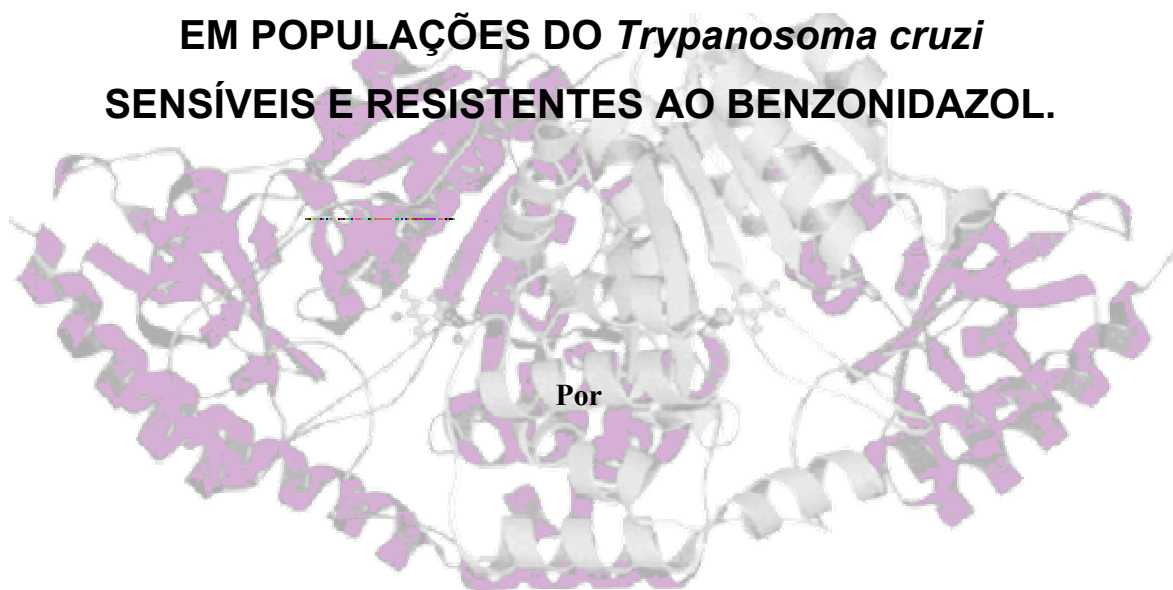


Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A  
ENZIMA TIROSINA AMINOTRANSFERASE (TcTAT)  
EM POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi*  
SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL.**



**JUCIANE VAZ RÊGO**

**Belo Horizonte -MG  
Fevereiro/ 2007**

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

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA  
TIROSINA AMINOTRANSFERASE (TcTAT) EM  
POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi* SENSÍVEIS E**

**Por**

**JUCIANE VAZ REGO**

Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências  
na área de concentração Biologia Molecular  
Orientação: Dr. Alvaro José Romanha  
Co-orientação: Dra Silvane M. F. Murta

**Belo Horizonte -MG  
Fevereiro/ 2007**

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

R343c  
2007

Rego, Juciane Vaz

Caracterização do gene que codifica a enzima Tirosina Aminotransferase (TAT) em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol. Juciane Vaz Rego. Belo Horizonte, 2007

xiii, 67 f: il. : 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 57 - 67

Dissertação de mestrado 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. *Trypanosoma cruzi* 2. Tirosina aminotransferase 3. Resistência a drogas I. Título. II. Romanha, Alvaro José (Orientação). III. Murta, Silvane M. Fonseca (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**

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA  
TIROSINA AMINOTRANSFERASE (TcTAT) EM  
POPULAÇÕES DO *Trypanosoma cruzi* SENSÍVEIS E**

por

**JUCIANE VAZ REGO**

**Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:**

**Prof. Dr. Alvaro José Romanha (Presidente)**

**Prof. Dr. Elio Hideo Babá**

**Prof. Dr. Luciano Andrade Moreira**

**Suplente: Dr. Flávio Guimarães da Fonseca**

**Dissertação ou tese defendida e aprovada em: 28/02/2007**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por estar sempre comigo, por me guiar, dar força, serenidade e fé em todos os momentos de minha vida.

