um papel importante no controle da susceptibilidade ao H₂O₂ e na oxidação de ascorbato (Adak & Datta, 2005). Estes autores observaram também que a LmAPX possui uma inativação dependente de H₂O₂ na ausência de doadores de elétrons como ascorbato.

Dados da literatura mostraram que a LmAPX de *L. major* é muito instável em um sistema depletado de ascorbato (Adak & Datta, 2005). Entretanto, a LmAPX pode promover adaptações bioquímicas mostrando uma atividade pseudocatalase para degradar H₂O₂ exógeno durante o estresse oxidativo, quando o nível de ascorbato celular pode ser menor pelo metabolismo de radicais oxí (Dolai et al., 2007). Além disso, em baixas concentrações de ascorbato, a LmAPX pode catalisar a oxidação de H₂O₂ para oxigênio molecular em pH fisiológico (Dolai et al., 2007).

Nossos dados mostraram que o gene TcAPX apresentou dois transcritos (2.6 e 3.3 Kb) em todas as populações do *T. cruzi*, independente do fenótipo de resistência a drogas ou zimodema da cepa. Ao contrário, Wilkinson e colaboradores (2002a) encontraram apenas um transcrito (1.9 Kb) em epimastigotas da cepa CL Brener. Esta diferença no número e tamanho dos transcritos pode ser resultado de diferentes níveis de maturação do mRNA, diferenças no tamanho das regiões 5' e 3' UTR ou diferenças no tamanho da cauda poli-A do mRNA (Teixeira e DaRocha, 2003).

Dolai e colaboradores (2008) demonstraram que o nível de transcrição do gene LmAPX em *L. major* foi 6 vezes maior em parasitos que cresceram na presença de H₂O₂, comparado com o controle. Este resultado confirma a idéia dos autores de que a expressão do

gene LmAPX foi super-regulada em resposta ao H₂O₂. Resultados similares foram observados em cultura de células de soja tratada com H₂O₂ exógeno, alterando o nível de transcrição da APX (Lee et al., 1999). Wilkinson e colaboradores (2002a), em células do *T. cruzi* superexpressando o gene TcAPX, mostraram um aumento no nível de transcrição do mRNA de 5 vezes, comparado com as células não transformadas. Entretanto, em populações do *T. cruzi* resistentes ao BZ não observamos diferenças significativas no nível de mRNA do gene TcAPX.

Como os kinetoplastídeos perderam o controle da transcrição, eles apresentam algumas opções para a regulação da expressão gênica, como controle do splicing; poliadenilação; compartimentalização do RNA; controle da tradução e degradação de proteína e mRNA. Adicionalmente, altos níveis de mRNA e proteína podem ser obtidos com o aumento do número de cópias do gene (Clayton et al., 2008). No caso do gene TcAPX do *T. cruzi*, observamos apenas um aumento no nível de expressão da proteína na população resistente BZR, sem nenhuma alteração no número de cópias do gene nem aumento do nível de mRNA do gene TcAPX.

A disponibilidade das sequências do genoma do *T. cruzi* permitiu um melhor entendimento do contexto genômico e arranjo de genes nos contigs. Desta forma, nossas análises de bioinformática e Southern blot sugerem que o gene TcAPX apresenta duas cópias completas em contigs diferentes, dispersas ao longo do genoma do parasito. Ao contrário, Wilkinson e colaboradores (2002a) estudando a organização genômica do TcAPX propuseram que este gene apresenta uma única cópia no genoma do *T. cruzi*. A discrepância entre os resultados pode ser explicada pelo fato que no ano de 2002, o genoma deste parasito não estava totalmente sequenciado e que os resultados por Southern blot algumas vezes são inconclusivos. Em nossas análises ambas as técnicas apresentaram os mesmos resultados. Em *L. major*, Dolai e colaboradores (2008) revelaram a presença de apenas uma cópia do gene LmAPX no genoma do parasito.

Nossas análises de inferência filogenética sugerem que a proteína APX de *T. cruzi* e das espécies de *Leishmania* estão estreitamente relacionadas (57%), representando uma ramificação dicotômica, quando comparadas a APX de *A. thaliana* (25%), que inicialmente foi utilizada nos estudos de caracterização do sítio ativo da enzima. Esta análise sugere a presença de um grupo monofilético entre a APX de *T. cruzi* e a APX das espécies de *Leishmania*, uma vez que esta clade inclui todas as espécies descendentes de uma espécie ancestral.

Estudos evolutivos sugerem uma origem evolucionária comum das hemoperoxidasas de tripanosomatídeos e plantas, de onde podem ter divergido. Como uma possível evidência

de tal fato, temos algumas enzimas deste grupo, incluindo uma peroxidase dependente de glutationa do *T. cruzi*, que apresenta grande similaridade com aquelas encontradas em plantas e cuja origem pode estar relacionada a um evento de transferência gênica (Wilkinson et al., 2002a; b).

Desde que os tripanosomatídeos perderam a glutationa redutase e tioredoxina redutase, a tripanotiona redutase (TR) é a única enzima que conecta o sistema redox baseado em tiol e NADPH nestes parasitos. A TR não é responsável por metabolizar H_2O_2 , mas é fundamental para manter o ambiente intracelular reduzido, regenerando a dihidrotripanotiona ($T(SH_2)$) e permitindo a ação das enzimas APX e TXNPx citosólica e mitocondrial (Turrens, 2004).

É interessante ressaltar que a depleção de TR em *T. brucei* não é acompanhada por um aumento da regulação da biossíntese de tiol (Krieger et al., 2000), enquanto que a baixa regulação da síntese de $T(SH_2)$ promove um aumento de duas vezes na atividade da TR (Ariyanayagam et al., 2005). Provavelmente, células selvagens com 10% de atividade de TR podem sustentar o balanço redox de tiol em células na fase estacionária (Krieger et al., 2000). Em contraste, interferindo na biossíntese de $T(SH_2)$ observa-se um impacto mais severo na homeostase redox, que é parcialmente compensado pelo aumento da regulação da TR (Krauth-Siegel & Comini, 2008). A transfecção do gene TR em *T. cruzi* e *L. donovani* mostrou que a reação catalizada pela TR não está limitada a concentração de H_2O_2 (Kelly et al., 1993).

Em nosso estudo de caracterização da TR do *T. cruzi* mostramos que este gene apresenta um único transcrito de 1.0 Kb em todas as amostras analisadas. De acordo com dados densitométricos normalizados com o gene rRNA, não encontramos diferenças significativas no nível de mRNA do gene TcTR entre as amostras sensíveis e resistentes ao BZ. Tovar e Fairlamb (1996) observaram um transcrito de 2.1 Kb em *T. cruzi* transfectado com o gene TR. Eles mostraram também que as células transfectadas apresentaram um aumento de 4 a 10 vezes nos níveis de mRNA, proteína e atividade enzimática.

Nozaki e colaboradores (1996) caracterizaram a TR nas formas tripomastigota e epimastigota de cepas do *T. cruzi* sensíveis e com resistência induzida *in vitro* ao NFX. A resistência ao NFX observada nas formas tripomastigotas das cepas resistentes foi de 3 a 8 vezes maior comparada com as sensíveis, enquanto que na forma epimastigota a resistência ao NFX foi 10 vezes maior. Os autores não observaram diferença no nível de mRNA, na organização genômica e na sequência de nucleotídeos do gene da tripanotiona redutase entre as cepas sensíveis e resistentes ao NFX. Este resultado corrobora com nossos dados mostrando que não houve diferença no nível de mRNA, nem amplificação do gene TR em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

Em *L. donovani* com resistência natural ao antimônio, a TR foi 2 a 2.5 vezes amplificada no genoma do parasito resistente, comparado a cepa sensível. Esta amplificação foi acompanhada pelo aumento da atividade específica da TR. Os autores sugerem que o aumento nos níveis da TR pode ajudar a manter os níveis elevados de tripanotona reduzida, que é necessária para conjugar com antimônio para efluxo e retornar aos efeitos inibitórios do antimônio trivalente (Mittal et al., 2007). Estes dados indicam o possível envolvimento da TR na resistência a drogas em *Leishmania*.

Com relação à organização genômica, nossos resultados de bioinformática e Southern blot sugerem que o gene TcTR do *T. cruzi* apresenta apenas uma cópia no genoma do parasito. Similar a este resultado, Taylor e colaboradores (1994) observaram uma única cópia do gene TR no genoma de *L. donovani*. Os autores também observaram que os parasitos transfectados com o gene TR apresentaram um aumento no número de cópias, no nível de mRNA e na atividade enzimática da TR.

Análises filogenéticas do gene TR em *T. cruzi* realizadas por Alvarez e colaboradores (1996) revelaram pela matriz de distâncias uma maior similaridade de sequência com *T. brucei* (distância de 0.12) do que aquelas observadas em *Leishmania* e *C. fasciculata*, valores da matriz de distância de 0.29 e 0.25 respectivamente.

Mais recentemente, Castro-Pinto e colaboradores (2008) construíram um dendograma evidenciando as relações filogenéticas entre a TR de vários tripanosomatídeos. Em seus estudos foi observado que as sequências de aminoácidos das TR de *Leishmanias* do Novo Mundo (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*) formaram um grupo separado das espécies do Velho Mundo. Além disso, os autores constataram a presença do grupo monofilético do *Trypanosoma* para o gene TR, dados esses que confirmam nossos resultados.

As proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx apresentam um nível de expressão aumentado na população do *Trypanosoma cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ, enquanto a expressão da proteína TcAPX está maior na população do parasito com resistência *in vivo* ao BZ. Estes resultados mostram que o mecanismo de resistência em populações do *T. cruzi* naturalmente resistentes ou com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol é diferente daquele observado em populações do parasito com resistência induzida *in vitro* ao BZ.

A maioria dos estudos sobre os mecanismos de resistência a drogas em parasitos foram baseados em modelos produzidos pela indução artificial de resistência. Em contraposição, existem raros estudos sobre os mecanismos de resistência a drogas em amostras isoladas de pacientes resistentes (Ullman, 1995). Estudos comparativos da susceptibilidade entre cepas do *T. cruzi* a drogas demonstraram que não existe correlação entre a susceptibilidade *in vivo* e *in vitro* (Neal & Van Bueren, 1988; Scoth & Mathews, 1987; Ribeiro-Rodrigues et al., 1995;

Villarreal et al., 2005; Dos Santos et al., 2008). Esta ausência de correlação pode explicar, pelo menos em parte, diferenças nos mecanismos de resistência a drogas observado em populações do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* e selecionada *in vivo* ao BZ.

Em um estudo de expressão diferencial de genes do *T. cruzi*, Villarreal e colaboradores (2005) analisaram populações do parasito com resistência induzida *in vitro* e selecionada *in vivo* ao BZ. Em concordância com nossos resultados, os autores observaram que os mecanismos associados com resistência natural a drogas são diferentes daqueles encontrados na resistência induzida *in vivo*. Este fato pode ocorrer uma vez que a resistência do *T. cruzi* a drogas é um processo complexo entre os estágios do parasita, envolvendo não apenas mecanismos bioquímicos, mas outros elementos do sistema imune do hospedeiro que podem interferir na susceptibilidade do parasita a droga. Esta interação múltipla, parasita, droga e sistema imune têm sido descrita no tratamento de Tripanosomíase Africana e Leishmaniose (Target, 1985; Berger & Fairlamb, 1992). Murta e colaboradores (1999) observaram a existência de cooperação entre o tratamento com o BZ e a resposta imune do hospedeiro contra a infecção com *T. cruzi*.

Genes diferencialmente expressos ou eventos de mutação genética podem explicar a hipótese de que a resistência a drogas em parasitos é um fenômeno multigênico. Em *Plasmodium falciparum*, Sidhu e colaboradores (2002) observaram que a resistência deste parasito a cloroquina pode ocorrer por diferentes mutações pontuais no gene *pfcr1*. Em nossos estudos, mostramos que a expressão gênica diferencial de enzimas desidrogenases e proteínas do sistema antioxidante podem estar desenvolvendo a resistência do *T. cruzi* a drogas. No entanto, as enzimas da defesa antioxidante, possivelmente envolvidas na resistência do *T. cruzi* a drogas apresentam diferenças em relação ao tipo de resistência, cepa do parasito e a localização intracelular de cada proteína. O *T. cruzi* pode apresentar um mecanismo próprio de susceptibilidade ou resistência, de acordo com a situação que foi exposto. No caso de um estresse temporário, o parasito pode ser capaz de desenvolver mecanismos transientes. Enquanto que para níveis estabilizados ou altos de quimioresistência, comparado aos parasitos selvagens, eles podem iniciar novos mecanismos por um longo período de tempo (Villarreal et al., 2005).

O nosso resultado mostrando que o nível da proteína APX está aumentado na população do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao BZ pode ser explicado também pelo fato deste parasito invadir a célula do hospedeiro. O ambiente celular do hospedeiro pode interferir no aumento da expressão da APX, já que este fenômeno não foi observado na população do parasito com resistência induzida *in vitro* ao BZ. Alguns autores sugerem que a defesa antioxidante baseado em ascorbato pode ser essencial durante a infecção do *T. cruzi* e

Leishmania, comparado com *T. brucei* que aparentemente não possui a proteína APX e é uma parasita extracelular (Wilkinson et al., 2002a). O estudo desta via dependente de ascorbato em protozoários parasitos pode ser um potencial alvo para a quimioterapia.

Modelos produzidos pela indução artificial de resistência fornecem importantes informações em relação ao mecanismo de resistência (Ullman, 1995). O sistema *in vitro* pode permitir visualizar os mecanismos de resistência em um sistema mais limpo, como por exemplo, nutrientes do meio de cultura e concentração efetiva da droga definidos. Os modelos *in vitro* enfatizam alguns mecanismos moleculares que provavelmente também ocorrem *in vivo*, mas eles são difíceis de serem detectados em isolados de campo ou em amostras selecionadas *in vivo* devido a limitação na determinação do fenótipo, isolamento de amostras, manutenção dos parasitos *in vitro* e outros.

Em bactérias, leveduras e células de mamíferos há uma adaptação ao estresse oxidativo quando as células são inicialmente sujeitas a uma baixa concentração não tóxica de peróxido de hidrogênio e quando posteriormente são expostas a uma concentração sub-letal deste composto. Células podem desenvolver resistência através do aumento da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na proteção antioxidante e sistema de reparo (Steenkamp, 2002; Finzi et al., 2004). Baseado nos nossos resultados, sugerimos que a população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ exibe um aumento no nível da proteína TXNPx juntamente com outras enzimas associadas com o sistema de defesa antioxidante, como a TcFeSOD-A previamente descrita (Nogueira et al., 2006), protegendo estes parasitos resistentes contra o estresse oxidativo. Adicionalmente, na população do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao BZ observamos um aumento no nível de expressão da proteína TcAPX. Como estudos futuros para esta tese, pretendemos realizar ensaios funcionais, como transfecção de genes, para comprovar o possível envolvimento das enzimas da defesa antioxidante no fenótipo de resistência do *T. cruzi* ao benzonidazol.

6 CONCLUSÕES

- O nível de mRNA dos genes cTcTXNPx e mTcTXNPx é duas vezes maior na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) comparado com seu par sensível (17WTS);
- Os genes TcAPX e TcTR não apresentam diferenças significativas no nível de mRNA entre as populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ analisadas.
- Os genes cTcTXNPx, mTcTXNPx, TcAPX e TcTR não estão amplificados no genoma das cepas do *T. cruzi* analisadas independente do fenótipo de resistência a drogas;
- Análises de bioinformática e Southern blot sugerem que os genes cTcTXNPx e mTcTXNPx apresentam oito e duas cópias por genoma e os genes TcAPX e TcTR, possuem duas e uma cópia dispersas ao longo do genoma do *T. cruzi*.
- O gene cTcTXNPx pode estar localizado em vários cromossomas do parasito de acordo com o zimodema da cepa, independente do fenótipo de resistência a drogas. Ao contrário, o gene TcAPX está localizado em uma banda cromossômica em todas as populações do *T. cruzi* analisadas.
- As proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx estão duas vezes mais expressas na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER), em relação ao seu par sensível 17WTS, consistentes com os níveis de mRNA destes genes observados na mesma população resistente. Além disto, observamos que a proteína mTcTXNPx na sua forma oxidada demonstrou uma expressão 5.5 vezes maior na população 17LER, comparada ao par sensível.
- O nível de expressão da proteína TcAPX está duas vezes maior na população do parasito com resistência selecionada *in vivo* ao BZ (BZR), comparado ao seu par sensível.
- As relações filogenéticas das proteínas cTcTXNPx, mTcTXNPx, TcAPX e TcTR com os outros tripanosomatídeos mostram que todas as proteínas do *T. cruzi* analisadas estão estreitamente relacionados com *T. brucei*, com exceção da APX que não é encontrada neste parasito. A proteína TcAPX está mais relacionada com esta proteína em espécies de *Leishmania* do que com plantas.
- O nível de mRNA, o número de cópias dos quatro genes analisados e o nível de expressão das proteínas por eles codificadas são semelhantes para todas as cepas de *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao BZ.

