

Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

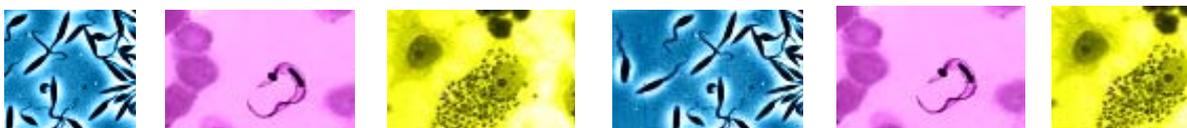
**“CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM  
A ENZIMA DIHIDROLIPOAMIDA DESIDROGENASE (TcLipDH) E  
A PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE HEXOSES (TcrHT1)  
EM CEPAS DO *Trypanosoma cruzi*  
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL”**

por

**Paula Fernandes dos Santos**

Belo Horizonte

Junho/2008



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**“CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM  
A ENZIMA DIHIDROLIPOAMIDA DESIDROGENASE (TcLIPDH) E  
A PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE HEXOSES (TcrHT1)  
EM CEPAS DO *Trypanosoma cruzi*  
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL”**

por

**Paula Fernandes dos Santos**

Dissertação apresentada com vistas à obtenção  
do Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração Biologia Molecular.

Orientação: Dra Silvane Maria Fonseca Murta

Co-orientação: Dr. Álvaro José Romanha,

Dr. Guilherme Oliveira e Dr. Jerônimo C. Ruiz.

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

S237c Santos, Paula Fernandes.  
2008

Caracterização dos genes que codificam a enzima dihidrolipomida desidrogenase (TcLip DH) e a proteína transportadora de hexoses (TcrHT1) em cepas do *Trypanosoma Cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol, ou, Characterization of the genes encoding the dihydrolipoamide dehydrogenase protein (TcLipDH) and the hexose transporter (TcrHT) protein in *Trypanosoma cruzi* strains susceptible and resistant to benznidazole / Paula Fernandes Santos. – Belo Horizonte, 2008.

xix, 113 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 93-106

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre 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/genética 2. *Trypanosoma cruzi*/genética 3. Diidrolipoamida Desidrogenase/síntese química 4. Hexoses/síntese química I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação) II. Romanha, Álvaro José (Co-orientação), Oliveira, Guilherme Corrêa (Co-orientação) e Ruiz, Jerônimo Conceição (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

A dissertação intitulada

**“CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM  
A ENZIMA DIHIDROLIPOAMIDA DESIDROGENASE (TcLIPDH) E  
A PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE HEXOSES (TcrHT1)  
EM CEPAS DO *Trypanosoma cruzi*  
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL”**

apresentada por **Paula Fernandes dos Santos** foi avaliada pela banca examinadora composta pelos membros Dra. Andréa Teixeira e Dra. Daniella Bartholomeu.

A dissertação foi defendida e aprovada no dia 10 de junho de 2008.

“Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

**- Luís Fernando Veríssimo**

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Silvane pela oportunidade;

Ao Dr. Álvaro José Romanha, atual diretor do CPqRR, por ter assumido várias vezes o papel de orientador. Meu eterno agradecimento pelos valiosos ensinamentos para a profissão e para a vida;

Ao Dr. Guilherme Oliveira, chefe do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, por buscar e disponibilizar sempre as melhores condições de trabalho e acesso ao conhecimento para os membros de seu laboratório;

À Dra. Ângela Volpini, vice-chefe do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, cuja chegada foi muito importante para a dinâmica e desenvolvimento dos trabalhos do laboratório;

Às agências financiadoras deste projeto: FAPEMIG, CNPq, PAPES-3/FIOCRUZ e NIH/UGA (parte do incentivo para este estudo é proveniente do projeto “INFORMATICS TRAINING FOR BRAZILIAN VECTOR AND PARASITIC DISEASES”, uma colaboração do *National Institute of Health e University of Georgia*);

Ao Dr. Jerônimo pela participação em uma parte importante deste projeto e do meu aprendizado;

Ao Dr. Rodrigo Soares pela colaboração nos ensaios de atividade do transportador de hexoses, pelos conselhos, e pelos ensinamentos;

Ao Dr. Carlos Chávez e seus alunos Clara Guerra, Liza Felicori e Ricardo Andrez;

Ao Dr. Michael Richardson e à Dra. Márcia Borges da Funed;

À Dra. Santuza Teixeira pelo exemplo e por ter me recebido sempre tão bem em seu laboratório quando precisei;

À Dra. Rosiane por sempre se dispor a discutir as minhas dúvidas;

À Gabriela Cristo, responsável pela qualidade, por garantir ótimas condições de trabalho e por zelar pela segurança de todos no laboratório;

À Rosana por me ensinar sobre cultura de epimastigotas e pela colaboração no cultivo das cepas utilizadas neste trabalho;

À Maureen, secretária do LPCM, pela ajuda com documentações, faxes, correspondências e pelos reconfortantes cafés;

À Kênia, cujo trabalho é essencial para manter o laboratório funcionando bem;

À Patrícia Ruy, um grande agradecimento. Chegou no final do trabalho e com disposição e muito conhecimento me ajudou nas análises de bioinformática;

Aos amigos que estão ou que passaram pelo LPCM nesses 5 anos que estou no CPqRR: Fernanda Barbosa, Marcela Lencine, Marcos Messias, Fernanda Freire, Simara, Sara, Daniel, Lorenza, Kelly Magalhães, Gabriela, Luciana, Flávio, Lívia, Luiza, Nilton, Rômulo, Anderson, Fernanda Ludolf, Elisângela, Joyce, Patrícia, Raul, Juciane, Maíra, Regina, Kelly Alves, Mariana, Gustavo, Marcilene, Alexandre, Adhemar, Caroline e Rafael. Obrigada pelos anos de convivência mais que agradável, pelas conversas descontraídas nos cafés (o melhor café do René!), pelas ajudas, pela força, pelas risadas e pelas palavras de incentivo.

Aos amigos da pós-graduação: Sara, Armando, Miriam e Maíra Neves não só pela amizade, mas por compartilharem suas idéias e experiências;

Às amigas da UFMG: Marcela, Patrícia, Raquel e Fernanda por estarem sempre presentes mesmo depois de formadas. Sua amizade é muito querida e muito importante;

Às amigas Lívia Monteiro, Fernanda Cunha e Priscilla Pimenta pela amizade nunca esquecida apesar da distância;

Às secretárias da pós-graduação Cristiane Pinheiro e Andréa Dias por sempre me tratarem com muita simpatia e por me ajudarem sempre com as documentações, prazos, assinaturas, matrículas e pelos lembretes para fazer tudo isso;

Às secretárias Carol e Michelle, pela prontidão em conseguir um valioso horário com o Dr. Álvaro;

Ao Fernando, à Izabela e à Alice do LAMAL por me ajudarem com reagentes e equipamentos;

Ao Dani, meu amor, uma das melhores surpresas dessa jornada, por tornar os momentos felizes muito mais felizes e por estar ao meu lado nos momentos difíceis com palavras de carinho e incentivo;

À Fátima, Tânius e Yasmine, por me acolherem como família em várias ocasiões;

À Heidi, Troy e todos os amigos de Iowa por não me esquecerem e por demonstrarem orgulho e respeito pelo meu esforço;

Aos meus tios, tias e primos por compreenderem sempre que troquei a família pelo trabalho;

À minha família por estarem ao meu lado sempre. Mãe, pai e Jú, amo muito vocês.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO EM PORTUGUÊS</b> .....	xviii
<b>RESUMO EM INGLÊS</b> .....	xix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 Carlos Chagas e a descoberta da Doença de Chagas .....	20
1.2 Características genéticas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
1.3 O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> e as formas clínicas da doença de Chagas .....	22
1.4 Quimioterapia .....	25
1.5 Mecanismos de resistência em parasitos e estudo de expressão diferencial em cepas do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes a drogas .....	27
1.6 Características do gene <i>TcrHT1</i> e da proteína transportadora de hexoses .....	29
1.7 Características do gene <i>TcLipDH</i> e da enzima dihidrolipoamida desidrogenase .	31
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 Objetivo Geral .....	35
3.2 Objetivos Específicos .....	35

<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1	Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	36
4.2	Extração de RNA total .....	36
4.3	Extração de DNA .....	37
4.4	Reação em Cadeia da Polimerase .....	38
4.5	Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida .....	38
4.6	<i>Northern blotting</i> .....	38
4.7	<i>Southern Blotting</i> .....	39
4.8	PCR Quantitativo em Tempo Real .....	39
4.9	Sondas e ensaio de hibridização .....	40
4.10	Eletroforese de Pulso Alternado .....	41
4.11	Clonagem dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> em vetores de expressão .....	43
4.12	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....	44
4.13	Teste de solubilidade das proteínas recombinantes TcLipDH e TcrHT1 .....	44
4.14	Extração de proteínas recombinantes insolúveis com sarcosil .....	45
4.15	Purificação das proteínas recombinantes .....	45
4.16	Purificação da proteína Glutathione S-transferase (GST) .....	46
4.17	Obtenção de anticorpo policlonal anti-rTcLipDH e anti-rTcrHT1 .....	46
4.18	Extração de proteínas totais do <i>T. cruzi</i> .....	46
4.19	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford .....	47
4.20	<i>Western blotting</i> .....	47
4.21	Análise Densitométrica .....	48
4.22	Ensaio de atividade da proteína TcrHT1 .....	48

4.23	Estudos dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> em diferentes bancos de dados de domínio público .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1	Nível de mRNA dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> nas cepas do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ .....	51
5.2	Organização genômica por <i>Southern Blotting</i> .....	55
5.3	Localização cromossômica dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> .....	58
5.4	Clonagem dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> , expressão das proteínas recombinantes e produção de anticorpos policlonais .....	60
5.5	Avaliação do nível de expressão das proteínas <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> em cepas do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ .....	64
5.6	Ensaio de atividade do transportador de hexoses .....	68
5.7	Estudos comparativos dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> contra diferentes bancos de dados de domínio público .....	70
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>93</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Carlos Chagas e a criança Berenice, primeira paciente detectada com o parasito .....	20
<b>Figura 2</b>	Variações morfológicas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
<b>Figura 3</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
<b>Figura 4</b>	Chagoma de inoculação no olho (sinal de Romana) com edema inflamatório unilateral palpebral .....	25
<b>Figura 5</b>	Modo de ação do BZ e do NFX .....	26
<b>Figura 6</b>	Estrutura secundária da proteína transportadora de hexose de <i>T. cruzi</i> e comparação com o transportador de glicose GLUT1 de mamíferos .....	31
<b>Figura 7</b>	Esquema representativo do complexo piruvato desidrogenase .....	33
<b>Figura 8</b>	Metabolismo energético em tripanosomatídeos .....	33
<b>Figura 9</b>	Análise por <i>Northern blot</i> do nível de mRNA dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> em populações de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ .....	53
<b>Figura 10</b>	Amplificação dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> por RT-PCR Quantitativo em Tempo Real .....	54
<b>Figura 11</b>	Análise por PCR Quantitativo em Tempo Real do nível de mRNA dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> em populações de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ ...	55
<b>Figura 12</b>	Organização genômica dos genes <i>TcrHT1</i> e <i>TcLipDH</i> em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis resistentes ao BZ .....	57

<b>Figura 13</b>	Localização cromossômica dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> .....	59
<b>Figura 14</b>	Gel de poliacrilamida corado pela prata mostrando PCR de colônia mostrando a clonagem dos genes <i>TcLipDH</i> e <i>TcrHT1</i> no vetor pGEX 5X-3 .....	61
<b>Figura 15</b>	Gel de poliacrilamida corado pela prata mostrando PCR de colônia para a confirmação da clonagem dos fragmentos do gene <i>TcrHT1</i> no vetor pGEX 5X-3 .....	63
<b>Figura 16</b>	Expressão e purificação das proteínas recombinantes .....	64
<b>Figura 17</b>	<i>Western blot</i> das proteínas totais das cepas de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao benzonidazol incubadas com anticorpo policlonal anti-GST (1:1.000).....	65
<b>Figura 18</b>	Análise por <i>Western blot</i> do nível de expressão da proteína TcLipDH .....	67
<b>Figura 19</b>	<i>Western Blot</i> mostrando reação de anticorpos policlonais anti-GST com proteínas totais das cepas de <i>T. cruzi</i> , GST e TcrHT1 fusionada à GST.....	68
<b>Figura 20</b>	Ensaio de transporte de glicose em cepas de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ .....	70
<b>Figura 21</b>	Interface do programa Artemis 7.0 mostrando a localização das regiões de similaridade com o gene transportador de hexoses em diferentes <i>contigs</i> .....	72
<b>Figura 22</b>	Árvore filogenética construída com seqüências de lipoamida desidrogenases ou transportadores de hexoses de diferentes organismos .....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características das populações e clones do <i>T. cruzi</i> utilizadas neste estudo ...	37
<b>Tabela 2</b>	Iniciadores utilizados para PCR, síntese de sondas e PCR Quantitativo em Tempo Real .....	42
<b>Tabela 3</b>	Valores de absorbância do soro 1:200 de coelhos imunizados com a proteína recombinante TcLipDH ou TcrHT1 ou GST. Quantificação por ELISA .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μCi</b>	Grandeza de radiação microCurie, 10 <sup>-6</sup> Ci
<b>μg</b>	Micrograma, 10 <sup>-6</sup> gramas
<b>μl</b>	Microlitro, 10 <sup>-6</sup> litros
<b>3'-UTR</b>	Do inglês <i>Untranslated Region</i> , região 3' não-traduzida
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BCIP</b>	5-Bromo 4-cloro-3-indolfosfato
<b>Blast</b>	Do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Ferramenta de Busca de Alinhamento Local
<b>Blastn</b>	Alinhamento de sequências de nucleotídeo
<b>Blastp</b>	Alinhamento de sequências de aminoácidos
<b>BZ</b>	Benzonidazol
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DD</b>	Do inglês <i>Differential Display</i> , Expressão Diferencial
<b>DNA</b>	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Do inglês <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i> , Deoxinucleotídeo Trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Do inglês <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic</i> , Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
<b>FAD</b>	Flamina Adenina Dinucleotídeo
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Íon Férrico
<b>Glu</b>	Ácido Glutâmico

<b>GLUT</b>	Do inglês <i>Glucose transporter</i> , transportador de glicose
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GR</b>	Glutaciona Redutase
<b>GST</b>	Gutaciona S-Transferase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HMM</b>	Do inglês <i>Hidden Markov Model</i> , Modelo Oculto de Markov
<b>HSP-100</b>	Do inglês <i>Heat Shock Protein of 100 kDa</i> , Proteína de Choque Térmico de 100 kDa
<b>HSP-70</b>	Do inglês <i>Heat Shock Protein of 70 kDa</i> , Proteína de Choque Térmico de 70 kDa
<b>HT</b>	Do inglês <i>Hexose Transporter</i> , Transportador de Hexoses
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IPTG</b>	Isopropil-Tio-2-D-Galactopiranosideo
<b>Kb</b>	Kilobases, 10 <sup>-3</sup> pares de bases
<b>kDa</b>	Kilodáltons
<b>kDNA</b>	DNA do Cinetoplasto
<b>KRP</b>	Tampão <i>Krebs-Ringer Phosphate</i>
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LipDH</b>	Lipoamida Desidrogenase
<b>LIT</b>	Do inglês <i>Liver Infusion-Tryptose</i> , Meio de Infusão de Fígado e Tryptose
<b>M</b>	Molar
<b>Mb</b>	Megabases, 10 <sup>6</sup> bases
<b>Met</b>	Metionina

<b>MFS1</b>	Do inglês <i>Multiple Facilitator Superfamily 1</i> , Família de proteínas que realizam difusão facilitada
<b>Min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros, $10^{-3}$ litros
<b>mM</b>	Milimolar, $10^{-3}$ litros
<b>MOPS</b>	Do inglês <i>3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid</i> , Ácido 3-N-Morfolino Propanosulfônico
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Sódio Dibásico
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Sódio Monobásico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>NBT</b>	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
<b>NCBI</b>	Do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i> , Centro Nacional de Informação Biotecnológica
<b>NFX</b>	Nifurtimox
<b>ng</b>	Nanograma, $10^{-9}$ gramas
<b>NJ</b>	Do inglês <i>Neighbour Joining</i> , método para construção de árvores filogenéticas baseado na distância entre sequências de DNA ou proteína de diferentes taxa
<b>nt</b>	Nucleotídeo
<b>NT-NCBI</b>	Coleção de nucleotídeos do NCBI
<b>nr-NCBI</b>	Coleção não-redundante de proteínas do NCBI
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Íon superóxido

<b>OH<sup>-</sup></b>	Íon hidroxila
<b>ORF</b>	Do inglês <i>Open Reading Frame</i> , janela de leitura aberta
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFGE</b>	Eletroforese de Campo Pulsado
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PMSF</b>	Fluoreto de Fenil-Metil-Sulfonil
<b>R</b>	Resistente
<b>RADES</b>	Do inglês <i>Random differentially expressed sequences</i> , Sequências aleatórias diferencialmente expressas
<b>RAPD</b>	Do inglês <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> , amplificação randômica de polimorfismos de DNA
<b>RDE</b>	Do inglês <i>Representation of Differential Expression</i> , Representação da Expressão Diferencial
<b>RNA</b>	Do inglês <i>Ribonucleic Acid</i> , Ácido Ribonucléico
<b>R-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Radical Nitroânion
<b>rRNA</b>	Do inglês <i>ribosomal RNA</i> , RNA ribossômico
<b>RT</b>	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase</i> , Transcriptase Reversa
<b>S</b>	Sensível
<b>SDS</b>	Do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> , Duodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Do inglês <i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
<b>Seg</b>	Segundos
<b>SSC</b>	Do inglês <i>Saline-Sodium Citrate</i> , Tampão Citrato de Sódio
<b>T<sub>11</sub>A</b>	Oligonucleotídeo formado por 11 timinas e 1 adenina
<b>T<sub>11</sub>C</b>	Oligonucleotídeo formado por 11 timinas e 1 citosina

<b>T<sub>11</sub>G</b>	Oligonucleotídeo formado por 11 timinas e 1 guanina
<b>TBE</b>	Tampão Tris-Borato EDTA, pH 8,0
<b>TcHGPRT</b>	Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferase do <i>T. cruzi</i>
<b>TcLipDH</b>	Lipoamida Desidrogenase do <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TcrHT1</b>	Transportador de Hexoses do <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>THT</b>	Transportador de Hexoses do <i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TR</b>	Tripanotiona Redutase
<b>Tris</b>	Tri-Hidroximetil Amino Metano
<b>V</b>	Volt
<b>Val</b>	Valina
<b>WHO</b>	Do inglês <i>World Health Organization</i> , Organização Mundial de Saúde
<b>Z1</b>	Zimodema 1
<b>Z2</b>	Zimodema 2
<b>Z3</b>	Zimodema 3
<b>ZB</b>	Zimodema B
<b>A[<sup>32</sup>P]dCTP</b>	Deoxicitidina Trifosfato marcado com fósforo radioativo

## RESUMO

A glicose e outras hexoses são importantes para o funcionamento das células eucariotas. Os transportadores de hexoses são proteínas transmembrana que levam o substrato para dentro da célula. Na glicólise, o açúcar captado é convertido em piruvato e este, por sua vez, é convertido a acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico. A conversão do piruvato a acetil-CoA conta com a participação da enzima lipoamida desidrogenase (LipDH), uma flavoenzima homodimérica da família das FAD-dissulfeto oxireductase que é também importante para o mecanismo de oxiredução da célula.

Murta *et al.* (2008, in press), utilizando a metodologia *Differential Display* (DD) selecionaram os genes que codificam o transportador de hexoses (TcrHT1) e a enzima lipoamida desidrogenase (TcLipDH) como genes mais expressos em uma cepa do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao benzonidazol BZ e, que, portanto, seriam alvos em potencial para quimioterapia.

Neste estudo, a fim de caracterizar os genes *TcrHT1* e *TcLipDH*, foram analisados os níveis de mRNA; a organização genômica, a amplificação e a presença de polimorfismos; o nível de expressão ou atividade da proteína e a localização cromossômica em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

Ensaio de *Northern blot* e PCR em Tempo Real confirmaram os resultados de DD e mostraram que ambos estão cerca de 2X mais expressos na cepa com resistência induzida *in vitro* ao BZ, 17LER, quando comparada a seu par sensível, 17WTS. Por *Southern blot* confirmamos que o gene TcLipDH possui duas cópias e o TcrHT1, um arranjo em “tandem” e não estão amplificados no genoma de nenhuma cepa resistente. Além disso, foi encontrado um polimorfismo para o gene *TcrHT1* que não está relacionado ao fenótipo de resistência a drogas e sim com o zimodema ao qual as cepas analisadas pertencem. Os resultados de *Western blot* mostraram que a enzima TcLipDH está igualmente expressa em todas as cepas analisadas à exceção da cepa 17LER na qual a proteína está 2X menos expressa em comparação à 17WTS. Devido à dificuldade de obter anticorpos anti-TcrHT1, os ensaios de *Western blotting* foram substituídos pelo ensaio de atividade enzimática no qual constatamos que a eficiência de captação de glicose é 40% menor na cepa 17LER quando comparada à 17WTS. A localização cromossômica desses genes não está relacionada à resistência e é zimodema-dependente para o gene *TcrHT1*. Análises de bioinformática permitiram contextualizar evolutivamente ambos os genes e geraram informações interessantes sobre filogenia e anotação no genoma.

## ABSTRACT

Glucose and other hexoses are important for eukaryote cell function. The hexose transporters are transmembrane proteins that take the sugar substrate into the cell. This sugar undergoes glycolysis and is converted into pyruvate which generates Acetyl-CoA for the citric acid cycle. This conversion of pyruvate to Acetyl-CoA takes into account the participation of lipoamide dehydrogenase enzyme (LipDH), a homodimeric flavoenzyme from the FAD-dissulfide oxidoreductase family that is also important for the redox balance inside the cell.

Murta *et al.* (2008 *in press*), using the Differential Display methodology, selected the genes encoding the *Trypanosoma cruzi* hexose transporter (TcrHT1) and the lipoamide dehydrogenase (TcLipDH) as genes with higher expression in a *T. cruzi* population (17LER) with in vitro induced resistance to benznidazole (BZ) than in its susceptible pair (17WTS). These genes could be, therefore, potential new targets for chemotherapy.

In the present study we used *T. cruzi* strains susceptible and resistant to BZ to characterize *TcrHT1* and *TcLipDH* genes in their mRNA levels, genomic organization and polymorphisms, protein expression or activity and, finally, their chromosomal location. We have also done an *in silico* characterization using different public databases.

Northern blot and Real Time RT-PCR analysis confirmed the results obtained by DD. Both genes are in average 2-fold more expressed in the resistant population 17LER compared to 17WTS. Southern blot analysis confirmed that TcLipDH gene presents 2 copies while TcrHT1 presents a tandem array. These genes are not amplified in the genome of resistant *T. cruzi* samples. In addition, we detected a polymorphism for the TcrHT1 gene that is related to the zimodeme of *T. cruzi* instead of the resistance phenotype. Western blot analysis showed that LipDH enzyme is equally expressed in all strains analyzed, except in 17LER population that presented 2-fold less expression. Due to the difficulty in obtaining anti-TcrHT1 antibodies, sugar uptake assays were used instead of Western blot and showed that the TcrHT1 protein has a 40% lower efficiency in 17LER strain when compared to its susceptible counterpart. Bioinformatic tools allowed us to analyze both genes in the evolutionary context reinforcing the idea of TcrHT1 and TcLipDH as potential drug targets. We have also generated interesting information about phylogeny and genome annotation of TcLipDH and TcrHT1 genes.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Carlos Chagas e a descoberta da Doença de Chagas

Em 1907 Oswaldo Cruz designou Carlos Chagas para combater uma epidemia de malária que paralisava as obras de prolongamento da Estrada de Ferro Central do Brasil, em Minas Gerais, na região do Rio das Velhas. No município de Lassance, onde se construía uma estação da ferrovia, Chagas instalou um pequeno laboratório em um vagão de trem onde também dormia. Sabendo da importância dos insetos hematófagos como transmissores de doenças parasitárias, Chagas examinou alguns barbeiros e encontrou, em seus intestinos, formas flageladas de um protozoário. Ele constatou que o protozoário era uma nova espécie de tripanossoma, que batizou então de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz. Posteriormente, o mesmo protozoário foi encontrado no sangue de animais domésticos e no dia 14 de abril de 1909 foi encontrado no sangue da criança Berenice:

“Num doente febricitante, profundamente anemiado e com edemas, com plêiades ganglionares engurgitadas, encontramos tripanossomas, cuja morfologia é idêntica à do *Trypanosoma cruzi*. Na ausência de qualquer outra etiologia para os sintomas mórbidos observados e ainda de acordo com a experimentação anterior em animais, julgamos tratar-se de uma tripanossomíase humana, moléstia ocasionada pelo *Trypanosoma cruzi*.”



**Figura 1:** Carlos Chagas e a criança Berenice, primeira paciente detectada com o parasito *T. cruzi* no sangue (*Dictionary of Medical Biography*, 2007).

## 1.2. Características genéticas do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família *Trypanosomatidae*, uma família de parasitos obrigatórios de plantas e animais. É caracterizado pela presença de um flagelo que se origina de uma invaginação da membrana plasmática conhecida como bolsa flagelar e pelo cinetoplasto, que corresponde a uma condensação do ácido desoxirribonucléico (DNA) localizado no interior de uma mitocôndria única e que ocupa boa parte do corpo do protozoário (Figura 2). Apesar de não haver condensação dos cromossomos na divisão celular, estudos de fracionamento cromossômico (Branche *et al.*, 2006) e análises do genoma (El-Sayed, *et al.*, 2005) classificaram o parasito como um organismo diplóide.

O projeto genoma do *T. cruzi* mostrou que o genoma do parasito é composto em cerca de 50% de seqüências repetitivas correspondentes, em sua maioria, a famílias de genes de proteínas de membrana, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed *et al.*, 2005). Além disso, cerca de 20 a 25% do DNA total da célula é encontrado no cinetoplasto. O DNA do cinetoplasto (kDNA, do inglês *kinetoplast DNA*) é constituído por dois tipos diferentes de moléculas: os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos contêm 20 kilobases (Kb), apresentam 50 cópias por célula e codificam proteínas da cadeia de transporte de elétrons e RNA ribossômico mitocondrial. Já os minicírculos contêm 1.400 pares de bases (pb), 10.000 a 20.000 cópias por célula e codificam pequenos RNAs com atividade no processamento dos transcritos do maxicírculo (Simpson, 1987).

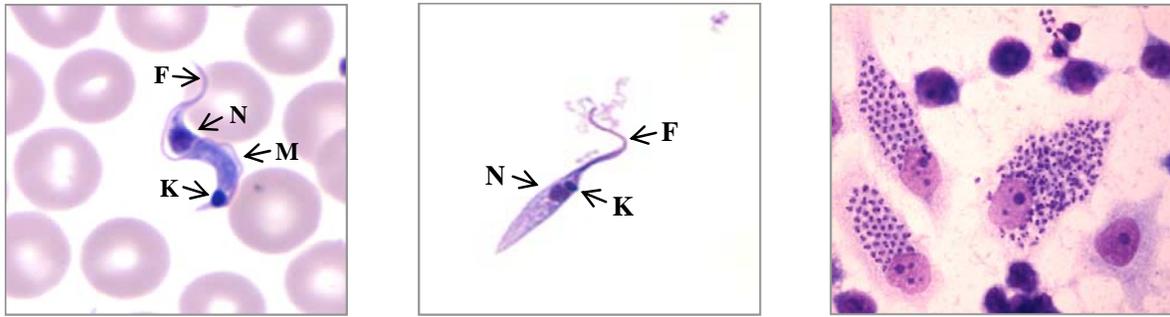
O fracionamento das bandas cromossômicas através do PFGE (Eletroforese de Campo Pulsado) e hibridização com sondas de DNA têm sido utilizados para definir o cariótipo molecular de diferentes cepas e isolados de *T. cruzi*. Hibridização com sonda derivada de regiões teloméricas indicaram que na cepa CL existem 64 cromossomos e que o conteúdo nuclear é da ordem de 87 Mb. Esses 64 cromossomos se dividem em 20 bandas cromossômicas cujos tamanhos variam de 0,45 a 3,5 Megabases (Mb), sendo 12 bandas de 3,5 a 1,0 Mb e 8 bandas de 1 a 0,45 Mb (Cano *et al.*, 1995).