Aos meus orientadores Dr. Alvaro José Romanha e Dra Silvane Maria Fonseca Murta pela oportunidade, assistência e pelo ensinamento profissional e pessoal.

Ao Chefe do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira e Vice-chefe Dra. Angela Cristina Volpini pela boa convivência, oportunidade e disponibilidade da estrutura para realização deste trabalho.

Aos participantes da banca examinadora por terem aceitado nosso convite.

À Coordenadoria de Pós-graduação do Centro de Pesquisa René Rachou, representada pela coordenadora Profa Cristiana Ferreira Alves de Brito e secretárias Cristiane Gomes, Andréa Silva e Maria Dalvineyde no apoio oferecido durante todo o curso.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e CPqRR pelo apoio financeiro deste projeto;

Às secretárias Michelle Marília e Carolina Lara pela ajuda, paciência e otimismo nas horas boas e difíceis.

Ao Segemar, pelo empenho em conseguir os artigos que solicitei;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular: Rosana, Nilton, Andréia, Lívia, Luiza, Fernanda Ludolf, Mariana, Adhemar, Anderson, Rômulo, Elizangela, Fernanda Costa, Gustavo, Gabriela, Jerônimo, Kelly, Lorenza, Simara, Luciana, Poliana, Rachel e Rosiane pelos ótimos momentos de convivência.

Aos amigos da turma de Pós-Graduação, em especial, Fernanda, Eliane, Patrícia, Tatiana e Nanci pelo bom convívio, estudo, amizade durante o período em que cursamos as disciplinas e em todos os momentos.

À Maureen, Silvinha e Kênia pela ajuda, carinho, amizade, conversas e agradável convívio.

Aos amigos Fê Freire, Marcela, Paula, Flavio, Marcos, Sara e Marcilene pela amizade, apoio, força, agradável convivência saídas e descontração.

Aos casais amigos, Daniel e Alexandra, Fê Barbosa e Toni, pela ajuda, amizade, atenção, aprendizado, companherismo, estudo, descontração, conselhos, conversas, saídas, e convívio nas horas boas e difíceis.

À amiga Regina e sua família, pela acolhida, convivência em casa, companherismo, conversas, aprendizado, conselhos e amizade.

À Dra Semiramis Jamil Hadad do Monte e a toda a equipe do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular por acreditarem em mim, pela ajuda, oportunidade, aprendizado, amizade e incentivo.

Aos amigos Adalberto, Ana Carolina, Anaregina e Carla Andréa pelo apoio, incentivo e amizade sincera.

Aos meus avós Pedro, Amparo, Geraldo e Luzia e todos familiares, tios, primos pelo carinho, amor e apoio.

Aos meus pais Francisco Rêgo e Maria Odete e meus irmãos Júnior e Jeferson, minha cunhada Eline e minha sobrinha Isa Gabriele pelo apoio em todos os momentos difíceis, amor, carinho, incentivo e pela força sempre, apesar da distância.

Ao meu noivo Elder, pelo amor, carinho, companheirismo, paciência, incentivo e força nos momentos difíceis, mesmo que à distância.

## Sumário

<b>Lista de figuras e tabelas.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de abreviaturas e símbolos.....</b>	<b>ix</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xii</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	14
1.3 Heterogeneidade genética.....	16
1.4 Organização genômica do <i>T.cruzi</i> .....	17
1.5 Quimioterapia da doença de Chagas.....	18
1.6 Seleção de cepas de <i>T.cruzi</i> resistentes a drogas.....	20
1.7 Resistência a drogas contra <i>T. cruzi</i> .....	21
1.8 Expressão diferencial de proteínas por proteômica.....	22
1.9 Tirosina Aminotransferase.....	23
<b>2 Justificativa.....</b>	<b>26</b>
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>4 Métodos.....</b>	<b>28</b>
4.1 Amostra do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	28
4.2 Cultivo das formas epimastigotas.....	28
4.3 Extração de RNA total.....	28
4.4 Extração de DNA.....	28
4.5 Northern blot.....	29
4.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	29
4.7 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida.....	30
4.8 Purificação do produto de PCR.....	30
4.9 RT-PCR quantitativo em tempo real.....	30
4.10 Southern blot.....	31
4.11 Sondas e ensaios de hibridização.....	31
4.12 Eletroforese de pulso alternado-PFGE.....	32
4.13 Obtenção do anticorpo policlonal anti-rTcTAT.....	32
4.13.1 Clonagem e expressão da proteína recombinante.....	32
4.13.2 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	34
4.13.3 Teste de solubilidade da proteína recombinante rTcTAT.....	34
4.13.4 Purificação da proteína recombinante rTcTAT.....	34