Conclusão final

- Nossos resultados sugerem que as enzimas da defesa antioxidante podem estar participando do fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As proteínas cTcTXNPx e mTcTXNPx apresentam um nível de expressão aumentada na população do *Trypanosoma cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ, enquanto a expressão da proteína TcAPX está maior na população do parasito com resistência *in vivo* ao BZ. Estes resultados mostram que o mecanismo de resistência em populações do *T. cruzi* naturalmente resistentes ou com resistência selecionada *in vivo* ao BZ é diferente daquele observado em populações do parasito com resistência induzida *in vitro* ao BZ. Este fato pode ocorrer uma vez que a resistência do *T. cruzi* a drogas é um processo complexo entre os estágios do parasita, envolvendo outros elementos do sistema imune do hospedeiro que podem interferir na susceptibilidade do parasita a droga.

- Os resultados obtidos da caracterização da proteína Ascorbato peroxidase (TcAPX) em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ estão sendo organizados para serem submetidos à publicação. Além disto, pretendemos concluir os ensaios de caracterização da enzima tripanotiona redutase (TcTR), como determinar o nível de expressão desta proteína e realizar o ensaio de atividade enzimática em cepas do parasito sensíveis e resistentes ao BZ.

- Os resultados apresentados nesta tese abrem perspectivas para novas linhas de pesquisa. Pretendemos realizar ensaios funcionais, como transfecção de genes, para comprovar o possível envolvimento das enzimas da defesa antioxidante no fenótipo de resistência do *T. cruzi* ao BZ.

8 ANEXOS

Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole

Fernanda B. Nogueira · Jerônimo C. Ruiz ·
Carlos Robello · Alvaro J. Romanha ·
Silvane M. F. Murta

Received: 3 August 2008 / Accepted: 3 November 2008 / Published online: 19 November 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Antioxidant defense in Trypanosomatids has been indicated as a potential target for chemotherapy. Tryparedoxin peroxidase (TXNPx) participates in this defense by metabolizing hydrogen peroxide to water molecules. In this work, genes encoding both cytosolic (cTcTXNPx) and mitochondrial (mTcTXNPx) TXNPx were characterized in 15 benznidazole-susceptible and resistant *Trypanosoma cruzi* strains. Northern blot and real-time RT-PCR analyses revealed that the levels of cTcTXNPx and mTcTXNPx mRNA were two-fold higher in the in-vitro-induced resistant 17 LER *T. cruzi* population than its drug-susceptible counterpart 17 WTS. The mRNA levels for both genes were similar among the other *T. cruzi* samples studied. No amplification of these genes was observed in the parasite genome. In silico analyses indicated that cTcTXNPx and mTcTXNPx genes present eight and two copies, respectively, dispersed in the parasite genome. By western blot analysis, anti-cTcTXNPx and anti-mTcTXNPx polyclonal antibodies recognized a 23- and 25-kDa peptide, respectively, in all *T. cruzi* samples analyzed. The expression levels of these native proteins were similar for all samples except 17 LER, which displayed two-fold greater expression. In addition, the oxidized mTcTXNPx protein (50 kDa) demonstrated 5.5-fold greater expression in the 17 LER

population than 17 WTS. Our findings demonstrate increased expression of the cytosolic and mitochondrial TcTXNPx in the *T. cruzi* population with in-vitro-induced resistance to benznidazole.

Abbreviations

cTcTXNPx	cytosolic tryparedoxin peroxidase <i>T. cruzi</i>
mTcTXNPx	mitochondrial tryparedoxin peroxidase <i>T. cruzi</i>
TXNPx	tryparedoxin peroxidase
BZ	benznidazole
ROS	reactive oxygen species

Introduction

Chagas disease, which is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, constitutes a major public health problem in Latin America. It is estimated that 8 to 11 million people are infected with *T. cruzi*, and more than 100 million live in endemic regions (CDC 2007). The impact of Chagas disease is no longer limited to rural areas of Latin America in which vector-borne transmission occurs. Large-scale population movements from rural to urban areas and to other regions of the world have expanded the geographic distribution and changed the epidemiology of Chagas disease (CDC 2007).

Currently, there is no vaccine available and the medicines used for chemotherapy, a nitrofurantoin, nifurtimox (NFX—Bayer) and a 2-nitroimidazole, benznidazole (BZ—Roche), have low efficacy for treating the chronic phase of the disease and severe side effects (Urbina and Docampo 2003). BZ acts via reductive stress, which involves the covalent

F. B. Nogueira · J. C. Ruiz · A. J. Romanha · S. M. F. Murta (✉)
Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular,
Centro de Pesquisas 'René Rachou', FIOCRUZ,
Av. Augusto de Lima 1715,
30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil
e-mail: silvano@cpqrr.fiocruz.br

C. Robello
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad de la República,
Uruguay and Institut Pasteur de Montevideo,
Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo Mattojo,
2020-11400 Montevideo, Uruguay

modification of macromolecules such as DNA, proteins, and lipids by reduced nitro intermediates (Docampo 1990). BZ and its metabolites are also thought to affect trypanothione metabolism in *T. cruzi* (Maya et al. 1997).

T. cruzi strains susceptible and naturally resistant to BZ and NFX have been described previously (Filardi and Brener 1987; Murta et al. 1998; Toledo et al. 2004). Part of the failure to cure chagasic infection after treatment may be due to differences in the drug susceptibility of the *T. cruzi* strain and/or the genetic diversity of host (Filardi and Brener 1987). Different protocols have been described in the literature for development in vitro *T. cruzi* strains resistant to NFX (Nozaki et al. 1996) and BZ (Nirde et al. 1995). However, comparative studies of drug susceptibility between *T. cruzi* strains detected no correlations between drug susceptibility in vitro and in vivo (Neal and Van Bueren 1988). In a previous study, we selected and biologically characterized an in-vivo-selected BZ-resistant population and *T. cruzi* clones (Murta and Romanha 1998). Recently, the deletion of copies of the genes encoding two different nitroreductases, type I: old yellow enzyme (TcOYE), also named prostaglandin synthase (Murta et al. 2006) and NTR-1 (Wilkinson et al. 2008), has been associated with in vitro BZ and NFX resistance in *T. cruzi*. However, the mechanism of drug resistance in this parasite remains poorly understood, especially in those parasites with in-vivo-selected and natural resistance to BZ.

To avoid cellular damage caused by reactive oxygen species (ROS), organisms have developed different antioxidant defense systems that include antioxidant enzymes and low molecular weight antioxidants (Turrens 2004). Trypanosomatids, especially *T. cruzi*, have a unique system of antioxidant enzymes that are dependent on the thiol trypanothione (N^1N^8 -bisglutathionylspermidine), which removes peroxides via the trypanredoxin pathway to regulate oxidative (Turrens 2004). The antioxidant enzymes work sequentially in different sub-cellular compartments of *T. cruzi* to promote hydroperoxide detoxification (Wilkinson et al. 2000).

Trypanredoxin peroxidase (TXNPx) belongs to a widespread family of peroxiredoxins, which are found in different organisms performing distinct functions including general cell detoxification and specific signaling during proliferation or differentiation processes (Hofmann et al. 2002). In parasites, TXNPx catalyzes the reduction of H_2O_2 or small-chain organic hydroperoxides to water or alcohols, respectively, and a peroxynitrite reductase activity has been reported in trypanosomes (Trujillo et al. 2004). These enzymes use trypanredoxin, a thioredoxin-related protein, as an electron donor, which is in turn reduced by dihydrotrypanothione. Trypanothione is maintained in its reduced form (T(SH₂)) by the action of trypanothione reductase and the NADPH cofactor (Turrens 2004).

The peroxiredoxin of trypanosomatids differs from that of mammals because it is dependent on trypanothione. TXNPx has been studied in the protozoans *Crithidia fasciculata* (Montemartini et al. 1998), *T. brucei* (Tetaud et al. 2001), *Leishmania* spp. (Castro et al. 2002; Lin et al. 2005), and *T. cruzi* (Wilkinson et al. 2000; Lopez et al. 2000), and is located in the cytosol (cTcTXNPx) or mitochondria (mTcTXNPx) of these trypanosomatids.

cTcTXNPx and mTcTXNPx present two domains that are common to subgroup 2-Cys, which is present in antioxidant enzymes from the peroxiredoxin family (I and II region). These domains have cysteine residues that are responsible for the peroxidase activity. The amino acid sequences of the I region are identical for both enzymes; however, they differ for region II. These differences in the II region do not interfere with the antioxidant activity (Piñeyro et al. 2005).

In this work, we evaluated the levels of transcription of the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes, as well as their copy numbers, chromosomal locations, and protein expression levels in 15 BZ-susceptible or resistant *T. cruzi* strains and clones.

Materials and methods

T. cruzi strains

Fifteen *T. cruzi* strains and clones were used in this study. The in-vitro-induced resistant *T. cruzi* population 17 LER was derived from the susceptible Tehuantepec cl2 strain 17 WTS (Nirde et al. 1995). The 17 LER parasites were maintained in the presence of 220 μ M BZ, which corresponds to a dose of BZ 23 times greater than that required to kill 50% of the 17 WTS parasites. The in-vivo-selected resistant *T. cruzi* population BZR was derived in a previous study (Murta and Romanha 1998) from the susceptible Y strain (BZS). Resistant BZR parasites were maintained in mice treated with a single high dose of BZ (500 mg/kg body weight) administered orally at the peak of parasitemia. Mice were bled 6 h after drug administration and the blood was seeded in LIT medium at 28°C in order to obtain a parasite mass. We also used two clones –9 S, a susceptible clone derived from BZS, and –27 R, a resistant clone derived from BZR.

The in vivo susceptibility of the remaining nine strains of *T. cruzi* to BZ and NFX has been characterized previously (Filardi and Brener 1987). Of these strains, six were susceptible (CL Brener, Berenice, Quaraizinho, Gilmar, Buriti, and Romano) and three were naturally resistant (Colombiana, VL-10 and Noel) to both drugs. All *T. cruzi* strains were previously classified as zymodemes Z1, Z2, or ZB, according to their isoenzyme patterns (Murta et al. 1998).

RNA and DNA preparations

The protocols used for the preparation of total RNA and DNA from *T. cruzi* were as previously described (Nogueira et al. 2006). About 10 µg of total DNA from different *T. cruzi* strains was digested with the restriction enzymes *Bgl*II and *Kpn*I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The DNA and RNA fragments were separated by electrophoresis in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), photographed, and blotted onto nylon membranes (Nogueira et al. 2006). Southern and northern blots were hybridized with ³²P-labeled cTcTXNPx and mTcTXNPx probes, according to a previously described protocol (Murta et al. 2006).

Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed according protocol described by Nogueira et al. (2006). The cDNA was used for real-time PCR amplification in an ABI Prism 7000—Sequence Detection System SDS (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The specific primer sequences RT TcTXNPc1 forward: 5'-GTTGAGACGTGCGGTGAATA-3'; and RT TcTXNPc2 reverse: 5'-GGCGTTTTTC AAAGTCCTTG-3'; were selected from the complete nucleotide sequence of cTcTXNPx (GenBank Accession number AJ012101) using the Primer Express software (PE Applied Biosystems). The complete nucleotide sequence of the mTcTXNPx (GenBank Accession number AJ006226.1) gene was used to select the specific primer sequences TXNPm rTPCR1 forward: 5'-GCGACAGCCAATATTCACACCT-3' and TXNPm rTPCR1 reverse: 5'-CGCAGAA TCCCTTTATCGTCAA-3'. The *T. cruzi* housekeeping unicyclic gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (TcHGPRT) was used to normalize the amount of sample (Nogueira et al. 2006). Standard curves were prepared for each experiment using known quantities of TOPO PCR 2.1 plasmids (Invitrogen) containing the cTcTXNPx, mTcTXNPx, and TcHGPRT genes. Raw products were quantified using the Sequence Detection System data analysis software and normalized to the TcHGPRT values for each sample.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

The *T. cruzi* chromosomes were separated by PFGE in a gene navigator TM system (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK), as previously described (Murta et al. 2006). After testing different electrophoresis conditions and switch times, the best condition for cTcTXNPx was: 70 s for 15 h, 90 s for 24 h, 200 s for 15 h, and 400 s for 15 h at 180 V. After electrophoresis, the gels were transferred onto Hybond nylon membranes (Amersham) as described by the manufacturer. The membranes were

hybridized with the ³²P-labeled cTcTXNPx gene probe, according to the protocol described below.

Probes and hybridization

Probes for Southern and northern blot assays were obtained by amplifying DNA from the Y strain by PCR with primers specific for the *T. cruzi* cTcTXNPx and mTcTXNPx genes. Primer cTcTXNPx forward: 5'-GAGGTGCTTGCATGCTCCA-3' and reverse: 5'-ACACCTCGCCATGCTTCTCC-3' and primer mTcTXNPx forward: 5'-AAATACACGGCCACTGTTGT-3' and mTcTXNPx reverse: 5'-GTCCAGGTTAAGAAGTCGCA-3'. Amplification was carried out as previously described (Murta et al. 2006). After amplification, the PCR products were recovered from the agarose gel, purified, and labeled with [α -³²P] dCTP using a random priming procedure. Blots were pre-treated and hybridized with a specific probe according to a previously described protocol (Nogueira et al. 2006).

Cloning of the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes

A 599-bp segment corresponding to an open reading frame (ORF) of the cTcTXNPx gene from the complete nucleotide sequence (GenBank Accession number AJ012101) was amplified using primers: TXNPQE1 forward: 5'-CGCGTTCGACATGTCCTGCGGAGACGCAAA-3' and TXNPQE2 reverse: 5'-CCCAAGCTTTCTACGCGACAGCACC AAAGT-3'. The underlined sequences correspond to *Sal*I and *Hind*III restriction sites, respectively, to facilitate cloning. A 650 bp sequence corresponding to an ORF of the mTcTXNPx gene was amplified using primers: TxmitopGEX1: 5'-CGCGGATCCCCATGTTTCGTGCGTATG GCCGT-3' and TxmitopGEX2: 5'-CCGGAATTCTTCTCAAATATTCATTTGC-3'. The underlined sequences correspond to *Bam*HI and *Eco*RI restriction sites, respectively. PCR amplification was carried out with genomic DNA from the *T. cruzi* 17 WTS strain using the following program: 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 5 min. The PCR products encoding cTcTXNPx or mTcTXNPx were digested with restriction enzymes and then inserted into the corresponding sites of the pQE-31 and pGEX expression vector, respectively (Qiagen, Valencia, CA, USA).

Purification of reTcTXNPx recombinant protein and production of polyclonal antiserum

The *Escherichia coli* BL21 strain was transformed with the pQE31-cTcTXNPx and pGEX-mTcTXNPx construct. Transformed cells were cultured for 4 h in the presence of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG—Promega, Madison, WI, U.S.A.) at 30°C and then harvested and lysed.

The 6× His-tagged recombinant protein produced in *E. coli* BL21 was purified using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) coupled to sepharose (Qiagen). The mTcTXNPx GST-tagged recombinant protein was purified by electroelution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cTcTXNPx polyclonal antiserum immune production was performed as previously described (Nogueira et al. 2006). The anti-mTcTXNPx polyclonal antibody was provided by Dr. Carlos Robello (Piñeyro et al. 2008).

Western blotting analysis

Total protein from different *T. cruzi* strains was obtained as previously described (Nogueira et al. 2006). Proteins (20 µg) were separated by electrophoresis in 12% SDS polyacrylamide gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were treated according to Nogueira et al. (2006). The anti-cTcTXNPx and anti-mTcTXNPx antisera were used at dilutions of 1:5,000 and 1:2,000, respectively.

Densitometric and statistical analysis

All Southern and northern autoradiograms and western blot membranes were photographed and analyzed using ImageMaster VDS software (Pharmacia Biotech). Differences were considered significant when the intensity band ratio was equal to or higher than twofold.

Bioinformatic analyses

The *T. cruzi* clone CL Brener genome sequence used in the in silico analysis described in this work was obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/>.