O *T. cruzi* é uma espécie altamente *pcolimórfica* e várias abordagens foram realizadas para agrupar as diferentes populações do parasito. Na década de 70 foram realizados os primeiros estudos de genética de populações de *T. cruzi*. Miles *et al.* (1978, 1980), analisando o *pcolimorfismo* dos perfis eletroforéticos de seis enzimas, reuniu algumas cepas em três grupos

principais chamados zimodemas. Os zimodemas Z1 e Z3 agrupavam predominantemente cepas do ciclo silvestre de transmissão do parasito, e o zimodema Z2, cepas do ciclo doméstico. Devido ao grande número de isoenzimas, fez-se a necessidade do uso de outros marcadores moleculares para agrupamento das cepas. Em 1996, Souto *et al.* utilizaram as metodologias de amplificação randômica de *pcolimorfismos* de DNA (RAPD) dos genes espaçadores do mini-éxon e reação em cadeia da *pcolimerase* (PCR) da subunidade 24S $\alpha$  do rRNA e mostraram que existem duas grandes linhagens filogenéticas denominadas por consenso grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (*Recommendations from a satellite meeting*, 1999). A distribuição epidemiológica desses grupos foi investigada, concluindo-se que cepas do grupo *T. cruzi* I predominam no ciclo silvestre e cepas do grupo *T. cruzi* II predominam no ciclo doméstico. Posteriormente, com base na análise de isoenzimas e RAPD, foi proposta a subdivisão do grupo *T. cruzi* II em cinco subgrupos denominados IIa–IIe (Brisse *et al.*, 2000). Apesar de haver três marcadores (izoenzimas, genes espaçadores do mini-éxon e subunidade 24S $\alpha$  do rRNA) definindo esses grupos, há ainda algumas cepas que não se incluem nos grupos *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II. Freitas *et al.* (2006), utilizando ferramentas de bioinformática e analisando *pcolimorfismos* de cinco loci de microsátelites nucleares, do gene 24S $\alpha$  do rRNA do gene que codifica a subunidade II da citocromo oxidase mitocondrial, além de sequências dos genes de citocromo B e NADH desidrogenase conseguiram distribuir 75 cepas de *T. cruzi* em três grupos, apresentando à comunidade científica o grupo *T. cruzi* III além dos grupos I e II previamente conhecidos.

### **1.3. O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e as formas clínicas da doença de Chagas**

O *T. cruzi* apresenta variações morfológicas ao longo de seu ciclo de vida denominadas formas tripomastigotas, epimastigotas, amastigotas (Figura 2). A forma tripomastigota é alongada podendo ser fina ou larga, com cinetoplasto na região posterior ao núcleo, membrana ondulante e flagelo livre na região anterior. Esta forma é altamente infectante, porém não-replicativa. A forma epimastigota é alongada, com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo que emerge de uma bolsa flagelar tornando-se livre na região anterior. É uma forma replicativa e não-infectante. A forma amastigota é arredondada, com cinetoplasto na região anterior ao núcleo e flagelo curto, imperceptível por microscopia óptica. É uma forma replicativa e infectante (Prata, 2001).



**Figura 2:** Variações morfológicas do parasito *Trypanosoma cruzi*. Da esquerda para a direita: forma tripomastigota, forma epimastigota e formas amastigotas dentro de células Vero. Nas formas tripomastigota e epimastigota, estão indicados o núcleo (N), o cinetoplasto (K), o flagelo (F) e a membrana (M).

Este parasito é o agente etiológico da doença de Chagas e pode ser transmitido pelo vetor triatomíneo infectado, por transfusão de sangue, por via congênita, por via oral na ingestão de alimentos contaminados, por acidentes de laboratório, por transplante de órgãos e pelo leite materno (Brener, Andrade & Barral-Netto, 2000).

Na transmissão vetorial (Figura 3), as formas tripomastigotas são adquiridas pelo hospedeiro invertebrado – barbeiro, inseto triatomíneo - ao alimentar-se de sangue infectado. Os parasitos tripomastigotas migram do intestino anterior para o intestino médio do inseto onde se diferenciam em epimastigotas e se multiplicam. Os vários parasitos epimastigotas migram para o intestino posterior do inseto, onde se convertem em tripomastigotas metacíclicos. Essas formas são excretadas nas fezes no momento do próximo repasto sanguíneo do inseto e se conseguirem penetrar a mucosa ou a pele do hospedeiro mamífero, atingirão a corrente sanguínea. Uma vez no sangue do hospedeiro, os parasitos invadem vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras) e se diferenciam em amastigotas. Após sucessivas multiplicações no citoplasma as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas e a célula se rompe liberando os parasitos no espaço intercelular. Estas formas podem invadir novas células ou também cair na corrente sanguínea. Da circulação, os parasitos podem infectar outros tecidos ou um barbeiro ainda não parasitado dando continuidade à transmissão da doença (Tyler & Engman, 2001).

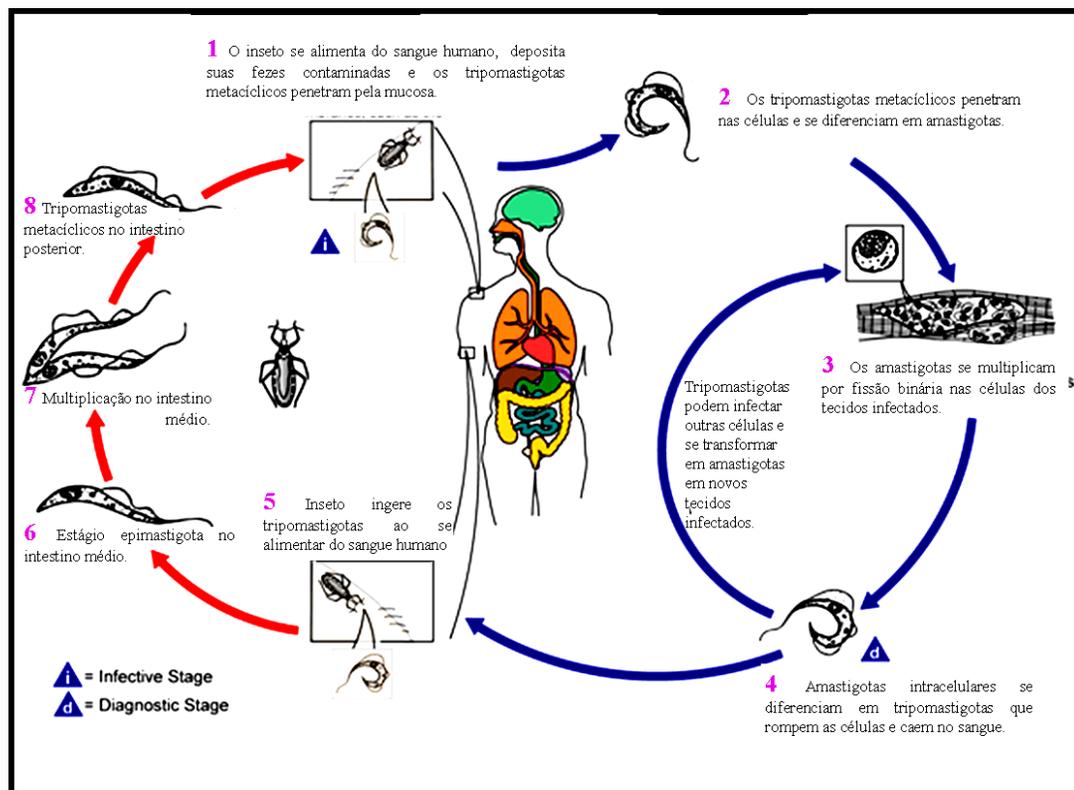
Atualmente, com o controle das transmissões vetorial e transfusional, a transmissão oral tem se tornado a mais importante forma de infecção pelo *T. cruzi* (Coura, 2007). A transmissão oral pode acontecer pela ingestão de sucos de frutas, leite cru e carne crua de animais silvestres

quando mal preparados e contendo fezes de barbeiros infectados (Relatório Técnico - *Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos*, 2006).

Indivíduos infectados podem apresentar três formas clínicas da doença: a forma aguda, a forma indeterminada e a forma crônica.

A forma aguda tem as características clínicas de uma infecção generalizada, podendo ser de gravidade variável. O diagnóstico é sugerido pela presença de chagomas de inoculação (*i.e.* sinal de Romaña ou chagoma cutâneo) (Figura 4) e comprovado pela detecção de parasitos no sangue periférico. A morbidade da doença aguda é sempre maior em crianças. A duração desta fase varia entre 4 e 12 semanas, ao fim das quais o quadro febril e os parasitos no sangue periférico tendem a desaparecer, os níveis de IgM diminuem e os de IgG aumentam.

A forma indeterminada é caracterizada por um estado de equilíbrio parasito-hospedeiro, raros parasitos no sangue e sem manifestações clínicas. Em cerca de 30% dos casos pode ocorrer uma transição para a forma crônica anos mais tarde.



**Figura 3:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*  
(<http://www.dpc.cdc.gov> - Centers for Disease Control and Prevention)

A forma crônica pode ser cardíaca ou digestiva. A cardíaca é caracterizada por miocardiopatia inflamatória fibrosante que leva a uma insuficiência cardíaca progressiva de curso fatal. A digestiva é caracterizada por megaesôfago e megacólon. Muitos outros órgãos podem ser comprometidos na forma crônica, em menor intensidade, sendo descritos parotidopatias, duodenopatias, ureteropatias, encefalopatias, entre outras. Muitos casos de formas crônicas determinadas apresentam uma evolução benigna e muito lenta da doença permitindo que o paciente viva muitos anos e tenha morte não relacionada com a infecção. No entanto, um percentual significativo de pacientes evolui rapidamente para a morte (Brener, Andrade & Barral-Netto, 2000).



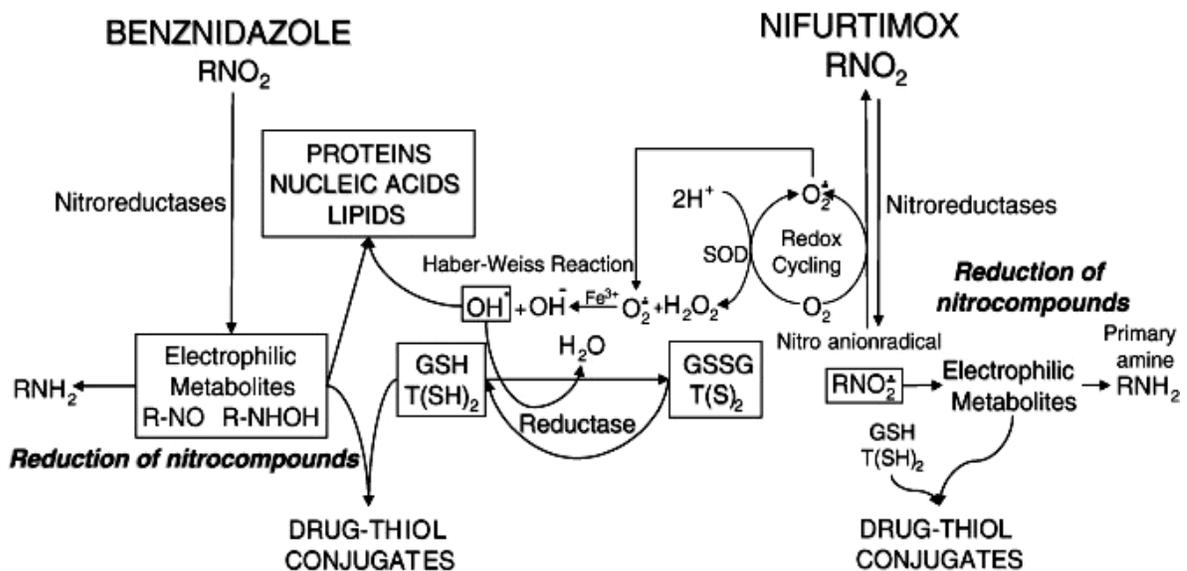
**Figura 4:** Chagoma de inoculação no olho (sinal de Romaña) com edema inflamatório unilateral palpebral.

#### 1.4. Quimioterapia

O nifurtimox (5-nitrofurano; NFX), comercialmente conhecido como Lampit<sup>®</sup>, e o benzonidazol (2-nitroimidazol; BZ), comercialmente conhecido como Rochagan<sup>®</sup>, foram introduzidos na clínica na década de 70. No mecanismo de ação de ambas as drogas, o grupo nitro é reduzido por enzimas nitroredutases produzindo radicais livres intermediários e metabólitos eletrofilicos. Para o nifurtimox, o grupo nitro é reduzido e o radical  $R-NO_2^{\cdot}$  reage com oxigênio molecular regenerando a droga. Entretanto, essa reação gera ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). A enzima superóxido dismutase elimina esse ânion superóxido formando  $H_2O_2$ . Na presença de  $Fe^{3+}$ , o peróxido de hidrogênio e  $O_2^{\cdot-}$  geram o radical livre  $OH^{\cdot}$  que se liga a lípidos, DNA e proteínas danificando-os. O mecanismo de ação do benzonidazol ainda é pouco conhecido, mas supõe-se que metabólitos produzidos a partir da droga reduzida se liguem

covalentemente a macromoléculas impedindo o crescimento do parasito (Maya *et al.*, 2007) (Figura 5).

Apesar da ação tripanocida nenhum deles é considerado uma droga ideal, pois: (i) apresentam baixo percentual de cura na fase crônica da doença (somente 8% contra 76% na fase aguda) (Cançado, 2002); (ii) produzem efeitos colaterais indesejáveis (distúrbios gastrintestinais, vômito, leucopenia, dermatopatia alérgica, dentre outros) (Andrade, 1992); (iii) seu percentual de ação varia em diferentes cepas do parasito (Brener *et al.*, 1976); (iv) existem populações do parasito naturalmente resistentes ao BZ ou ao NFX ou com resistência cruzada a ambos compostos (Filardi & Brener, 1987).



**Figura 5:** Modo de ação do BZ e do NFX (Maya *et al.*, 2007).

A experimentação de potenciais drogas para o tratamento da doença de Chagas recebe pouco investimento, mas os motivos supracitados tornam necessário o desenvolvimento de novos quimioterápicos (Nwaka & Hudson, 2006).

As alterações bioquímicas e os mecanismos moleculares que tornaram os parasitos resistentes a drogas são ainda pouco conhecidos. Para que novas terapias contra as doenças parasitárias sejam desenvolvidas, é preciso buscar novos alvos intracelulares para drogas e

compreender as estratégias de defesa da célula parasitada ou do parasito. Experimentos com produtos naturais ou sintéticos utilizados no tratamento de outras doenças ou ainda direcionados para alvos metabólicos específicos do parasito têm sido testados (Coura & Castro, 2002). A inibição da produção de ergosterol pelo parasito é um exemplo desta linha de pesquisa. O ergosterol é essencial para a sobrevivência do *T. cruzi* que não consegue utilizar o do hospedeiro como faz com açúcares e aminoácidos. Mcolina *et al.* (2000) demonstraram que o Posaconazol, originalmente um antifúngico, inibe a proliferação de epimastigotas pela inibição da síntese de ergosterol, inclusive em cepas com resistência cruzada ao BZ e ao NFX.

### **1.5. Mecanismos de resistência em parasitos e estudo de expressão diferencial em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas**

Os principais mecanismos de resistência a drogas em microrganismos (revisados por Ouellette, 2001) são: (i) diminuição da entrada da droga na célula (Ellenberg & Beverley, 1987); (ii) eliminação da droga pela fosfoglicoproteína de membrana (PGP) ou outras proteínas transportadoras dependentes de ATP (Krogstad *et al.*, 1987); (iii) diminuição da ativação da droga (Shaked-Mishan *et al.*, 2000); (iv) modificação da droga (Ellenberger & Beverley, 1989); (v) alteração da formação do complexo alvo-droga (Cowman *et al.*, 1988) e (vi) eficiência no sistema de reparo (Bethke *et al.*, 2007; Trotta *et al.*, 2004).

Com a finalidade de estudar o fenótipo de resistência a drogas em *T. cruzi*, vários autores obtiveram cepas desse parasito com resistência ao BZ ou ao NFX. Nirdé *et al.* (1995) conseguiram obter *in vitro* uma população de *T. cruzi* 23 vezes mais resistente ao BZ (17LER) do que o clone da cepa selvagem (17WTS). Nozaki & Engel (1996) induziram resistência ao nifurtimox em formas epimastigotas e tripomastigotas de várias cepas. Em nosso laboratório, uma população (BZR) e clones resistentes ao BZ foram selecionados *in vivo* a partir da cepa Y de *T. cruzi* (Murta & Romanha, 1998).

Apesar de cepas de *T. cruzi* com resistência natural a drogas terem sido descritas a mais de 30 anos, pouco se sabe sobre os artificios que o parasito utiliza para contornar a ação do BZ e do NFX. A fim de compreender as bases moleculares desse mecanismo de resistência, Murta *et al.* (2008 – *In press*) utilizaram as metodologias *Representation of Differential Expression* ou RDE (Krieger & Goldenberg, 1998) e *Differential Display* ou DD (Liang & Pardee, 1992) para

identificar genes diferencialmente expressos em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas. Os genes identificados nesse estudo são candidatos a estarem associados com o fenótipo de resistência a drogas e, portanto, alvos em potencial para a quimioterapia.

A metodologia DD foi realizada sintetizando a primeira fita do cDNA das populações sensíveis e resistentes com três iniciadores complementares à cauda *pcoli*-A (T<sub>11</sub>C ou T<sub>11</sub>A ou T<sub>11</sub>G). A segunda fita do cDNA foi sintetizada com sete iniciadores aleatórios, separadamente,  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP, além dos demais desoxirribonucleotídeos. As bandas diferencialmente expressas foram amplificadas, clonadas, seqüenciadas e analisadas em bancos de dados.

A metodologia RDE para análise de genes diferencialmente expressos em populações sensíveis e resistentes a drogas, foi realizada acoplando-se adaptadores às extremidades 5' e 3' das moléculas de cDNA da população resistente. Em seguida, os cDNAs de ambas as populações foram agrupados, sendo que foi adicionado um excesso molar (80 vezes) de moléculas de cDNA de população sensível de modo a hibridizar todo o cDNA da população resistente com o cDNA complementar da população sensível. Posteriormente, o cDNA da população resistente, o cDNA da população resistente híbrido com o da população sensível e o cDNA da população sensível foram amplificados com iniciadores complementares aos adaptadores 5' e 3'. Dessa forma, o cDNA da população resistente foi amplificado exponencialmente, o cDNA comum aos dois fenótipos foi amplificado linearmente e o cDNA da população sensível não foi amplificado, pois não possuía adaptadores. Após a eletroforese e análise quantitativa e qualitativa, as seqüências de cDNA da população resistente não hibridizadas foram posteriormente amplificadas por PCR, clonadas, seqüenciadas e analisadas em bancos de dados.

Com a metodologia RDE, Murta *et al.* identificaram um total de onze genes diferencialmente expressos na cepa com resistência induzida *in vitro* ao BZ, 17LER, e seu par sensível, 17WTS. Destes genes, quatro codificavam proteínas hipotéticas e os demais codificavam citocromo *b5-like* (putativo), MASP-putativo, lipoamida transacilase, anquirina, superóxido dismutase (TcFeSOD-A) e proteínas de choque térmico de 70 e 100 kDa (HSP-70 e HSP-100).

Com a metodologia DD, foram identificados nove genes no mesmo par. Destes, quatro codificavam proteínas hipotéticas e os demais codificavam mucina (TcMucII), proteína L12 da subunidade ribossomal 60S, DNA espaçador ribossômico, **lipoamida desidrogenase** e **transportador de hexoses**.

Mais recentemente, outras metodologias já foram utilizadas para o estudo de genes diferencialmente expressos. Villareal *et al.* (2005) utilizaram a metodologia *Random Differentially Gene Expression* (RADES) em diferentes cepas de *T. cruzi* na presença e na ausência do BZ. Análises de microarranjo foram utilizadas para estudar a resistência a drogas em *Leishmania* sp. (Guimond *et al.*, 2003), *Candida albicans* (Barker *et al.*, 2004) e *T. cruzi* (Murta *et al.*, 2006, comunicação pessoal). Entretanto, as metodologias DD e RDE ainda são utilizadas no estudo da expressão diferencial (Welss *et al.*, 2003; Yamada-Ogatta *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005).

### **1.6. Características do gene *TcrHT1* e da proteína transportadora de hexoses**

As hexoses glicose, galactose e frutose são carboidratos básicos para o funcionamento das células dos eucariotos. Estas moléculas são capazes de atravessar a membrana celular por intermédio de proteínas transportadoras. Os transportadores de hexose são proteínas integrais de membrana, que permitem a passagem de açúcares como resultado de uma série de modificações conformacionais. Os transportadores apresentam afinidades de acordo com a hexose e apresenta níveis de expressão bastante distintos entre os tecidos (Tetaud *et al.*, 1994).

Dentre os transportadores de glicose existem os que fazem co-transporte de solutos orgânicos para dentro da célula e cátions para fora da célula e os que fazem difusão facilitada a favor do gradiente de concentração de glicose. Neste segundo grupo encontram-se proteínas transmembrana homólogas como GLUT1-5 e GLUT7 de mamíferos (Gould & Holman, 1993; Mueckler, 1994), transportadores de glicose dos kinetoplastida (Barrett *et al.*, 1998) e outros.

O gene codificador da proteína transportadora de hexose do *T. cruzi* foi caracterizado por Tetaud *et al.* (1994) que, utilizando o gene do transportador de hexose de *T. brucei* (THT1) como sonda, identificou um clone contendo um inserto de 15 kb na cepa CL de *T. cruzi*. Análises desse clone revelaram a presença de uma ORF que codificava a proteína transportadora de hexose do *T. cruzi* (TcrHT1).

O parasito *T. brucei* expressa duas isoformas do gene do transportador de hexose: o THT1, que é de baixa afinidade e mais expresso quando o parasito se encontra em meios de alta concentração de glicose como o sangue, e o THT2, que é de alta afinidade e mais expresso quando o parasito se encontra em meios de baixa concentração desse substrato como o interior da

célula do hospedeiro. Ao contrário, em *T. cruzi* existe apenas uma isoforma do gene que codifica o transportador de hexose.

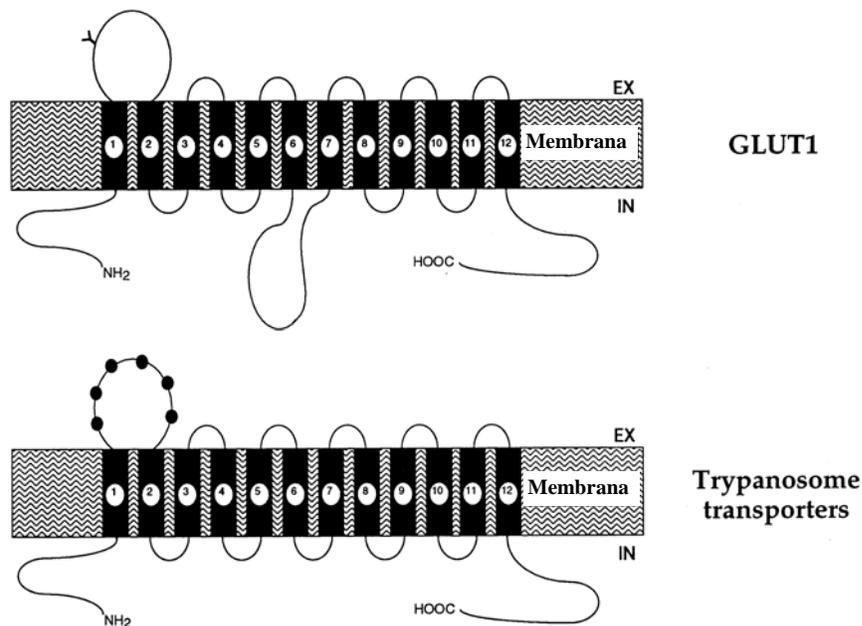
Pelo menos 8 cópias repetidas em tandem do gene TcrHT1 foram identificadas em um cromossomo da cepa CL (Tetaud *et al.*, 1994), mas pouco se conhece sobre o número de cópias em outras cepas do parasito. Quanto à seqüência, este gene possui 52% de identidade e 65% de similaridade com o gene THT1 do *T. brucei*. Com o gene THT2 dessa mesma espécie e com o gene do transportador de hexose de *Leishmania enriettii*, Pro-1, o gene TcrHT1 apresenta 55% e 54% de identidade e 72% e 73% de similaridade respectivamente (Tetaud *et al.* 1994).

Análises de *Northern blot* do RNA total das formas tripomastigotas e epimastigotas da cepa CL do *T. cruzi* revelaram a presença de dois transcritos de mRNA de igual abundância. Análises do cDNA desses dois transcritos revelaram que as regiões 3' UTR são diferentes em seqüência e em tamanho (Tetaud *et al.*, 1996).

O TcrHT1 já foi expresso em ovócitos de *Xenopus* e em células ovarianas de hamsters (células CHO). Esse transportador pertence à mesma superfamília do GLUT1 e, de acordo com perfis de hidropatia, são também compostos por 12 domínios transmembrana hidrofóbicos separados por alças hidrofílicas (Figura 6). As regiões amino e carboxi-terminais são voltadas para o meio intracelular. A primeira alça é maior que as demais e possui um arranjo de várias cisteínas espacialmente conservado entre os tripanosomatídeos (Tetaud *et al.* 1997). Essas cisteínas provavelmente estão envolvidas na formação de pontes dissulfeto além de contribuir para uma estrutura resistente à digestão por proteases – uma propriedade importante no funcionamento biológico dessas proteínas nas formas promastigotas encontradas no intestino médio de insetos (Bringaud & Baltz, 1992). Várias outras proteínas de membrana dos tripanosomatídeos possuem esse arranjo de cisteínas que, por ser conservado, sugere sua importância na arquitetura da superfície de membrana dos kinetoplastida (Barrett *et al.*, 1998). Análises de aminoácidos de transportadores de glicose de vários kinetoplastida acusaram a ocorrência de alguns sítios de glicosilação como Asn-81 em *T. cruzi*, Asn-90 e Asn-91 em *T. vivax* e Asn-69 no segundo transportador de *T. brucei* (Szlabewski, 2000).

Estudos foram realizados a fim de investigar os resíduos responsáveis pelo reconhecimento do substrato nos transportadores de hexose dos tripanosomatídeos. Gould & Holman (1993) mostraram que resíduos de aminoácidos presentes na hélice 7 podem apresentar essa função. No entanto, ainda hoje não se sabe ao certo como o transportador reconhece e transporta do substrato.

Quanto à interação do substrato com o transportador de *T. cruzi*, Tetaud *et al.* (1996) utilizou análogos de D-glicose com substituições em cada um dos carbonos e analisando a cinética do transporte desses compostos mostrou que os grupos hidroxila dos carbonos C-2, C-4 e C-6 da glicose são os mais importantes para a interação entre o substrato e o transportador. O grupo hidroxila em C-2 aparentemente é o mais importante no reconhecimento do substrato, visto que a afinidade por D-glicose é consideravelmente mais alta que aquela por 2-DOG. O transportador de *T. cruzi* também transporta D-frutose com relativamente alta afinidade ( $K_m$  é de 0.682 mM, enquanto o da D-glicose é de 84,1  $\mu$ M), mas não transporta D-galactose.



**Figura 6:** Estrutura secundária da proteína transportadora de hexose de *T. cruzi* e comparação com o transportador de glicose GLUT1 de mamíferos. EX - face extracelular; IN - face intracelular; ● - cisteína; Y - sítio de glicosilação (adaptado de Barret *et al.*, 1998).

### 1.7. Características do gene *TcLipDH* e da enzima lipoamida desidrogenase

A lipoamida desidrogenase (LipDH) é uma dissulfeto oxidoredutase que cataíza a reação  $\text{dihidrolipoamida} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{lipoamida} + \text{NADH} + \text{H}^+$  utilizando FAD como cofator. Esta enzima é encontrada na mitocôndria de todos os organismos aeróbicos e em alguns organismos

anaeróbicos, como é o caso da forma procíclica de *T. brucei*, encontra-se fracamente ligada à membrana plasmática, pois estes organismos não possuem uma mitocôndria desenvolvida (Portela & Stoppani, 1991; Else, Hough & Danson, 1992).

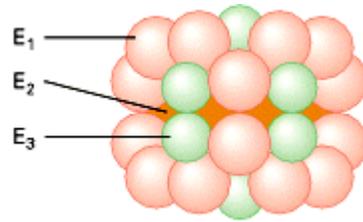
A LipDH é o componente E3 do complexo da piruvato desidrogenase (Figura 7), responsável pela formação de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico, e do complexo da 2-oxoglutarato desidrogenase, responsável pela conversão de 2-oxoglutarato a succinil-CoA para o ciclo do ácido cítrico (Williams, 1992). É nesta via metabólica que são produzidos precursores importantes de bases nitrogenadas e alguns aminoácidos (Figura 8).

Ensaio de *Southern blot* utilizando uma sonda para uma região idêntica da LipDH de *T. cruzi* e *T. brucei* apresentaram somente uma banda sugerindo que ambas as espécies possuem somente um gene que codifica esta enzima em todas as formas de vida desses parasitos. Entretanto, isso não exclui a idéia da existência de outras lipoida desidrogenases, visto que vários organismos possuem mais de uma isoforma desta enzima.

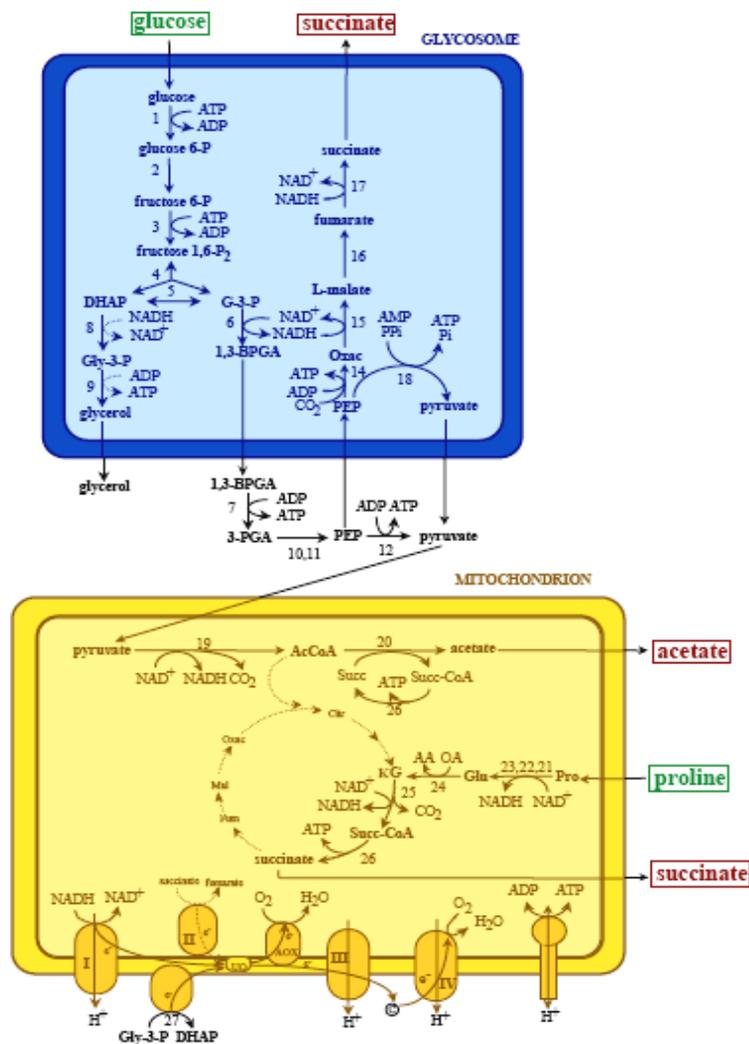
Em *T. cruzi*, o gene que codifica a LipDH (*TcLipDH*) possui 1.431 pb e codifica uma enzima homodimérica com 50 kDa por subunidade (Lohrer & Krauth-Siegel, 1990). Esse gene possui dois alelos 99% idênticos em cromossomos ainda não identificados. Ambos expressam transcritos de 2,1 Kb e codificam proteínas idênticas. A proteína é expressa em todas as formas do ciclo de vida do *T. cruzi* e possui cerca de 79% de identidade com a LipDH de *T. brucei* (Krauth-Siegel & Schöneck *et al.*, 1997).

A TcLipDH é um bom alvo para a quimioterapia, pois as diferenças estruturais entre a LipDH do parasito e a do hospedeiro garantem que drogas sejam sintetizadas especificamente para a enzima do parasito. Além disso, ela é capaz de seqüestrar radicais livres do citoplasma e da membrana, portanto, a inibição desta enzima pode interferir no mecanismo antioxidante do parasito. Um terceiro fator que a torna um alvo interessante para drogas tripanosomicidas é que ela é capaz de reduzir naftoquinonas e derivados de nitrofuranos como menadiona e nifurtimox em um elétron contribuindo para a concomitante produção de radicais de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Grinblat, Sreider & Stoppani, 1991).

Foi mostrado também que as flavoenzimas LipDH, tripanotiona redutase e glutatona redutase realizam também uma oxidação não-específica lenta de NADPH com oxigênio molecular. O consumo de NADPH também diminui a proteção contra radicais livres (Blumenstiel *et al.*, 1999; Salmon-Chemin *et al.*, 2001).



**Figura 7:** Esquema do representativo do complexo piruvato desidrogenase. 24 subunidades da piruvato desidrogenase (E1) e 12 subunidades da LipDH (E3) se ligam ao centro do complexo enzimático formado por 24 subunidades da lipoamida transacilase (E2). (Lodish *et al.*, 2000).



**Figura 8:** Metabolismo energético em tripanosomatídeos, à exceção da forma sanguínea de *T. brucei* que possui uma mitocôndria pouco desenvolvida. Transporte de glicose, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa (Hannaert *et al.*, 2003).

## 2. Justificativa

Em 1980 estimava-se que mais de 18 milhões de pessoas na América Latina estivessem infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (WHO, 1991). Naquela época, mais de 250 milhões de dólares/ano eram gastos com marca-passos e cirurgias intestinais, cerca de 1.000 dólares/ano eram gastos, por paciente, com consultas e cuidados médicos, e o auxílio desemprego por invalidez chegava a 399 mil dólares (Dias, 1987; Schofield & Dias 1991).

Na década de 90 foram instituídas iniciativas de controle da transmissão da doença de Chagas em países do Cone Sul concentrando esforços na eliminação de vetores com inseticidas, no melhoramento de moradias e em campanhas educacionais. Essas medidas contribuíram para queda no número de infectados 18 milhões para 10 milhões em 2001 (Schofield, Jannin & Salvatella, 2006), queda na estimativa DALY de 2,7 milhões (World Bank, 1993) para 649.000 atualmente e queda do número de mortes anuais de 45 mil para 13 mil atualmente (WHO, World Health Report, 2004). Em 9 de junho de 2006, o Ministério da Saúde do Brasil recebeu a *Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas* graças à eliminação das populações domésticas e peridomésticas do *Triatoma infestans* na área endêmica.

Apesar dos avanços, a doença de Chagas ainda representa um sério desafio. Há outras espécies da subfamília Triatominae além de *T. infestans* que são potenciais vetores da doença; há várias espécies de mamíferos que são reservatórios em potencial; há outras formas de infecção pelo *T. cruzi* além da vetorial (*i.e.* transmissão por via oral); ainda não foi estabelecida uma quimioterapia mais eficiente, menos tóxica e de custo mais baixo e a resistência natural de cepas do *T. cruzi* ao BZ e/ou ao NFX é outro fator importante no combate à doença. Estes dados reforçam a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de controle de transmissão e terapêuticas, incluindo a identificação de novos alvos e novas drogas tripanocidas.

Murta *et al.* (2008, *in press*), utilizando as metodologias RDE e DD de estudo da expressão diferencial em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas, identificaram vários genes que podem estar relacionados com o fenótipo de resistência a drogas e que, portanto, são candidatos em potencial para novas abordagens terapêuticas.

Neste estudo caracterizamos dois genes que foram indicados pela metodologia DD como estando mais expressos em uma cepa do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ.

### 3. OBJETIVOS

#### 3. 1. Objetivo geral

Caracterizar os genes que codificam a enzima **lipoamida desidrogenase (TcLipDH)** e a **proteína transportadora de hexoses (TcrHT1)** em cepas do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

#### 3. 2. Objetivos específicos

Os genes *TcLipDH* e *TcrHT1* foram avaliados com relação:

- ao nível de mRNA;
- à sua organização no genoma;
- à localização cromossômica;
- ao nível de expressão ou atividade das proteínas;
- à anotação em bancos de dados e inferência filogenética.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Cepas do *Trypanosoma cruzi*

Neste estudo utilizamos uma população do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol (BZR) e seu par sensível (BZS); um par de clones dessas populações (clo16R e clo4S) (Murta & Romanha, 1998); uma cepa com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) 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 dez cepas de *T. cruzi*, sendo seis sensíveis (CL, MR, Luna, Ernane, Quaraizinho e Gilmar) e cinco naturalmente resistentes (Colombiana, VL-10, Noel, Yuyu e SC-28), previamente caracterizadas por Filardi & Brener (1987). As formas epimastigotas do parasito foram mantidas em meio líquido *Liver Infusion Triptose* (LIT) a 28°C (Camargo, 1964). As características principais das cepas utilizadas neste estudo estão presentes na Tabela 1.

### 4.2. 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 parasitos (cerca de  $1 \times 10^9$  epimastigotas) foi ressuspenso em TRIZOL (vol/vol). Em seguida foram adicionados 200 µl de clorofórmio à suspensão que foi homogeneizada e incubada por 15 min no gelo. A amostra foi centrifugada a 13.400 Xg por 10 min e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo contendo o mesmo volume de isopropanol 95% e incubado a -20°C por 12 a 18h para precipitação do RNA. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em água autoclavada, estéril e livre de RNase. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorbância  $260_{nm} = 40 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 1:** Características das populações e clones do *T. cruzi* utilizadas neste estudo.

Cepa	Hospedeiro	Susceptibilidade <sup>a</sup>	Zimodema <sup>b</sup>	Grupo de <i>T. cruzi</i> <sup>c</sup>	Origem
17WTS	Triatoma infestans	S	1	I	México
17LER	Triatoma infestans	R	1	I	México
SC-28	Didelphis marsupialis	R	1	I	Santa Catarina
Colombiana	Caso crônico humano	R	1	I	Colômbia
Quaraizinho	Triatoma infestans	S	I	I	R.G do Sul
Gilmar	Caso agudo humano	S	I	I	Minas Gerais
Yuyu	Triatoma infestans	R	1	I	Bahia
BZS-Y	Caso agudo humano	S	2	II	São Paulo
BZR-Y	Caso agudo humano	R	2	II	-
Clone 4S	Clone da cepa BZS	S	2	II	-
Clone 16R	Clone da cepa BZR	R	2	II	-
VL-10	Caso crônico humano	R	2	II	Minas Gerais
Noel	Caso agudo humano	R	2	II	Minas Gerais
Ermane	Caso crônico humano	S	2	II	Goiás
CL	Triatoma infestans	S	B	II	R. G. do Sul
MR	Triatoma infestans	S	B	II	R.G. do Sul
Luna	Caso agudo humano	S	B	II	Argentina

<sup>a</sup>Susceptibilidade a drogas: R(resistente), S(Sensível) como descrito por Filardi & Brener (1987).

<sup>b</sup>Zimodema, como previamente descrito por Murta *et al.* (1998).

<sup>c</sup>Grupos de *T. cruzi* (Fernandes *et al.*, 1994; *Recommendations from a Satellite Meeting*, 1999).

### 4.3. Extração de DNA

O sedimento de epimastigotas das populações sensíveis e resistentes foi ressuspensionado em tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0) e incubado com 100 µg/mL de proteínase 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 0,3M a 20°C por 12h. O DNA foi então lavado 2 vezes com etanol 70% e ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0). A concentração do DNA obtido foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorvância 260 nm = 50 µg/mL.

#### **4.4. Reação em Cadeia da Pcolimerase (PCR)**

As reações de PCR foram feitas com 10 µL/tubo, sendo: 1 µL de tampão de reação 10 vezes concentrado, 1 µL de dNTP (200 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos), 1 µL de cada iniciador específico (10 pmoles/µL) senso e anti-senso, 1 µL de DNA genômico de *T. cruzi* (1 ng/µL), 0,1 µL de Taq DNA *pcolimerase* (Invitrogen) e água autoclavada q.s.p. 10 µL. Os iniciadores utilizados nas PCRs foram desenhados a partir da seqüência nucleotídica completa dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI* disponíveis no banco de dados (número de acesso no Genebank: X89112 e U05588, respectivamente) e constam na tabela 2. Cada reação foi submetida à amplificação no termociclador Perkin Elmer® com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de três etapas (desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento 65°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min). Após os 30 ciclos foi feita uma extensão final por 5 min a 72°C.

#### **4.5. Eletroforese de DNA em gel de pcoliacrilamida**

Após a PCR, 3 µL do produto da reação foram submetidos à análise em mini-gel de *pcoliacrilamida*. Para a *pcolimerização* de 10 mL da solução de *pcoliacrilamida* 6% foram utilizados 125 µL de persulfato de amônio 10% e 12,5 µL de TEMED (N,N,N',N' – tetrametil-etenodiamina) 0,05%. Após a eletroforese a 100 V durante 1h, o gel foi fixado em 150 mL de solução de etanol a 10% com 0,5% de ácido acético e impregnados por nitrato de prata a 0,2%. Finalmente, o gel foi lavado em água deionizada e revelado em solução aquosa de hidróxido de sódio 3% com 0,5% de formaldeído, até o aparecimento das bandas (Sanguinetti *et al.*, 1994).

#### **4.6. Northern Blot**

A fim de confirmar as análises de DD, inicialmente foram realizados ensaios de *Northern blot*. Para esses experimentos, o RNA das diferentes cepas do *T. cruzi* foi submetido a eletroforese em gel de agarose-formaldeído e transferido para uma membrana de náilon. Foi preparado um gel de agarose 1% (Sigma) em tampão MOPS 1X (0,04 M 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 no gel e submetidas a eletroforese a 20V por 4h em tampão MOPS 1X acrescido de formaldeído 18,7% (v/v). O gel contendo as amostras foi transferido para membrana de náilon durante 12h usando tampão SSC 10X (1,5 M NaCl, 150 mM citrato de sódio). Posteriormente, as membranas foram hibridizadas com sondas específicas para cada gene marcadas com fósforo  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP, segundo protocolo descrito por Dos Santos & Buck (1999).

#### **4.7. Southern Blot**

Foram preparadas uma digestão de 14 µg de DNA genômico com a enzima *Sall* e outra com a enzima *EcoRI* para o gene *TcrHT1* e uma digestão de 14 µg de DNA genômico com a enzima *AvaI* e outra com a enzima *EcoRI* para o gene *TcLipDH*. Todas as reações foram realizadas por 16h a 37°C. Os fragmentos originados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%. Esses géis foram corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL, transferidos para membranas de náilon (Hybond-Amersham Biosciences) em tampão SSC 10X e as membranas foram hibridizadas com a sonda para o gene de interesse marcada com  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP.

A análise dos perfis de restrição permitiu a avaliação da organização genômica desses genes.

#### **4.8. RT-PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)**

Para a confirmação da expressão diferencial dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* foi feito também um RT-PCR Quantitativo em tempo real (RT-PCRq). O cDNA utilizado nesses ensaios foi sintetizado a partir de uma solução de 10,5 µL contendo 2 µg do RNA total, 1 µL de coligonucleotídeo-d(T) a 500 µg/mL, 4 µL de tampão RT 5X, 2 µL de DTT (10mM), 1 µL de dNTP mix (10 mM de cada desoxinucleosídeo), 0,5 µL de RNase (40 U/µL) e 1 µL da enzima transcriptase reversa Superscript II 200 U/µL (Invitrogen) totalizando um volume final de 20 µL. Essa reação foi incubada a 42°C por 60 min, em seguida a 70°C por 20 min e depois colocada a 4°C. O cDNA obtido foi diluído 15 vezes em água estéril e livre de DNase. Os iniciadores utilizados para os genes *TcLipDH* e *TcrHT1* amplificam, respectivamente, fragmentos de 283 pb

e 157 pb (Tabela 2). O gene constitutivo e de cópia única que codifica a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (*TcHGRPT*) foi usado para normalizar a quantidade da amostra analisada. Os iniciadores específicos para este gene amplificam um fragmento de 412 pb (Tabela 2).

As reações de PCR Quantitativo foram realizadas em placa de 96 poços. Foram feitas 21 reações para análise de cada gene, sendo uma triplicata para cada uma das 6 cepas analisadas (17WTS/17LER, BZS/BZR, CL/Colombiana) e uma triplicata de controles negativos. Cada reação continha um volume final de 20 µL, sendo 1µL de cada iniciador senso e anti-senso (10 pmoles/µL cada), 2,5 µL de tampão Sybr Green 10X (Applied Biosystems), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,0 µL de dNTP 12,5 mM, 0,1 µL Amplitaq Gold DNA Polymerase (5 U/µL) e 10,4 µL água deionizada. Após a adição das reações na placa, a cada poço foram adicionados 5 µL do cDNA diluído 15X. Os controles negativos não receberam cDNA. A placa foi devidamente selada e colocada no aparelho ABI Prism 7900, *Sequence Detection System* SDS (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 1 ciclo de 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 seg seguido de extensão e anelamento a 60°C por 1 min. Os resultados foram normalizados com o gene *TcHGPRT* e a diferença no nível de expressão foi analisada entre os pares.

#### **4.9. Sondas e ensaio de hibridização**

As sondas foram utilizadas nos ensaios *Northern* e *Southern blot*. Elas foram preparadas a partir da amplificação por PCR do DNA da cepa Y do *T. cruzi* com iniciadores específicos para cada gene. A sonda para o gene *TcLipDH* foi sintetizada para o gene inteiro e a sonda para o gene *TcrHTI* foi sintetizada para um fragmento de 457 pb do gene. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados e precipitados com fenol/clorofórmio e marcados com  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP conforme protocolo descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). Uma pré-hibridização das membranas foi feita com 15 mL de solução constituída por 1% BSA, 500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA e 7% SDS (Church & Gilbert, 1984) a 60°C durante 2 h. Em seguida, a sonda foi adicionada a esta solução e a membrana foi hibridizada durante 14 horas a 60°C. Para os ensaios de *Southern blot* a hibridização foi realizada pelo mesmo tempo a 65°C. Depois da hibridização, as membranas foram lavadas 4 vezes com SSC 2X e 0,1% SDS a temperatura ambiente. Após a lavagem, a membrana foi exposta ao filme de raio-X e incubada a -70 °C.

#### 4.10. Eletroforese de Pulso Alternado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Para fazer a localização cromossômica dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* foi feita uma eletroforese para separação dos cromossomos de diferentes cepas de *T. cruzi*.

Para o preparo de blocos de agarose contendo células de *T. cruzi*, um número de aproximadamente  $2 \times 10^9$  de parasitos epimastigotas foram lavados em solução salina 0,9% e ressuspensos em solução PSG (130 mM NaCl, 142 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e glicose 2 %). Aos parasitos foi adicionada uma solução de agarose de baixo ponto de fusão que foi então transferida para um molde de acrílico para gerar os blocos. Após polimerização da agarose, os blocos foram incubados em uma solução de lise de sarcosil 3%, 1 mg/mL de Proteinase K e 500 mM de EDTA pH 8,0 por 48h a 50°C. Em seguida, os blocos foram estocados em solução de EDTA 500 mM a 4°C.

A eletroforese de pulso alternado foi realizada no equipamento Gene Navigator TM System (Amersham Biosciences). Os blocos contendo os parasitos foram colocados em canaletas separadas de um gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada com pulsos norte/sul, leste/oeste de 250 V por 24 h, 250 V por 24 h, 750 V por 24 h e 1000 V por 24 h. Ao final da corrida o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL), fotografado com o programa EagleEye (Stratagene) e tratado com tampões de desnaturação ácida (HCl 0,25 M), neutralização (NaOH 0,5 M e NaCl 1,5 M) e equilíbrio (NaCl 1,5 M e Tris-HCl 0,5 M pH 7,4). Posteriormente, os cromossomos foram transferidos do gel para membrana de náilon e a membrana foi utilizada para hibridização com sonda específica para o gene.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados para PCR, síntese de sondas e PCR Quantitativo em Tempo Real.

	<b>Tamanho do fragmento esperado</b>
<b>Toda a seqüência codificadora do gene <i>TcLipDH</i></b>	1.434 pb
<b>Senso</b> 5' <u>CGCGGATCCCC</u> ATGTTCCGTCGTTGTGCAGTCAAG 3'	(toda a ORF do gene)
<b>Anti-senso</b> 5' <u>CGGGAATTCT</u> TAAAAGTTAATAGTCTTCGCGAC 3'	Número de acesso: X89112
<b>Toda a seqüência codificadora do gene <i>TcrHTI</i></b>	1.635 pb
<b>Senso</b> 5' <u>CGCGGATCCCC</u> ATGCCATCCAAGAAGCAGACTGAT 3'	(toda a ORF do gene)
<b>Anti-senso</b> 5' <u>CGGGAATTCT</u> CACGCGGCTTGACGGTTGCCAGG 3'	Número de acesso: U05588
<b>Clonagem e sonda do gene <i>TcLipDH</i> nos ensaios de localização cromossômica</b>	1.434 pb
<b>Senso</b> 5' <u>CGCGGATCCCC</u> ATGTTCCGTCGTTGTGCAGTCAAG 3'	(toda a ORF do gene)
<b>Anti-senso</b> 5' <u>CGGGAATTCT</u> TAAAAGTTAATAGTCTTCGCGAC 3'	Número de acesso: X89112
<b>Sonda do gene <i>TcLipDH</i> nos ensaios de <i>Northen</i> e <i>Southern blot</i></b>	500 pb
<b>Senso</b> 5' <u>CGCGGATCCCC</u> ATGTTCCGTCGTTGTGCAGTCAAG 3'	(nt 1 ao nt 500)
<b>Anti-senso</b> 5' TCATCAAACGGCAAGAAGGG 3'	Número de acesso: X89112
<b>Clonagem e sondas do gene <i>TcrHTI</i></b>	450 pb
<b>Senso</b> 5' <u>CGCGGATCCCC</u> ATGCCATCCAAGAAGCAGACTGAT 3'	(nt 273 ao nt 723)
<b>Anti-senso</b> 5' <u>CGGGAATTCT</u> CTGCCCGGCATAGATCGACCCAATC 3'	Número de acesso: U05588
<b>PCR em tempo real para o gene <i>TcLipDH</i></b>	283 pb
<b>Senso</b> 5' CCAACTTTGCACGCTACGG 3'	(nt 217 ao nt 500)
<b>Anti-senso</b> 5' TCATCAAACGGCAAGAAGGG 3'	Número de acesso: X89112
<b>PCR em tempo real para o gene <i>TcrHTI</i></b>	157 pb
<b>Senso</b> 5' AGTTCCTTACGTGGACG 3'	(nt 922 ao nt 1.079)
<b>Anti-senso</b> 5' CTGTGCCTTTTCTACGCT 3'	Número de acesso: U05588
<b>PCR em tempo real para o gene <i>TcHGPRT</i></b>	412 pb
<b>Senso</b> 5' CTACAAGGGAAAGGGTCTGC 3'	(nt 337 ao nt 749)
<b>Anti-senso</b> 5' ACCGTAGCCAATCACAAAGG 3'	Número de acesso: L07486

\* As regiões sublinhadas são seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, que foram adicionadas aos iniciadores senso e anti-senso, respectivamente. Essas enzimas possuem seqüências de restrição no sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEX 5X-3, permitindo a digestão e ligação do produto de PCR ao vetor de expressão.

#### 4.11. Clonagem dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* em vetores de expressão

Para a expressão das proteínas recombinantes, toda a seqüência codificante do gene *TcLipDH* foi clonada enquanto o gene *TcrHT1* foi clonado somente dos nucleotídeos 273 ao 726. Os fragmentos de interesse foram amplificados com os iniciadores específicos (Tabela 2). Em cada iniciador senso e anti-senso foi adicionada uma seqüência reconhecida pela enzima de restrição *Bam*HI ou *Eco*RI, que também reconhecia uma seqüência no sítio de clonagem múltipla do vetor de expressão pGEX-5X-3 (GE Healthcare). O plasmídeo e os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas de restrição a 37 °C durante 8 h e os vetores recombinantes (pGEX-TcLipDH ou pGEX-TcrHT1) foram construídos com a enzima T4 DNA Ligase (Biolabs) de acordo com as informações do fabricante.

Os vetores recombinantes foram inseridos em bactérias *E. coli* cepa BL-21(DE3)pLysS através da metodologia de choque térmico, que foi realizada da seguinte maneira: 5 µL de um dos vetores foram incubados com 100 µL de bactérias cálcio-competentes durante 30 min no gelo. Em seguida o tubo foi incubado a 42°C por 30 segundos e resfriado no gelo imediatamente para o choque térmico. As bactérias transformadas foram adicionadas a 1 mL de meio Luria Bertani (LB) sem antibiótico e incubadas a 37 °C por 1h com agitação. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C durante 12 h. A confirmação da clonagem foi feita através de PCR das colônias transformadas com os iniciadores específicos.

Para confirmar as clonagens, realizamos PCR de colônia utilizando o mesmo protocolo descrito no item 4.4, porém, ao invés de DNA genômico, utilizamos pequenas quantidades das colônias transformadas com o plasmídeo recombinante.

As colônias positivas foram induzidas a expressar as proteínas recombinantes mediante a adição de IPTG 2 mM, a 37°C, sob agitação por até 6h.

Como utilizamos o vetor pGEX 5X-3, as proteínas TcLipDH e TcrHT1 foram expressas com a proteína de fusão GST (Glutathione S-Transferase) de *Schistosoma japonicum*. Devido à dificuldade de comprar o fator Xa, necessário para clivagem da GST, as proteínas recombinantes TcLipDH e TcrHT1 permaneceram ligadas à proteína de fusão. Desta forma, também expressamos e purificamos a GST para utilizá-la como controle positivo em nossos experimentos. Essa expressão também foi feita com IPTG 2 mM, a 37°C, sob agitação por até 6h.

#### **4.12. Eletroforese de proteínas em gel de *pcoli*acrilamida SDS-PAGE**

Para verificar a eficiência da expressão das proteínas recombinantes, foi feita uma eletroforese em gel de *pcoli*acrilamida. Inicialmente foi preparado um gel a partir da mistura de 0,8% de N,N'-metileno-bis-acrilamida e 30% de acrilamida. O gel de separação foi feito adicionando-se a 3,3 mL de acrilamida 30%, 4 mL de água, 2,5 mL de Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e 100 µL de SDS 10%. O gel foi *pcol*imerizado pela adição de 40 µL de persulfato de amônio 10% e 7 µL de TEMED 0,05%. O gel de concentração foi preparado a 4% adicionando-se a 650 µL de acrilamida 30%, 3 mL de água, 1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 50µ l de SDS, 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED (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%, 2β-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%), fervidas em banho-maria por 5 min e aplicadas nas canaletas do gel de concentração. A eletroforese foi realizada a 50 V para o gel de concentração e a 100 V 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 h pelo azul de Coomassie (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.

#### **4.13. Teste de solubilidade das proteínas recombinantes TcLipDH e TcrHT1**

Um volume de 40 mL de cultura de bactérias expressando a rTcLipDH ou a rTcrHT1 foi centrifugado a 4000 Xg por 10 min. O sedimento foi ressuspendido em 2 mL de PBS 1X pH 8,0, acrescido de 100 µg/mL de lizosima e incubado no gelo durante 15 min. Posteriormente, foi adicionado na solução 1 mM de PMSF e 5 mM de DTT (dithiothreitol). A amostra foi homogeneizada e sonicada (3X por 15 segundos com pulso 5,0/3,0 em 30% amplitude). Após a sonicação, a mistura foi passada 20X em seringa de 5mL. Em seguida a amostra foi centrifugada a 8000 Xg durante 10min a 4°C. O sobrenadante e o sedimento foram coletados para análise em gel SDS-PAGE.

#### **4.14. Extração de proteínas recombinantes insolúveis com sarcosil**

Um volume de 50 mL de cultivo de bactérias expressando rTcLipDH ou rTcHT1 foi centrifugado a 4.000 Xg por 10 min. O sedimento foi ressuscitado em 2,5 mL de PBS 1X pH 8,0, acrescido de 1 mM de PMSF e 20 µg/mL de lizosima e incubado no gelo por 15 min. A amostra foi homogeneizada e sonicada (3X por 15 segundos com pulso 5,0/3,0 em 30% amplitude). Após a sonicação, a mistura foi seringada 10X e foi adicionado 1 mM de DTT. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 Xg durante 10min a 4°C. O sobrenadante foi coletado para análise em gel SDS-PAGE. O sedimento foi ressuscitado em 2,5 mL de PBS 1X pH 8,0 com 1,5% de Sarcosil (n-lauryl sarcosil). Posteriormente foi adicionado à amostra 5 mL de PBS 1X pH 8,0 com 4% de Triton X-100 e 1mM de PMSF e 1mM de DTT. Essa mistura foi centrifugada a 10.000 Xg durante 10min a 4°C. O sedimento e o novo sobrenadante foram coletados para análise em gel SDS-PAGE.

#### **4.15. Purificação das proteínas recombinantes**

A purificação das proteínas TcLipDH foi realizada por eletroeluição. A proteína recombinante foi submetida à eletroforese em gel de *pcoli*acrilamida. Após a eletroforese, o gel foi corado a 4°C com uma solução de KCl 0,1 M. As bandas de proteínas ficaram esbranquiçadas, permitindo que o fragmento de interesse fosse excisado do gel. Essa parte do gel foi colocada em uma membrana de diálise com 3 mL de tampão de corrida 1 X filtrado (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3). A eletroeluição foi realizada a 100 V durante 3h. Posteriormente inverteu-se a corrente (pólo negativo para positivo) por 10 segundos para permitir que proteínas presas à parede da membrana de diálise se desprendessem e se misturassem ao tampão. O tampão contendo a proteína foi coletado e, após dosagem pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1.000 a 280 nm, foi armazenado a -20°C. O mesmo procedimento foi realizado para a purificação do fragmento correspondente ao fragmento de 35 kDa da proteína TcHT1.

#### **4.16. Purificação da proteína Glutathione S-transferase (GST)**

A GST foi purificada através da coluna “Glutathione Sepharose 4B” de acordo com as instruções do fabricante (“Bulk and RediPack GST Purification Modules” – GE Life Sciences).