A locally compiled DB of *T. cruzi* sequences was built by parsing sequences from Genbank, GeneDB <http://www.genedb.org>, and The Institute for Genomic Research (TIGR), and used for sequence similarity searches. Similarity searches against this locally compiled DB were carried using the BLAST (Altschul et al. 1990) algorithm.

We used the previously described sequences of cTcTXNPx (Wilkinson et al. 2000; AJ012101) and mTcTXNPx (Wilkinson et al. 2000; AJ006226.1) to scan the local compiled *T. cruzi* DB for contigs presenting similarities against the query sequences. Blast hits presenting a minimum identity of 90% over a 100-nucleotide stretch were selected for further manual annotation. For cTcTXNPx, we identified nine potential contigs (AAHK01017795; AAHK01001715; AAHK01006290; AAHK01005376; AAHK01003652; AAHK01001127; AAHK01005566; AAHK01002353; AAHK01003652), and for mTcTXNPx,

we identified 4 (AAHK01005244; AAHK01001562; AAHK01017300; AAHK01001473).

The annotation and graphical output of the contigs was performed using ARTEMIS software (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) and in-house developed PERL (Practical Extraction and Report Language) scripts to analyze and format the results. All in silico searches and analyses described above were carried out in a local server using an in-house copy of the DBs and software.

Global multiple sequence alignments were performed using Clustal-W (Thompson et al. 1994), followed by visual inspection and manual adjustment with SeaView (Galtier et al. 1996) <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html> and GeneDoc <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>.

Results

T. cruzi cTcTXNPx and mTcTXNPx mRNA levels

We investigated the mRNA levels of *T. cruzi* cytosolic and mitochondrial TcTXNPx enzymes by northern blotting and real-time RT-PCR analysis. The hybridization profile with the ³²P-labeled cTcTXNPx gene specific probe showed the presence of two transcripts, one of 1.1 kb and other of 1.4 kb in size, in *T. cruzi* samples from Zymodeme 1 (Z1) or *T. cruzi* group I: 17 WTS, 17 LER, and Colombiana (Fig. 1a). The other samples belonging to zymodemes Z2 and ZB, *T. cruzi* group II, presented a transcript of 1.4 kb. The hybridization profile of the mTcTXNPx gene was similar for all *T. cruzi* samples, presenting a transcript of 0.85 kb (Fig. 1b).

A ribosomal RNA gene probe was used as a quantitative control for both the c- and m-TcTXNPx genes (Fig 1a and b). Densitometric analyses of band intensities normalized to the rRNA profile indicated a two-fold increase in the mRNA level of both c- and m-TcTXNPx genes in the *T. cruzi* population with in-vitro-induced resistance to BZ (17 LER) compared to its susceptible pair (17 WTS). No differences were observed in the transcription levels of these genes for the other *T. cruzi* strains regardless of their drug-resistance phenotype.

The mRNA levels of c- and m-TcTXNPx were quantified by real-time RT-PCR for eight *T. cruzi* strains. Number of cDNA molecules (copy number) were normalized by comparison with those obtained for the single-copy *T. cruzi* housekeeping gene TcHGPRT. The results indicate that the number of c- and m-TcTXNPx cDNA molecules in the 17 LER population was two-fold higher than that in the 17 WTS population (Fig. 1c and d). No differences were observed in the levels of c- and m-TcTXNPx transcription for the other *T. cruzi* strains regardless of their drug-resistance phenotype or zymodeme.

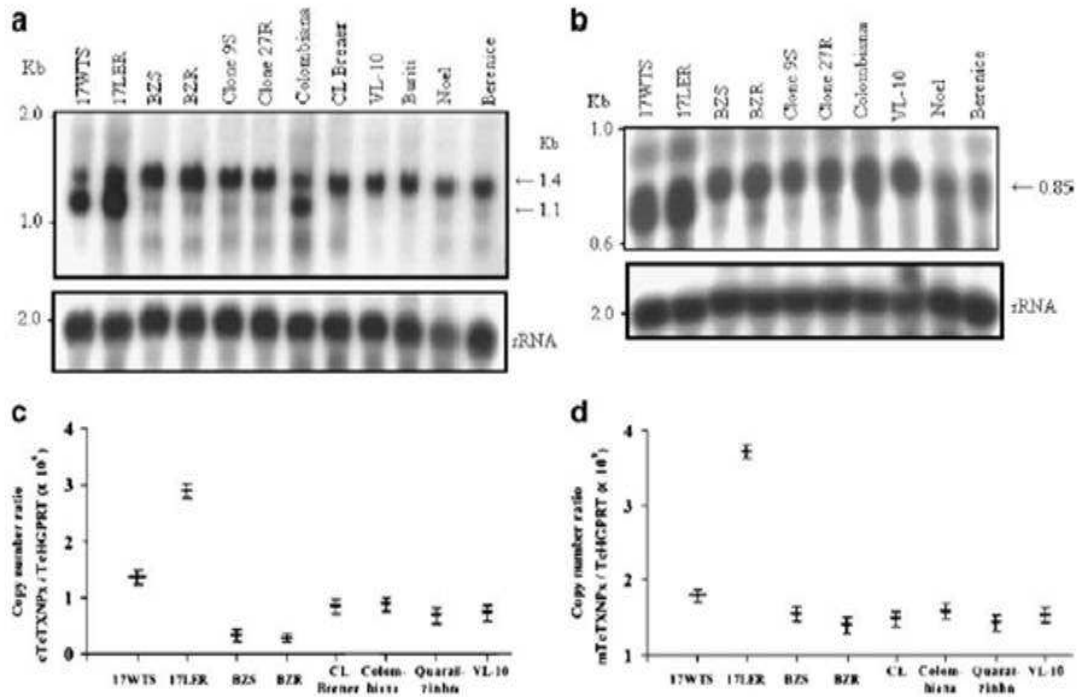


Fig. 1 Levels of cTcTXNPx and mTcTXNPx mRNA in benzimidazole-resistant and susceptible *T. cruzi* strains. Northern blot profile of total RNA extracts from the *T. cruzi* strains obtained using a ³²P-labeled cTcTXNPx (a) and mTcTXNPx (b) specific probe. Number of cDNA molecules (copy number ratio) of cTcTXNPx (× 10⁶) (c) and

mTcTXNPx (× 10⁵) (d) genes in each of the *T. cruzi* populations tested. Values were normalized to those obtained for TcHGPR1 and are given as the means (±S.D.M.) of triplicate real-time RT-PCR analyses from three independent experiments

Genomic organization, copy number, and bioinformatic analyses of the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes

We also determined the genomic organization and copy number of c- and m-TcTXNPx genes in the susceptible and resistant *T. cruzi* strains. Southern blot analysis of parasite genomic DNA digested with *Bgl*III, which has one restriction site within the cTcTXNPx gene, hybridized with a specific probe revealed three fragments of 1.9, 2.9, and 6.7 kb in the 17 WTS, 17 LER, and Colombiana populations, respectively (Fig. 2a). The BZS and BZR populations demonstrated these same fragments, except for a small fragment that was 2.4 kb instead of 1.9 kb. Interesting, the CL Brener strain from zymodeme B-hybrid parasite, presented both Z1 and Z2 profiles (Fig. 2a). These results indicate the presence of a polymorphism in the cTcTXNPx gene sequence that seems to be related to the *T. cruzi* zymodeme rather than its drug-resistance phenotype. Hybridization of blots containing DNA digested with *Kpn*I, which has no restriction sites within the gene sequence, demonstrated a single band of 6.7 kb for all samples (Fig. 2b).

Southern blot analysis of DNA digested with two restriction enzymes (*Hinf*I, for which there is a restriction site within mTcTXNPx, and *Xho*I, for which there is not) and hybridized with the specific probe, showed bands of

0.3, 0.56, and 0.77 kb for all samples (Fig. 2c), whereas *Xho*I-digested DNA contained only one band of 8.6 kb (Fig. 2d). Densitometric analysis of the bands showed no amplification or differences in copy number of either gene.

The copy number of the c- and m-TcTXNPx genes in the *T. cruzi* populations was also determined by real-time PCR. Assuming that one *T. cruzi* parasite contains 0.33 pg of DNA (Moser et al. 1989) and that TcHGPR1 is a single-copy gene (Allen and Ullman 1994), cTcTXNPx and mTcTXNPx copy numbers were estimated using 200, 100, 50, and 25 ng of genomic DNA from the 17 WTS and 17 LER populations. The results show that the copy number ratio of the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes were the same for the 17 WTS and 17 LER populations (data not shown), indicating that these genes are not amplified in the genome of BZ-resistant parasites. These data are in agreement with those obtained by Southern blot analysis.

With the goal of a complete characterization of the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes, we carried out several in silico analyses together with the experimental approaches. Initially, the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes sequences were compared against the local compiled database (according described in section 2.10) and 13 contigs were identified. Since that some contigs contained incomplete annotation in the database, we performed manual annotation and sequence analyses. The results

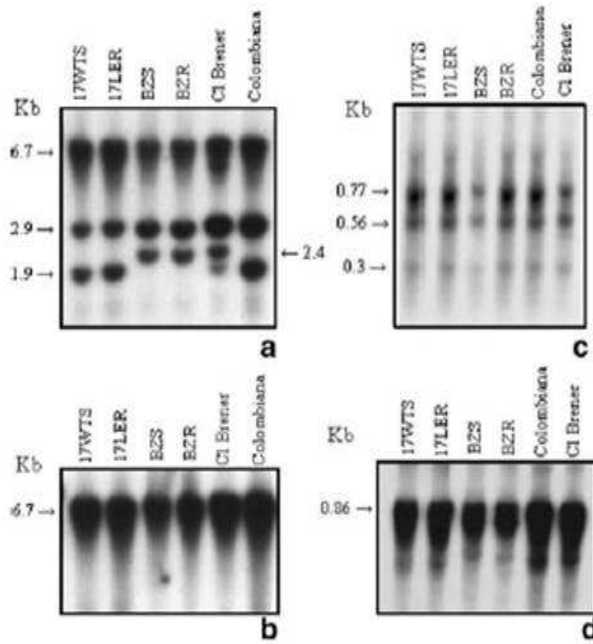
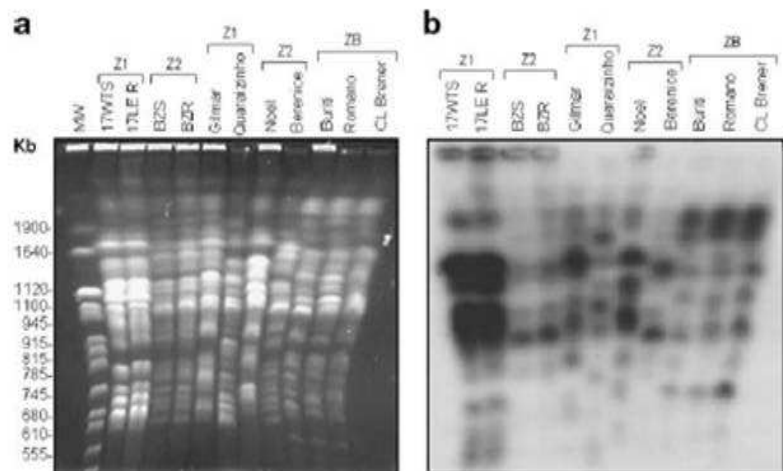


Fig. 2 Southern blot analysis of the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes from benzimidazole-susceptible and -resistant *T. cruzi* populations. Total DNA extracts (5 µg) were digested with *Bgl*II (a), *Kpn*I (b), endonucleases for cTcTXNPx and *Hinf*I (c), and *Xho*I (d) for mTcTXNPx genes. Southern blots were hybridized with a ³²P-labeled cTcTXNPx and mTcTXNPx-specific probe. The molecular weight markers (kb, left-hand side) were derived from λ phage DNA digested with *Hind*III and φX 174 DNA digested with *Hae*II. The strains used are listed in Table 1

indicated that seven (AAHK01017795; AAHK01001715; AAHK01006290; AAHK01003652; AAHK01001127; AAHK01005566; AAHK01002353) and two (AAHK01005244; AAHK01001562) contigs containing full copies of the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes, respectively. The AAHK01001127 contig contains two full copies of the cTcTXNPx gene. Although the *T. cruzi* data presented in the databases reflects a draft of the genome

Fig. 3 Chromosomal location of the cTcTXNPx gene in the *T. cruzi* strains with different zymodeme and drug-resistance phenotypes. **a** Chromosomal bands from the *T. cruzi* strains were separated by PFGE and stained with ethidium bromide. **b** Southern blots of the chromosomes using a ³²P-labeled cTcTXNPx-specific probe. Whole chromosomes from *Saccharomyces cerevisiae* were used as molecular weight markers



assembly (El-Sayed et al. 2005), we can suggest based on the in silico analyses that the cTcTXNPx and mTcTXNPx genes present eight and two full copies per haploid genome, respectively, with both being dispersed throughout the parasite genome.

The in silico restriction map analysis performed with *Bgl*II, *Kpn*I, and *Eco*RI for the cTcTXNPx gene and *Hinf*I, *Xho*I, and *Eco*RI for the mTcTXNPx gene (data not shown) was confirmed by wet lab experiments using parasite genomic DNA digested with the same endonucleases.

Chromosomal location

Chromosomal localization of the cTcTXNPx gene in the *T. cruzi* genome was examined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Figure 3a shows that the size and number of the chromosomes differed markedly among the *T. cruzi* strains. Chromosomes hybridization with the cTcTXNPx-specific probe showed that this gene is present in chromosomal bands that range from 745 to 2,100 kb (Fig. 3b, Table 1). No correlation between the chromosomal location of the cTcTXNPx gene and the drug-resistance phenotype was observed. However, in *T. cruzi* strains from the ZB zymodeme (Buriti, Romano and CL Brener), the cTcTXNPx gene was located on the same chromosomal bands (Fig. 3b and Table 1).

cTcTXNPx and mTcTXNPx protein expression

A 6× His-tagged recombinant cTcTXNPx protein was generated and used as an antigen for producing rabbit anti-cTcTXNPx polyclonal antibodies. These antibodies were used for western blotting to evaluate the level of enzyme produced by each *T. cruzi* strain. Western blot analyses using total extracts of *T. cruzi* proteins showed that the anti-cTcTXNPx polyclonal antibody recognized a polypeptide of 23 kDa in all samples, corresponding to

Table 1 *Trypanosoma cruzi* populations and clones used in this study

<i>T. cruzi</i>	Origin ^a	Host	Sus. ^b	Z. ^c	cTcTXNPx Chromosomal location (kb)
17 WTS	Mex	Triatomine	S	1	2,100; 1,700; 1756; 1,120; 922
17 LER	Mex	Triatomine	R	1	2,100; 1,700; 1,756; 1,120; 922
Colombiana	Col	Human C. P.	R	1	ND
Quaraizinho	RGS	<i>T. infestans</i>	S	1	1,990; 1,500
Gilmar	MG	Human A. P.	S	1	1,700; 1,170
BZS	SP	Human A. P.	S	2	922
BZR	SP	Human A. P.	R	2	922
Clone 9 S	SP	Human A. P.	S	2	ND
Clone 27 R	SP	Human A. P.	R	2	ND
VL-10	MG	Human C. P.	R	2	ND
Berenice	MG	Human C. P.	S	2	1,700; 922
Noel	MG	Human A. P.	R	2	1,720; 1,756; 1,170
Cl Brener	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	2,100; 1,990; 1,700; 922; 745
Romano	Arg	Human A. P.	S	B	2,100; 1,990; 1,700; 922; 745
Buriti	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	2,100; 1,990; 1,700; 922; 745

Chromosomal location of cTcTXNPx gene

Mex Mexico, SP São Paulo, BA Bahia, SC Santa Catarina, Arg Argentina, GO Goiás, RGS Rio Grande do Sul, Col Colombia, MG Minas Gerais, SP, BA, SC, GO, RGS, and MG are different states of Brazil, S susceptible, R resistant, ND not done, A.P. acute phase, C.P. chronic phase

^aOrigin

^bSus, in vivo drug susceptibility to BZ and NFX as previously described (Filardi and Brener 1987)

^cZ, zymodeme classification as previously described (Murta et al. 1998)

the native protein, and a 25 kDa polypeptide representing the recombinant protein (Fig. 4a). Additionally, this antibody recognized a 46 kDa polypeptide in some samples. This polypeptide probably corresponds to oxidized, homodimeric form of the cTcTXNPx protein. In order to quantify the expression level of cTcTXNPx in each strain, the same membrane was incubated with anti-rTcHSP70 polyclonal antibody. The expression level of TcHSP70 protein has been observed to be equal in both BZ-susceptible and -resistant *T. cruzi* populations (Murta et al. 2008). Densitometric analysis of the cTcTXNPx band

using TcHSP70 as a reference showed that the level of cTcTXNPx protein expression was similar for all samples tested except 17 LER, which exhibited a two-fold higher level than 17 WTS (Fig. 4a).