#### **4.17. Obtenção de anticorpo policlonal anti-rTcLipDH e anti-rTcrHT1**

Para produção de soro policlonal, as proteínas recombinantes foram inoculadas em coelhos provenientes da fazenda da UFMG em Igarapé. Foram utilizados 4 coelhos com 3 meses de idade, pesando cerca de 2,5-3Kg. Os coelhos foram identificados e receberam 3 inoculações subcutâneas nos dias 0, 7 e 21. O coelho 1 foi o controle e recebeu adjuvante de Freund (SIGMA); o coelho 2 recebeu 300µg da proteína TcLipDH sem adjuvante; o coelho 3: 300µg da proteína TcLipDH com adjuvante de Freund; o coelho 4: 300µg da proteína TcrHT1 sem adjuvante; o coelho 5: 300µg da proteína TcrHT1 com adjuvante; o coelho 6: 350µg da proteína GST purificada com adjuvante. Antes das imunizações, 5 mL de sangue dos coelhos foi coletado para servir como controle pré-imune. Na primeira inoculação, os coelhos 3 e 5 receberam adjuvante completo de Freund e nas inoculações subseqüentes, adjuvante incompleto de Freund. O sangue foi coletado 15 e 30 dias após a última inoculação. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 6.000 Xg durante 5 min a 4°C e o soro foi aliquoteado, submetido a ensaios de reatividade e armazenado a -20°C.

#### **4.18. Extração de proteínas totais do *T. cruzi***

As formas epimastigotas das cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) e obtidas na fase exponencial de crescimento. Os parasitos foram lavados em PBS por 3 vezes e o sedimento congelado a -70°C. Posteriormente as massas de parasitos foram submetidas à extração de proteínas de acordo com protocolo descrito por Steindel *et al* (1993). O sedimento de parasitos foi ressuscitado 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 µg/mL Leupeptina, 2 µg/mL aprotinina e 5 mM EDTA). Após incubação por 10min no gelo, os parasitos foram lisados através de 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio (N<sub>2</sub>) 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, aliquotado e armazenado à -70°C.

#### **4.19. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford**

A dosagem das proteínas recombinantes TcLipDH, TcrHT1, GST e das proteínas totais do *T. cruzi* foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando uma placa de ELISA com 96 poços. 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 recombinantes foram utilizados os volumes de 1 µl, 5 µl e 10 µl da proteína concentrada. Enquanto que para a dosagem das proteínas totais do *T. cruzi* (extraídas conforme item 3.18), foram utilizados os volumes de 0 µL, 2 µL, 1 µL e 2µL da proteína concentrada. Na placa, pipetamos 20 µL das amostras diluídas em PBS e 180µL do reagente de Bradford (100mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 50 mL etanol 95% e 100mL ácido fosfórico 85%). A placa foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min e posteriormente submetida à leitura a 595nm em um leitor de ELISA (BIO-RAD). A concentração das proteínas foi calculada com base na curva-padrão da BSA.

#### **4.20. Western Blot**

A análise da expressão da proteína TcLipDH no parasito foi feita por *Western blot*, utilizando soro dos coelhos imunizados com a proteína TcLipDH. O perfil das proteínas totais foi resolvido por eletroforese em gel de *p*coliacrilamida-SDS 10% (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 3 vezes de 5 min. Em seguida foram incubadas com o soro de coelho imunizado com a proteína recombinante TcLipDH diluído a 1:200 a temperatura ambiente por 1h. As membranas foram lavadas e incubadas por 1h com o conjugado anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina, diluído a 1:5.000 (Promega). Depois de lavadas, as membranas foram reveladas com 100µL dos substratos 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) e *nitro blue tetrazolium* (NBT), respectivamente, em tampão fosfatase alcalina (AP), de acordo com o protocolo do fabricante (Bio-Rad).

#### **4.21. Análise Densitométrica**

A análise densitométrica da intensidade das bandas do gene e da proteína TcLipDH visualizadas nos ensaios de *Northern blot* e *Western blot* foi realizada através do aparelho ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech), utilizando o programa ImageMaster VDS. 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 a 2 vezes.

#### **4.22. Ensaio de atividade da proteína TcrHT1**

O ensaio para avaliar a atividade do transportador de hexoses nas diferentes cepas de *T. cruzi* foi realizado de acordo com Eienthal *et al.* (1989). Para este ensaio um total de  $2 \times 10^8$  células epimastigotas na fase exponencial de crescimento cultivadas em meio LIT foram lavadas 3 vezes em KRP pH 8,0 estéril em cetrifugações de 2.000 Xg por 5 min a temperatura ambiente. Ao final das três lavagens, as células foram ressuspensas em KRP até um volume final de 900 µL. Em um tubo eppendorf foi colocado 5 µL contendo 0,6 µCi de de 6-deoxi-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose. As células eram colocadas sobre a glicose radioativa e após um intervalo de 30 segundos o transporte era bloqueado com floridzina (Sigma) 2 mM diluída em KRP gelado. A floridzina é um bloqueador de transportadores da família MFS1 impedindo a entrada da glicose na célula. O mesmo procedimento foi realizado para intervalos de tempo de 60 e 120 segundos. Para o tempo zero, as células só foram adicionadas após a adição da floridzina à glicose. Foi preparado um

controle negativo contendo células e floridzina e um controle positivo contendo somente a glicose radioativa. Após todos os intervalos, os tubos foram centrifugados a 4°C, 10.000 Xg por 1 min. O sobrenadante contendo a glicose não incorporada foi cuidadosamente pipetado e o sedimento foi ressuspendido em 500 µL de água deionizada para a lise dos parasitos. Em seguida, o material foi transferido para tubos de cintilação aos quais foram adicionados 1 mL de solução de cintilação. A radioatividade foi medida por cintilação utilizando o cintilador Beckman modelo LSC.

O volume de células de cada cepa utilizada nos experimentos foi submetido a dosagem de proteínas usando o método de Bradford como no item 3.19. A quantidade de glicose transportada foi estimada considerando que 1 mol de 6-deoxi-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose apresenta uma contagem de 9,26E+15 c.p.m (contagens por minuto). Esta estimativa foi feita medindo a contagem de radiação de uma quantidade conhecida de 6-deoxi-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose.

Análises estatísticas foram realizadas utilizando o modelo ANOVA fatorial (Two-Way ANOVA) para comparar simultaneamente as variáveis tempo e quantidade de glicose capturada. O pacote utilizado foi o *Minitab Statistical Software*® e o nível de significância considerado foi  $\alpha = 0,05$  em todas as análises.

#### **4.23. Estudos comparativos dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* contra diferentes bancos de dados de domínio público**

Para início das análises dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* foram utilizadas as seqüências depositadas com os seguintes números de acesso: X89112 e U05588.

As seqüências descritas acima foram utilizadas para buscas por similaridade de seqüência contra uma cópia local instalada em nossos servidores do banco de dados de *Trypanosoma cruzi* (número de acesso do projeto: AAHK00000000). Complementarmente foram utilizados os dados disponíveis do banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/>).

A partir da identificação dos hits blast positivos para cada busca, os respectivos *contigs* presentes no genoma foram reanotados no intuito de localizarmos ambiguidades nas predições.

Análises incluindo buscas por similaridade de seqüências contra bancos de dados de domínio público (bancos nr e swissprot do NCBI), bancos de dados de domínios protéicos (Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), Prodom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/>).

[home.php](#)) e Blocks (<http://blocks.fhcrc.org/>) e análises de domínios transmembrana (TMHMM 2.0) (Krogh *et al.*, 2001) foram integrados na anotação pela utilização da ferramenta de anotação genômica Artemis (Rutherford *et al.*, 2000).

Análises de inferência filogenética foram realizadas pela utilização do pacote MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Genes homólogos aos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* foram identificados nos bancos de dados, clusterizados pela utilização do programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) implementado em um script (cluster5 - Ruiz, JC., comunicação pessoal) e posteriormente, do alinhamento múltiplo global obtido com os dois genes foi construída uma matriz de Markov (HMM - *Hidden Markov Model*) que viabilizou buscas mais amplas por seqüências relacionadas em outros organismos.

No processo de caracterização *in silico* do número de cópias, cada gene foi comparado com o genoma seqüenciado de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) pela utilização do algoritmo blastn (Altschul *et al.*, 1997). Estes alinhamentos foram realizados sem a utilização do filtro de baixa complexidade e com valor de corte de *e-value* igual a  $10^{-6}$ .

Particularmente com relação à caracterização do sítio ativo da LipDH foi utilizado um script perl (Ruiz, JC., comunicação pessoal) que utiliza a expressão regular que define o referido sítio (- G - G - x - C - [LIVA] - x(2) - G - C - [LIVM] - P -) para buscas em um banco de dados de seqüências de aminoácidos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Nível de mRNA dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI* nas cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol

Para confirmar os níveis de expressão diferencial dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI*, os níveis de mRNA de ambos os genes foram analisados por ensaios de *Northern blot*. Para isso, o RNA total das populações 17WTS, 17LER, BZS, BZR e clones foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de náilon e hibridizados com sondas específicas para os genes *TcLipDH* ou *TcrHTI* marcadas com  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]dCTP (Tabela 2).

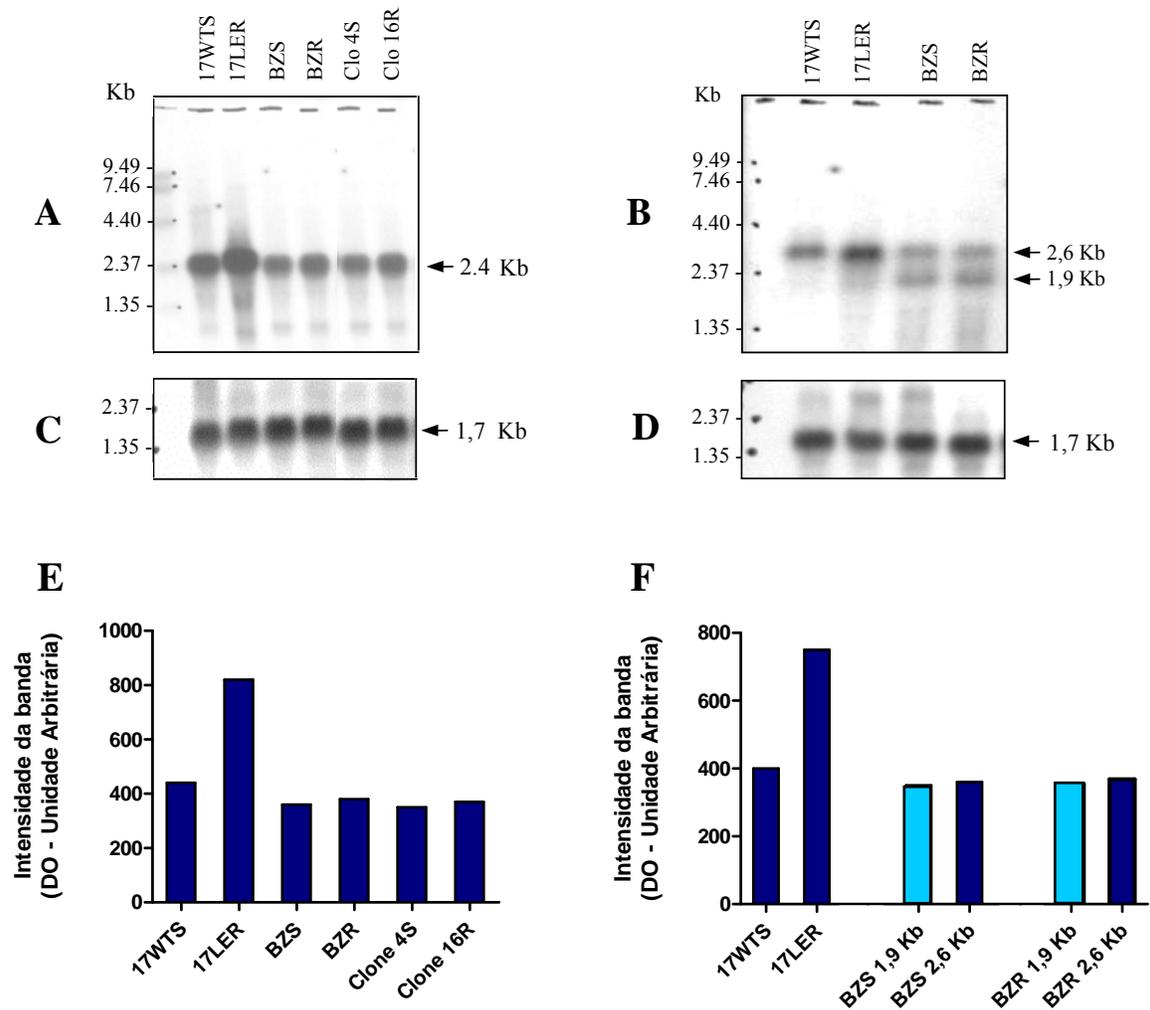
A hibridização do RNA total das cepas do *T. cruzi* com sonda específica para o gene *TcLipDH* mostrou que a sonda reconheceu um transcrito de 2,4 Kb em todas as amostras estudadas (Figura 9A). Quanto ao gene *TcrHTI* observamos a presença de um transcrito de 2,6 Kb nas populações 17WTS e 17LER, pertencentes ao grupo *T. cruzi* I e dois transcritos, um de 1,9 e outro de 2,6 Kb, nas populações BZS e BZR, pertencentes ao grupo *T. cruzi* II (Figura 9B). O gene do RNA ribossomal foi utilizado como controle quantitativo nesses ensaios mostrando que a mesma quantidade de RNA total foi aplicada nos géis (Figuras 9C e 9D). Análises densitométricas comparando a intensidade dos transcritos dos genes normalizados com o RNA ribossomal mostraram que tanto o *TcLipDH* quanto o *TcrHTI* estão 2 vezes mais expressos na população com resistência induzida in vitro ao BZ, 17LER, do que em seu par sensível, 17WTS. Nenhuma diferença no nível de expressão desses genes foi observada nas demais amostras analisadas (Figuras 9E e 9F).

O nível de expressão de ambos os genes em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foi também analisado por ensaios de RT-PCR Quantitativo em Tempo Real normalizados com o gene constitutivo *TcHGPRT*. Inicialmente foi obtida uma reta-padrão utilizando diluições ao décimo ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  cópias) de plasmídeos contendo os genes *TcHGPRT*, *TcLipDH* e *TcrHTI* (Figuras 10A, 10B e 10C). Observamos que todas as retas-padrões apresentaram boa linearidade ( $r^2 = 0,99$ ) para todos os genes.

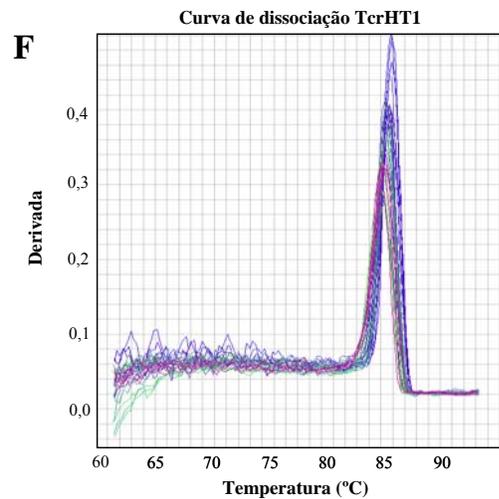
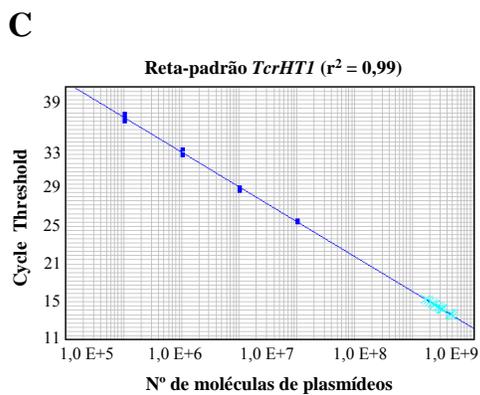
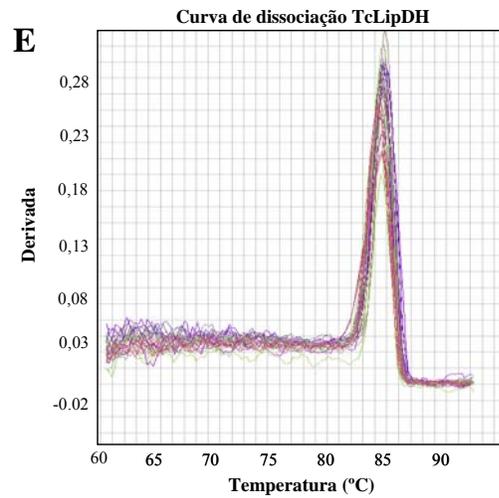
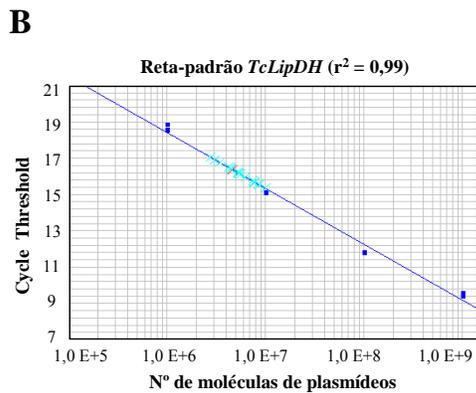
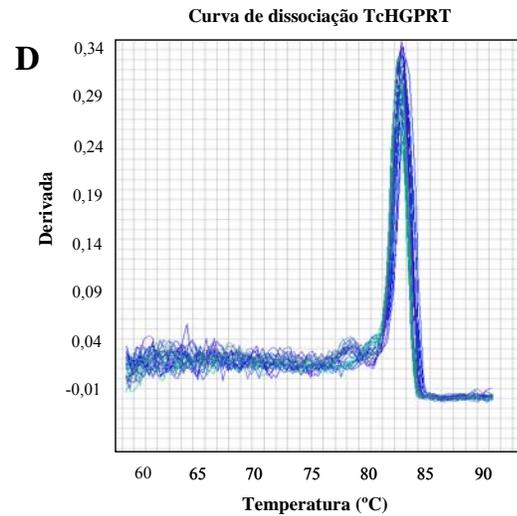
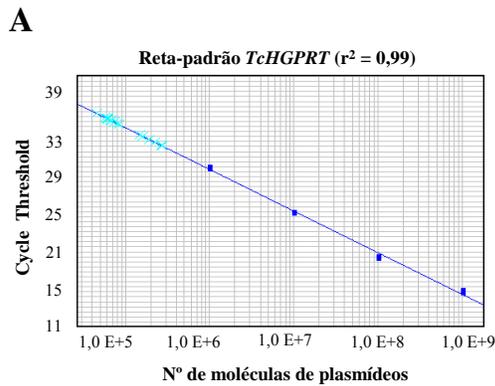
Nestes ensaios foi utilizado o fluoróforo Sybr Green I que se intercala preferencialmente a moléculas de DNA dupla fita detectando não apenas alvos específicos, mas também dímeros de iniciadores e produtos inespecíficos de PCR. Os gráficos de dissociação para os produtos de PCR

amplificados com os iniciadores específicos para os genes *TcHGPRT*, *TcLipDH* e *TcrHTI* possuem apenas um pico, mostrando que somente um produto foi amplificado (Figuras 10D, 10E e 10F).

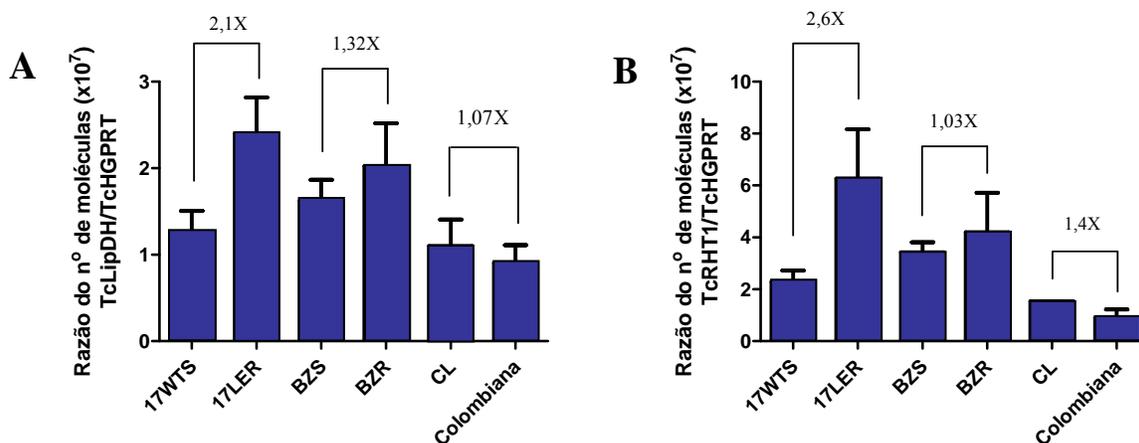
A quantidade de moléculas amplificadas é dada por interpolação com os valores da reta-padrão e a diferença do nível de mRNA dos genes *TcLipDH* ou *TcrHTI* entre as cepas sensível e resistente é determinada pela diferença do número de moléculas amplificadas do gene normalizado com os valores de *TcHGPRT*. Nas análises de RT-qPCR para o gene *TcLipDH* observamos que a diferença de expressão do mRNA foi de 2,1 vezes maior na cepa 17LER quando comparada a seu par sensível, 17WTS. Para os demais pares BZS/BZR e CL/Colombiana essa diferença não foi significativa (Figura 11A). Para o gene *TcrHTI* observamos que essa diferença de expressão foi de 2,6 vezes mais na cepa 17LER quando comparada com a 17WTS. (Figura 11B). Para os pares BZS/BZR e CL/Colombiana a diferença também não foi significativa. Estes dados confirmam os resultados de *Northern blot* para ambos genes analisados.



**Figura 9:** Análise de *Northern blot* do nível de mRNA dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* em populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Perfil das amostras hibridizadas com sondas específicas para os genes *TcLipDH* (A) e *TcrHT1* (B) marcadas com  $\alpha^{[32}\text{P}]\text{dCTP}$ . C e D - Controle quantitativo utilizando a sonda do gene do RNA ribossomal 24S alpha de *T. cruzi*. E e F - Gráficos de densitometria das bandas correspondentes aos transcritos dos genes *TcLipDH* (E) e *TcrHT1* (F) encontrados no ensaio de *Northern blot* e normalizados com o gene do rRNA..



**Figura 10:** Amplificação dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI* por RT-PCR Quantitativo em Tempo Real. A,B,C – Retas-padrões feitas com diluições seriadas ao décimo de plasmídeos recombinantes contendo os genes *TcHGPRT* (A), *TcLipDH* (B) e *TcrHTI* (C). D,E,F – Gráficos de dissociação dos genes *TcHGPRT* (D), *TcLipDH* (E) e *TcrHTI* (F).



**Figura 11:** Análise por PCR Quantitativo em Tempo Real do nível de mRNA dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI* em populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Razão do número de moléculas de cDNA do gene *TcLipDH* (A) e *TcrHTI* (B) normalizado com o gene constitutivo *TcHGPRT*. A barra de variação indica o erro padrão da média. Os valores sobre as barras indicam a diferença de expressão entre os pares. Estes dados são resultado de três experimentos em duplicata.

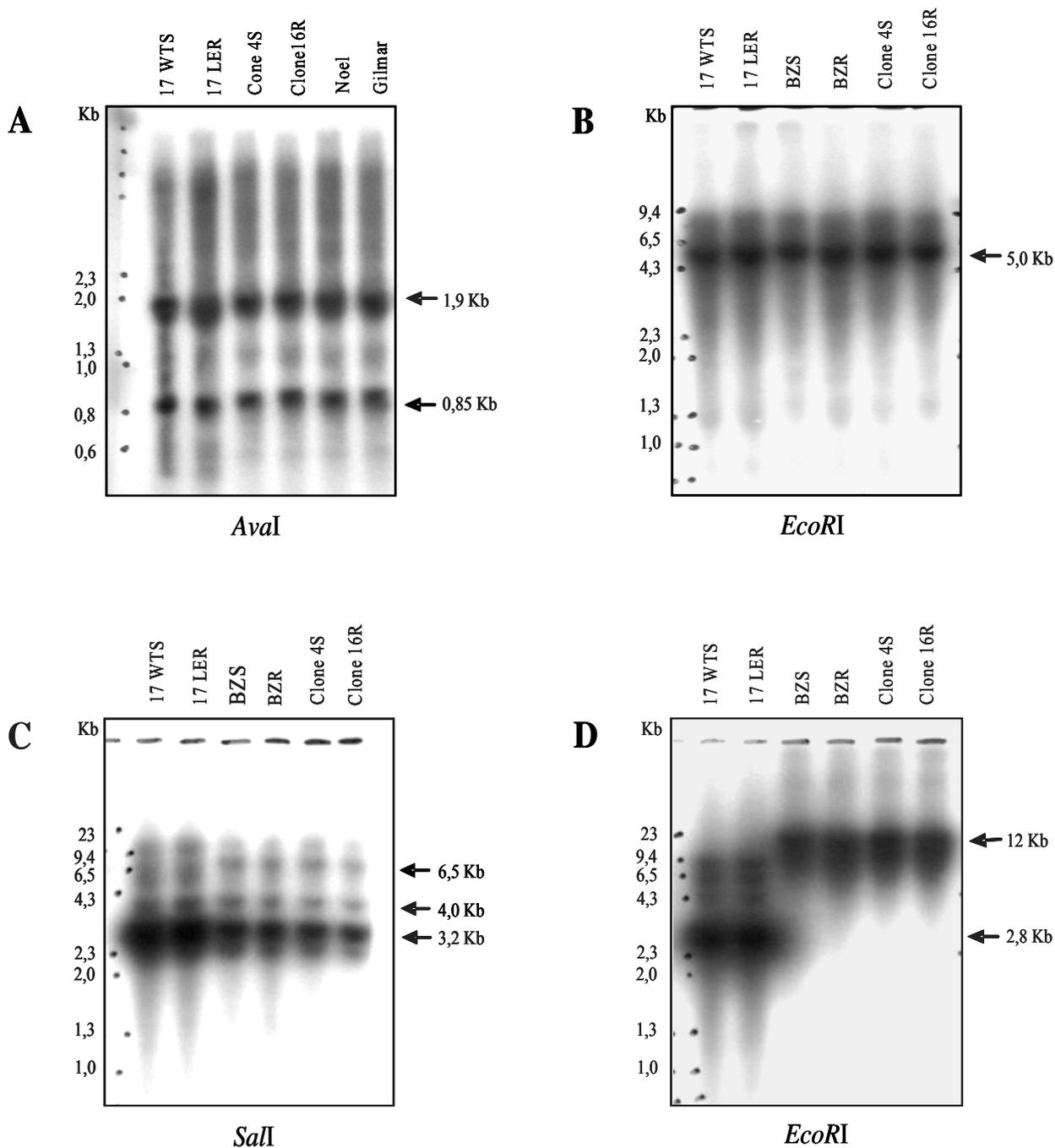
## 5.2. Organização genômica dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI*

O estudo de *polimorfismo* de tamanho dos fragmentos de restrição foi realizado com o objetivo de analisar a organização genômica, a amplificação e a presença de *polimorfismos* dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI* entre as cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Para análise do gene *TcLipDH*, o DNA genômico das cepas foi submetido a uma digestão com a enzima *AvaI*, que possui um sítio de restrição na região codificante do gene, e a outra digestão com a enzima *EcoRI*, que não possui sítio de restrição nessa região. Na digestão com a enzima *AvaI*, a sonda específica para o gene *TcLipDH* (Tabela 2) reconheceu um fragmento de 1,9 Kb e outro de 0,85 Kb em todas as populações estudadas (Figura 12A). Na digestão com a enzima *EcoRI* foi observado apenas um fragmento de 5,0 Kb em todas as populações analisadas (Figura 12B).

De acordo com a literatura o gene *TcLipDH* possui somente dois alelos 99% idênticos (Schöneck *et al.*, 1997). O perfil de *Southern blot* com a enzima *AvaI*, que corta cada alelo uma só vez, possui 2 fragmentos, o resultado esperado para o número de cópias. Em relação à presença de amplificação, observamos que não houve diferença significativa de intensidade das bandas entre a cepa sensível e a resistente de um mesmo par, mostrando que este gene não está amplificado no genoma das cepas resistentes.

Para a análise de *Southern blot* para o gene *TcrHT1*, o DNA genômico das cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foi submetido a uma digestão com a enzima *SalI*, que possui um sítio de restrição na região codificante do gene, e a outra digestão com a enzima *EcoRI*, que não possui sítio de restrição nessa região. Para o DNA digerido com a enzima *SalI*, a sonda específica para o gene *TcrHT1* (Tabela 2) reconheceu um fragmento majoritário de 3,2 Kb e outros fragmentos de aproximadamente 4 e 6 Kb (Figura 12C). O perfil de digestão com a enzima *EcoRI*, mostrou um *polimorfismo* intra-específico. A sonda reconheceu um fragmento de 2,8 Kb para as populações 17WTS e 17LER, pertencentes ao grupo *T. cruzi* I, e outro fragmento de 12,0 Kb para as populações BZS e BZR e clones, classificados como grupo *T. cruzi* II (Figura 12D).