Western blot analysis using the anti-mTcTXNPx polyclonal antibody showed that it recognized 25 and 50 kDa polypeptides in all *T. cruzi* samples studied. These polypeptides correspond to the native protein and the oxidized, homodimeric form of the mTcTXNPx protein, respectively (Fig. 4b). The GST-tagged recombinant mTcTXNPx protein of 54 kDa was used as a positive control. Densitometric analysis of the

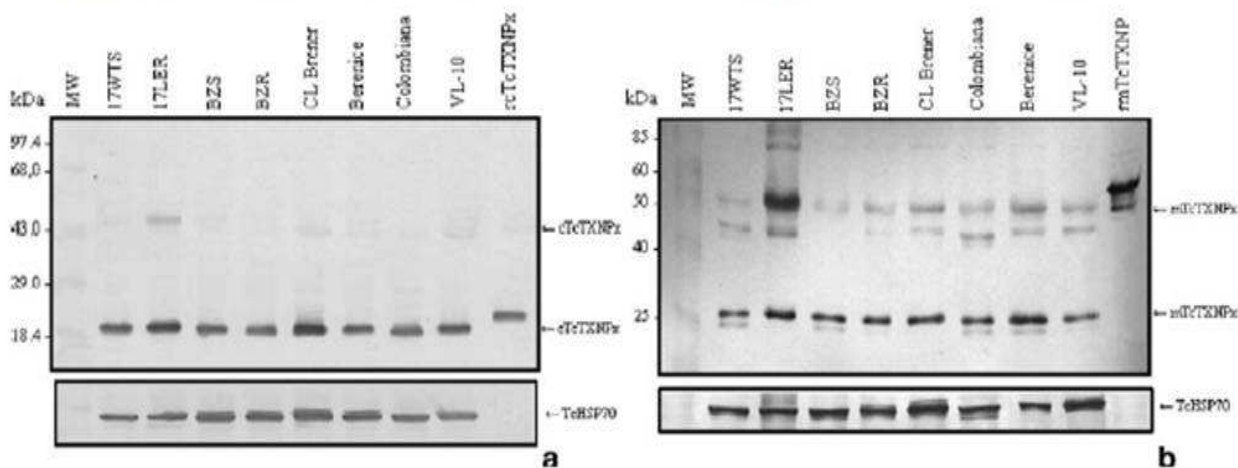


Fig. 4 cTcTXNPx and mTcTXNPx protein expression. Western blot analysis using polyclonal rabbit antiserum raised against the recombinant proteins cTcTXNPx (a), mTcTXNPx (b), and TcHSP70 (a and

b, bottom). The drug-resistance phenotypes and zymodemes of the *T. cruzi* strains analyzed are listed in Table 1. As a positive control, we used the recombinant rcTcTXNPx and mTcTXNPx proteins

mTcTXNPx polypeptides using TcHSP70 as a reference showed that the levels of native (25 kDa) and oxidized (50 kDa) mTcTXNPx protein were two-fold and 5.5-fold higher in the 17 LER population compared to its susceptible pair 17 WTS, respectively. The expression level of these polypeptides was the same for all others samples analyzed regardless of BZ resistance (Fig. 4b). These results were confirmed by the double serial dilutions of the protein extracts from 17 WTS and 17 LER populations (data not shown).

Discussion

Trypanosomatids present a unique mechanism for detoxification of peroxides that is dependent on trypanothione, which differs from that found in vertebrates. Therefore, antioxidant defense is a promising target for chemotherapy. Tryparedoxin peroxidase (TXNPx) participates in this defense by metabolizing hydrogen peroxide to water molecules. Previous studies carried out by our group using proteomic analysis indicated that tryparedoxin peroxidase protein was more expressed in the *T. cruzi* population with in-vitro-induced resistance to BZ (17 LER) (Andrade et al. 2008). In the present work, we have extended these results by characterizing both cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in others nine strains of *T. cruzi* that were either susceptible or naturally resistant to BZ. Our results demonstrated that the expression levels of these native proteins, using specific polyclonal antibodies, were similar for all samples except 17 LER, which displayed two-fold greater expression. In addition, the oxidized mTcTXNPx protein (50 kDa) demonstrated 5.5-fold greater expression in the 17 LER population than 17 WTS. The data presented here show that both cTcTXNPx and mTcTXNPx enzymes have an increased level of expression in the in-vitro-induced BZ-resistant *T. cruzi* population, a situation that is different from that observed in the in-vivo-selected BZ-resistant and naturally resistant strains.

Literature data have shown that peroxidase enzymes can be essential for the survival of parasites subjected to drug pressure. Metronidazole-resistant *Entamoeba histolytica* presented a three-fold increase in its mRNA level of TXNPx (Wassmann et al. 1999). Interestingly, when parasites were transfected simultaneously with genes encoding iron-superoxide dismutase and TXNPx, the mRNA level of enzyme TXNPx was 20–30% greater than in parasites overexpressing only TXNPx. Similarly, in arsenate-resistant *Leishmania amazonensis* an increase of five- and fourfold in the transcription levels of the cTXNPx and mTXNPx genes, respectively, was also described (Lin et al. 2005). *L. tarentolae* resistant to trivalent antimony has been reported an increase of 6.5- and 1.8-fold in cytosolic and mitochondrial TXNPx

enzymes, respectively (Wyllie et al. 2008). Altogether, these findings are in agreement with our results showing an increase in the mRNA level of the TXNPx enzyme in drug-resistant parasites.

In *T. cruzi* has been reported that overexpression of cTcTXNPx or mTcTXNPx enzymes protects the parasite from either hydrogen peroxide or organic peroxide *t*-butyl hydroperoxide damage (Finzi et al. 2004; Wilkinson et al. 2000). However, parasites overexpressing either peroxidases were equally susceptible to NFX and BZ similar to parental control (Wilkinson et al. 2000). This result may reflect an imbalance in the antioxidant defense these parasites overexpressing only one enzyme involved in the pathway of ROS detoxification.

Recently, our group has shown that iron-superoxide dismutase-A (FeSOD-A), a mitochondrially localized enzyme, is overexpressed in a *T. cruzi* population with in-vitro-induced resistance to BZ (Nogueira et al. 2006). This enzyme also participates in the antioxidant defense of parasites, removing excess superoxide radicals by converting them to oxygen and hydrogen peroxide (Bannister et al. 1987). As antioxidant defense is a metabolic pathway that functions sequentially, we anticipated that the resistant parasite would also overexpress peroxidases in order to metabolize hydrogen peroxide. Interestingly, we observed that both tryparedoxin peroxidase protein levels were increased and can protect this resistant parasite against the oxidative stress generated by benzimidazole.

Compartmentalization of peroxiredoxins in *T. cruzi* protects the cell against the toxic effects of exogenous peroxide, indicating that these oxidants may penetrate the cytosol and mitochondria. In cells overexpressing peroxidase enzymes, peroxide metabolism increases at both sites, protecting against cellular damage (Turrens 2004). Due to its localization, cTXNPx would be important during oxidative stress generated by external sources like the macrophage oxidative burst because the primary build-up of oxidative stress products would be in the cytosol. In the event of oxidative stress generated by the cell's own mitochondrion, mTXNPx would be more active (Lyer et al. 2008). Our data show that both c- and m-TcTXNPx presented a two-fold higher protein level in the resistant *T. cruzi* population 17 LER than in its susceptible pair 17 WTS. The highest expression, 5.5-fold, was observed for the homodimeric form of the mTcTXNPx enzyme. These data suggest that overexpression of c- and m-TcTXNPx in *T. cruzi* could be associated with BZ resistance. Lin et al. (2005) also described a concomitant increase in the expression of cytosolic and mitochondrial TXNP in arsenite-resistant *L. amazonensis*. In addition, the largest increase in cytosolic TXNPx protein levels has been observed in *L. tarentolae* resistant to trivalent antimony (Wyllie et al. 2008).

Our data demonstrate the presence of two transcripts of the cTcTXNPx gene in *T. cruzi* samples from zymodeme 1. In contrast, the other *T. cruzi* strains presented only one transcript, showing an association between the transcript number and the zymodeme, but not the drug-resistance phenotype. The two transcripts observed for the cTcTXNPx gene could be due to different maturation levels of the mRNA, differences in the size of the 5' and 3' UTR regions, or differences in the size of the mRNA poly-A tail (Teixeira and DaRocha 2003).

TXNPx belongs to a family of peroxiredoxins having cysteine residues in conserved domains of their amino acids sequence that are responsible for peroxide reduction. In *T. cruzi*, TXNPx presents a decameric structure organized as one pentamer of symmetrical dimers (Piñeyro et al. 2005). Our western blot analysis using the anti-cTcTXNPx or anti-mTcTXNPx polyclonal antibodies shows the presence of two polypeptides for each TXNPx-specific antibody. These polypeptides correspond to forms of the cTcTXNPx or mTcTXNPx oxidized (homodimeric) and reduced (monomeric) protein. Some authors have demonstrated the occurrence of two to three polypeptides by SDS-PAGE, probably representing dimers or tetramers of these proteins (Wilkinson et al. 2000; Piñeyro et al. 2005; Piñeyro et al. 2008; Guerrero et al. 2000). Also, the difference of the trypanredoxin peroxidase expression level obtained by our western blot analysis, two- to 5.5-fold increased in the 17 LER population, compared to proteomic analysis (15-fold) (Andrade et al. 2008) can be due to high sensibility and specificity of the polyclonal antibody when compared with 2D electrophoresis methodology and to forms oxidized and reduced of protein.

Genomic organization analysis of the cTcTXNPx gene by Southern blot using restriction enzymes and bioinformatic analysis suggested that the cTcTXNPx gene is present in seven different contigs and has multiple copies (probably eight) dispersed throughout the parasite genome. Previous results have also shown that the cTcTXNPx gene presents multiple copies organized in tandem in *T. cruzi* (Wilkinson et al. 2000). In *L. major*, this gene presents between eight to 13 copies in the genome that are organized in tandem as imperfect arrangements of repeated units, including polymorphic intergenic sequences and genes (Levick et al. 1998). Similar to observations in *L. major*, the genomic organization of the *T. cruzi* cTcTXNPx can also present imperfect arrangements of repetition. Wilkinson et al. (2000) have suggested that the mTcTXNPx gene can present only one copy in the *T. cruzi* genome. However, our Southern blot and bioinformatic analyses indicated that the mTcTXNPx complete gene is present in two different contigs, suggesting the presence of two complete copies dispersed throughout the parasite genome.

Data from the literature have shown that drug-resistant parasites can overexpress genes as a result of their

amplification in the genome (Guimond et al. 2003; Nogueira et al. 2006). On the other hand, some genes demonstrate increased mRNA and protein levels, but are not amplified (Guimond et al. 2003). Our results show that c- and m-TcTXNPx genes presented increased mRNA levels in the 17 LER-resistant population but no DNA amplification in the *T. cruzi* genome.

In bacterial, yeast, and mammalian cells, there is an adaptation to oxidative stress when cells are first subjected to low, non-toxic concentrations of hydrogen peroxide and then exposed to higher sub-lethal concentrations. Cells can develop resistance by increasing expression of genes that encode protective and repair system enzymes (Steenkamp 2002; Finzi et al. 2004). Based on our results, we suggest that the *T. cruzi* population with in vitro resistance to BZ exhibits an increase in TcTXNPx protein levels together with other enzymes associated with peroxide metabolism, such as the previously described TcFeSOD (Nogueira et al. 2006), protecting these resistant parasites against oxidative stress. Further studies are underway to determine whether co-overexpression of both enzymes TXNPx and TcFeSOD in susceptible *T. cruzi* populations confers BZ resistance to the parasites.

Acknowledgments This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS-FIOCRUZ).

References

- Allen TE, Ullman B (1994) Molecular characterization and over-expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 65:233–245
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirde P, Romanha AJ (2008) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *J Proteome Res* 7:2357–2367
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22:111–180
- Castro H, Sousa C, Santos M, Cordeiro-da-Silva A, Flobe L, Tomas AM (2002) Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* 33:1552–1562
- Centers for Disease Control and Prevention (2007) Available from: www.cdc.gov/chagas. Reviewed August 8.
- Docampo R (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interact* 73:1–27
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN et al (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409–415
- Filardi LS, Brener Z (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas Disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81:755–759

- Finzi JK, Chiavegatto CW, Corat KF, Lopez JA, Cabrera OG, Mielniczki-Pereira AA, Colli W, Alves MJ, Gadelha FR (2004) *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol* 133:37–43
- Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543–548
- Guerrero SA, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, Singh M, Alves MJ, Flohe L (2000) His-tagged trypanodioxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:410–414
- Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, El Fadili A, Peytavi R, Briand G, Richard D, Messier N, Papadopoulou B, Corbeil J, Bergeron MG, Legare D, Ouellette M (2003) Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 31:5886–5896
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383:347–364
- Levick MP, Tetaud E, Fairlamb AH, Blackwell JM (1998) Identification and characterisation of a functional peroxidase from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 96:125–137
- Lin YC, Hsu JY, Chiang CS, Lee ST (2005) Distinct overexpression of cytosolic and mitochondrial trypanodioxin peroxidases results in preferential detoxification of different oxidants in arsenite-resistant *Leishmania amazonensis* with and without DNA amplification. *Mol Biochem Parasitol* 142:66–75
- Lopez JA, Carvalho TU, de Souza W, Flohe L, Guerrero SA, Montemartini M, Kalisz HM, Nogoceke E, Singh M, Alves MJ, Colli W (2000) Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med* 28:767–772
- Lyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary ML, Shaha C (2008) Crucial role of cytosolic trypanodioxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol* 68:372–391
- Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A (1997) Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 86:101–106
- Montemartini M, Nogoceke E, Singh M, Steinert P, Flohe L, Kalisz HM (1998) Sequence analysis of the trypanodioxin peroxidase gene from *Crithidia fasciculata* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 273:4864–4871
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27:1477–1482
- Murta SM, Romanha AJ (1998) In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116:165–171
- Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 93:203–214
- Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirde P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ (2006) Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TeOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 146:151–162
- Murta SM, Nogueira FB, dos Santos PF, Campos FF, Volpe C, Liarte DB, Nirdé P, Probst CM, Krieger MA, Goldenberg S, Romanha AJ (2008) Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Trop* 107:59–65
- Neal RA, Van Bueren J (1988) Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82:709–714
- Nirde P, Larroque C, Bamabe C (1995) Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *C R Acad Sci III* 318:1239–1244
- Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM (2006) Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TeFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop* 100:119–132
- Nozaki T, Engel JC, Dvorak JA (1996) Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 55:111–117
- Piñeyro MD, Pizarro JC, Lema F, Pritsch O, Cayota A, Bentley GA, Robello C (2005) Crystal structure of the trypanodioxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Struct Biol* 150:11–22
- Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, Robello C (2008) Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408:45–50
- Steenkamp DJ (2002) Thiol metabolism of the trypanosomatids as potential drug targets. *IUBMB life* 53:243–248
- Teixeira SMR, DaRocha W (2003) Control of gene and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* 2:148–158
- Tetaud E, Giroud C, Prescott AR, Parkin DW, Baltz D, Biteau N, Baltz T, Fairlamb AH (2001) Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanodioxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 116:171–183
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Toledo M, Tafuri W, Bahia MT, Tibayrenc M, Lana M (2004) Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 4:11–22
- Trujillo M, Budde H, Pineyro MD, Stehr M, Robello C, Flohe L, Radi R (2004) *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanodioxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem* 279:34175–34182
- Turnens JF (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med* 25:211–220
- Urbina JA, Docampo R (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19:495–501
- Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I (1999) Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin I and flavin reductase. *J Biol Chem* 274:26051–26056
- Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragon A, Kelly JM (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 275:8220–8225
- Wilkinson SR, Taylor MC, Hom D, Kelly JM, Cheeseman I (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5022–5027
- Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH (2008) Roles of trypanothione S-transferase and trypanodioxin peroxidase in resistance to antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1359–1365



Short communication

Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole[☆]

Silvane M.F. Murta^{a,*}, Fernanda B. Nogueira^a, Paula F. dos Santos^a, Fernanda M.F. Campos^a, Caroline Volpe^a, Daniel B. Liarte^a, Philippe Nirdé^b, Christian M. Probst^c, Marco A. Krieger^c, Samuel Goldenberg^c, Alvaro J. Romanha^a

^a Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas 'Renê Rachou', FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, Caixa Postal 1743, CEP 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Unité INSERM U439, 34090 Montpellier, France

^c Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Rua Prof. Alcaguir Munhoz Mader 3775, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2008

Received in revised form 19 March 2008

Accepted 10 April 2008

Available online 18 April 2008

Keywords:

Trypanosoma cruzi

Drug resistance

Differential gene expression

Differential display (DD)

Representation of differential expression

(RDE)

70kDa heat shock protein (HSP70)

ABSTRACT

Differential gene expression in three pairs of *Trypanosoma cruzi* populations or clones susceptible or resistant to benznidazole (BZ) was investigated by differential display (DD) and representation of differential expression (RDE). GenBank searches of 14 genes selected by DD showed that four sequences corresponded to different hypothetical proteins and the others were very similar to *T. cruzi* genes encoding mucin (*TcMUC*), dihydrolipoamide dehydrogenase (*TcLipDH*), the hexose transporter (*TcHT*), or a ribosomal protein. Sequence analysis was performed on 34 clones obtained by RDE; approximately half of these clones encoded 14 different hypothetical proteins and the other half encoded proteins involved with stress response, antioxidant defence, metabolism, transporter proteins, surface proteins, ribosomal proteins and others. The mRNA levels of eight *T. cruzi* genes obtained by RDE and DD were analysed by northern blotting to confirm the differential expression of these sequences. For six of the eight genes, *TcLipDH*, *TcHT*, *TcFeSOD-A* (iron superoxide dismutase-A), *TcHSP70*, *TcHSP100* (heat shock protein) and *Tc52* (thiol-transferase), mRNA levels in the drug-resistant *T. cruzi* population were at least twice those in the susceptible population. Further analysis of *TcHSP70* showed that although the levels of *TcHSP70* mRNA were four-fold higher in *T. cruzi* BZ-resistant population, no corresponding increase was observed in the levels of *TcHSP70* protein expression. The results suggest that *TcHSP70* is not directly associated with the *T. cruzi* drug resistance phenotype.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. It is a widespread and important disease in Latin America, where 16–18 million people are infected (World Health and Organization, 2002). Current treatment is based on the administration of nitrofurans nifurtimox (NFX) and 2-nitroimidazole benznidazole (BZ). These drugs have toxic side effects and a very low efficacy for treatment of the chronic phase of the disease (Urbina and Docampo, 2003). NFX acts via the reduction of its nitro group to unstable nitroanion radicals, which react to produce highly toxic reduced oxygen metabolites (superoxide anion and hydrogen

peroxide) (Docampo, 1990; Maya et al., 2003). BZ acts via a different mechanism, reductive stress. This mechanism involves the covalent modification of macromolecules, such as DNA, proteins and lipids, by reduced nitro intermediates (Docampo, 1990).

T. cruzi strains have different susceptibilities to BZ and NFX (Filardi and Brener, 1987; Murta et al., 1998; Toledo et al., 2004). This may partly account for differences in the efficacy of drug treatment. *T. cruzi* strains resistant to NFX (Nozaki et al., 1996), BZ (Nirdé et al., 1995), azole (Buckner et al., 1998), and cysteine-protease inhibitors (Engel et al., 2000) have been developed *in vitro* to investigate these differences. However, comparative studies found no correlation between *T. cruzi* drug susceptibility *in vitro* and *in vivo* (Neal and Van Bueren, 1988). In a previous study, *in vivo* BZ-resistant population and clones of *T. cruzi* were selected and characterised (Murta and Romanha, 1998). However, the mechanism of drug resistance used by this parasite remains poorly understood.

The identification of genes differentially expressed in drug-susceptible and drug-resistant *T. cruzi* populations may provide

[☆] Note: nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ under the accession numbers EH035783–EH035834.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 33497781; fax: +55 31 32953515.
E-mail address: smurta@yahoo.com (S.M.F. Murta).

insight into the molecular basis of drug resistance. Techniques such as differential display (DD) (Liang and Pardee, 1992) have allowed researchers to associate differentially expressed genes with drug resistance in cancer cells (Wang et al., 2002) and in *Candida albicans* (Liu et al., 2005). Villarreal et al. (2005) used the random differentially expressed sequences (RADES) technique to analyse differential gene expression in representative *T. cruzi* strains exposed to BZ. Each strain was found to act independently of its own genetic cluster when subjected to a drug stress. Microarray analysis has also been used to study drug resistance in various microorganisms: *Leishmania* (Guimond et al., 2003), *C. albicans* (Barker et al., 2004), and *T. cruzi*, recently investigated by our group. The deletion of copies of a gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NADPH flavin oxidoreductase, has been associated with *in vitro*-induced BZ resistance in *T. cruzi* (Murta et al., 2006).

Representation of differential expression (RDE) (Krieger and Goldenberg, 1998) has been used to identify genes differentially expressed during *T. cruzi* metacyclogenesis. RDE is based on the PCR amplification of specific cDNA sequences expressed by a target population, after subtractive hybridisation with a large molar excess of cDNA sequences from a related cell population. DD involves the systematic amplification of 3'-terminal portions of mRNAs, which are converted to cDNA and amplified; the amplification products are then separated by electrophoresis in DNA sequencing gels (Liang and Pardee, 1992).

In the present study, we used RDE and DD to investigate differential gene expression in *T. cruzi* populations or clones susceptible or resistant to benzimidazole, selected *in vivo* (Murta and Romanha, 1998) and induced *in vitro* (Nirdé et al., 1995). We analysed the mRNA levels of eight *T. cruzi* genes identified by RDE and DD, to confirm the differential expression of these sequences. Further, we characterised *TcHSP70* gene, identified by RDE, determining gene copy number and levels of protein production in 10 BZ-susceptible and BZ-resistant *T. cruzi* strains or clones.

2. Materials and methods

2.1. *T. cruzi* strains

The BZ-resistant *T. cruzi* population (17 LER) derived from the Tehuantepec cl2 susceptible wild-type strain (17 WTS) (Nirdé et al., 1995) was obtained *in vitro* by increasing the concentration of benzimidazole (*N*-benzyl-2-nitro-1-imidazolacetamide, Rochagan, Roche Co.) in a stepwise manner. 17 LER parasites are resistant to 220 μ M BZ. We used a BZ-resistant *T. cruzi* population (BZR), derived from the Y strain (BZ-susceptible population BZS). BZR was selected *in vivo* through 25 successive passages in mice treated with a single high dose of BZ (500 mg/kg of body weight) (Murta and Romanha, 1998). We also used two clones: Clone 4S, a susceptible clone derived from BZS and Clone 16R, a resistant clone derived from BZR. The other four *T. cruzi* strains used in the Southern and northern analyses were previously characterised according to their *in vivo* susceptibility to BZ and NFX (Filardi and Brener, 1987). Two of these four strains were susceptible (CL Brener and Berenice) and two were naturally resistant (Yuyu and VL-10) to both drugs.

2.2. RNA and DNA preparations

Total RNA and DNA from *T. cruzi* samples were extracted as previously described (Murta et al., 1998). Southern and northern blots were hybridised with 32 P-labelled RDE and DD fragments using protocol previously described (Murta et al., 2006).

2.3. Differential display (DD)

The DD method described by Liang and Pardee (1992) involves systematic amplification of the 3'-terminal portions of mRNAs and resolution of the fragments on a DNA sequencing gel. Aliquots of total RNA from *T. cruzi* populations (17 WTS and 17 LER) and clones (Clone 4S and Clone 16R) were treated with DNase I (Promega, Madison, WI) to prevent genomic DNA contamination and RNA was then purified, using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA). The first-strand cDNA was synthesised, using 10 μ g of total RNA, 1 \times first-strand buffer, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 40 U RNasin and 200 U Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) in a final volume of 20 μ l. We used the following anchored primers in this reaction: T₁₁C (5'-TTTTTTTTTTC-3'), T₁₁G (5'-TTTTTTTTTTTG-3') or T₁₁A (5'-TTTTTTTTTTTA-3'). All reactions were allowed to proceed for 1 h at 42 °C and were then stopped by incubation at 70 °C for 20 min. The second-strand of the cDNA was synthesised by PCR, using a combination of the corresponding anchored primer, T₁₁(A, C or G), and one of the following arbitrary primers (APs): AP1, 5'-AGCCAGCGAA-3'; AP2, 5'-GACCCCTTGT-3'; AP3, 5'-AGGTGACCGT-3'; AP4, 5'-GGTACTCCAC-3'; AP5, 5'-GTTCCGATCC-3'; AP6, 5'-GCAATCGATG-3'; AP7, 5'-CCGAAGGAAT-3'. PCR was carried out in duplicate, in a reaction mixture containing 0.2 μ M of each random primer (AP1–AP7), 0.2 μ M T₁₁(A, C or G), 2 μ M deoxyribonucleoside triphosphate, 5 μ Ci [α - 33 P]dCTP (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1 \times Taq buffer, 25 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 100 ng template cDNA and water, bringing the final reaction volume up to 25 μ l. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension phase for 5 min at 72 °C. PCR products were separated by electrophoresis in denaturing 6% polyacrylamide–7 M urea gels, transferred onto a filter under vacuum (BioRad, Hercules, CA, U.S.A.) and placed against X-ray film at –70 °C. The fragments of differentially expressed PCR products were recovered from the sequencing gel, re-amplified with same set of primers, inserted into the pCR 2.1 plasmid (TA Cloning kit, Invitrogen) and sequenced.

2.4. Representation of differential expression (RDE)

RDE was used, according to the protocol described by Krieger and Goldenberg (1998). Populations of "tester" cDNA molecules (resistant *T. cruzi* samples—17 LER, BZR and Clone 16R), to which a specific set of adaptors was added, were hybridised with an excess of "driver" cDNA molecules (susceptible *T. cruzi* samples—17 WTS, BZS and Clone 4S) to sequester from the tester all (or at least most) sequences common to the driver. Following hybridisation, the molecules were amplified by PCR using primers complementary to the adaptors added to the tester cDNA. In this system, molecules present only in the tester population should be exponentially amplified; those common to the tester and driver populations should be linearly amplified, and those exclusive to the driver population should not be amplified as they lack the adaptors. This subtractive amplification procedure was repeated twice, increasing the extent to which the driver molecules were in excess with each repetition. After the first RDE cycle, the subtractive amplification products were inserted into the *Bam*HI site of pBluescript KS⁺ (Stratagene); each amplicon had a *Bam*HI adapter at each end. The positive clones were sequenced and the nucleotide sequences analysed.

2.5. Gene identification

Sequencing reactions were carried out using protocol previously described (Murta et al., 2006). The nucleotide sequences

were identified by performing a BLAST search using the TcruziDB database (<http://TcruziDB.org>) and non-redundant NCBI database from the National Center for Biotechnology Information website. We performed nucleotide–nucleotide BLAST (BLASTN) and translated query versus protein database (BLASTX) searches of the sequences. The best matches to nr nucleotide or nr protein database were considered in this study.

2.6. Cloning of the TcHSP70 gene

A 2037 bp segment corresponding to the TcHSP70 ORF (GenBank accession number for complete nucleotide sequence, X67716) was amplified using the following primers: TcHSP70-forward 5'-cgcgatccgATGACCTACGAGGGAGCCATCGGC-3' and TcHSP70-reverse 5'-cgcaagcttCTACAAGGGAGAAAACCAACGGGT-3'. The PCR product encoding TcHSP70 was digested with *Bam*HI and *Hind*III and inserted into the corresponding sites of the pQE-31 expression vector (Qiagen) containing a 6× His-tag. Protocols for purification of the recombinant rTcHSP70 protein and production of polyclonal antiserum were as previously described (Nogueira et al., 2006).

2.7. Western blotting analysis

The levels of expression of TcHSP70 were determined by western blot analysis according to Murta et al. (2006), using antiserum raised against recombinant rTcHSP70 at 1:5000 dilution.

2.8. Densitometric analysis

All autoradiographs of Southern and northern blots, and western blot membranes were photographed and analysed using ImageMaster VDS software (Pharmacia Biotech). Differences were considered significant if the band intensity ratio was at least 1.5-fold.

3. Results

3.1. Differential display (DD) analysis

An autoradiograph of the sequencing gel depicting the PCR products obtained with the random primers, AP2, AP4, AP7, AP5 and AP6, is shown (Fig. 1A–E, respectively). The bands differentially

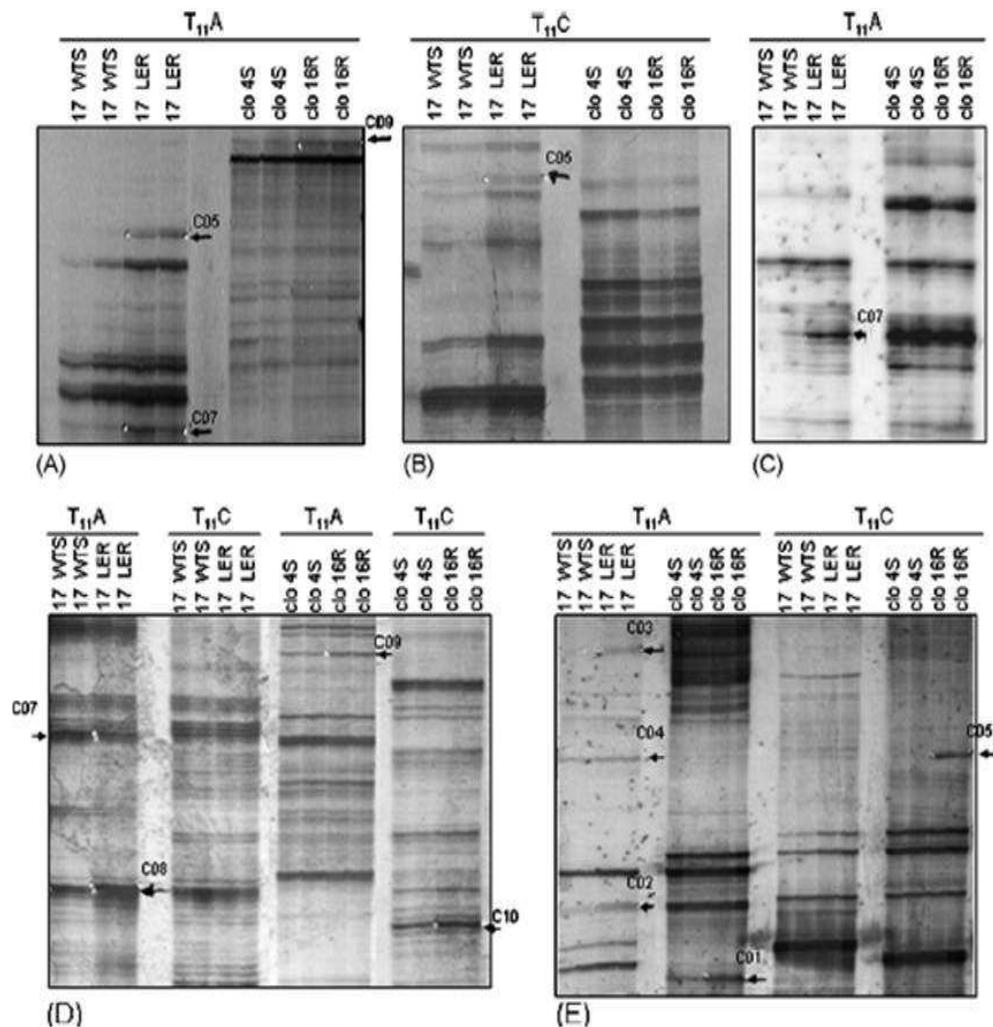


Fig. 1. Autoradiograph of ³²P-labelled PCR products obtained with primers AP2 (A), AP4 (B), AP7 (C), AP5 (D) and AP6 (E). PCR was carried out in duplicate using the anchored primer T₁₁ (A, C or G) and each arbitrary primer (AP). PCR products were separated by electrophoresis in a 6% denaturing polyacrylamide–7 M urea gel. The fragments differentially expressed, indicated by arrows, were recovered from the sequencing gel, re-amplified with the same set of primers, cloned and sequenced. The fragment sizes are listed in table as supplementary data.