Tetaud *et al.*, (1996) utilizando digestão parcial mostrou que o gene *TcrHT1* possui várias cópias organizadas em tandem. Nossos resultados de *Southern blot* para esse gene são compatíveis com um perfil de organização em tandem. Comparando a intensidade dos fragmentos obtidos para as cepas sensível e resistente de um mesmo par, observamos que este gene também não está amplificado no genoma do parasito.

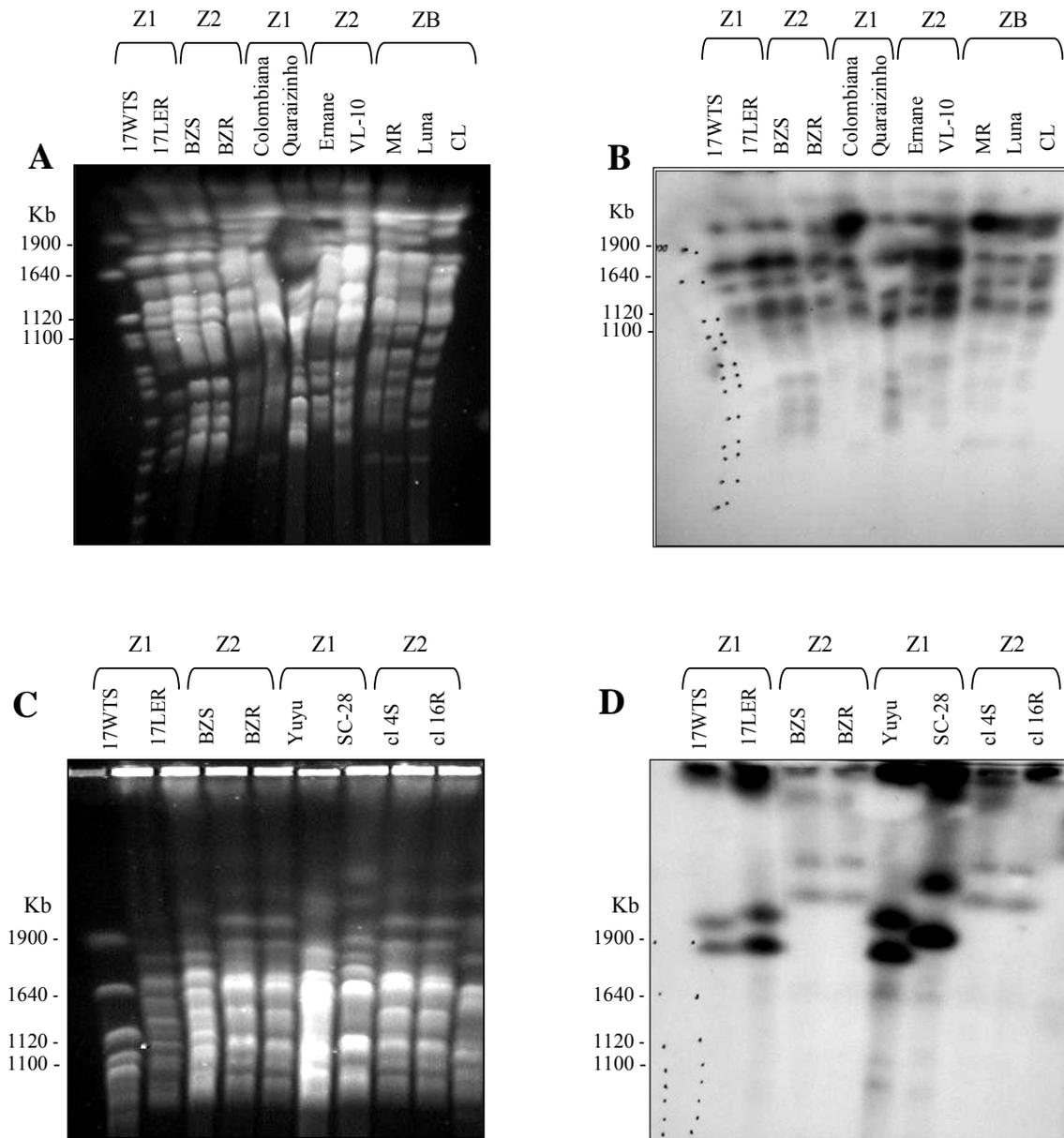


**Figura 12:** Organização dos genes *TcrHT1* e *TcLipDH* no genoma de populações do *T. cruzi* sensíveis resistentes ao BZ. O DNA genômico foi digerido com endonucleases de restrição e hibridizado com sondas específicas para o gene *TcLipDH* (A e B) ou *TcrHT1* (C e D) marcadas com  $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP

### 5.3. Localização cromossômica dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1*

A fim de avaliar a distribuição cromossômica dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1*, os cromossomos das diferentes cepas de *T. cruzi* foram separados por eletroforese de campo alternado (Figuras 13A e 13C). Após a eletroforese, os cromossomos foram transferidos do gel de agarose para membrana de náilon e hibridizados com sonda específica para o gene *TcLipDH* ou para o gene *TcrHT1* (Tabela 2).

Na figura 13B, podemos observar que a sonda específica para o gene *TcLipDH* reconheceu quatro bandas cromossômicas de aproximadamente 1,2; 1,45; 1,8Mb e em 1 cromossomo maior que 1,9Mb. Este perfil foi observado em todas as populações analisadas, variando um pouco a intensidade das bandas entre as amostras. Na figura 13D, podemos observar que a sonda específica para o gene *TcrHT1* reconheceu duas bandas bem definidas para cada amostra, sendo uma de 1,85Mb e outra maior que 1,9Mb, nas populações 17WTS/17LER e Yuyu (zimodema Z1, grupo *T. cruzi* I). Por outro lado, na cepa SC-28 (Z1) observamos uma banda cromossômica de 1,9Mb e outra maior que 1,9Mb. Nas populações BZS/BZR e clones 4S/16R (zimodema Z2, grupo *T. cruzi* II), observamos dois cromossomos maiores que 1,9Mb.



**Figura 13:** Localização cromossômica dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1*. A e C - Bandas cromossômicas separadas por PFGE e coradas com brometo de etídio. B - Perfil de bandas cromossômicas hibridizadas com sonda do gene *TcLipDH* marcada com  $\alpha^{[32]P}$ dCTP. D - Perfil de bandas cromossômicas hibridizadas com sonda do gene *TcrHT1* marcada com  $\alpha^{[32]P}$ dCTP. Como padrão de tamanho molecular foram utilizados os cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 5.4. Clonagem dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1*, expressão das proteínas recombinantes e produção de anticorpos policlonais

Com o objetivo de estudar o nível de expressão das proteínas TcLipDH e TcrHT1 em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, clonamos os genes *TcLipDH* e *TcrHT1* e expressamos as proteínas recombinantes.

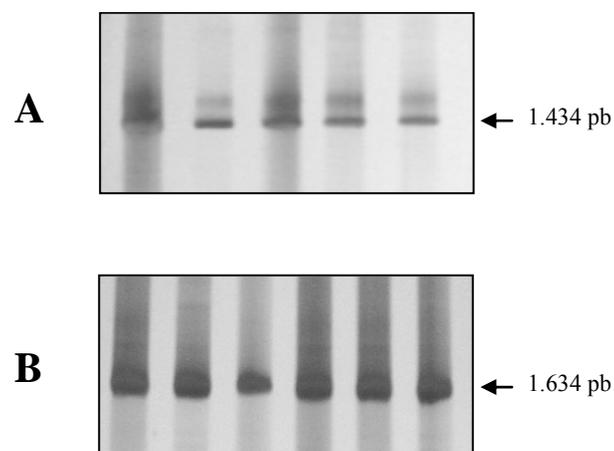
A primeira tentativa de expressão destas proteínas foi feita no vetor de expressão pQE31 (Qiagen). Após a amplificação com iniciadores específicos, a seqüência codificante de cada gene e o vetor de expressão pQE31 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e submetidos a reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Após a ligação, os vetores recombinantes foram inseridos em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS por choque térmico. Após a confirmação da clonagem por PCR de colônia dos genes *TcLipDH* (Figura 13A) e *TcrHT1* (Figura 13B) foi realizada a indução da expressão das proteínas recombinantes com IPTG 2mM a 37°C sob agitação. O IPTG é um análogo da lactose que se liga ao repressor do operon lac fazendo com que esse repressor desligue-se da região operadora e permitindo a transcrição do gene clonado pela RNA polimerase. Entretanto, não conseguimos expressar as proteínas recombinantes no vetor pQE31.

Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado utilizando o vetor de expressão pET-5b (Promega). Após amplificação com iniciadores específicos (Tabela 2), a seqüência codificante dos genes e o vetor foram digeridos com as enzimas *Nde*I e *Bam*HI e submetidos a reação de ligação com a T4 DNA Ligase(Biolabs). Após a ligação, os vetores recombinantes foram inseridos em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS por choque térmico. Novamente, a clonagem foi bem sucedida, mas não conseguimos expressar as proteínas recombinantes.

Uma terceira tentativa foi realizada, desta vez utilizando o vetor pGEX 5X-3 (GE Life Sciences). O vetor pGEX 5X-3 possui a seqüência que codifica a proteína GST (Glutathione S-Transferase) de *Schistosoma japonicum* que é expressa fusionada à proteína recombinante. De acordo com o fabricante, a GST é uma proteína de 26 kDa que, quando expressa em *E. coli*, apresenta atividade enzimática normal e nenhuma toxicidade para a bactéria. Por esse motivo, a presença da GST fusionada à extremidade aminoterminal da proteína recombinante contribui para a expressão de níveis mais altos da mesma, principalmente em cepas de *E. coli* deficientes em proteases. Em nossos experimentos, inicialmente toda a seqüência codificante dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* foram amplificadas por PCR com iniciadores específicos (Tabela 2).

Posteriormente, o vetor pGEX 5X-3 e os produtos de amplificação foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* e submetidos a reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Biolabs). Após a ligação, os vetores recombinantes foram inseridos em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS por choque térmico. Os clones positivos foram identificados por PCR de colônia (Figura 14) e sequenciamento.

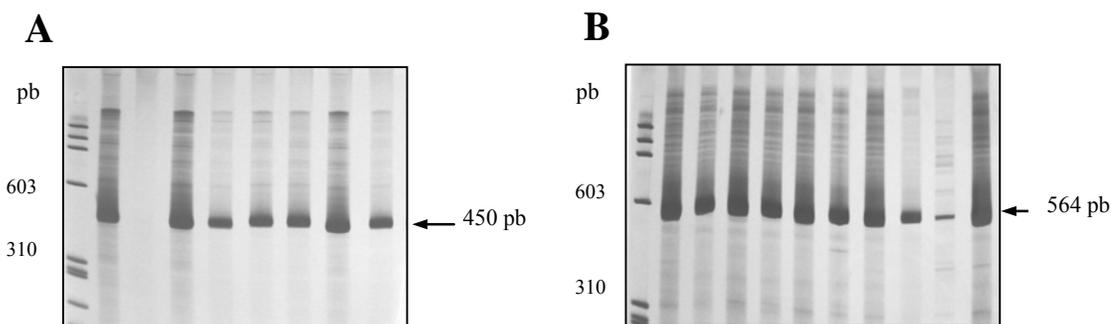
Após indução da expressão das colônias positivas com IPTG 2 mM, a 37°C, o perfil total de proteínas das bactérias induzidas foi analisado em gel de *pcoli*acrilamida-SDS corado com azul de Coomassie. Conseguimos expressar com sucesso a proteína TcLipDH (50 kDa) fusionada à GST (26 kDa), totalizando um *pcoli*peptídeo de tamanho molecular equivalente a 76 kDa (Figura 16A). Entretanto não conseguimos expressar a proteína TcrHT1 (dado não mostrado).



**Figura 14:** Gel de *pcoli*acrilamida corado pela prata mostrando o produto de PCR das colônias de bactéria mostrando a clonagem dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* no vetor pGEX 5X-3. A - Clonagem da seqüência codificante completa do gene *TcLipDH*. B - Clonagem da seqüência codificante completa do gene *TcrHT1*.

Está descrito na literatura que a expressão de proteínas de membrana é particularmente difícil (Miroux & Walker, 1996). Em cepas de *E. coli*, a expressão dessas proteínas pode ser amplamente reduzida e levar à degradação do plasmídeo caso a proteína recombinante tenha efeitos tóxicos para a célula. É possível ainda, que haja inserção da proteína recombinante na membrana da célula bacteriana, causando instabilidade e lise celular (Dumon-Seignover *et al.*, 2004; Laage & Langosch, 2001). A dificuldade de expressão da proteína TcrHT1 pode ser devido

à uma toxicidade causada pela proteína recombinante nas bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS utilizadas para a clonagem. Sendo assim, a fim de reduzir essa possível toxicidade, desenhamos dois novos pares de iniciadores para amplificação apenas de partes da proteína ao invés da proteína inteira. Um dos pares foi desenhado para a expressão dos domínios transmembrana 1 e 2 e amplifica desde a metionina inicial Met-273 até a Gln-723, resultando em um fragmento de 450 pb (17 kDa). O segundo par foi desenhado para a expressão dos domínios 7 a 12 e amplificam da Met-1.218 até a Val-1.781, resultando em um fragmento de 564 pb (21 kDa). Os produtos da amplificação com esses iniciadores e o vetor pGEX 5X-3 foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* e submetidos a reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Biolabs). Após a ligação, os vetores recombinantes foram inseridos em bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS por choque térmico. A figura 15 mostra os produtos de PCR das colônias contendo os fragmentos correspondentes aos domínios transmembrana 1 a 2 (450 pb) e 7 a 12 (564 pb). A confirmação da clonagem foi realizada também por sequenciamento.



**Figura 15:** Gel de *pcoli*acrilamida corado pela prata mostrando PCR de colônia para a confirmação da clonagem dos fragmentos do gene *TcrHT1* no vetor pGEX 5X-3. A – Fragmento contendo os domínios transmembrana 1 e 2. B – Fragmento contendo os domínios transmembrana 7 a 12.

As colônias positivas foram submetidas a indução da expressão com IPTG 2 mM a 37°C durante 6 horas. Após a indução, o perfil de proteínas totais das bactérias foi analisado em gel de *pcoli*acrilamida-SDS corado com azul de Coomassie. O *pcoli*peptídeo contendo os domínios 1 e 2 possui aproximadamente 17 kDa e o que contém os domínios 7 a 12 possui aproximadamente 21 kDa. A massa molecular predita para esses *pcoli*peptídeos fusionados à GST de 26 kDa seria

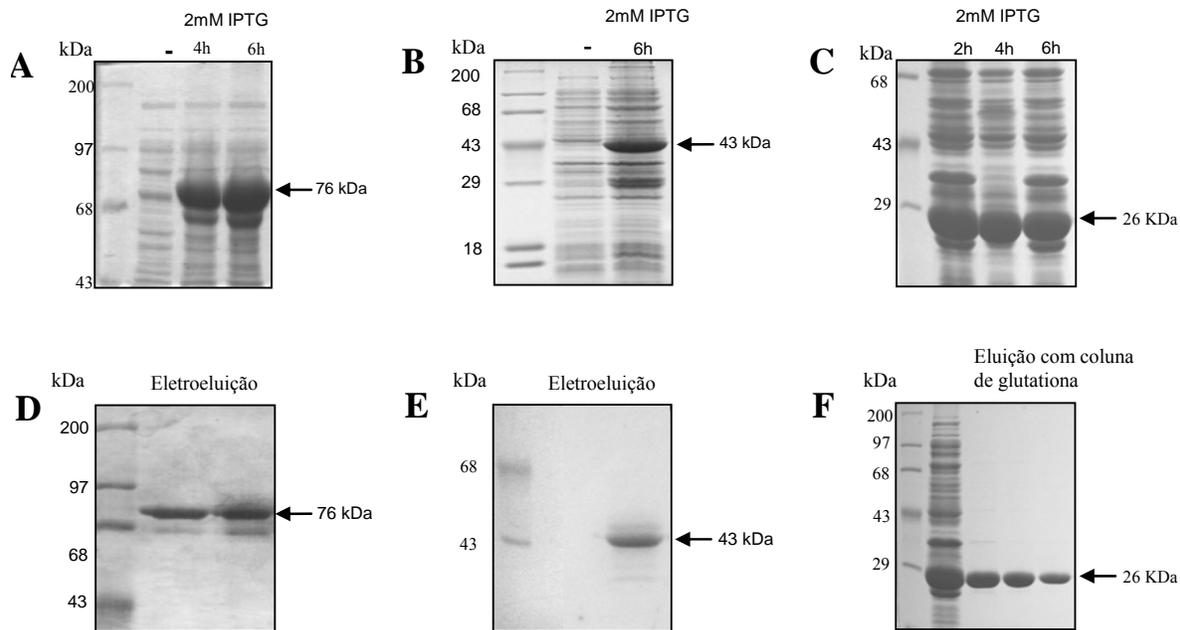
de 43 kDa e 47 kDa, respectivamente. O primeiro foi expresso com sucesso (Figura 16B). Entretanto, apesar das análises de sequenciamento mostrarem que os vetores recombinantes apresentavam as sequências corretas de nucleotídeos, o *pcolipeptídeo* contendo os domínios 7 a 12 foi expresso com 39 kDa, um tamanho menor do que o de 47 kDa esperado (dado não mostrado). Diante disso, demos continuidade à etapa subsequente do projeto com os domínios 1 e 2 da proteína recombinante fusionados à GST.

Na época destes experimentos o Fator Xa, necessário para clivar a proteína de fusão GST não estava sendo comercializado, por isso, também fizemos a indução da expressão somente da proteína GST para verificar se os anticorpos produzidos contra ela reconheceriam proteínas do *T. cruzi*, sendo este um dos controles dos nossos experimentos (Figura 16C).

As proteínas recombinantes TcLipDH e TcrHT1 na fração insolúvel do extrato total de proteínas da bactéria (dado não mostrado). Para solubilização dessas proteínas usamos a metodologia descrita no item 4.14 de Material e Métodos, porém nas condições utilizadas os *pcolipeptídeos* não foram solubilizados. Sendo assim, optamos pela purificação da proteína insolúvel por eletroeluição.

Os resultados da purificação por eletroeluição mostram que conseguimos preparações quase puras de ambas proteínas (Figuras 16D e 16E, respectivamente). Quanto à proteína GST, esta foi purificada utilizando coluna de glutationa-sepharose 4B (Figura 16F). Após a purificação, as proteínas foram inoculadas em coelhos em três doses de 300 µg cada nos dias 0, 7 e 21 dias conforme descrito em Material e Métodos. Aproximadamente 5 mL de sangue dos coelhos foi colhido 15 e 30 dias após o último inóculo.

O soro obtido 15 dias após o primeiro inóculo foi submetido a um ensaio de ELISA para testar sua reatividade. A Tabela 3 mostra os valores de absorvância do soro diluído 1:200. Podemos observar que não houve diferença na reatividade do soro dos coelhos imunizados com proteína recombinante com adjuvante ou sem adjuvante. Além disso, as reatividades dos soros dos coelhos imunizados com TcLipDH, TcrHT1 ou TcHGPR1 foram muito próximas. Como esperado para o controle, o soro do coelho imunizado apenas com adjuvante apresentou baixo valor de absorvância.



**Figura 16:** Expressão e purificação das proteínas recombinantes. Eletroforese em SDS-PAGE 10% mostrando a expressão da proteína recombinante TcLipDH (76 kDa) após indução com IPTG 2mM por 4 e 6 horas. Os 76 kDa correspondem a 50 kDa da TcLipDH fusionada à GST de 26 kDa. B - Expressão da proteína recombinante TcrHT1 após indução com IPTG 2 mM por 6 horas. Os 43 kDa correspondem a 17 kDa de um fragmento da TcrHT1 fusionado à proteína GST de 26 kDa. C - Proteína GST após indução com IPTG 2 mM por 2, 4 e 6 horas. D, E e F – Proteínas TcLipDH, TcrHT1 e GST recombinantes purificadas.

### 5.5. Avaliação do nível de expressão das proteínas TcLipDH e TcrHT1 em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ

A expressão das proteínas TcLipDH e TcrHT1 em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foi analisada através de ensaios de *Western blot*. Para isso, extratos de proteínas totais de parasitos na forma epimastigota foram submetidos à eletroforese em gel de *pcoli*acrilamida-SDS. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e esta foi incubada com um dos soros produzidos.

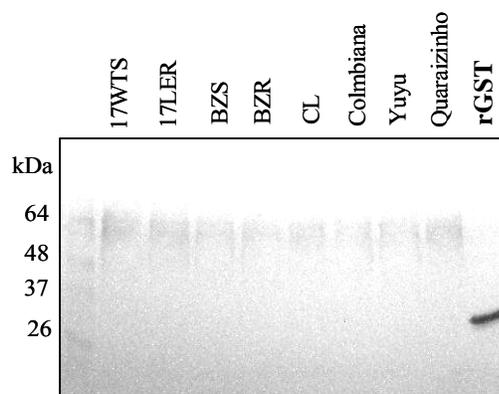
Antes de realizarmos os ensaios de *Western blot* para analisar o nível de expressão das proteínas TcLipDH e TcrHT1, avaliamos se os anticorpos anti-GST presentes nos soros *pcoliclonais* anti-TcLipDH e anti-TcrHT1 não apresentariam reação cruzada com as proteínas do parasito. Foram preparados dois géis idênticos de proteínas totais do *T. cruzi*. Um deles foi

corado com azul de Coomassie e o outro foi transferido para membrana de nitrocelulose. O soro do coelho imunizado com a GST foi então colocado para reagir com as proteínas totais de *T. cruzi*. A Figura 17 mostra que os anticorpos anti-GST (1:1.000) não reconhecem nenhuma proteína do parasito indicando que não há interferência dos anticorpos produzidos contra a proteína de fusão nos nossos ensaios de *Western blot*.

**Tabela 3:** Absorbância dos soros de coelhos imunizados com as proteínas recombinantes TcLipDH, TcrHT1 ou GST. Diluição (1:200).

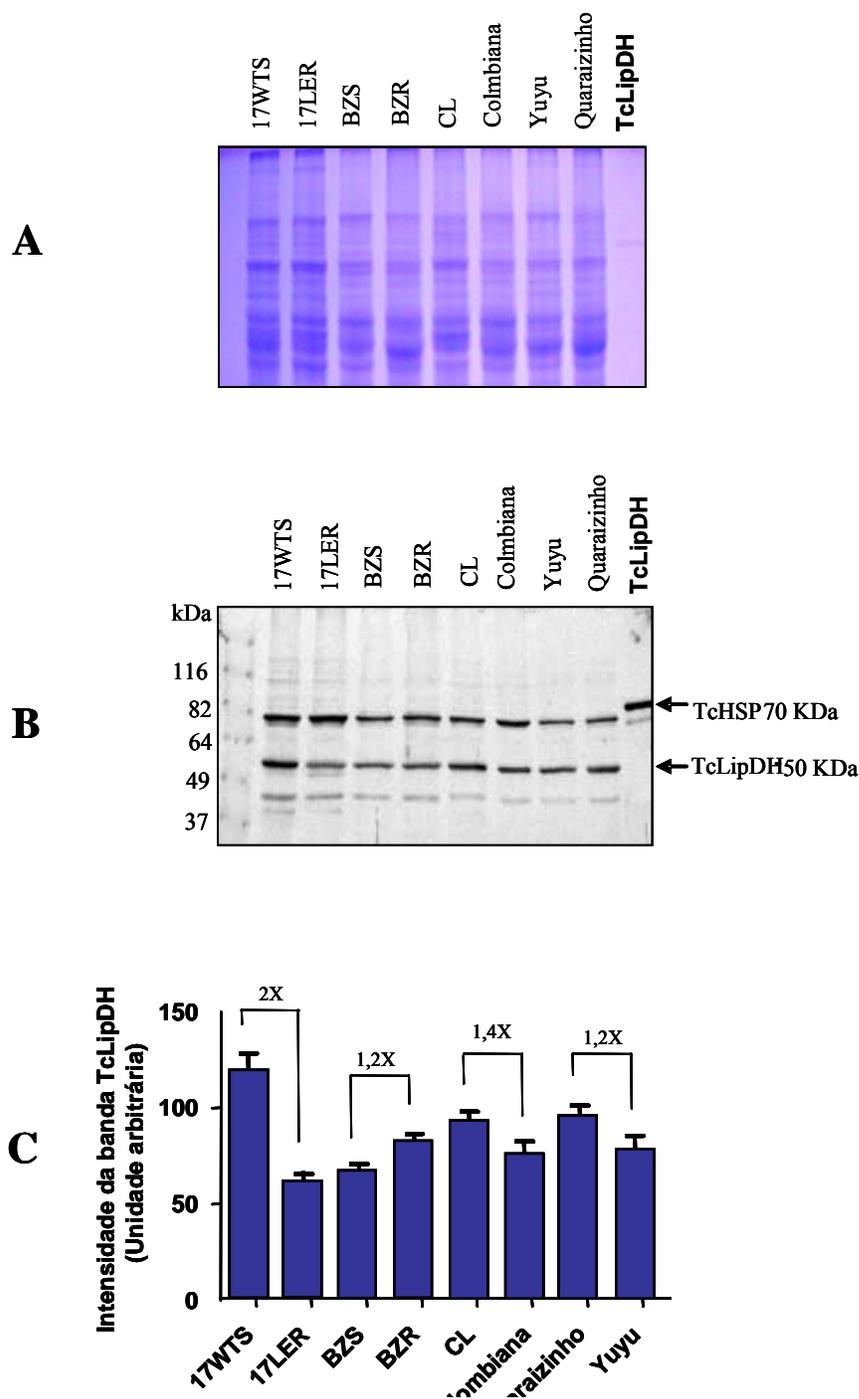
Coelho	Imunização	Absorbância do soro a 405 nm
1	Adjuvante de Freund	0,236
2	TcLipDH sem adjuvante	1,542
3	TcLipDH com adjuvante	1,539
4	TcrHT1 sem adjuvante	1,624
5	TcrHT1 com adjuvante	1,508
6	GST com adjuvante	1,649

\* A absorbância dos soros dos coelhos antes da imunização variou de 0,061 a 0,074 (Diluição 1:200).



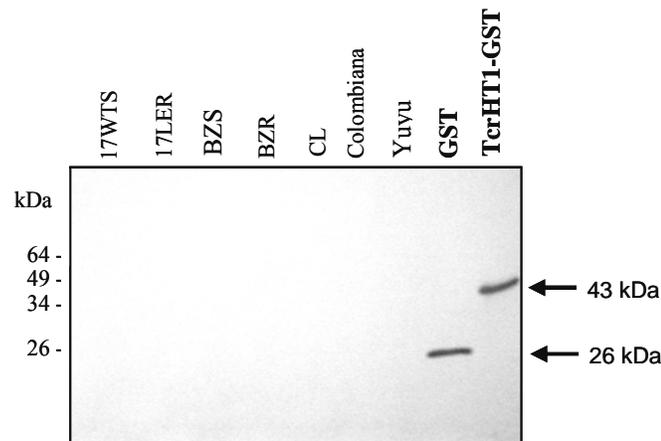
**Figura 17:** *Western blot* das proteínas totais das cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol incubadas com anticorpo policlonal anti-GST (1:1.000). Os anticorpos produzidos contra a proteína de fusão GST não reagiram com nenhuma proteína de *T. cruzi* e, portanto, não interferiram nos ensaios de *Western blot* realizados posteriormente.

Em seguida, para avaliar o nível de expressão da proteína TcLipDH nas cepas sensíveis e resistentes de *T. cruzi*, foram preparados dois géis idênticos de proteínas totais do *T. cruzi*. Um deles foi corado com azul de Coomassie (Figura 18A) e o outro foi transferido para membrana de nitrocelulose para posterior incubação com o soro dos coelhos imunizados com a proteína TcLipDH. Os resultados de *Western blot* mostraram que o anticorpo anti-TcLipDH (1:200) reconheceu um *pcolipeptídeo* de aproximadamente 50 KDa em todas as amostras de *T. cruzi* analisadas. Este *pcolipeptídeo* corresponde ao tamanho esperado para a proteína **lipoamida desidrogenase** (Figura 18B). A mesma membrana foi em seguida incubada com anticorpo *pcoliclonal* anti-TcHSP70. Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostram que a TcHSP70 é igualmente expressa nas cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, sendo, portanto, utilizada como normalizador (Murta S.M.F., 2008, *in press*). Os resultados de análises densitométricas comparativas entre a proteína TcHSP70 e TcLipDH mostraram que a TcLipDH está 2 vezes menos expressa na população 17LER quando comparada à 17WTS. Nenhuma diferença significativa foi observada nas demais cepas de *T. cruzi* analisadas (Figura 18C).



**Figura 18:** Análise por *Western blot* do nível de expressão da proteína TcLipDH.. A- Gel SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie mostrando o perfil eletroforético de proteínas totais das cepas de *T. cruzi*. B - Membrana contendo proteínas totais das cepas de *T. cruzi* incubada com anticorpos *policlonais* anti-TcLipDH e anti-TcHSP-70. C - Gráficos de desitometria da banda correspondente à proteína TcLipDH normalizada com TcHSP-70. A barra de erro indica o erro padrão da média. Os valores sobre as barras indicam a diferença entre a cepa sensível e a resistente do par. Estes dados são resultado de três experimentos.

Nos ensaios de *Western Blot* realizados para avaliar o nível de expressão da proteína TcrHT1, observamos que o soro produzido contra os domínios transmembrana 1 a 2 não reconheceu a proteína TcrHT1 mesmo quando utilizado em concentrações altas de 1:50. A GST fusionada à proteína recombinante TcrHT1 aparentemente foi mais imunogênica que a proteína do *T. cruzi*, pois o soro anti-TcrHT1 reagiu com a GST purificada e também com a GST fusionada ao fragmento de TcrHT1, mas não reconheceu nenhuma proteína do parasito (Figura 19).



**Figura 19:** Membrana de *Western blot* contendo proteínas totais das cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, a proteína GST e o fragmento da proteína TcrHT1 fusionado à GST. A membrana foi incubada com anticorpo policlonal anti-TcrHT1 fusionada à GST (1:50).

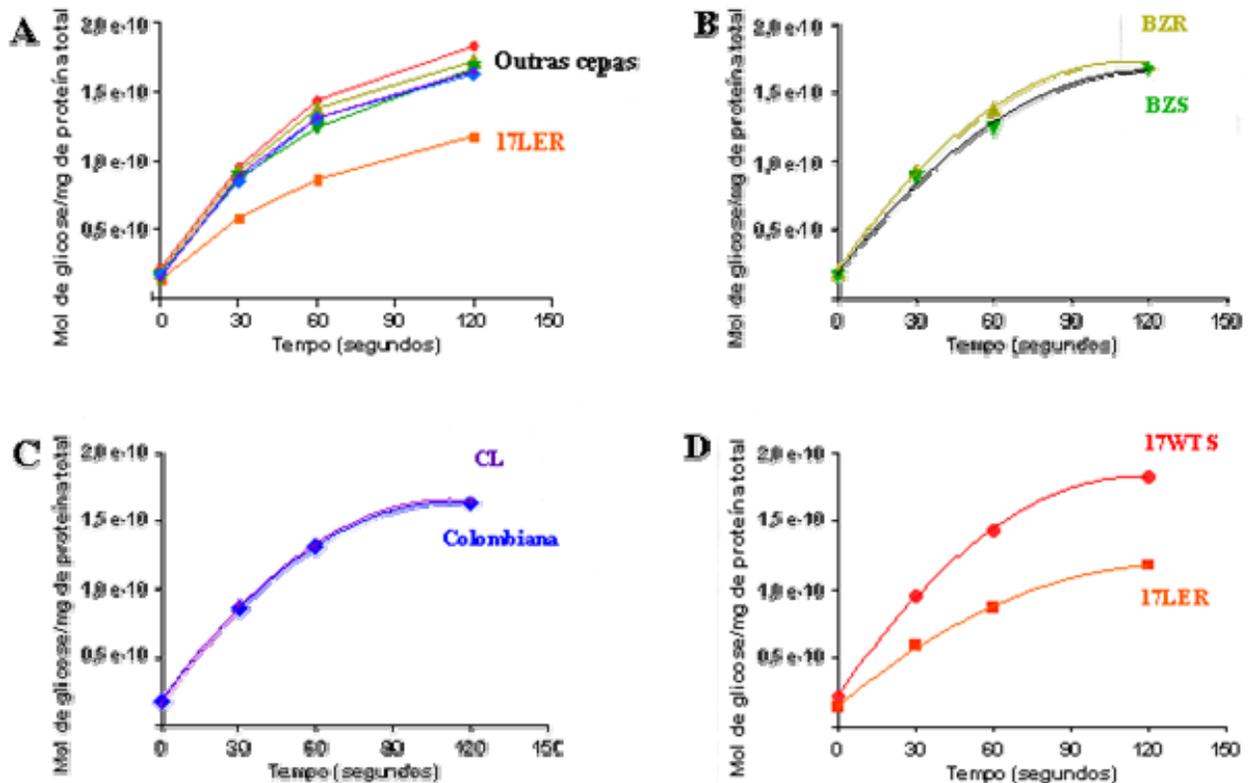
## 5.6. Ensaio de atividade do transportador de hexoses

Por não termos conseguido produzir anticorpos anti-TcrHT1, substituímos a avaliação do nível de expressão do transportador pelo ensaio de atividade de transporte de glicose nas cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Segundo Uzcategui *et al.* (2005), vários tipos celulares resistentes a drogas apresentam taxas exacerbadas de glicólise, síntese preferencial de ATP por oxidação fosforilativa e/ou transporte de glicose alterado. O protocolo que usamos neste experimento foi adaptado dos ensaios descritos por Eisenthal *et al.* (1989). Resumidamente, para o ensaio de atividade, as formas epimastigotas do parasito foram crescidas em meio LIT. Na fase exponencial de crescimento, os parasitas foram lavados em solução salina a fim de retirar traços de glicose do meio. Quatro reações com  $10^7$  células foram incubadas com 6-deoxi-D-[6-

<sup>3</sup>H]glicose durante 0, 30, 60 ou 120 segundos. O maior intervalo de tempo estabelecido foi de 120 seg, pois após este período a curva atinge um platô devido a concentrações próximas de glicose dentro e fora da célula. Após estes intervalos foi adicionado a flordizina, que bloqueia o transportador de hexoses. Posteriormente, as células com os transportadores bloqueados foram centrifugadas e o sobrenadante contendo a 6-deoxi-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose não capturada foi retirado. O sedimento contendo os parasitos foi ressuspenso em água para lise das células e transferido para um tubo de cintilação. Após a adição de solução de cintilação a radiação foi contada no cintilador Beckman modelo LSC. Adicionalmente, a quantidade de proteínas totais de cada reação foi quantificada pelo método de Bradford. A quantidade em mols de glicose transportada em cada reação foi calculada por correlação a partir da contagem de radiação de uma quantidade conhecida de glicose. Em seguida, a quantidade de glicose transportada em cada intervalo foi dividida pela quantidade de proteínas totais. Os dados finais foram expressos em mols de 6-deoxi-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose/mg de proteínas totais/tempo

Na Figura 20A, pode-se observar que no tempo zero a taxa de glicose transportada é semelhante em todas as cepas. Após esse intervalo de tempo observamos que a eficiência do transporte de glicose é consideravelmente menor na cepa 17LER quando comparada às demais. Análises utilizando o teste ANOVA fatorial mostraram que essa diferença é estatisticamente significativa ( $F = 90,12$  e  $p < 0,001$ ).

Avaliando cada par separadamente observamos que, após o tempo zero, a quantidade de glicose transportada pela cepa 17LER é em média 40% inferior àquela transportada pela cepa sensível 17WTS em todos os intervalos de tempo (Figura 20B). As análises utilizando o teste ANOVA fatorial mostraram que a diferença entre o par 17LER/17WTS é estatisticamente significativa ( $F = 1.148$  e  $p < 0,001$ ). Para os pares BZS/BZR (Figura 20C) e CL/Colombiana (Figura 20D), não foi observada diferença ( $p = 0,072$  e  $p = 0,5$ , respectivamente).



**Figura 20:** Ensaio de transporte de glicose em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Quantidade de 6-deoxi-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose transportada em função do tempo e da quantidade de proteínas totais: A – Comparação da quantidade de glicose transportada entre todas as cepas analisadas. B – par 17WTS/17LER ( $p < 0,001$ ); C – par BZS/BZR ( $p = 0,072$ ); D – par CL/Colombiana ( $p = 0,5$ ).

### 5.7. Estudos comparativos dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI* em diferentes bancos de dados de domínio público

As análises de bioinformática dos genes *TcLipDH* e *TcrHTI* foram realizadas com a finalidade de comparar as informações disponíveis em diferentes bancos de dados de domínio público. Para isso foram utilizadas as seqüências depositadas com os seguintes números de acesso X89112 e U05588.

Inicialmente foi realizada uma busca por similaridade dessas seqüências em uma cópia local instalada em nossos servidores do banco de dados de *T. cruzi* (número de acesso do projeto: AAHK00000000) (El-Sayed *et al.*, 2005).

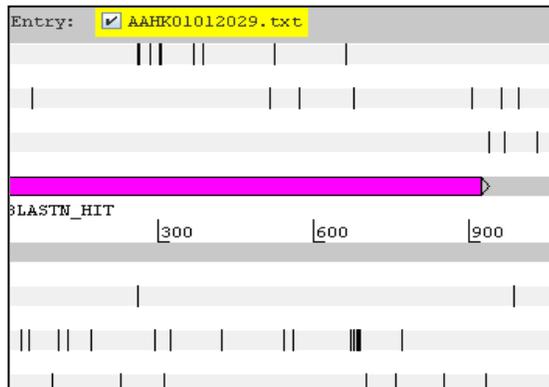
Nossas buscas revelaram a existência de diversos contigs (2 contigs para *TcLipDH* e 31 contigs para *TcrHTI*) contendo cópias inteiras e/ou parciais, anotadas e/ou não anotadas dos referidos genes (Tabela 1 do Anexo).

Para o gene *TcrHTI*, nos 31 contigs identificados (Tabela 1 do Anexo) foi verificada a existência de três cópias inteiras anotadas (contigs AAHK01000388, AAHK01001276 e AAHK01002461), uma cópia truncada (AAHK01000388) e 29 cópias incompletas do gene (Tabela 1 do Anexo).

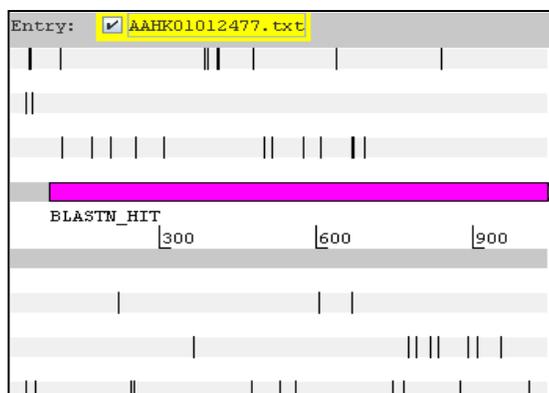
De fato, com exceção do contig AAHK01001276 que apresenta uma única cópia inteira do gene anotado, todos os contigs identificados possuem trechos de seqüências que variam de 190 a 1.186 pb com identidade acima de 97% e *E-value* igual ou próximo de zero com o transportador de hexoses do *T. cruzi* (Número de acesso: U05588). Nossos resultados indicam que aproximadamente 86% desses contigs (25/29) possuíam tais fragmentos de seqüência não anotados e conseqüentemente passaram por um processo de re-anotação manual.

Algumas situações predominantes foram identificadas como potenciais motivadoras da existência dessas “cópias incompletas” do gene analisado. Na situação 01 temos as regiões de similaridade com o gene transportador de hexoses ancoradas nas extremidades do contig, fato que acarreta a truncagem da região amino ou carboxi terminal do gene. Na situação 02 temos contigs pequenos que apresentam na sua extensão completa identidade com o gene *TcrHTI* (U05588) (Figura 21).

### Situação 01 - A



### Situação 01 - B



### Situação 02



**Figura 21:** Interface do programa Artemis 7.0 mostrando a localização das regiões de similaridade com o gene transportador de hexoses (destacadas em rosa) em diferentes *contigs* (em cinza). Esses fragmentos correspondem a “cópias incompletas” do gene devido a duas situações. Na Situação 01, essas sequências estão ancoradas à extremidade do *contig* com truncagem da região amino terminal (A) ou carboxi terminal do gene (B). Na Situação 02, a região de similaridade com o gene do transportador de hexoses ocupa toda a extensão de um *contig* acarretando truncagem nas regiões amino e carboxi terminais. As linhas claras acima e abaixo do *contig* correspondem às três janelas de leitura da fita senso e anti-senso, respectivamente.

Com base nesses achados e na versão disponível da montagem do genoma de *T.cruzi* (versão 4) só podemos especular que tal fato possa ser decorrente do processo de anotação automática adotado, da parcialidade de anotação do genoma (somente 60,4 Kb dos 108 Mb do genoma diplóide do *T. cruzi* foram anotados até o momento) e/ou do alto conteúdo de repetições do genoma (Arner *et al.*, 2007). Aproximadamente 50% do genoma de *T.cruzi* é constituído por sequencias repetitivas (El-Sayed *et al.*, 2005).

Complementarmente, as seqüências de lipoamida desidrogenases e transportadores de hexoses do *T. cruzi* foram analisadas no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>) pela utilização das ferramentas de busca booleana disponíveis no website do banco de dados.

Com relação aos transportadores de hexoses, os resultados obtidos pela utilização do GeneDB corroboram nossas análises anteriores, uma vez que quatro seqüências completas do gene foram identificadas.

Contudo, com relação às lipoamida desidrogenases foram identificados quatro genes anotados distintos daquele descrito na literatura (Lohrer & Krauth-Siegel, 1990; Krauth-Siegel & Schoneck *et al.*, 1997). Dois desses genes possuem 1.530pb e dois 1.653pb e codificam proteínas de 510 e 551 aminoácidos (Tabela 2 do Anexo) com identidade inferior a 30% quando comparadas à seqüência de 477 aminoácidos e 50 kDa descrita na literatura (Figura 1 do Anexo).

No intuito de melhor entendermos esses resultados e averiguar a acurácia da predição realizada pelo banco de dados bem como pelas nossas análises realizamos um estudo de caracterização computacional dos domínios presentes em cada uma das seqüências.

As lipoamida desidrogenases são enzimas caracterizadas pela presença de um sítio de ligação de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) dentro de um domínio maior de ligação de FAD (Flavina Adenina dinucleotídeo). Este sítio ativo é também encontrado nas glutathiona redutases, tripanotiona redutases e mercúrio redutases e é caracterizado pela expressão regular **G - x - C - [LIVA] - x(2) - G - C - [LIVM] - P**, onde as duas cisteínas participam da transferência de elétrons do FAD para o substrato lipoamida (Mande *et al.*, 1996).

Utilizando um script Perl (Practical Extraction and Report Language) especialmente desenvolvido e que incorpora a expressão regular descrita acima (Ruiz, JC, comunicação pessoal) para buscas sistemáticas contra seqüências protéicas encontramos o sítio de ligação de NADH representado apenas nas seqüências de 477 aminoácidos descritas na literatura (Figura 2 do Anexo) e não nas seqüências de 510 ou de 551 aminoácidos.

Embora essas seqüências não apresentem o sítio ativo de ligação característico das lipoamida desidrogenases, pela utilização do banco de dados de domínios Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) pudemos classificar tais seqüências como pertencentes à família das FAD-dissulfeto oxidoredutases (PFAM: PF00070).

Como alguns organismos como plantas e bactérias possuem mais de uma isoforma da enzima lipoamida desidrogenase e pelo fato de até o presente momento não terem sido descritas outras desidrogenases em tripanosomatídeos, resolvemos avaliar a relação existente entre as LipDH de *T. cruzi* anotadas no GeneDB e na literatura com aquelas descritas para outros organismos.

Inicialmente, objetivando a identificação sistemática de seqüências relacionadas às desidrogenases nos bancos de dados de domínio público, foram construídas matrizes de Markov (HMM - *Hidden Markov Model*) representando o alinhamento entre as seqüências de cada um dos três grupos de LipDH descritos anteriormente. Tais matrizes foram utilizadas para buscas por similaridade de seqüência global contra o banco de dados NR do NCBI o que viabilizou a identificação de seqüências correlacionadas e a realização de análises de inferência filogenética.

Os resultados indicam que a seqüência de 477 aminoácidos descrita por Schöneck está agrupada à seqüência da lipoamida desidrogenase de *T. brucei* em um cluster próximo aquele contendo seqüências de lipoamida desidrogenases do gênero *Leishmania* (identidade média superior a 75%). Curiosamente, esta seqüência da LipDH de *T. cruzi* encontra-se próxima as LipDH da alga unicelular *Euglena gracilis* (60% de identidade) e das plantas *Arabidopsis thaliana* e *Lycopersicum esculentum* (58% de identidade). Na árvore filogenética gerada através da estratégia de NJ (*Neighbour Joining*) observamos uma porcentagem de identidade média de ~50% entre as seqüências analisadas de LipDH de *T. cruzi*, humanos e de outros mamíferos (Figura 22A).

Com relação às seqüências de 510 e 551 aminoácidos, nossas análises de inferência filogenética também revelaram o agrupamento das seqüências de LipDH em um mesmo clado com seqüências de bactérias, como exemplificado na árvore pela LipDH de *Desulfuromonas acetoxidans* (Figura 22A).

Abordagem idêntica de estudo computacional também foi realizada para o gene *TcrHTI*. Contudo, ao contrário do que foi observado para o gene *TcLipDH*, os resultados obtidos das buscas executadas no GeneDB foram idênticos aqueles encontrados pelo alinhamento da seqüência referência (U05588) contra o banco de dados genômico de *T. cruzi*. De fato, em ambas

as análises, todas as seqüências possuem o mesmo tamanho (544 aminoácidos) e identidade superior a 97% entre si.

Adicionalmente analisamos as características de domínio que definem a função dos transportadores de hexoses de tripanosomatídeos.

Todos os transportadores de hexoses que fazem parte da superfamília dos transportadores que realizam difusão facilitada (MFS1) possuem uma estrutura conservada constituída por 12 domínios transmembrana. Particularmente nos transportadores de glicose dos tripanosomatídeos os resíduos QLT (glutamina-leucina-treonina) presentes na hélice 7 bem como as três argininas presentes nas alças entre as hélices 5/6, 8/9 e 10/11 (Tetaud *et al.*, 1996; Baldwin, 1993) são importantes para o reconhecimento do substrato (Gould & Holman, 1993).

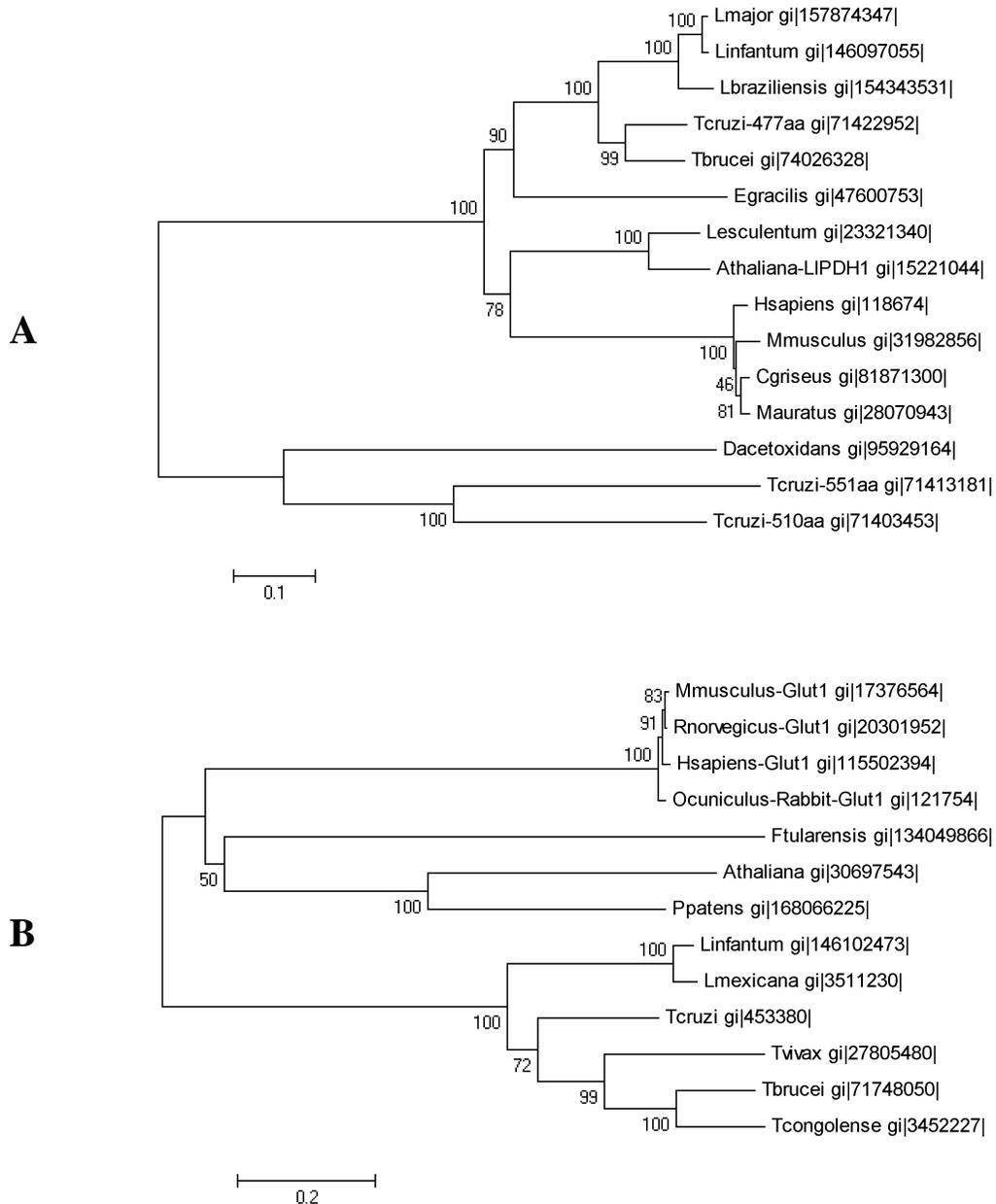
Outra característica peculiar que caracteriza esses transportadores está relacionada a existência de um arranjo conservado de cisteínas na alça que une os domínios transmembrana 1 e 2. Especula-se que este motivo deva possuir um papel importante na conformação de domínios extracelulares dessas proteínas contribuindo dessa maneira para a prevenção da clivagem por proteases presentes no trato intestinal do hospedeiro invertebrado e no sangue do hospedeiro vertebrado (Carrington & Boothroyd, 1996).

Para predição *in silico* dos domínios transmembrana das proteínas transportadoras de hexoses analisadas no presente estudo utilizamos o algoritmo TMHMM 2.0 (Krogh *et al.*, 2001). Os resultados das nossas análises com o referido programa revelaram a existência dos 12 domínios transmembrana para todas as proteínas analisadas e, complementarmente, pela anotação manual das mesmas identificamos a trinca de aminoácidos QLT na hélice transmembrana 7, as três argininas importantes para o reconhecimento do substrato e o arranjo conservado de cisteínas (Figura 3 do Anexo).

Similarmente à estratégia descrita anteriormente para a identificação sistemática de seqüências relacionadas às desidrogenases, foi construída uma matriz de Markov (HMM - *Hidden Markov Model*) para o grupo de seqüências de transportadores de hexose de *T. cruzi*. que foi utilizada para buscas por similaridade de seqüência global contra o banco de dados NR do NCBI.

As seqüências identificadas nesse banco de dados foram então utilizadas em análises de inferência filogenética visando explorar as interrelações entre os transportadores de hexoses de *T. cruzi* e de outros organismos.

Os resultados dessa análise estão apresentados na figura 22B e evidenciam o agrupamento dos transportadores de hexoses do *T. cruzi* em um mesmo clado com seqüências de outros tripanosomatídeos. Além disso, diferentemente da TcLipDH, o TcrHT1 possui muito pouca identidade (< 25%) com seqüências de plantas, bactérias e mamíferos.



**Figura 22:** Árvore filogenética construída com seqüências de lipoamida desidrogenases (A) ou transportadores de hexoses (B) de diferentes organismos. O modelo utilizado foi o NJ e a identificação das seqüências encontra-se após o nome específico.

## 6. 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). Para que novas drogas sejam propostas, é necessário conhecermos os possíveis alvos moleculares e as vias bioquímicas das quais eles participam. O estudo da expressão diferencial de genes de cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas é uma abordagem promissora para a seleção de novos alvos quimioterapêuticos nesse parasito.

Murta *et al.* (2008, *in press*), utilizando as metodologias para análise de expressão diferencial RDE e DD, identificaram vários genes diferencialmente expressos em uma população do parasito com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) quando comparado com seu par sensível (17WTS). Os genes que codificam a enzima **lipoamida desidrogenase** (*TcLipDH*) e a **proteína transportadora de hexoses** (*TcrHT1*) foram ambos detectados como diferencialmente expressos pela metodologia DD. Os dois genes seriam candidatos a alvos racionais para a quimioterapia, pois possuem baixa similaridade (< 50%) com seus homólogos no hospedeiro mamífero, permitindo a seleção de drogas que atuem especificamente no parasito sem interferir no metabolismo do hospedeiro. Além disso, a TcLipDH participa do metabolismo antioxidante do parasito podendo ser inibida e tem a capacidade de reduzir nitroheterocíclicos como o nifurtimox levando à ativação da droga e conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio. Já a proteína TcrHT1 pode ser inibida impedindo a entrada de nutrientes vitais para o parasito ou ainda pode servir como uma via de entrada para a droga (Joët & Krishna, 2004).

O objetivo deste projeto foi caracterizar os genes *TcLipDH* e *TcrHT1* em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol quanto: ao nível de mRNA, ao número de cópias, à localização cromossômica, ao nível de expressão das proteínas por eles codificadas e também quanto às informações sobre esses genes em diferentes bancos de dados de domínio público.

Na caracterização do gene que codifica a **enzima lipoamida desidrogenase** em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, inicialmente analisamos o nível de mRNA a fim de confirmar a expressão diferencial indicada por DD. Os resultados de *Northern blot* mostraram a presença de um transcrito de 2,4 Kb em todas as amostras de *T. cruzi* analisadas. Dados de densitometria utilizando o rRNA como controle quantitativo mostraram que este gene está igualmente expresso em todas as amostras de *T. cruzi* sensíveis e resistentes, à exceção da cepa 17LER que apresentou um nível 2 vezes maior quando comparada à 17WTS. Estes dados foram

confirmados por ensaios de RT-PCR Quantitativo em Tempo Real utilizando o gene constitutivo *TcHGPRT* como normalizador. Estes ensaios mostraram que o gene *TcLipDH* está 2,1 vezes mais expresso na cepa 17LER quando comparada à 17WTS. Também por essa metodologia, nenhuma diferença de expressão foi observada nas demais amostras de *T. cruzi* analisadas. Estes resultados confirmam os dados de expressão diferencial obtidos por DD e *Northern blot*.

Investigamos também a organização genômica do gene *TcLipDH* em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, além da presença de *pcolimorfismos* e de amplificação do gene. Para esse fim, realizamos ensaios de *Southern blot* de DNA genômico de formas epimastigotas digerido com enzimas de restrição. O produto dessas digestões hibridizado com a sonda específica para o gene *TcLipDH* marcada com  $\alpha[^{32}\text{P}]d\text{CTP}$  revelou fragmentos idênticos em tamanho para cada um dos pares de amostra sensível/resistente analisados. Observamos também um perfil compatível com a existência de dois alelos desse gene dispersos no genoma. Em relação à presença de amplificação, não houve diferença significativa de intensidade das bandas entre a cepa sensível e a resistente de um mesmo par, mostrando que este gene não está amplificado no genoma das cepas resistentes.

Neste estudo também foi avaliada a localização cromossômica do gene *TcLipDH* em cepas sensíveis e resistentes ao BZ. O *T. cruzi* possui alta plasticidade genômica com distinta organização dos genes visto que diferentes cópias do mesmo gene podem estar agrupadas em tandem ou ainda distribuídas em diferentes cromossomos (Frasch, 2000). Outra característica interessante é que cromossomos homólogos podem possuir tamanhos diferentes e ocorrer em diferentes números. Essa variação foi reportada não só entre cepas (Dvorak *et al.*, 1982), mas também entre clones obtidos a partir da mesma cepa mantida em cultura de laboratório (McDaniel & Dvorak, 1993; Branche *et al.*, 2006). Também foi observado que parasitos com resistência selecionada *in vitro* possuem cariótipo distinto da cepa parental (Murta *et al.*, 2006; Nozaki & Engel, 1996; Nourani *et al.*, 1996). Isto pode ser o resultado de ganhos ou perdas de fragmentos cromossômicos ocorridos durante a replicação e/ou recombinação cromossômicas (Vargas *et al.*, 2004).

Na localização cromossômica, a sonda específica para o gene *TcLipDH* marcada com  $\alpha[^{32}\text{P}]d\text{CTP}$  mostrou 4 bandas cromossômicas (1,1; 1,2; 1,45 e uma maior que 1,9 Mb) em todas as amostras de *T. cruzi* analisadas, independente do fenótipo de resistência a drogas ou zimodema. Era esperado que a sonda desenhada para todo o gene *TcLipDH* (1.434 pb) reconhecesse duas bandas cromossômicas, uma para cada alelo. Outras tentativas utilizando a

mesma sonda dos ensaios de *Northern* e *Southern blot* foram realizadas, mas sem sucesso e esta abordagem utilizando uma sonda para toda a sequência codificante do gene *TcLipDH* foi realizada em 2007 após busca por similaridade no banco de dados NT-NCBI. Até então não havia outras sequências de *T. cruzi* que apresentassem identidade com o gene estudado. A fim de explicar o resultado obtido para a localização cromossômica, refizemos o alinhamento do gene *TcLipDH* contra o banco de dados e observamos que em Abril de 2008 foram depositadas outras sequências que apresentam identidade acima de 80% com regiões de 20 e 40 pb do gene *TcLipDH*. Dentre essas estão algumas proteínas hipotéticas e uma MASP (número de acesso: XM\_816212.1). Tudo indica, então, que estas sequências impediram que fizéssemos a localização cromossômica correta do gene *TcLipDH* até o presente momento.