Table 1Analysis of sequences from differentially expressed fragments in BZ-resistant and BZ-susceptible *T. cruzi* populations obtained by DD and RDE validated by northern blot

GenBank accession number	<i>T. cruzi</i> sample	Tech ^a	Best match to NR protein or NR nucleotide database ^b	Match	mRNA level ratio ^c
EH035833	Clone 16R	DD	<i>T. cruzi</i> mucin-like protein gene, complete cds	gi 914965	Clone 4S = Clone 16R
EH035834	17 LER	DD	<i>T. cruzi</i> lpd gene - dihydrolipoamide dehydrogenase, allele 2	gi 1854570	17 WTS < 17 LER (two-fold)
EH035784; EH035786	17 LER; Clone 16R	DD	<i>T. cruzi</i> Cl. hexose transporter gene, complete cds	gi 453379	17 WTS < 17 LER (two-fold); Clone 4S = Clone 16R
EH035794	17 LER/WTS	RDE	Heat shock protein 70 [<i>T. cruzi</i>]	gi 10626	17 WTS < 17 LER (four-fold)
EH035796	17 LER/WTS	RDE	Heat shock protein 100 (clp protein), putative [<i>T. cruzi</i>]	gi 71408672	17 WTS < 17 LER (2.6-fold)
EH035804	17 LER/WTS	RDE	iron superoxide dismutase A [<i>T. cruzi</i>]	gi 62529248	17 WTS < 17 LER (three-fold)
EH035822	BZS/BZR	RDE	Mucin-associated surface protein (MASP), putative [<i>T. cruzi</i>]	gi 71665513	BZS = BZR
EH035832	BZS/BZR	RDE	Thiol-transferase Tc52 [<i>T. cruzi</i>]	gi 124109201	17 WTS < 17 LER (three-fold); BZS < BZR (two-fold)

^a Tech, techniques used: DD: differential display or RDE: representation of differential expression.^b Results of sequence similarity searches were obtained using the BLAST algorithm (BLASTX and BLASTN) against TcruziDB and the non-redundant NCBI databases.^c The mRNA level ratio was determined by Northern blot analysis. Total RNA from drug-susceptible (S) and drug-resistant (R) (17 WTS/17 LER; BZS/BZR; Clone 4S/Clone 16R) *T. cruzi* samples were hybridised with the ³²P-labelled gene-specific probe. A ribosomal RNA probe was used as a quantitative loading control for each membrane. The mRNA level ratio was determined by comparative densitometric analysis between transcripts from S and R *T. cruzi* pairs.

expressed are indicated with arrows. The profile of bands generated with the random primers AP1 and AP3 was complex, but no band displaying differential expression was observed (data not shown). We isolated 14 differentially expressed bands using DD: eight specific to the *T. cruzi* population with resistance to BZ (17 LER) induced *in vitro*, one specific to the susceptible *T. cruzi* population (17 WTS) and five specific to the *T. cruzi* clone with resistance to BZ selected *in vivo* (Clone 16R) (Fig. 1). No fragment was specific to the susceptible *T. cruzi* clone (Clone 4S). The *T. cruzi* populations (BZS and BZR) were not submitted to DD analysis. The differentially expressed bands identified (Fig. 1) were recovered from sequencing gel and re-amplified with the same set of primers. All bands were inserted into pCR TA Topo (Invitrogen) and sequenced. The nucleotide sequences of the fragments obtained by DD were between 99 and 313 bp in length (Table - Supplementary data). Searches for similarity to sequences in GenBank identified nine different *T. cruzi* genes displaying significant similarity to the query sequences. Four of these sequences corresponded to different hypothetical proteins and 10 were highly similar to *T. cruzi* genes encoding mucin (*TcMUCII*) (two fragments), dihydrolipoamide dehydrogenase (*TcLipDH*) (one fragment), the hexose transporter (*TcHT*) (two fragments), the 60S ribosomal protein L12 (four fragments), and ribosomal intergenic spacer DNA (one fragment) (Table - Supplementary data).

Northern blot analysis was performed to determine the levels of mRNA of three *T. cruzi* genes – *TcMUCII*, *TcHT* and *TcLipDH* (Table 1) – to confirm that these genes were differentially expressed. Northern blot profiles of total RNA from drug-resistant and drug-susceptible *T. cruzi* strains hybridised with the ³²P-labelled gene-specific probe, showed 0.8 and 2.4 kb transcripts for the *TcMUCII* and *TcLipDH* genes, respectively (data not shown). *TcHT* transcripts presented polymorphisms specific to the *T. cruzi* strains: one transcript for 17 LER/17 WTS (2.6 kb) and two transcripts for BZS/BZR populations (1.9 and 2.6 kb) (data not shown). A ribosomal RNA probe was used as a quantitative loading control for each membrane. Comparative densitometric analysis showed that *TcLipDH* and *TcHT* mRNA levels in the drug-resistant *T. cruzi* population (17 LER) were at least double those in the susceptible (17 WTS) population (Table 1). The other *T. cruzi* samples analysed (BZS/BZR and Clone 4S/Clone 16R) presented similar transcript levels. We detected no differences in *TcMUCII* mRNA levels between the *T. cruzi* strains and clones analysed, regardless of their drug-resistance phenotype. The results show that two of the three genes obtained by DD were overexpressed in 17 LER.

3.2. Representation of differential expression (RDE) analysis

We obtained 34 clones with the RDE approach: 13 were obtained using 17 LER/17 WTS, 10 with BZS/BZR and 11 with Clone 16R/Clone 4S. All 34 clones were sequenced four times and their nucleotide sequences analysed. GenBank searches showed that these 34 fragments corresponded to 28 different *T. cruzi* genes. Almost half of these fragments (16 fragments) encoded 14 different hypothetical proteins and the other part (18 fragments) corresponded to 14 different *T. cruzi* genes. In relation to pairs; three of the 13 fragments obtained with 17 LER/17 WTS corresponded to different hypothetical proteins. Ten fragments presented high levels of similarity to seven different *T. cruzi* genes: cytochrome b5-like putative (two fragments), chitin-binding like protein, putative (one fragment), dihydrolipoamide branched chain transacylase (three fragments); one fragment each for the ankyrin repeat protein, the iron superoxide dismutase-A (*TcFeSOD-A*), the 70 kDa heat shock protein (*TcHSP70*), and the 100 kDa heat shock protein (*TcHSP100*) (Table - Supplementary data). Seven of the 10 fragments obtained with BZS/BZR (*T. cruzi* Y strain) corresponded to six different hypothetical proteins. Three were highly similar to the following *T. cruzi* genes: conserved mitochondrial carrier protein, thiol-transferase (*Tc52*) and mucin-associated surface protein (*TcMASP*). Six of the 11 different fragments obtained with Clone 16R/Clone 4S corresponded to different hypothetical proteins. The remaining five fragments corresponded to four different *T. cruzi* genes: 60S ribosomal protein L44, 5'-3' exonuclease XRND, zinc finger protein 1 (*ZFP1*) (two fragments), and polypyrimidine binding protein (*PTB*) (Table - Supplementary data). Fragments with code numbers 17C40, YC08 and YC28 corresponded to the same hypothetical protein (gi|71406711), identified as the product of a gene overexpressed in the *T. cruzi* populations: 17 LER/17 WTS and BZS/BZR.

Northern blot analyses were performed to determine the levels of mRNA for five *T. cruzi* genes identified by RDE: *TcFeSOD-A*, *TcHSP70*, *TcHSP100*, *Tc52* and *TcMASP* (Table 1). We detected two major mRNA transcripts on northern blots of *TcFeSOD-A*, at 1.2 and 1.6 kb (data not shown). The *T. cruzi* genes *TcHSP70* and *TcHSP100* presented transcripts of 2.1 and 0.52 kb, respectively (data not shown), for all *T. cruzi* samples analysed. We detected a 2.1 kb transcript in northern blot analyses of *Tc52* and a 2.0 kb transcript on northern blots of *TcMASP* (data not shown). Comparative densitometric analysis, using a ribosomal RNA probe, showed that

TcFeSOD-A, TcHSP70 and TcHSP100 mRNA levels were two to four times higher in the *in vitro* drug-resistant *T. cruzi* (17 LER) population than in the susceptible (17 WTS) population (Table 1). The other *T. cruzi* samples analysed (BZS/BZR and Clone 4S/Clone 16R) presented similar transcript levels. Interestingly, Tc52 mRNA levels in 17 LER were three times those in 17 WTS population and twice higher in BZR (a population with *in vivo*-selected resistance) than in BZS (a susceptible population) (Table 1). By contrast, no differences in TcMASP mRNA levels were found between the susceptible and resistant strains of *T. cruzi* and the clones analysed, regardless of drug-resistance phenotype. Four of the five genes obtained by RDE were overexpressed in resistant *T. cruzi*.

3.3. Genomic organization of the TcHSP70 gene

Genomic organization of TcHSP70 gene was determined by Southern blot analysis of DNA from *T. cruzi* strains digested with two restriction enzymes *SacI* cutting within the TcHSP70 gene, and with *XbaI*, which does not cut within this gene. Hybridisation of the blots with a TcHSP70 gene-specific probe revealed that *SacI*-digested DNA from all *T. cruzi* populations contained bands of 0.5 and 1.7 kb, whereas *XbaI*-digested DNA samples presented a single band of 27 kb (data not shown). No difference in band intensity was observed for any of the *T. cruzi* strains analysed.

3.4. Levels of TcHSP70 protein expression

We generated 6× His-tagged TcHSP70 recombinant proteins as antigens for the generation of rabbit anti-TcHSP70 polyclonal antibody. We used this antibody in western blot analyses to determine whether populations of parasites producing different levels of TcHSP70 mRNA also produced different amounts of the TcHSP70 proteins. Western blot analysis of *T. cruzi* extracts probed with a rabbit anti-recombinant TcHSP70 antibody revealed two bands: one at 70 kDa and another at 73 kDa (data not shown). The intensity of the bands was similar for all *T. cruzi* samples, regardless of drug-resistance phenotype.

4. Discussion

Current BZ and NFX treatment for Chagas disease is unsatisfactory for several reasons: a decrease in cure efficacy, particularly during the chronic phase of the disease; considerable toxic side effects; the existence of BZ and NFX naturally resistant *T. cruzi* strains; and cross resistance between these two drugs (Filardi and Brener, 1987; Urbina and Docampo, 2003; Toledo et al., 2004). However, few studies have investigated the mechanism of drug resistance in *T. cruzi*.

In this study, we identified 48 fragments that corresponded to 36 different *T. cruzi* genes upregulated in *T. cruzi* populations and clones resistant to BZ, using the RDE and DD methodologies. Approximately half of these genes were highly similar to genes encoding hypothetical proteins and have orthologs in the *Leishmania major* and/or *T. brucei* genomes. Proteomic analysis of different developmental forms of *T. cruzi* resulted in the identification of 2784 polypeptides; 1008 of these correspond to genes annotated as encoding hypothetical proteins (Atwood et al., 2005). We also found 18 differentially expressed genes encoding proteins associated with drug stress (heat shock proteins (HSPs)), enzymes involved in antioxidant defence, metabolism, transport proteins, surface proteins, and others. We used northern blot analysis of the mRNA levels of a subset of the differentially regulated genes to verify our findings. Six of the eight upregulated genes identified by RDE and DD were confirmed by northern blotting. TcLipDH, TcHT,

TcFeSOD-A, TcHSP70, TcHSP100 and Tc52 mRNA levels in the drug-resistant *T. cruzi* (17 LER) population were at least twice those in the susceptible (17 WTS) population.

The cellular response to various chemical or physical stresses is represented at the molecular level by the induced synthesis of a set of highly conserved proteins: heat shock proteins, which protect cells against oxidative stress and prevent cell death (Park et al., 2000). *T. cruzi* responds to heat shock by synthesising HSPs, which have molecular masses of about 100, 90, 70 and 60 kDa (de Carvalho et al., 1990). In this study, the TcHSP70 and TcHSP100 genes selected by RDE presented higher levels of mRNA in the *in vitro* drug-resistant *T. cruzi* population than in the susceptible one. Calini et al. (2003) showed that HSP70 overproduction in mouse fibroblasts acts as a radioprotective mechanism against DNA damage and increases long-term viability. In this present work, we also have characterised TcHSP70 gene in 10 *T. cruzi* populations susceptible and resistant to BZ. Southern blot analysis of genomic DNA with a TcHSP70 probe revealed a profile typical of multiple copies of the gene in tandem, and this is in accord with previously reported data (Requena et al., 1988). However, no amplification or differences were observed in copy number of the TcHSP70 gene between BZ-resistant and -susceptible *T. cruzi* populations. Although the levels of TcHSP70 mRNA were four-fold higher in the *in vitro* *T. cruzi* BZ-resistant population (17 LER), western blot analysis showed that the level of expression of TcHSP70 protein was equal in all *T. cruzi* populations regardless of BZ resistance. This suggests that the TcHSP70 mRNA of resistant population may be partially degraded, resulting in a non-proportional increase in TcHSP70 protein levels. In support of this hypothesis is the finding that the regulation of trypanosomatid gene expression occurs mainly at the post-transcriptional level (Vanhamme and Pays, 1995).

The physiological function of lipamide dehydrogenase (LipDH) is the dehydrogenation of protein-bound dihydrolipoamide as part of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes (Blumenstiel et al., 1999). Additionally, LipDH like trypanothione reductase (TR), catalyses the NAD(P)H-dependent reduction of disulphide substrate, thus maintaining a reducing intracellular medium (Schoneck et al., 1997). It has been shown that LipDH catalyses the single-electron reduction of nitrofurans, concomitantly generating superoxide anion radicals and/or hydrogen peroxide (Sreider et al., 1992). LipDH has thus been indicated as a potential target for the development of new chemotherapeutic agents. Interestingly, like *TcLipDH*, *Tc52* gene encoding thiol-transferase is also overexpressed in *T. cruzi* populations with BZ resistance selected *in vivo* (BZR) and induced *in vitro* (17 LER). This gene encodes a 52 kDa protein in *T. cruzi* (Tc52) that shares motifs with glutathione S-transferase (Ouaissi et al., 1995). The involvement of *TcLipDH* and *Tc52* genes on *T. cruzi* drug-resistance phenotype should be investigated further.

Whole-genome sequencing revealed the considerable expansion of several families of surface proteins in *T. cruzi*, including mucin, mucin-associated surface proteins (MASPs), *trans*-sialidase (TS) and GP63, which are encoded by several hundred genes in the genome (El-Sayed et al., 2005). These surface proteins are putative targets for chemotherapeutic intervention, because *T. cruzi* simultaneously expresses numerous copies of TS, mucin and probably MASPs. Interestingly, genes encoding mucin and MASP proteins were selected by RDE and/or DD as upregulated in the drug-resistant *T. cruzi* population. However, northern blot analysis showed that TcMASP and TcMUC were expressed to similar levels in BZ-resistant and -susceptible *T. cruzi* populations.

The transport of glucose in trypanosomatids has been extensively studied (Barrett et al., 1998). Drug uptake into a parasite is a prerequisite for any intracellular toxic activity. The gene encoding a protein of the hexose transporter (TcHT) has been cloned and char-

acterised in *T. cruzi* (Tetaud et al., 1994). The capacity of the TcHT to transport D-fructose with a higher affinity than the mammalian hexose transporters may represent a more useful means of developing toxic molecules specific for *T. cruzi* (Tetaud et al., 1996). Our data demonstrate that *TcHT* is overexpressed in *T. cruzi* parasites resistant to BZ, and reinforce the importance of this gene as a worthwhile drug target.

Villareal et al. (2005) recently analysed the differential gene expression in BZ-resistant *T. cruzi* parasites, using the RADES technique. Twelve differentially expressed sequences were deposited in GenBank. Ten of the 12 fragments showed sequence similarity to various *T. cruzi* hypothetical proteins and two presented significant matches to the *T. cruzi* succinate dehydrogenase enzyme. The authors also observed a random distribution of differential bands, suggesting that each strain acts independently of its own genetic cluster when briefly subjected to stress. Thus, the mechanisms involved in natural resistance to drugs are different from those involved in induced resistance, consistent with the findings of this study.

The drug resistance mechanism in protozoan parasites may involve differential expression of some genes associated with drug metabolism; this leads to a lower drug concentration inside the cell, an increase in its elimination, a decrease in its activation and changes in the target enzyme, hence reducing the drug–enzyme interaction (Ullman, 1995; Borst and Ouellette, 1995; Guimond et al., 2003). Superoxide dismutase (SOD) is a metalloenzyme that is a central component in antioxidant defence in most organisms. It removes excess superoxide radicals by converting them to oxygen and hydrogen peroxide (Bannister et al., 1987). The gene *TcFeSOD* was also selected by RDE. In a previous study, we have characterised the gene in 25 *T. cruzi* strains susceptible and resistant to BZ (Nogueira et al., 2006). We have observed *TcFeSOD-A* gene amplification, increased mRNA levels and protein expression and *TcFeSOD* enzyme activity in a *T. cruzi* population having an *in vitro*-induced resistance to BZ (17 IER). Further characterisation of the other differentially expressed genes is required to determine their possible involvement in the drug resistance phenotype in *T. cruzi*.