Quanto ao nível de expressão da proteína, embora tenha sido observado um aumento no nível do mRNA do gene *TcLipDH* na cepa resistente, 17LER, os ensaios de densitometria do *Western blot* mostraram que há uma redução de 2 vezes no nível de expressão da proteína TcLipDH nessa mesma cepa quando comparada à cepa sensível 17WTS. Este resultado mostra que esta ocorrendo uma regulação pos-transcricional deste gene no parasito resistente.

Em organismos que surgiram mais recentemente na linha evolutiva eucariota a transcrição é monocistrônica, ou seja, os genes são transcritos individualmente em pré-mRNAs que passam por um processo de maturação chamado *cis-splicing*, no qual os introns são retirados e os exons são unidos entre si. O mRNA maduro recebe uma guanina metilada (“*cap*”) na extremidade 5’ e a cauda *poli-A* na extremidade 3’. Os membros da família *Trypanosomatidae*, primitivos na linha evolutiva eucariota, não possuem introns e, portanto, não realizam *cis-splicing*. Nesses organismos a transcrição é *poli*cistrônica, ou seja, vários genes estão presentes em um mesmo pré-mRNA e a edição em mRNAs maduros se dá por um mecanismo conhecido como *trans-splicing*, no qual as unidades de mRNA são separadas, em seguida recebem na extremidade 5’ uma sequência de 39 nucleotídeos (mini-éxon ou *spliced leader*) e a cauda *poli-A* na extremidade 3’ (revisado por Teixeira, 1998).

Enquanto em organismos que realizam *cis-splicing*, a regulação gênica é primordialmente transcricional (proteínas que se ligam ao DNA aumentando ou inibindo a transcrição de um gene), em organismos cuja transcrição é *poli*cistrônica os principais fatores de regulação são pós-transcricionais e envolvem a eficiência de *trans-splicing* (Nozaki & Cross, 1995), a estabilidade do mRNA (Hotz *et al.*, 1995) e a taxa de degradação do mRNA (Albuin *et al.*, 1999). Portanto, é possível que, apesar do nível de transcritos do gene *TcLipDH* estar aumentado na cepa

17LER quando comparada a seu par sensível, que haja algum fator de regulação pós-transcricional influenciando o nível de expressão final da proteína na presença da droga.

Recentemente, Wilkinson *et al.* (2008) identificaram em *T. cruzi* a seqüência de uma nitroredutase putativa similar a seqüências de NTR tipo I de bactérias. As NTR tipo I são insensíveis ao oxigênio e usam FMN (flavina mononucleotídeo) como cofator. Elas possuem um papel conhecido na ativação de nitroheterocíclicos através da redução da droga por dois elétrons e conseqüente geração de radicais tóxicos que danificam o DNA do patógeno. Wilkinson observou que a transfecção de células epimastigotas de *T. cruzi* com o gene TcNTR desencadeia a diminuição da resistência dos parasitos a drogas devido à sua capacidade de ativá-las. Em contrapartida, a deleção de um dos alelos desse gene levou a um aumento da resistência em 2,5 vezes ao nifurtimox e em 5 vezes ao benzonidazol. Outra NTR tipo I encontrada em *T. cruzi* é a TcOYE (*T. cruzi* Old Yellow Enzyme). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo mostraram que esta enzima também está menos expressa na população resistente 17LER (Murta *et al.*, 2006).

Além das NTR do tipo I existem as NTR do tipo II que são sensíveis ao oxigênio, utilizam FAD (flavina adenina dinucleotídeo) ou FMN como cofator e que são capazes de ativar os nitroheterocíclicos através da redução da droga em um elétron. Na presença de oxigênio, a droga reduzida é metabcolizada pela SOD (super óxido dismutase) produzindo peróxido de hidrogênio e ânion superóxido que danificam as macromoléculas do parasito (Docampo *et al.*, 1981). A TcLipDH estudada neste projeto é uma nitroredutase do tipo II (Blumenstiel *et al.*, 1999, Salmon-Chemin *et al.*, 2001). Sreider *et al.* (1992) e Blumenstiel *et al.*, (1999) mostraram que a enzima TcLipDH participa no metabcolismo do NFX, reduzindo o grupo nitro da droga e gerando espécies reativas de oxigênio. Viodé *et al.* (1999) observaram que o megazol, um nitroimidazol, também pode ser reduzido por esta enzima.

Dentre as cepas estudadas neste projeto, a cepa 17LER é a única que apresenta resistência induzida *in vitro* ao BZ e é a única cultivada na presença da droga; condição indispensável para manutenção do fenótipo de resistência. Levando em consideração os resultados de Wilkinson *et al.* (2008) e a capacidade da LipDH de reduzir nitrocompostos, acreditamos então, que a TcLipDH possa estar participando da ativação do BZ tornando-o tóxico para os parasitos sensíveis. Contrariamente, parasitos resistentes, na presença da droga teriam sua sobrevivência favorecida pela produção de níveis menores desta enzima. Entretanto estudos de transfecção e

deleção do gene *TcLipDH* deverão ser realizados para comprovar o envolvimento desta enzima no fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas.

Neste estudo também foram realizadas análises de bioinformática a fim de comparar as informações sobre o gene *TcLipDH* (1.434 pb) (número de acesso: X89112) disponíveis em diferentes bancos de dados de domínio público.

Inicialmente fizemos uma busca por similaridade desta sequência contra o banco de dados genômico de *T. cruzi* (número de acesso do projeto: AAHK00000000) (El-Sayed *et al.*, 2005). Nestas análises observamos a existência da sequência completa e anotada do gene em dois *contigs*. Esses dados estão de acordo com o que foi observado na literatura. Schöneck *et al.* (1997), utilizando cDNA de *TcLipDH* marcado com digoxigenina identificaram somente 2 clones em uma biblioteca genômica mostrando que o gene *TcLipDH* não faz parte das famílias de genes multicópias presentes no genoma de *T. cruzi* e que possui somente dois alelos.

Complementarmente à busca por similaridade no banco de dados genômico do *T. cruzi*, as sequências de lipoamida desidrogenases foram analisadas no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>) utilizando a ferramenta de busca booleana no website do banco de dados. Nesta busca foram identificados quatro genes anotados como lipoamida desidrogenases que são distintos daquele de 1.434 pb descrito na literatura por Lohrer & Krauth-Siegel (1990) e Krauth-Siegel & Schoneck (1997). Dois desses genes possuem 1.530 pb e dois possuem 1.653 pb e codificam proteínas com identidade inferior a 30% quando comparadas à sequência de 1.434 pb.

Em seguida, a fim de entender estes resultados foram realizados estudos de caracterização computacional dos domínios presentes em cada uma dessas sequências.

As LipDH participam do complexo piruvato desidrogenase que é responsável pela produção de acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico. Este complexo é formado por 3 enzimas: a piruvato desidrogenase (E1), a lipoamide transacilase (E2) e a lipoamida desidrogenase (E3). Resumidamente, o composto hidroxietil-tpp (hidroxietil tiamina-pirofosfato) se liga ao sítio ativo da enzima E1. Simultaneamente, a coenzima lipoamida se liga à enzima E2. A enzima E1 transfere o grupo acetil para a lipoamida formando acetil-lipoamida e a enzima E2 transfere esse mesmo acetil para Coenzima A, formando acetil-CoA e lipoamida reduzida (dihidrolipoamida). A dihidrolipoamida é transferida para a enzima E3 onde é oxidada a lipoamida por FAD. O FADH<sub>2</sub> formado é reduzido pela ligação de NAD<sup>+</sup> ao sítio ativo da enzima E3 restaurando o FAD e permitindo que a lipoamida seja liberada para uma nova reação.

O sítio ativo da enzima lipoamida desidrogenase (E3) é caracterizado pela expressão **G - G - x - C - [LIVA] - x(2) - G - C - [LIVM] - P** que representa o sítio de ligação de NADH. Além disso, as duas cisteínas participam da transferência de elétrons da dihidrolipoamida para o FAD. Utilizando um script Perl para buscas sistemáticas contra sequências protéicas encontramos essa expressão apenas nas sequências de 477 aminoácidos descritas na literatura e não nas sequências de 510 ou de 551 aminoácidos. Apesar da ausência do sítio ativo conhecido, pudemos classificar estas sequências como pertencentes à família das FAD-dissulfeto oxidoreduases utilizando o banco de dados de domínios Pfam.

Alguns organismos, como a bactéria *Pseudomonas putida*, possuem 2 isoformas da enzima lipoamida desidrogenase. Quando essa bactéria é crescida em meio rico em glicose, somente a Lpd-Glu (abreviação para lipoamida-glicose) é expressa, porém, na presença de valina são expressas a Lpd-Glu (56 kDa) e a Lpd-Val (49 kDa). A primeira participa dos complexos piruvato desidrogenase e 2-oxoácido desidrogenase, responsáveis pelo metabolismo de carboidratos, e a segunda participa do complexo cetoácido desidrogenase, responsável pelo metabolismo de valina, leucina e isoleucina (Roberts & Sokatch, 1978). Essas enzimas possuem identidade inferior a 48% entre si (Burns *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1991).

Até o momento somente uma LipDH foi descrita para tripanosomatídeos, mas devido à existência de outras isoformas dessa enzima em plantas e bactérias, avaliamos a relação existente entre aquelas sequências anotadas no GeneDB e na literatura com as LipDH de outros organismos. Para isso, realizamos uma busca por similaridade contra o banco de dados NR do NCBI e fizemos seleção das sequências correlacionadas para inferência filogenética. Em nossas análises observamos que a sequência não-putativa de LipDH de *T. cruzi* de 477 aminoácidos está agrupada à sequência de *T. brucei* em um *cluster* próximo às sequências de *Leishmania sp.* A identidade média entre essas sequências é de 75%. Curiosamente, a TcLipDH de 477 aminoácidos também encontra-se próxima à sequência de *Euglena gracilis* (60% de identidade) e das plantas *Arabidopsis thaliana* e *Lycopersicon esculentum* (58% de identidade).

Em 2003, Hannaert *et al.* reportaram a existência em tripanosomatídeos de várias sequências similares a sequências de cianobactérias e plantas. Há um grande número de genes que parecem ser o resultado de transferência lateral entre ancestrais de tripanosomatídeos e cianobactérias, cloroplastos de plantas ou de bactérias fotossintetizantes e bactérias anaeróbias que viviam no intestino médio do hospedeiro (Oppenoes & Michels, 2007). Os genes que codificam a fosfofrutocinase dependente de ATP de tripanosomatídeos estão relacionados a

bactérias anaeróbias. Já a gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) está relacionada a cianobactérias. Além disso, os tripanosomatídeos possuem uma fosfoglicerato mutase independente de cofator que também é encontrada em plantas.

*T. cruzi* e *L. major* possuem uma ribulocinase e uma galactocinase enquanto que uma xilulocinase está presente apenas em *L. major*. *Leishmania* sp. Também possuem uma sucrase e uma  $\beta$ -frutosidase responsáveis pela quebra de dissacarídeos. *T. brucei* não possui nenhuma dessas enzimas. Ribulocinase e xilulocinase possuem um percentual alto de identidade (50%-60%) quando comparadas às mesmas enzimas de bactérias. Outros homólogos não foram encontrados em eucariotos, o que sugere que é provável que esses genes de metabolismo de açúcar tenham sido originados de bactérias (Opperdoes & Michels, 2007).

Estes eventos de transferência lateral explicam a alta identidade da sequência de TcLipDH com sequências da alga *Euglena gracilis* e de plantas.

Quanto às sequências de 510 e 551 aminoácidos, observamos que elas estão distantes da sequência de LipDH de tripanomatídeos, mas agrupadas à LipDH de bactérias. A anotação do genoma de *T. cruzi* é um procedimento automático realizado pela busca por similaridade com sequências depositadas em outros bancos de dados. Este tipo de anotação está sujeito a erros e seriam necessários dados experimentais para comprovar se as sequências de 510 e 551 aminoácidos codificam lipoamida desidrogenases ou outras proteínas funcionais no *T. cruzi*. A elucidação da função de sequências putativas pode contribuir muito para o conhecimento da evolução, bioquímica e resistência a drogas do parasito. A TcNTR estudada por Wilkinson *et al.* (2008), por exemplo, era uma sequência putativa sem similaridade com outras sequências de tripanosomatídeos, mas similar a sequências de bactérias.

A árvore filogenética gerada mostra também que há baixa identidade (~50%) entre as sequências de LipDH de mamíferos e tripanosomatídeos. Um dos pré-requisitos para a seleção de um bom alvo para a quimioterapia de doenças parasitárias é que o alvo seja distinto de seu homólogo no hospedeiro mamífero. É possível então que a TcLipDH de 477 aminoácidos seja um alvo para drogas específicas para o parasito e que não irão interferir no metabolismo do hospedeiro mamífero. A alta identidade entre as LipDH de tripanosomatídeos ainda mostra que uma droga que atue contra *T. cruzi* poderia também ter atividade contra *T. brucei* e *Leishmania* sp.

A inexistência de registros fósseis contribui para que a evolução do Filo Protozoa seja ainda uma questão para especulações. Entretanto, avanços em biologia molecular e

enriquecimento dos bancos de dados e análises filogeéticas contribuem cada vez mais para que a história escrita nos genes seja interpretada. Estudos de filogenia são importantes não só para a elucidação da origem das espécies, mas também para uma melhor compreensão da biologia dos organismos e, conseqüentemente, para a escolha de melhores estratégias de profilaxia ou de tratamento de uma doença parasitária.

Em nossas inferências filegenéticas observamos que a árvore construída com sequências de LipDH corrobora a teoria monofilética para o gênero *Trypanosoma*.

Os principais estudos de filogenia de tripanosomatídeos foram fundamentados na seqüência do rRNA 18S. Estes estudos inicialmente incluíam somente sequencias de *T. cruzi* e *T. brucei* e indicavam que o gênero *Trypanosoma* era parafilético, ou seja, este gênero estava incluído em um grupo cujo ancestral comum mais recente não era exclusivo do gênero *Trypanosoma*, mas era o mesmo ancestral dos gêneros *Leptomonas*, *Crithidia* e *Phytomonas* (revisado por Stevens & Gibson, 1999). Aumentando-se o número de espécies de tripanosomatídeos para 11 estabeleceu que este gênero devia ser monofilético. Posteriormente, após maior enriquecimento dos bancos de dados, foi construída uma árvore com 47 espécies de *Trypanosoma* que também determinou que o gênero é monofilético (revisado por Stevens & Gibson, 1999), pelo menos para o gene rRNA 18S. Em um estudo mais complexo, Hughes & Piontkivska (2003) fizeram análise filogenética para 42 famílias de proteínas de membros da família Trypanosomatidae (gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*) utilizando os modelos evolutivos de análise de distância, máxima parsimônia e máxima verossimilhança. Assim como os últimos resultados de filogenia alcançados com análise da subunidade 18S do rRNA, 69% dessas famílias (29/42) apontaram, nos três modelos evolutivos, que o gênero *Trypanosoma* é monofilético, ou seja, a análise da seqüência agrupa *T. cruzi* e *T. brucei* em um *cluster* cujo ancestral comum mais recente é diferente daquele do gênero *Leishmania*.

Para a caracterização do gene que codifica a **proteína transportadora de hexoses** em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, foram utilizados, inicialmente, ensaios de *Northern blot* para confirmar os resultados de DD. Utilizando uma sonda específica para o gene *TcrHT1*, observamos a presença de um transcrito de 2,6 Kb nas populações 17WTS e 17LER, pertencentes ao Zimodema 1 e grupo *T. cruzi* I e dois transcritos, um de 1,9 e outro de 2,6 Kb, nas populações BZS e BZR, pertencentes ao Zimodema 2 e grupo *T. cruzi* II. Os dados de densitometria utilizando o rRNA como controle quantitativo mostraram que o gene *TcrHT1* está 2 vezes mais expresso na população 17LER quando comparada a seu par sensível, 17WTS.

Nenhuma diferença significativa foi observada no par BZS/BZR. A diferença de expressão no par 17WTS/17LER foi confirmada por RT-PCR Quantitativo em Tempo Real utilizando o gene *TcHGPRT* como normalizador. Estes ensaios mostraram que o gene *TcrHT1* está 2,6 vezes mais expresso na cepa resistente 17LER quando comparada ao seu par sensível. Também por essa metodologia, nenhuma diferença significativa foi observada em outras cepas do *T. cruzi* analisadas. Estes resultados confirmam os dados de expressão diferencial obtidos por DD e *Northern blot*.

Tetaud *et al.* (1994) também detectou dois transcritos de tamanhos 2,1 e 2,6 Kb na cepa CL de *T. cruzi*. De acordo com os autores, esses dois transcritos codificam a mesma proteína, porém a diferença de tamanho é decorrente de variações das seqüências da 3'UTR (região 3' não-traduzida). Isso foi observado após PCR com iniciadores que anelam em regiões intergênicas de diferentes repetições, amplificando assim somente a região 3'UTR. As regiões 3'UTR são importantes para a regulação gênica. Teixeira *et al.* (1995) fizeram um ensaio de transfecção transiente utilizando um plasmídeo que continha a região 3'UTR (630 pb) do gene de amastina de *T. cruzi* fusionada ao gene que codifica a enzima luciferase. Os autores observaram uma diminuição de 5 vezes na atividade da enzima bioluminescente nas formas epimastigotas e um aumento de 7 vezes nas formas amastigotas. Nozaki *et al.* (1995) em um ensaio similar, porém utilizando a região 3'UTR do gene que codifica a gliceraldeído 1-fosfato desidrogenase do *T. cruzi*, observaram um aumento de 6 a 14 vezes na atividade da luciferase nas formas epimastigotas. Esses trabalhos mostram que seqüências específicas na região 3'UTR são capazes de regular a expressão gênica, pois permitem a interação com fatores capazes de estimular ou inibir a expressão gênica, dependendo do estágio de desenvolvimento do parasito.

A região 3' UTR é importante para a regulação da transcrição de transportadores hexoses em *T. brucei*. Este parasito possui duas isoformas desses transportadores, sendo uma chamada THT1 e mais adaptada ao meio rico em glicose (como o sangue do hospedeiro) e outra chamada THT2 e mais adaptada ao meio pobre em glicose (como interior da célula ou intestino do inseto vetor). O THT1 é mais expresso na forma do *T. brucei* presente no hospedeiro e é um transportador de baixa afinidade, mas com alta eficiência devido à alta disponibilidade de glicose. Já o THT2 é mais expresso nas formas presentes no inseto vetor e é um transportador de alta afinidade, mas com baixa eficiência, devido à baixa disponibilidade de glicose. Hotz *et al.*, (1995) realizaram ensaios de transfecção de plasmídeos contendo a região 3'UTR do gene THT1 ou THT2 fusionada à seqüência de actina em diferentes estágios de vida do parasito *T. brucei*.

Foi observado que a região 3'UTR do THT2 estimulou a transcrição de actina na forma procíclica do parasito (que fica no intestino médio do inseto vetor), mas inibiu essa expressão na forma sanguínea.

Estudos realizados por Tetaud *et al.* (1994) utilizando a cepa CL de *T. cruzi* indicam que esse parasito possui somente uma isoforma do gene *TcrHTI* e que o nível de transcrição desse gene não varia da forma epimastigota para a tripomastigota, embora haja variação dos níveis de glicose do meio. De acordo com Barrett *et al.* (1998), isso acontece porque o período em que o *T. cruzi* fica em meio pobre em glicose é menor quando comparado ao *T. brucei*, pois o repasto sanguíneo de triatomíneos é mais freqüente do que o de moscas tse-tsé. Sendo assim, não é necessária a presença de um outro transportador de maior afinidade.

Além do nível de expressão, investigamos também a organização genômica do gene *TcrHTI* em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, além da presença de *pcolimorfismos* e de amplificação do gene. Para esse fim, realizamos ensaios de *Southern blot* de DNA genômico de formas epimastigotas digerido com diferentes enzimas de restrição. O produto dessas digestões hibridizado com a sonda específica para o gene marcada com  $\alpha[^{32}\text{P}]d\text{CTP}$ , revelou um perfil de organização em tandem. Esse mesmo resultado foi mostrado por Tetaud *et al.*, (1996) utilizando digestão parcial com a enzima *EcoRV*. Também nos resultados de *Southern blot* observamos bandas idênticas em tamanho e intensidade para cada um dos pares sensível/resistente de cepas do *T. cruzi*, mostrando que o gene não está amplificado no genoma das cepas resistentes. Quanto ao *pcolimorfismo* detectado observamos que não houve variação entre as cepas sensíveis e resistentes, e sim entre cepas de diferentes zimodemas (zimodema 1 e zimodema 2) ou grupos de *T. cruzi* (grupo I ou grupo II). Concluimos então, que o *pcolimorfismo* no gene *TcrHTI* detectado com a enzima *EcoRI* está relacionado ao zimodema e não ao fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas.

Na localização cromossômica observamos que o gene *TcrHTI* está localizado em dois cromossomos em todas as cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes analisadas. As bandas encontradas foram de 1,85 e 2,02 Mb nas populações do zimodema Z1 e grupo *T. cruzi* I (17WTS/17LER e Yuyu) e de 1,94 e 2,21 Mb nas populações do zimodema Z2 e grupo *T. cruzi* II (BZS/BZR e clones 9S/27R). A cepa SC-28, embora também pertencente ao zimodema Z1 e grupo *T. cruzi* I, apresentou outro perfil com bandas de 1,9 e 2,6 Mb. A julgar pela intensidade das bandas, o número de cópias do gene *TcrHTI* é o mesmo em ambos os cromossomos de uma mesma cepa. Concluimos, portanto, que a localização cromossômica do gene *TcrHTI* não está

relacionada com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas, e sim com o zimodema da cepa analisada.

Quanto ao nível de expressão da proteína TcrHT1, embora um ensaio de *Western blot* não tenha sido realizado, buscamos mensurar a atividade desse transportador padronizando um ensaio de captação de 6-deoxi-D-[6-<sup>3</sup>H]glicose nas diferentes cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Neste ensaio não foi observada diferença significativa no transporte de glicose entre os pares de cepas sensível e resistente BZS/BZR e CL/Colombiana. Entretanto, foi observada uma diminuição de aproximadamente 40% na taxa de glicose transportada pela cepa 17LER quando comparada a seu par sensível, 17WTS. Análises estatísticas utilizando o teste não-paramétrico ANOVA de dois fatores mostraram que esses valores são significativos.

A diminuição da atividade de transportadores pode estar relacionada com o fenótipo de resistência a drogas. Nourani *et al.* (1997), mostraram que a levedura *S. cerevisiae* nocaute para transportadores do tipo ABC (*ATP Binding Casstte*) mantinham, inesperadamente, o fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Os transportadores do tipo ABC são conhecidos por conferir resistência a múltiplas drogas em vários microrganismos (revisado por Ouellette, 2001). Nourani observou uma diminuição da expressão dos transportadores de hexoses HTX11 e HTX9 nas leveduras nocaute e mostrou que, quando transfectadas com o gene HXT11, as células apresentavam maior susceptibilidade a drogas. Nesse caso, os transportadores HXT11 e HXT9 devem funcionar como via de entrada para a droga. Na presença de transportadores ABC, a droga que entra pelos transportadores de hexoses é expulsa ativamente. Na ausência de transportadores ABC, portanto, leveduras com menor expressão dos transportadores de hexoses têm sua sobrevivência favorecida na presença da droga.

Uzkategui *et al.* (2005) também observaram uma diminuição de 80% no transporte de glicose de uma cepa de *Leishmania amazonensis* resistente a glibenclamida na fase exponencial do crescimento. A glibenclamida é um inibidor de transportadores ABC. A diminuição da expressão do transportador de hexoses nessa cepa estaria associada a alguma alteração metabólica devido à pressão da droga. Essa alteração provavelmente seria em favor da limitação da produção de metabólitos tóxicos pela glicólise.

Os tripanosomatídeos são organismos com grande flexibilidade metabólica e capazes de se adaptar a vários ambientes. Como já foi explicitado, a cepa 17LER é cultivada na presença da droga. É possível especular que, como mostrado para o gênero *Leishmania*, o *T. cruzi* esteja modulando a captação de glicose em resposta à pressão da droga. Embora em pequenas

quantidades, a respiração aeróbica também gera espécies reativas oxigênio além de compostos tóxicos como gás carbônico, glicerol e metilglioxalato. Portanto, uma diminuição da atividade do transportador na presença da droga contribuiria, bem como a diminuição nos níveis de TcLipDH, para a sobrevivência dos parasitos.

A busca por similaridade da sequência do gene *TcrHT1* contra uma cópia local do banco de dados genômico de *T. cruzi* mostrou que na coleção de 32.746 *contigs* existem 31 *contigs* distintos contendo cópias inteiras ou parciais, anotadas ou não anotadas deste gene. Nesses *contigs* foram encontradas 4 cópias completas e outras 29 sequências com tamanhos entre 190 e 1.186 pb que possuem alta identidade quando comparadas à sequência referência (U05588) do gene *TcrHT1*. No processo de re-anotação manual observamos que, salvo as cópias inteiras do gene *TcrHT1*, somente 14% dessas cópias incompletas estão anotadas. Especulamos que as cópias incompletas do gene estejam truncadas devido à sua localização e/ou ao tamanho do *contig*.

Tetaud *et al.* (1994) determinou por digestão parcial do DNA genômico que o gene *TcrHT1* apresenta pelo menos 8 cópias. Arner *et al.* (2007) mostraram que, devido ao colapso de sequências idênticas, nem todas as cópias dos genes repetitivos foram incluídos na montagem final do genoma de *T. cruzi*. Para corrigir o número de repetições presentes no banco de dados, Arner *et al.* (2007), desenvolveram uma abordagem *in silico* de alinhamento múltiplo contra todas as sequências geradas pelo projeto genoma, inclusive *contigs* que não foram incluídos na montagem por serem muito pequenos e considerados fragmentados demais para serem usados. De acordo com Arner, o gene *TcrHT1* possui 35 cópias, um resultado muito próximo ao encontrado em nossas análises.

Os resultados das buscas executadas no GeneDB confirmaram os dados encontrados pelo alinhamento da sequência referência contra o banco de dados do *T. cruzi*. Em ambas as análises foram encontradas 4 sequências que possuem o mesmo tamanho (544 aminoácidos) e identidade superior a 97% entre si.

A árvore filogenética construída por alinhamento global entre diferentes sequências de transportadores de hexoses mostra que a sequência do *T. cruzi* está incluída em um grupo de sequências de outros *Trypanosoma* sp. e próximo a um grupo de sequências de *Leishmania*. A identidade entre essas sequências é inferior a 60%. Além disso, observamos que o *TcrHT1* é distante das sequências de plantas, bem como de mamíferos e bactérias, havendo somente 25% de identidade entre elas. Este resultado reforça o uso dessa proteína como um bom alvo para a quimioterapia contra a doença de Chagas, entretanto, a identidade entre as sequências de

tripanosomatídeos não é alta e uma droga que atue contra o *T. cruzi* pode não funcionar para *T. brucei* ou *Leishmania sp.*

Também como foi observado para a TcLipDH e para 69% das 42 famílias de proteínas estudadas por Hughes & Piontkivska (2003), a árvore dos transportadores de hexoses corrobora a teoria monofilética do gênero *Trypanosoma*.

## 7. CONCLUSÃO

▪ Análises de *Northern Blot* com sondas específicas mostraram a presença de um transcrito de 2,4 kb do gene *TcLipDH* em todas as amostras de *T. cruzi* analisadas. Para o gene *TcrHT1* foi observado um transcrito de 1,6 Kb para as amostras do grupo *T. cruzi* I (Zimodema 1) e dois transcritos, um de 1,9 Kb e outro de 2,6 Kb, para as amostras do grupo *T. cruzi* II (Zimodema 2). Dados de densitometria dos ensaios de *Northern blot* utilizando o rRNA como controle quantitativo e resultados de RT-qPCR utilizando o gene *TcHGPRT* como normalizador confirmaram os resultados de DD encontrados por Murta *et al.* (2008, *in press*) e mostraram que ambos os genes *TcLipDH* e *TcrHT1* estão mais expressos na cepa 17LER quando comparada à cepa 17WTS. Nenhuma diferença foi observada nas demais amostras de *T. cruzi* analisadas.

▪ Ensaios de *Southern blot* confirmaram a presença de duas cópias do gene *TcLipDH* e do arranjo em tandem do gene *TcrHT1* no genoma do parasito. Vimos também estes genes não estão amplificados no genoma das cepas resistentes e que o *pcolimorfismo* detectado na sequência do gene *TcrHT1* não está relacionado ao fenótipo de resistência ao BZ e sim ao zimodema ou grupo ao qual a cepa do *T. cruzi* analisada pertence.

▪ Ensaios de localização cromossômica mostraram que o gene *TcrHT1* está localizado em 2 cromossomos em todas as amostras analisadas. Esta localização não está relacionada com a resistência. A localização cromossômica do gene *TcLipDH* foi inconclusiva.