Acknowledgements

We thank Dr. Jeronimo C. Ruiz for helping us with the bioinformatic analysis. This work was supported by grants from the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica (PAPES III-FIOCRUZ).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.actatropica.2008.04.011.

References

- Atwood, J.A., Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., Oppenheides, F.R., Orlando, R., Tarleton, R.L., 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309, 473–476.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H., Rotilio, G., 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *Crit. Rev. Biochem.* 22, 111–180.
- Barker, K.S., Crisp, S., Wiederhold, N., Lewis, R.E., Bareither, B., Eckstein, J., Barbuch, R., Bard, M., Rogers, P.D., 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 376–385.
- Barrett, M.P., Tetaud, E., Seyfang, A., Bringaud, F., Baltz, T., 1998. Trypanosome glucose transporters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 195–205.
- Blumenstiel, K., Schoneck, R., Yardley, V., Croft, S.L., Krauth-Siegel, R.L., 1999. Nitrofurans as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipamide dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1791–1799.
- Borst, P., Ouellette, M., 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 427–460.
- Buckner, F., Wilson, A., Whittr, T., Van Voorhis, W., 1998. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 3245–3250.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M., 2003. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol. In Vitro* 17, 561–566.
- de Carvalho, E.F., de Castro, F.T., Rondinelli, E., Soares, C.M., Carvalho, J.F., 1990. HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. *J. Cell Physiol.* 143, 439–444.
- Docampo, R., 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.* 73, 1–27.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., et al., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409–415.
- Engel, J., Garcia, C., Hsieh, I., Doyle, P., Mckerrow, J., 2000. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.* 113, 1345–1354.
- Filardi, L., Brener, Z., 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 755–759.
- Guimond, C., Trudel, N., Brochu, C., Marquis, N., Fadili, A.E., Peytavi, R., Briand, G., Richard, D., Messier, N., Papadopoulou, B., Cordeil, J., Bergeron, M., Legaré, D., Ouellette, M., 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucl. Acids Res.* 31, 5886–5896.
- Krieger, M.A., Goldenberg, S., 1998. Representation of differential expression: a new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. *Parasitol. Today* 14, 163–166.
- Liang, P., Pardee, A.B., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967–971.
- Liu, T.T., Lee, R.E., Barker, K.S., Lee, R.E., Wei, L., Homayouni, R., Rogers, P.D., 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2226–2236.
- Maya, J.D., Bollo, S., Nuñez-Vergara, L.J., Squella, J.A., Repetto, Y., Morello, A., Pèrié, J., Chauvière, G., 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 65, 999–1006.
- Murta, S.M., Romanha, A., 1998. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116, 165–171.
- Murta, S., Gazzinelli, R., Brener, Z., Romanha, A., 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93, 203–214.
- Murta, S.M.F., Krieger, M.A., Montenegro, L.R., Campos, F.F.M., Probst, C.M., Avila, A.R., Muto, N.H., Oliveira, R., Nunes, L.R., Nirdè, P., Bruna-Romero, O., Goldenberg, S., Romanha, A.J., 2006. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with *in vitro*-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 151–162.
- Neal, R., Van Bueren, J., 1988. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* *in vitro* and *in vivo*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 709–714.
- Nirdè, P., Larroque, C., Barnabè, C., 1995. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *C. R. Acad. Sci. Paris* 318, 1239–1244.
- Nogueira, F.B., Krieger, M.A., Nirdè, P., Goldenberg, S., Romanha, A.J., Murta, S.M.F., 2006. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop.* 100, 119–132.
- Nozaki, T., Engel, J., Dvorak, J., 1996. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Med. Hyg.* 55, 111–117.
- Ouaisi, M.A., Dubremetz, J.F., Schoneck, R., Fernandez-Gomez, R., Gomez-Corvera, R., Billaut-Mulot, O., et al., 1995. *Trypanosoma cruzi*: a 52-kDa protein sharing sequence homology with glutathione S-transferase is localized in parasite organelles morphologically resembling reservosomes. *Exp. Parasitol.* 81, 453–461.
- Park, S.H., Lee, S.J., Chung, H.Y., Kim, T.H., Cho, C.K., Yoo, S.Y., Lee, Y.S., 2000. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat. Res.* 153, 318–326.
- Requena, J.M., Lopez, M.C., Jimenez-Ruiz, A., Torre, J.C., Alonso, C., 1988. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucl. Acids Res.* 16, 1393–1406.
- Schoneck, R., Billaut-Mulot, O., Numrich, P., Ouaisi, M.A., Krauth-Siegel, R.L., 1997. Cloning, sequencing and functional expression of dihydrolipamide dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* 243, 739–747.
- Sreider, C., Grinblat, L., Stoppani, A.O.M., 1992. Reduction of nitrofurans compounds by heart lipamide dehydrogenase: role of flavin and the reactive disulfide groups. *Biochem. Int.* 28, 323–334.
- Tetaud, E., Bringaud, F., Chabas, S., Barrett, M.P., Baltz, T., 1994. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8278–8282.

- Tetaud, E., Chabas, S., Giroud, C., Barrett, M.P., Baltz, T., 1996. Hexose uptake in *Trypanosoma cruzi*: structure-activity relationship between substrate and transporter. *Biochem. J.* 317, 353–359.
- Toledo, M., Tafuri, W., Bahia, M.T., Tibayrenc, M., Lana, M., 2004. Genetic diversity and drug resistance in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4, 11–22.
- Ullman, B., 1995. Multidrug resistance and P-glicoprotein in parasitic Protozoa. *J. Bioenerg. Biomemb.* 27, 77–84.
- Urbina, J.A., Docampo, R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19, 495–501.
- Vanhamme, L., Pays, E., 1995. Control of gene expression in Trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 59, 223–240.
- Villarreal, D., Nirdé, P., Hide, M., Barnabè, C., Tibayrenc, M., 2005. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2701–2709.
- Wang, X., Lan, M., Shi, Y.Q., Lu, J., Zhong, Y.X., Wu, H.P., Zai, H.H., Ding, J., Wu, K.C., Pan, B.R., Jin, J.P., Fan, D.M., 2002. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cell. *World J. Gastroenterol.* 8, 54–59.
- World Health Organization, 2002. Control of Chagas disease. Report a WHO Expert Committee. Geneva. WHO Tech. Rep. Sers. 905, 1–109.

9 REFERÊNCIAS

- Abdo MCB. Caracterização da sensibilidade e resistência *in vitro* de cepas e linhagens de *Trypanosoma cruzi* aos compostos nitroheterocíclicos nifurtimox e benznidazol. 89p. Dissertação, Mestrado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.
- 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. *Biochem J.* 2005;390(Pt 2):465-74.
- Aldunate J, Morello A. Free radicals in the mode of action of antiparasitic drugs. In: Aruoma OI, editor. *Free radicals in tropical disease* 1993;137-65.
- Alphey MS, Bond CS, Tetaud E, Fairlamb AH, Hunter WN. The structure of reduced trypanredoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol* 2000;300:903-16.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215(3):403-10.
- Alvarez F, Cortinas MN, Musto H. The analysis of protein coding genes suggests monophyly of *Trypanosoma*. *Mol Phyl Evol* 1996;5:333-343.
- Alvarez MN, Piacenza L, Irigoín F, Peluffo G, Radi R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* 2004;432(2):222-32.
- Andrade ALS, Zicker F, Oliveira RM, Silva AS, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 1996;348:1407-1413.
- Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res.* 2008;7(6):2357-67.
- Andrade SG, Andrade ZA, Figueira RM. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Rev. Inst. Med. Trop* 1977;19:124-129.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull. World Health Organiz* 1985;63(4):721-726.
- Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999;94:429-432.
- Ariyanayagam MR, Oza SL, Guther ML, Fairlamb AH. Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome, *Biochem. J.* 2005;391:425-432.
- Ariyanayagam MR, Oza SL, Mehlert A, Fairlamb AH. Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2003;278(30):27612-9.

Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Oppendoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 2005;309(5733):473-6.

Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, da Silva Monteiro V, Krieger MA, Nakamura CV, De Souza W, Goldenberg S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol* 2001;117(2):169-77.

Bacchi CJ. Resistance to clinical drugs in African trypanosomes. *Parasitol. Today* 1993;9:190-193.

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crit. Rev. Biochem* 1987;22:111-180.

Benaïm G, Sanders JM, Garcia-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *Med Chem* 2006;49(3):892-9.

Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol* 2006;112(1):132-3.

Berger BJ, Fairlamb AH. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. *Parasitology* 1992;105:871-88.

Bittencourt AL. Chagasic placentitis and congenital transmission of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1963;5:62-7.

Bock M, Gonnert R, Haberkorn A. Studies with Bay 2502 on animals. *Bol. Chileno Parasitol* 1969;24:13-19.

Boiani L, Gerpe A, Arán VJ, Torres de Ortiz S, Serna E, Vera de Bilbao N, et al. *In vitro* and *in vivo* antitrypanosomatid activity of 5-nitroindazoles. *Eur J Med Chem* 2008; Epub ahead of print.

Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J* 1980;188:643-648.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

Braga MS, Lauria-Pires L, Arganaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira AR. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivates. *Rev. Inst. Med. Trop* 2000;42:157-161.

Brandão A. The untranslated regions of genes from *Trypanosoma cruzi*: perspectives for functional characterization of strains and isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(7):775-7.

Brener Z. Recent advances in the chemotherapy of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1984;79:149-155.

- Brener Z, Chiari E. Susceptibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. Rev. Inst. Med. Trop 1967;9:197-207.
- Brener R, Costa AG, Chiari E. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. Med. Trop 1976;18:450-455.
- Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1987;82:205-212.
- Bringaud F, Müller M, Cerqueira GC, Smith M, Rochette A, El-Sayed NM, et al. Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. PLoS Pathog 2007;3(9):1291-307.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. Mol. Biochem. Parasitol 2000;111:95-105.
- Buckner F, Wilson A, Whitr T, Van Voorhis W. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemoth 1998;42:3245-50.
- Buscaglia CA, Di Noia J. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. Microb. Infec 2003;5:419-427.
- Caldas S, Santos FM, de Lana M, Diniz LF, Machado-Coelho GL, Veloso VM, Bahia MT. *Trypanosoma cruzi*: acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. Exp Parasitol 2008;18(3):315-23.
- Campos PC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Cerqueira GC, Teixeira SM. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol 2008;38(12):1383-9.
- Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. Rev Inst Med Trop 2002;44(1):29-37.
- Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortés A, Levin MJ, González A, et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mol Biochem Parasitol 1995;71(2):273-8.
- Castro C, Craig SP, Castaneda M. Genomic organization and ploidy number in *T. cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol 1981;4:273-282.
- Castro GD, Lopez A, Castro JA. Evidence for hydroxyl free radical formation during paraquat but not for nifurtimox liver microsomal biotransformation. A dimethyl-sulfoxide scavenging study. Arch Toxicol 1988;62:355-8.
- Castro H, Sousa C, Santos M, Cordeiro-da-Silva A, Flohe L, Tomas AM. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. Free Radic Biol Med 2002;33:1552-62.
- Castro H, Tomás AM. Peroxidases of trypanosomatids. Antioxid Redox Signal 2008;10(9):1593-606.

Castro-Pinto DB, Genestra M, Menezes GB, Waghabi M, Gonçalves A, De Nigris Del Cistia C, et al. Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. Arch. Microbiol 2008;189:375–384.

Centers for Disease Control and Prevention 2007 Available from: www.cdc.gov/chagas. Reviewed August 8.

Centers for Disease Control and Prevention Chagas disease after organ transplantation – Los Angeles, California, 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 55:798-800.

Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J Biol Chem 1994;269:27670-8.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev 1979;59:527–605.

Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci 1984;81(7):1991-5.

Clark D, Albrecht M, Arevalo J. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. Mol Biochem Parasitol 1994;66:143-5.

Clayton C, Schwede A, Stewart M, Robles A, Benz C, Po J, et al. Control of mRNA degradation in trypanosomes. Biochem Soc Trans 2008;36(6):520-1.

Cota BB, Rosa LH, Caligiorno RB, Rabello AL, Almeida Alves TM, Rosa CA, Zani CL. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett 2008b;285(2):177-82.

Cota BB, Rosa LH, Fagundes EM, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R, Romanha AJ, et al. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008a;103(3):263-70.

Coura JR, De Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2002;97(1):3-24.

Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. J. Cell. Biol 1991;113:1033-1042.

Croft AM, Jackson CJ, Friend HM, Minton EJ. African trypanosomiasis in a British soldier. J R Army Med Corps 2006;152(3):156-60.

De Castro SL. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. Acta. Trop 1993;53:83-98.

de Koning HP. Ever-increasing complexities of diamidine and arsenical crossresistance in African trypanosomes. Trends Parasitol 2008;24(8):345-9.

Dias De Toranzo EGD, Castro JA, Franke De, Cazzulo BM, Cazulo JJ. Interaction of benzonidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experimentia 1988;44:880-881.

- Docampo R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Design* 2001;7:1157-1164.
- Docampo R, de Boiso JF, Boveris A, Stoppani AO. Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. *Experientia* 1976;32:972-5.
- Docampo R, Moreno SNJ, Stoppani AOM, Leon W, Cruz FS, Villaalta F, Muniz RFA. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol* 1981;30:14:1947-1951.
- Dolai S, Yadav RK, Datta AK, Adak S. Effect of thiocyanate on the peroxidase and pseudocatalase activities of *Leishmania major* ascorbate peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770(2):247-56.
- Dolai S, Yadav RK, Pal S, Adak S. *Leishmania major* ascorbate peroxidase overexpression protects cells against reactive oxygen species-mediated cardiolipin oxidation. *Free Radic Biol Med* 2008;45(11):1520-9.
- Donelson JE, Gardner MJ, El-Sayed NM. More surprises from Kinetoplastida. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;16:96(6):2579-81.
- Dorn PL, Perniciaro L, Yabsley MJ, Roellig DM, Balsamo G, Diaz J, Wesson D. Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana. *Emerg Infect Dis* 2007;13(4):605-7.
- D'Orso I, De Gaudenzi JG, Frasch AC. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends Parasitol* 2003;19:151-155.
- Dos Santos FM, Caldas S, de Assis Cáu SB, Crepalde GP, de Lana M, Machado-Coelho GL, Veloso VM, Bahia MT. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance in vivo and its modulation by in vitro culturing and mice infection. *Exp Parasitol* 2008;120(4):385-90.
- Dos Santos W, Buck G. Polymorphisms at the topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. *J. Euk. Microbiol* 1999;46:17-23.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev* 2002;82:47-95.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J* 1997;16:2590-8.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005a;15:309(5733):409-15.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005b;15:309(5733):404-9.

- Engel J, Garcia C, Hsieh I, Doyle P, Mckerrow J. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 2000;113:1345-54.
- Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 1985;227:1485-7.
- Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastidia. *Annu. Rev. Microbiol* 1992;46:695-729.
- Fairlamb AH, Henderson GB, Cerami A. The biosynthesis of trypanothione and N1-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 1986;21:247-57.
- Fampa P, Lisboa CV, Jansen AM, Santos AL, Ramirez MI. Protease expression analysis in recently field-isolated strains of *Trypanosoma cruzi*: a heterogeneous profile of cysteine protease activities between TC I and TC II major phylogenetic groups. *Parasitology* 2008;135(9):1093-100.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132(1):6-13.
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Trop. Med. Hyg* 1987;81:755-759.
- Finzi JK, Chiavegatto CWM, Corat KF, Lopez JA, Cabrera OG, Mielniczki-Pereira AA, et al. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol. Bioch. Parasit* 2004;133:37-43.
- Flohe L, Hecht HJ, Steinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic Biol Med* 1999;27:966-84.
- Flohe L, Steinert P, Hecht HJ, Hofmann B. Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. *Methods Enzymol* 2002;347:244-58.
- Fries DS, Fairlamb AH. Antiprotozoal agents, p. 1033–1087. In J. Abraham (ed.), *Burger's medicinal chemistry and drug discovery: chemotherapeutic agents*. John Wiley & Sons, New York, N.Y. 2003
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1992;22(10):2501-6.
- Gibson AC, Miles MA. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J*. 1986;5:1299-1305.
- Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, Colli W, Morel CM. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett* 1985;180:265-70.