▪ Os dados de *Western blot* mostraram que a enzima TcLipDH está 2 vezes menos expressa na cepa 17LER quando comparada à 17WTS. Também observamos uma diminuição de 40% na eficiência de transporte da proteína TcrHT1 nessa mesma cepa resistente quando comparada à sensível. Em ambos os ensaios nenhuma diferença foi observada para as demais amostras analisadas.

▪ Análises de bioinformática mostraram que somente 2 cópias do gene *TcLipDH* podem ser encontradas no genoma do *T. cruzi* contra 33 cópias completas e incompletas do gene *TcrHT1*. Também foi observado que existem outras sequências anotadas no genoma como lipoamida desidrogenases de *T. cruzi*, entretanto, estas sequências não estão descritas na literatura.

▪ As árvores filogenéticas construídas com sequências de lipoamida desidrogenases ou de transportadores de hexoses de tripanosomatídeos e outros organismos favorecem a teoria de que o gênero *Trypanosoma* é monofilético. As árvores também mostram que ambos os genes são bons

Um estudo mais amplo e aprofundado dos genes diferencialmente expressos entre as cepas sensíveis e resistentes do *T. cruzi* pode contribuir para a descoberta de novos alvos terapêuticos na doença de Chagas. As diferenças estruturais entre a lipoamida desidrogenase e o transportador de hexoses do *T. cruzi* e do hospedeiro mamífero podem facilitar o desenho de drogas específicas para o parasito e que não interfiram no metabolismo do hospedeiro. A TcLipDH como alvo terapêutico poderia ser utilizada para a produção de espécies reativas de oxigênio devido à sua capacidade de reduzir compostos nitrogenados. Já o TcrHT como alvo terapêutico poderia ser uma via de entrada para a droga ou poderia ser bloqueado impedindo a captação de nutrientes essenciais para a sobrevivência do parasito. A diminuição no influxo de hexoses pode também diminuir a capacidade de infecção do parasito, pois elas são essenciais para a biossíntese de glicoconjugados expressos ou secretados na membrana de tripanosomatídeos. Esses glicoconjugados estão diretamente relacionados com a virulência e capacidade de evasão do sistema imune.

Os resultados deste projeto de caracterização dos genes *TcLipDH* e *TcrHT1* se somarão a estudos de outros genes que estamos realizando em nosso laboratório para o entendimento do mecanismo de resistência do *T. cruzi* a drogas e a descoberta de novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas.

## **8. PERSPECTIVAS**

A fim confirmar o envolvimento da enzima TcLipDH e da proteína TcrHT1 com o fenotipo de resistência do *T. cruzi* a drogas, futuramente serão realizados experimentos de transfecção destes genes em cepas do parasito sensíveis e/ou resistentes a drogas. O fenótipo de susceptibilidade ao BZ dos parasitos que superexpressam estes genes será analisado e comparado aos seus respectivos controles.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.94 Suppl 1, p.429-32. 1999.

Adam, R. D., Y. M. Yang, *et al.* The cysteine-rich protein gene family of *Giardia lamblia*: loss of the CRP170 gene in an antigenic variant. Mol Cell Biol, v.12, n.3, Mar, p.1194-201. 1992.

Altschul, S. F., T. L. Madden, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.

Andrade, S. G., A. Rassi, *et al.* Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.86, n.6, Nov-Dec, p.624-6. 1992.

Arner, E., E. Kindlund, *et al.* Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20,000 additional gene variants. BMC Genomics, v.8, p.391. 2007.

Bakker, B. M., H. V. Westerhoff, *et al.* Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. Mol Biochem Parasitol, v.106, n.1, Feb 25, p.1-10. 2000.

Baldwin, S. A. Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. Biochim Biophys Acta, v.1154, n.1, Jun 8, p.17-49. 1993.

Barker, K. S., S. Crisp, *et al.* 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, v.54, n.2, Aug, p.376-85. 2004.

Barrett, M. P., E. Tetaud, *et al.* Trypanosome glucose transporters. Mol Biochem Parasitol, v.91, n.1, Mar 1, p.195-205. 1998.

Bethke, L., S. Thomas, *et al.* The role of DNA mismatch repair in generating genetic diversity and drug resistance in malaria parasites. Mol Biochem Parasitol, v.155, n.1, Sep, p.18-25. 2007.

Blumenstiel, K., R. Schoneck, *et al.* Nitrofurán drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. Biochem Pharmacol, v.58, n.11, Dec 1, p.1791-9. 1999.

Branche, C., S. Ochaya, *et al.* Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, v.147, n.1, May, p.30-8. 2006.

Brener, Z., C. A. Costa, *et al.* Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.18, n.6, Nov-Dec, p.450-5. 1976.

Brener, Z., Z. Andrade, M Barral-Neto (eds.). 2.<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ed., 2000.

Bringaud, F. e T. Baltz. A potential hexose transporter gene expressed predominantly in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, v.52, n.1, May, p.111-21. 1992.

Brisse, S., C. Barnabe, *et al.* Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol, v.30, n.1, Jan, p.35-44. 2000.

Burns, G., P. J. Sykes, *et al.* Isolation of a third lipoamide dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. J Bacteriol, v.171, n.2, Feb, p.665-8. 1989.

Camargo, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.12, May-Jun, p.93-100. 1964.

Cancado, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.44, n.1, Jan-Feb, p.29-37. 2002.

Cano, M. I., A. Gruber, *et al.* Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. Mol Biochem Parasitol, v.71, n.2, May, p.273-8. 1995.

Carrington, M. e J. Boothroyd. Implications of conserved structural motifs in disparate trypanosome surface proteins. Mol Biochem Parasitol, v.81, n.2, Oct 30, p.119-26. 1996.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <http://www.cdc.gov>. Acesso em Março de 2008.

Church, G. M. e W. Gilbert. Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.7, Apr, p.1991-5. 1984.

Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res, v.16, n.22, Nov 25, p.10881-90. 1988.

Coura, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.102 Suppl 1, Oct 30, p.113-22. 2007.

Cowman, A. F., M. J. Morry, *et al.* Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.23, Dec, p.9109-13. 1988.

Dias, J. C. Control of Chagas disease in Brazil. Parasitol Today, v.3, n.11, Nov, p.336-41. 1987.

Dictionary of Medical Biography. KROPF, Simone ; HOCHMAN, G. . Carlos Chagas (entry). In: W. F. Bynum; Helen Bynum. (Org.). 1 ed. Westport, CT: Greenwood Press, 2007, v. 1, p. 320-325.

Desiase Control Priority Projects – [www.dcpp2.org](http://www.dcpp2.org). Acesso em Abril de 2008.

Docampo, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des, v.7, n.12, Aug, p.1157-64. 2001.

Dos Santos, W. G. e G. A. Buck. Polymorphisms at the topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. J Eukaryot Microbiol, v.46, n.1, Jan-Feb, p.17-23. 1999.

Dumon-Seignovert, L., G. Cariot, *et al.* The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). Protein Expr Purif, v.37, n.1, Sep, p.203-6. 2004.

Eisenthal, R., S. Game, *et al.* Specificity and kinetics of hexose transport in *Trypanosoma brucei*. Biochim Biophys Acta, v.985, n.1, Oct 2, p.81-9. 1989.

Ellenberger, T. E. e S. M. Beverley. Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *Leishmania major* are independent of R or H region amplification. J Biol Chem, v.262, n.28, Oct 5, p.13501-6. 1987.

Ellenberger, T. E. e S. M. Beverley. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. J Biol Chem, v.264, n.25, Sep 5, p.15094-103. 1989.

El-Sayed, N. M., P. J. Myler, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science, v.309, n.5733, Jul 15, p.409-15. 2005.

Else, A. J., J. F. Clarke, *et al.* Dihydrocolipoamide dehydrogenase in the *Trypanosoma* subgenus, trypanozoon. Mol Biochem Parasitol, v.64, n.2, Apr, p.233-9. 1994.

Else, A. J., D. W. Hough, *et al.* Cloning, sequencing, and expression of *Trypanosoma brucei* dihydrocolipoamide dehydrogenase. Eur J Biochem, v.212, n.2, Mar 1, p.423-9. 1993.

- Elstrom, R. L., D. E. Bauer, *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. Cancer Res, v.64, n.11, Jun 1, p.3892-9. 2004.
- Feinberg, A. P. e B. Vogelstein. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem, v.132, n.1, Jul 1, p.6-13. 1983.
- Fernandes, A. J., L. Diotaiuti, *et al.* [Relationships between *Trypanosoma cruzi* transmission cycles in the county of Bambui, Minas Gerais, Brazil]. Cad Saude Publica, v.10, n.4, Dec, p.473-80. 1994.
- Filardi, L. S. e Z. Brener. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.81, n.5, p.755-9. 1987.
- Finn, R. D., J. Mistry, *et al.* Pfam: clans, web tools and services. Nucleic Acids Res, v.34, n.Database issue, Jan 1, p.D247-51. 2006.
- Frasch, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today, v.16, n.7, Jul, p.282-6. 2000.
- Gould, G. W. e G. D. Holman. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. Biochem J, v.295 ( Pt 2), Oct 15, p.329-41. 1993.
- Grinblat, L., C. M. Sreider, *et al.* Superoxide anion production by lipoamide dehydrogenase redox-cycling: effect of enzyme modifiers. Biochem Int, v.23, n.1, Jan, p.83-92. 1991.
- Guimond, C., N. Trudel, *et al.* Modulation of gene expression in Leishmania drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. Nucleic Acids Res, v.31, n.20, Oct 15, p.5886-96. 2003.
- Hannaert, V., F. Bringaud, *et al.* Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. Kinetoplastid Biol Dis, v.2, n.1, Oct 28, p.11. 2003.

Hasne, M. e M. P. Barrett. Drug uptake via nutrient transporters in *Trypanosoma brucei*. J Appl Microbiol, v.89, n.4, Oct, p.697-701. 2000.

Hertz-Fowler, C., C. S. Peacock, *et al.* GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. Nucleic Acids Res, v.32, n.Database issue, Jan 1, p.D339-43. 2004.

Hotz, H. R., P. Lorenz, *et al.* Role of 3'-untranslated regions in the regulation of hexose transporter mRNAs in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, v.75, n.1, Dec, p.1-14. 1995.

Hughes, A. L. e H. Piontkivska. Molecular phylogenetics of *Trypanosomatidae*: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. Kinetoplastid Biol Dis, v.2, n.1, Oct 28, p.15. 2003.

Joet, T. e S. Krishna. The hexose transporter of *Plasmodium falciparum* is a worthy drug target. Acta Trop, v.89, n.3, Feb, p.371-4. 2004.

Kollien, A. H. e P. F. Billingsley. Differential display of mRNAs associated with blood feeding in the midgut of the bloodsucking bug, *Triatoma infestans*. Parasitol Res, v.88, n.12, Dec, p.1026-33. 2002.

Krauth-Siegel, R. L. e R. Schoneck. Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. Faseb J, v.9, n.12, Sep, p.1138-46. 1995.

Krieger, M. A. e S. Goldenberg. Representation of differential expression: a new approach to study differential gene expression in *Trypanosomatids*. Parasitol Today, v.14, n.4, Apr, p.163-6. 1998.

Krishna, S., R. Webb, *et al.* Transport proteins of *Plasmodium falciparum*: defining the limits of metabolism. Int J Parasitol, v.31, n.12, Oct, p.1331-42. 2001.

Krogg, A., B. Larsson, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol, v.305, n.3, Jan 19, p.567-80. 2001.

Krogstad, D. J., I. Y. Gluzman, *et al.* Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. Science, v.238, n.4831, Nov 27, p.1283-5. 1987.

Kubata, B. K., Z. Kabututu, *et al.* A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med, v.196, n.9, Nov 4, p.1241-51. 2002.

Laage, R. e D. Langosch. Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. Traffic, v.2, n.2, Feb, p.99-104. 2001.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Liang, P. e A. B. Pardee. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, v.257, n.5072, Aug 14, p.967-71. 1992.

Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E., Molecular Cell Biology, New York: W. H. Freeman & Co. ; c1999

Lohrer, H. e R. L. Krauth-Siegel. Purification and characterization of lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. Eur J Biochem, v.194, n.3, Dec 27, p.863-9. 1990.

Lutziger, I. e D. J. Coliver. Molecular evidence of a unique lipoamide dehydrogenase in plastids: analysis of plastidic lipoamide dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett, v.484, n.1, Oct 27, p.12-6. 2000.

Macheda, M. L., S. Rogers, *et al.* Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. J Cell Physiol, v.202, n.3, Mar, p.654-62. 2005.

Mande, S. C., V. Mehra, *et al.* Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*. Science, v.271, n.5246, Jan 12, p.203-7. 1996.

Mande, S. S., S. Sarfaty, *et al.* Protein-protein interactions in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: dihydrcolipoamide dehydrogenase complexed with the binding domain of dihydrcolipoamide acetyltransferase. Structure, v.4, n.3, Mar 15, p.277-86. 1996.

Maslov, D. A., J. Lukes, *et al.* Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the *Trypanosomatid* protozoa. Mol Biochem Parasitol, v.75, n.2, Jan, p.197-205. 1996.

Massey, V. e C. Veeger. On the reaction mechanism of lipoyl dehydrogenase. Biochim Biophys Acta, v.40, May 6, p.184-5. 1960.

Maya, J. D., B. K. Cassels, *et al.* 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, v.146, n.4, Apr, p.601-20. 2007.

Mccully, V., G. Burns, *et al.* Resolution of branched-chain oxo acid dehydrogenase complex of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Biochem J, v.233, n.3, Feb 1, p.737-42. 1986.

Mcdaniel, J. P. e J. A. Dvorak. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. Mol Biochem Parasitol, v.57, n.2, Feb, p.213-22. 1993.

Miles, M. A., S. M. Lanham, *et al.* Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.74, n.2, p.221-37. 1980.

Miles, M. A., A. Souza, *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature, v.272, n.5656, Apr 27, p.819-21. 1978.

Miroux, B. e J. E. Walker. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J Mol Biol, v.260, n.3, Jul 19, p.289-98. 1996.

Mcolina, J., O. Martins-Filho, *et al.* Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. Antimicrob Agents Chemother, v.44, n.1, Jan, p.150-5. 2000.

Moller, S., M. D. Croning, *et al.* Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. Bioinformatics, v.17, n.7, Jul, p.646-53. 2001.

Morello, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol C, v.90, n.1, p.1-12. 1988.

Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. Eur J Biochem, v.219, n.3, Feb 1, p.713-25. 1994.

Murta, S. M., M. A. Krieger, *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, v.146, n.2, Apr, p.151-62. 2006.

Murta, S. M. e A. J. Romanha. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. Parasitology, v.116 ( Pt 2), Feb, p.165-71. 1998.

Nirde, P., C. Larroque, *et al.* Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. C R Acad Sci III, v.318, n.12, Dec, p.1239-44. 1995.

Nogueira, F. B., M. A. Krieger, *et al.* Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. Acta Trop, v.100, n.1-2, Nov, p.119-32. 2006.

Nourani, A., M. Wesolowski-Louvel, *et al.* Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. Mol Cell Biol, v.17, n.9, Sep, p.5453-60. 1997.

Nozaki, T. e G. A. Cross. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, v.75, n.1, Dec, p.55-67. 1995.

Nozaki, T., J. C. Engel, *et al.* Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg, v.55, n.1, Jul, p.111-7. 1996.

Nwaka, S. e A. Hudson. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.11, Nov, p.941-55. 2006.

Opperdoes, F. R. e P. A. Michels. Horizontal gene transfer in *Trypanosomatids*. Trends Parasitol, v.23, n.10, Oct, p.470-6. 2007.

Ouellette, M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. Trop Med Int Health, v.6, n.11, Nov, p.874-82. 2001.

Palmer, J. A., K. T. Madhusudhan, *et al.* Cloning, sequence and transcriptional analysis of the structural gene for LPD-3, the third lipoamide dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. Eur J Biochem, v.202, n.2, Dec 5, p.231-40. 1991.

Portela, M. P. e A. O. Stopopani. Lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: some properties and cellular localization. Biochem Int, v.24, n.1, May, p.147-55. 1991.

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis, v.1, n.2, Sep, p.92-100. 2001.

RELATÓRIO TÉCNICO - Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, v.39, n.5, Sep./Oct. 2006

Roberts, C. M. e J. R. Sokatch. Branched chain amino acids as activators of branched chain ketoacid dehydrogenase. Biochem Biophys Res Commun, v.82, n.3, Jun 14, p.828-33. 1978.

Rodrigues Coura, J. e S. L. De Castro. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.1, Jan, p.3-24. 2002.

Romanha, A. J., R. O. Alves, *et al.* Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. J Infect Dis, v.186, n.6, Sep 15, p.823-8. 2002.

Rutherford, K., J. Parkhill, *et al.* Artemis: sequence visualization and annotation. Bioinformatics, v.16, n.10, Oct, p.944-5. 2000.

Salmon-Chemin, L., E. Buisine, *et al.* 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. J Med Chem, v.44, n.4, Feb 15, p.548-65. 2001.

Sanguinetti, C. J., E. Dias Neto, *et al.* Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques, v.17, n.5, Nov, p.914-21. 1994.

Schmunis, G. A. e J. C. Dias. [Health care reform, decentralization, prevention and control of vector-borne diseases]. Cad Saude Publica, v.16 Suppl 2, p.117-23. 2000.

Schofield, C. J. e J. C. Dias. A cost-benefit analysis of Chagas disease control. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.86, n.3, Jul-Sep, p.285-95. 1991.

Schofield, C. J., J. Jannin, *et al.* The future of Chagas disease control. Trends Parasitol, v.22, n.12, Dec, p.583-8. 2006.

Schoneck, R., O. Billaut-Mulot, *et al.* Cloning, sequencing and functional expression of dihydrolipoamide dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Eur J Biochem, v.243, n.3, Feb 1, p.739-47. 1997.

Shaked-Mishan, P., N. Ulrich, *et al.* Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. J Biol Chem, v.276, n.6, Feb 9, p.3971-6. 2001.

Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. Annu Rev Microbiol, v.41, p.363-82. 1987.

Sreider, C. M., L. Grinblat, *et al.* Reduction of nitrofurans by heart lipoamide dehydrogenase: role of flavin and the reactive disulfide groups. Biochem Int, v.28, n.2, Oct, p.323-34. 1992.

Steindel, M., E. Dias Neto, *et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Mol Biochem Parasitol, v.60, n.1, Jul, p.71-9. 1993.

Tamura, K., J. Dudley, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, v.24, n.8, Aug, p.1596-9. 2007.

Teixeira, S. M. Control of gene expression in *Trypanosomatidae*. Braz J Med Biol Res, v.31, n.12, Dec, p.1503-16. 1998.

Teixeira, S. M., L. V. Kirchhoff, *et al.* Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem, v.270, n.38, Sep 22, p.22586-94. 1995.

Tetaud, E., M. P. Barrett, *et al.* Kinetoplastid glucose transporters. Biochem J, v.325 ( Pt 3), Aug 1, p.569-80. 1997.

Tetaud, E., F. Bringaud, *et al.* Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.17, Aug 16, p.8278-82. 1994.

Tetaud, E., S. Chabas, *et al.* Hexose uptake in *Trypanosoma cruzi*: structure-activity relationship between substrate and transporter. Biochem J, v.317 ( Pt 2), Jul 15, p.353-9. 1996.

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

Trotta, R. F., M. L. Brown, *et al.* Defective DNA repair as a potential mechanism for the rapid development of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. Biochemistry, v.43, n.17, May 4, p.4885-91. 2004.

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

Urbina, J. A. e R. Docampo. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol, v.19, n.11, Nov, p.495-501. 2003.

Uzcategui, N. L., K. Figarella, *et al.* Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant Leishmania parasites. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.140, n.3-4, Mar-Apr, p.395-402. 2005.

Vargas, N., A. Pedroso, *et al.* Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. Mol Biochem Parasitol, v.138, n.1, Nov, p.131-41. 2004.

Villarreal, D., P. Nirde, *et al.* Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. Antimicrob Agents Chemother, v.49, n.7, Jul, p.2701-9. 2005.

Viode, C., N. Bettache, *et al.* Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. Biochem Pharmacol, v.57, n.5, Mar 1, p.549-57. 1999.

Ward, D. E., R. P. Ross, *et al.* Catabolism of branched-chain alpha-keto acids in *Enterococcus faecalis*: the bkd gene cluster, enzymes, and metabolic route. J Bacteriol, v.181, n.17, Sep, p.5433-42. 1999.

Welss, T., M. Papoutsaki, *et al.* Molecular basis of basal cell carcinoma: analysis of differential gene expression by differential display PCR and expression array. Int J Cancer, v.104, n.1, Mar 10, p.66-72. 2003.

Wilkinson, S. R., M. C. Taylor, *et al.* A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.13, Apr 1, p.5022-7. 2008.

Yamada-Ogatta, S. F., M. C. Motta, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. Acta Trop, v.90, n.2, Apr, p.171-9. 2004.

Zhu, Y. N. e S. M. Lu. [Application of differential display-PCR technique in fluconazole-resistance gene expression of *Candida*.]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, v.34, n.2, Mar, p.157-62. 2005.

WHO. Organização Mundial da Saúde. Disponível em [www.who.gov.br](http://www.who.gov.br). Acesso em Dezembro de 2007.

World Bank 1993. World Development Report 1993. Investing in Health. World Development Indicators, Oxford University Press, Washington.

**- ANEXO -**

**Tabela 1:** Resultados de alinhamento local das seqüências dos genes *TcLipDH* (1.434 pb) e *TcrHT1* (1.635 pb) contra os *contigs* do projeto genoma de *T. cruzi*

Gene	Número do <i>Contig</i>	Tamanho do <i>contig</i>	Tamanho do alinhamento	Localização no <i>contig</i>	E-value	% ID	Particularidades da seqüência
TcLipDH	AAHK01000630*	28.018	1.434	23.044 a 24.477	0.0	99	Cópia completa
TcLipDH	AAHK01000124*	63.491	1.434	62.448 a 61.015	0.0	97	Cópia completa
TcrHT1	AAHK01000388*	38.079	1.636	22.851 a 24.486	0.0	98	Pseudogene Cópia completa truncada
TcrHT1	AAHK01000388*	38.079	1.635	1.529 a 3.163	0.0	98	Cópia completa
TcrHT1	AAHK01002461*	5.780	1.635	2.062 a 3.696	0.0	97	Cópia completa
TcrHT1	AAHK01001276*	3.814	1.635	10.148 a 8.518	0.0	97	Cópia completa
TcrHT1	AAHK01002461*	5.780	1.186	4.595 a 5.780	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01009252	1.180	1.180	1 a 1.180	0.0	99	Cópia incompleta truncada que ocupa todo o <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01013805	1.008	1.008	1 a 1.008	0.0	98	Cópia incompleta que ocupa todo o <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01014414	997	997	1 a 997	0.0	98	Cópia incompleta que ocupa todo o <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01017188	954	954	1 a 954	0.0	97	Cópia incompleta que ocupa todo o <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01012477	1.041	953	89 a 1.041	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01017715	947	947	947 a 1	0.0	99	Cópia incompleta que ocupa todo o <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01012029	1.054	941	1 a 941	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01017408	951	897	1 a 951	0.0	97	Cópia incompleta que ocupa todo o <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01013354	1.018	852	1 a 852	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01014925	987	826	826 a 1	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01015986	970	816	1 a 822	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01017534	949	767	1 a 767	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01013060	1.025	701	1.025 a 325	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01000133*	60.578	687	687 a 1	0.0	96	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01004532*	1.884	631	631 a 1	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01003121*	3.814	615	1 a 615	0.0	97	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01010271	1.124	613	1 a 613	0.0	98	Cópia incompleta truncada ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01024153	855	606	606 a 1	0.0	97	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>

TcrHT1	AAHK01008070	1.266	591	1.266 a 676	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01021913	890	542	349 a 890	0.0	97	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01006226	1.482	516	1 a 516	0.0	96	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01014930	987	452	536 a 987	0.0	96	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01023986	858	446	858 a 413	0.0	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01023849	860	378	1 a 378	0.0	97	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01012965	1.028	327	1.028 a 702	1,00E-166	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01006904	1.348	294	1.384 a 1.091	1,00E-153	98	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01006848	1.390	298	1.093 a 1.390	1,00E-151	97	Cópia incompleta ancorada ao final do <i>contig</i>
TcrHT1	AAHK01000388	38.079	190	1 a 190	1,00E-93	97	Cópia incompleta ancorada ao início do <i>contig</i>

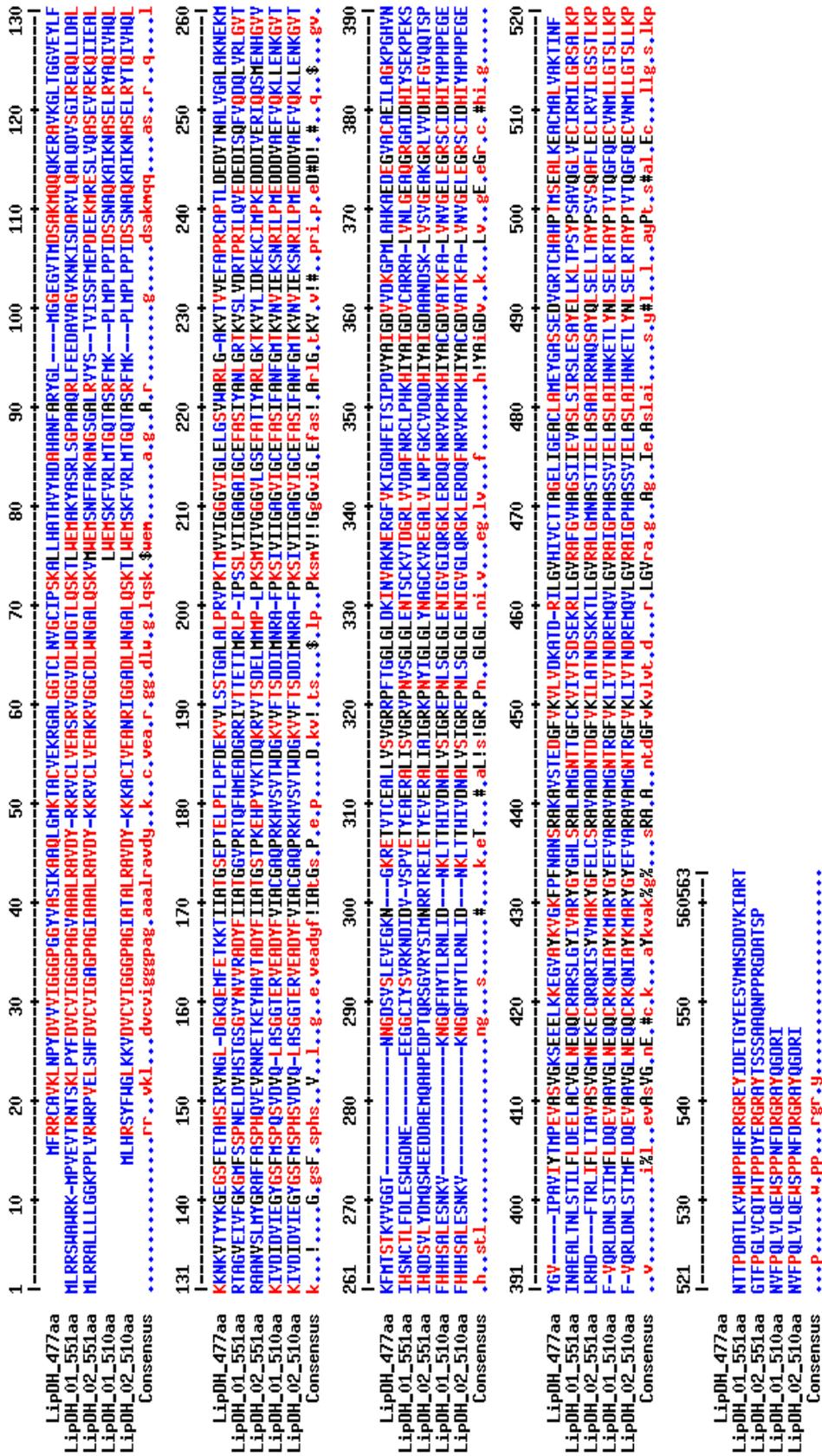
\* Sequências anotadas no genoma.

**Tabela 2:** Sequências do genoma do *T. cruzi* anotadas como TcLipDH ou TcrHT1

<b>TcLipDH</b>	
<b>Numero de acesso</b>	<b>Tamanho (aminoácidos)</b>
Tc00.1047053508933.20	551 aa
Tc00.1047053507757.60	551 aa
Tc00.1047053506701.10	510 aa
Tc00.1047053509379.10	510 aa

<b>TcrHT1</b>	
<b>Numero de acesso</b>	<b>Tamanho (aminoácidos)</b>
Tc00.1047053511041.40	544 aa
Tc00.1047053508551.30	544 aa
Tc00.1047053506355.10	544 aa



**Figura 1:** Alinhamento múltiplo global da sequência da lipomida desidrogenase de 477 aminoácidos descrita na literatura com as sequências de 510 e 551 aminoácidos anotadas no banco de dados GeneDB. O alinhamento foi realizado com o programa Multalin (Corpet, 1988). Nas sequências, os aminoácidos consenso estão representados em preto enquanto os aminoácidos variáveis estão representados em vermelho ou azul.