- Goulielmos GN, Arhontaki K, Eliopoulos E, Tserpistali K, Tsakas S, Loukas M. *Drosophila* Cu,Zn superoxide dismutase gene confers resistance to paraquat in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2003;308:433-438.
- Gros P, Buschman E. The mouse multidrug resistance family: structural and functional analysis. *Int. Rev. Cytology* 1993;137C:169-197.
- Guerrero SA, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, et al. His-tagged tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:410-4.
- Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis* 2003;9(1):29-32.
- Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, Fadili AE, Peytavi R. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, 2003;31:5886-96.
- Haberkorn A, Gonnert R. Animal experimental investigations in the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittel-Forschung* 1972;22:1570-1580.
- Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2007;10(6):569-77.
- Halliwell B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 2001;475:29-35.
- Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione *in situ*: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J* 2003;369:529-537.
- Harman D. The free radical theory of aging, in: WA Pryor (ed), *Free Radicals in Biology*, vol. 5, Academic Press 1982.
- Hauschka TS. Persistence of strains-specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *J. Parasitol* 1949;35:593-599.
- Henderson GB, Ulrich P, Fairlamb AH, Rosenberg I, Pereira M, Sela M, Cerami A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: Alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1988;85:5374-5378.
- Henriksson J, Aslund L, Marcina RA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1990;42:213-224.
- Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 1996;12:108-114.
- Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Sabaj V, Galanti N, et al. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1995;73:63-74.

- Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem* 2002;383:347-364.
- 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 Radic Biol Med* 2008;45:733-42.
- Jacobson MD. Apoptosis, Bcl-2-related proteins get connected. *Curr. Biol* 1997;7:277-281.
- Jespersen HM, Kjaersgard IV, Ostergaard L, Welinder KG. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J* 1997;326:305-10.
- Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, Jeang KT. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 1997;272:30952-61.
- Jirata D, Kuru T, Genetu A, Barr S, Hailu A, Aseffa A, Gedamu L. Identification, sequencing and expression of peroxidoxin genes from *Leishmania aethiopica*. *Acta Trop* 2006;99(1):88-96.
- Jockers-Scherubl MC, Schimer RH, Krauth-Siegel RL. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur. J. Biochem* 1989;180:267-272.
- Johnson PJ. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today* 1993;9:183-186.
- Kelly JM, Taylor MC, Smith K, Hunter KJ, Fairlamb AH. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. *Eur. J. Biochem* 1993;218:29-37.
- Kibona SN, Matemba L, Kaboya JS, Lubega GW. Drug-resistance of *Trypanosoma b. rhodesiense* isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health* 2006;11(2):144-55.
- Krauth-Siegel LR, Comini MA, Schlecker T. The trypanothione system. *Subcell Biochem.* 2007;44:231-51.
- Krauth-Siegel RL, Comini, MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochemica et Biophysica Acta* 2008;1780:1236-1248
- Krauth-Siegel RL, Enders B, Henderson GB, Fairlamb AH, Schirmer RH. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur. J. Biochem* 1987;164:123-128.
- Krauth-Siegel RL, Inhoff O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasitol. Res* 2003;90:77-85.
- Krauth-Siegel RL, Meiering SK, Schmidt H. The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*. *Biol Chem* 2003;384:539-49.

- 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. *Mol Microbiol* 2000;35:542-52.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform* 2004;5:150-163.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Lee SC, Kang BG, Oh SE. Induction of ascorbate peroxidase by ethylene and hydrogen peroxide during growth of cultured soybean cells. *Mol Cells* 1999;9(2):166-71.
- Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, *et al.* The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem* 2001;276:26301-26307.
- Levick MP, Tetaud E, Fairlamb AH, Blackwell JM. Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 1998;96:125-37.
- Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *J Am. Med. Assoc* 1999;281:1415-23.
- Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2003;2(5):830-40.
- Lin YC, Hsu JY, Chiang SC, Lee ST. Distinct overexpression of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidases results in preferential detoxification of different oxidants in arsenite-resistant *Leishmania amazonensis* with and without DNA amplification. *Mol Biochem Parasitol* 2005;142:66-75.
- Lopez JA, Carvalho TU, de Souza W, Flohe L, Guerrero SA, Montemartini M, *et al.* Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med* 2000;28:767-72.
- Lyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary ML, Shaha C. Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol* 2008;68(2):372-91.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(1):1-12.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7396-401.
- Machado CR, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira SM. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat Res* 2006;612(1):40-57.
- Mason RP, Holtzman JL. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;67(4):1267-74.

Massad E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect* 2007;136(9):1153-64.

Maya JD, Bollo S, Nuñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, et al. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochem. Pharmacol* 2003;65:999-1006.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007;146(4):601-20.

Maya JD, Repetto Y, Agosín M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote, and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1997;86:101-6.

McDaniel JP, Dvorak JA. Identification, isolation and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol* 1993;57:213-222.

Meziane-Cherif D, Aumercier M, Kora I, Sergheraert C, Tartar A, Dubremetz JF, Ouaisi MA. *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization of trypanothione reductase. *Exp. Parasitol* 1994;79:536-541.

Miles MA, Lanhan SM, De Souza AA, Pova DG. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1980;74:221-242.

Miles MA, Souza AA, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978;272:819-821.

Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 1977;71:217-225.

Mittal MK, Misra S, Owais M, Goyal N. Expression, purification, and characterization of *Leishmania donovani* trypanothione reductase in *Escherichia coli*. *Prot. Express. Purif* 2005;40:279-286.

Mittal MK, Rai S, Ashutosh, Ravinder, Gupta S, Sundar S, Goyal N. Characterization of natural antimony resistance in *Leishmania donovani* isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(4):681-8.

Montemartini M, Kalisz HM, Hecht HJ, Steinert P, Flohe L. Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type trypanothione peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem* 1999;264:516-24.

Montemartini M, Nogoceke E, Singh M, Steinert P, Flohe L, Kalisz HM. Sequence analysis of the trypanothione peroxidase gene from *Crithidia fasciculata* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1998;273:4864-71.

- Moreno SNJ, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AOM. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Arch. Biochem. Biophys 1982;218:585-91.
- Murta SMF, Gazzineli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. Mol. Biol. Parasitol 1998;93:203-214.
- Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 2006;146(2):151-62.
- Murta SM, Romanha AJ. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:177-80.
- Murta SMF, Romanha AJ. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. Parasitology 1998;116:165-171.
- Murta SMF, Dos Santos WG, Anacleto C, Nirdé P, Moreira ESA, Romanha AJ. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of phosphoglycoprotein (PGP) genes. Molecular and Biochemical Parasitology 2001;117:223-228.
- Nanda N, Michel RG, Kurdgelashvili G, Wendel KA. Trichomoniasis and its treatment. Expert Rev Anti Infect Ther 2006;4(1):125-35.
- Neal RA, Van Bueren J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* *in vivo* and *in vitro*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg 1988;82:709-714.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod 2007;70(3):461-77.
- Nirdé P, Larroque C, Barnabé C. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. Medical Sciences 1995;318:1239-44.
- Nogoceke E, Gommel DU, Kiess M, Kalisz HM, Flohe L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. Biol Chem 1997;378:827-36.
- Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benznidazole. Acta Trop 2006;100:119-32.
- Nozaki T, Cross GA. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol 1995;75:55-67.
- Nozaki T, Engel J, Dvorak J. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Med. Hyg 1996;55:111-117.

Ogbonna A, Uneke CJ. Artemisinin-based combination therapy for uncomplicated malaria in sub-Saharan Africa: the efficacy, safety, resistance and policy implementation since Abuja 2000. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102(7):621-7.

Olanow CW. Attempts to obtain neuroprotection in Parkinson's disease. *Neurology* 1997;1 (Suppl) S26-S33.

Olive P. Nitrofurazone-induced DNA damage to tissues of mice. *Chem. Biol. Interact* 1978;20:323-31.

Patterson WR, Poulos TL. Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 1995;34:4331-41.

Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: exploring the nuclear genome of zymodeme 3 stocks by chromosome size polymorphism. *Exp Parasitol* 2007;116(1):71-6.

PERNAMBUCO. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco. **Lafepe produzirá Benzonidazol.** Recife: LAFEPE, [s.d.], [s.p.]. Disponível em: < <http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/noticias/noticiario/09082007.html> > Acesso em: 29 jun. 2009

Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, et al. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J* 2007;403(2):323-34.

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. *Biochem J* 2008;1;410(2):359-68.

Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, Robello C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 2008;408(1-2):45-50.

Piñeyro MD, Pizarro JC, Lema F, Pritsch O, Cayota A, Bentley GA, Robello C. Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Struct Biol* 2005;150:11-22.

Pontes AL, Andrade SG. Response to chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice inoculated with strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from previously treated animals. *Resumo do XX Congresso da Soc. Bras. Med. Trop* 1984;p. 25.

Porcile PE, Santos MR, Souza RT, Verbisck NV, Brandão A, Urmenyi T, et al. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene* 2003;308:53-65.

Pradines B, Pagès JM, Barbe J. Chemosensitizers in drug transport mechanisms involved in protozoan resistance. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2005;5(4):411-31.

Rassi A, Luquetti AO. Therapy of Chagas disease. In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine (ed.) Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. ISBT Brazil, São Paulo, 1992;237-247.

Rassi A, Rassi JA, Rassi GG. Fase aguda. In: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2.^a Edição. Brener, Z., Andrade, ZA., Barral-Netto, M. Rio de Janeiro, 2000;231-244.

Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. IUBMB Life 2001;52:35-41.

Ribeiro-Rodrigues R, Dos Santos W, Oliveira AB, Snieckus V, Zani C, Romanha AJ. Growth inhibitory effect of naphthofuran and naphthofuranquinone derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 1995;5:1509-1512.

Rodriguez JB. Specific molecular targets to control tropical diseases. Curr. Pharm.Des 2001;7:1105-1116.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 1994;17:914-21.

Schapira A, Beales PF, Halloran ME. Malária: living with drug resistance. Parasitol. Today 1993;9:168-174.

Schlecker T, Schmidt A, Dirdjaja N, Voncken F, Clayton C, Krauth-Siegel RL. Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem 2005;280:14385-14394.

Scoth VR, Mathews TR. The efficacy of an n-substituted imidazole, RS-49676, against a *Trypanosoma cruzi* infection in mice. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1987;37:308-313.

Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J 1996;10:709-20.

Senkovich O, Pal B, Schormann N, Chattopadhyay D. *Trypanosoma cruzi* genome encodes a pteridine reductase 2 protein. Mol Biochem Parasitol. 2003;127(1):89-92.

Shames SL, Fairlamb AH, Cerami A, Walsh CT. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* newly discovered member of the family of disulphide containing flavoprotein oxidoreductase. Biochem 1986;25:3519-3526.

Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcrt mutations. Science 2002;298(5591):210-3.

Silveira JF. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2.^a edição. Brener, Z., Andrade, ZA., Barral-Netto, M. Rio de Janeiro, 2000;127-147.

Silvestre R, Santarém N, Cunha J, Cardoso L, Nieto J, Carrillo E, et al. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. Vet Parasitol. 2008;158(1-2):23-30.

- Solari A. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma* 1980;78:239-255.
- Sommer JM, Wang CC. Targeting proteins to the glycosomes of African trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol* 1994;48:105-138.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell D, Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1996;83:141-152.
- Steenkamp DJ. Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. *Antioxid. Redox Signal* 2002;4:105-21.
- Steindel M. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados de Santa Catarina. Belo Horizonte, 1993; UFMG. 162p. Tese de Doutorado.
- Steinert P, Dittmar K, Kalisz HM, Montemartini M, Nogoceke E, Rohde M, et al. Cytoplasmic localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*. *Free Radic Biol Med* 1999;26:844-9.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Internat. J. Parasitol* 2003;33:269-279.
- Sullivan FX, Walsh CT. Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1991;44:145-148.
- Tamayo EM, Iturbe A, Hernandez E, Hurtado G, de Lourdes Gutierrez-X M, Rosales JL, et al. Trypanothione reductase from the human parasite *Entamoeba histolytica*: a new drug target. *Biotechnol Appl Biochem* 2005;41:105-15.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon SA, Morris LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev* 1992;5:400-419.
- Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fedn. Proc* 1973;32:1870-4.
- Target GAT. Chemotherapy and the immune response in parasitic infections. *Parasitology* 1985;90:661-673.
- Taylor MC, Kelly JM, Champman CJ, Fairlamb AH, Miles MA. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Mol. Biochem. Parasitol* 1994;64:293-301.
- Teixeira SM, daRocha WD. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* 2003;31;2(1):148-58.
- Teixeira SM, Kirchhoff L, Donelson J. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNA from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem* 1995;270:22586-22594
- Teixeira SM, Kirchhoff LV, Donelson JE. *Trypanosoma cruzi*: suppression of tuzin gene expression by its 5'UTR and spliced leader addition site. *Exp Parasitol* 1999;93:143-151.

Teixeira SMR. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Braz. J. Med. Biol. Res 1998;31:1503-16.

Tetaud E, Fairlamb AH. Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. Mol Biochem Parasitol 1998;96:111-23.

Tetaud E, Giroud C, Prescott AR, Parkin DW, Baltz D, Biteau N, et al. Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 2001;116:171-83.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 1994;22:4673-4680.

Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabe C, et al. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob. Agents Chemother 2003;47:223-30.

Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. Downregulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998;95:5311-5316.

Tovar J, Fairlamb AH. Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res 1996;24:2942-2949.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 1979;76:4350-4.

Trujillo M, Budde H, Pineyro MD, Stehr M, Robello C, Flohe L, Radi R. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. J Biol Chem 2004;279:34175-82.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol 2003;552:335-44.

Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Mol. Aspects of Medicine 2004;25:211-220.

Ubeda JM, Légaré D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, et al. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. Genome Biol. 2008;9(7):115.

Ullman B. Multidrug resistance and P-glicoprotein in parasitic Protozoa. J. Bioenerg. Biomemb 1995;27:77-84.

Ullu E, Nilsen T. Molecular biology of protozoan and helminth parasites. In: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. New York, Academic Press LTD, 1995;1-17.

- Ullu E, Tschudi C, Gunzi A. Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. Em: Smith, DF, Parson, M. (ed) Molecular Biology of Parasitic Protozoa IRL Press Oxford, 1996;115-129.
- Upcroft JA, Upcroft P. Drug resistance and *Giardia*. Parasitol. Today 1993;9:187-190.
- Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol 2003;19(11):495-501.
- Vanhame L, Pays E. Control of gene expression in Trypanosomes. Microbiol. Ver 1995;59:223-40.
- Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. Mol. Biochem. Parasitol 2004;138:131-141.
- Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJO, Lana M, Chiari E, Tafuri WL, Bahia MT. Variation in susceptibility to Benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2001;96:1005-1011.
- Veloso VM, Romanha AJ, Lana M, Murta SM, Carneiro CM, Alves CF, et al. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. Parasitol Res 2005;96(6):382-9.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. Int. J. Parasitol 1994;24:1317-1331.
- Villarreal D, Nirdé P, Hide M, Barnabé C, Tibayrenc M. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(7):2701-9.
- Walker J, Acestor N, Gongora R, Quadroni M, Segura I, Fasel N, Saravia NG. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and tryparedoxin peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. Mol Biochem Parasitol 2006;145:254-64.
- Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. J Biol Chem 1999;274:26051-6.
- Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. Biochem. J 2000b;352:755-61.
- Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly J. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. J. Biol. Chem 2002b;277:17062–17071.
- Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio EL, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci 2002a;13453–13458.
- Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM. Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:11645-50.

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(13):5022-7.

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. *Biochem. J* 2002c;364:787-794.

Wilkinson SR, Temperton N, Mondragon A, Kelly J. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem* 2000a;275:8220-5.

Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH. Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(4):1359-65.

Yadav RK, Dolai S, Pal S, Adak S. Role of tryptophan-208 residue in cytochrome c oxidation by ascorbate peroxidase from *Leishmania major*-kinetic studies on Trp208Phe mutant and wild type enzyme. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784(5):863-71.

Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 2007;47(3):540-4.

Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect* 2007;9(9):1049-52.

Zeledón R, Dias JCP, Brilla-Salazar A, Rezendo JM, Vargas LG, Urbina A. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? In: Brener, Z. & Andrade, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988;152-174.

Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* 1997;272:30615-8.