---

4.13.4.1 Purificação por cromatografia de afinidade.....	34
4.13.4.2 Purificação por eletroeluição.....	35
4.13.5 Dosagem de proteínas.....	35
4.13.6 Imunização dos coelhos com a proteína recombinante purificada.....	36
4.14 Extração de proteínas.....	36
4.15 Western blot.....	36
4.16 Análise densitométrica.....	37
4.17 Sequenciamento.....	37
<b>5 Resultados.....</b>	<b>38</b>
5.1 Nível de mRNA do gene TcTAT em populações do <i>Trypanosoma cruzi</i> sensíveis e resistentes ao benzonidazol.....	38
5.2 Organização genômica e número de cópias do gene TcTAT.....	40
5.3 Localização do gene TcTAT nos cromossomas do <i>T. cruzi</i> .....	40
5.4 Clonagem e expressão da proteína recombinante TcTAT.....	44
5.5 Teste de solubilidade da proteína rTcTAT.....	44
5.6 Purificação da proteína recombinante rTcTAT.....	47
5.6.1 Purificação por resina de ácido nitrilotriacético com níquel.....	47
5.6.2 Purificação por eletroeluição.....	47
5.7 Nível de expressão da proteína rTcTAT em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	47
<b>6 Discussão.....</b>	<b>52</b>
<b>7 Conclusões.....</b>	<b>56</b>
<b>8 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>57</b>



**Lista de figuras e tabelas**

**Figura 1.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* .....15

**Figura 2.** Estrutura química dos compostos nifurtimox e benzonidazol.....20

**Figura 3.** Esquema da eletroforese bidimensional e espectrometria de massa..... 23

**Figura 4.** Metabolismo da TAT do *T. cruzi*.....25

**Figura 5.** Nível de mRNA do gene TcTAT em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.....39

**Figura 6.** Southern blot do gene TcTAT de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. DNA total de cada cepa digerido com XhoI.....41

**Figura 7.** Localização cromossômica do gene TcTAT em populações do *T. cruzi* com diferentes zimodemas e resistência a droga.....42

**Figura 8.** Expressão da proteína recombinante rTcTAT induzidas com IPTG.....45

**Figura 9.** Teste de solubilidade da proteína recombinante r TcTAT do *T. cruzi*.....46

**Figura 10.** Purificação da proteína recombinante rTcTAT fusionada a cauda de 6 histidina.....49

**Figura 11.** Perfil eletroforético das proteínas totais do *T. cruzi*, Western blot e densitometria da proteína TcTAT.....50

**Figura 12.** Perfil eletroforético das proteínas totais do *T. cruzi*, Western blot de extrato proteico das populações 17WTS e 17LER diluídas.....51

**Tabela 1.** Populações e clones do *T. cruzi* utilizada neste estudo e a localização cromossômica do gene TcTAT..... 43

**Lista de abreviaturas e símbolos**

**AMP-** Ampicilina

**AP-** Fosfatase alcalina

**APS-** Persulfato de amônio

**ATP-** Adenosina trifosfato

**BCIP-** 5-bromo-4 cloro -3-indolifosfato

**BSA-** Albumina bovina sérica

**BZ** – Benzonidazol

**cDNA-** DNA complementar

**CIAP-** Fosfatase alcalina, vitela intestinal

**Cols.** – Colaboradores

**CT** – Limiar do ciclo

**DNA-** Ácido desoxirribonucleico

**dNTP-** Deoxinucleotídeos trifosfato

**DP-** Desvio padrão

**DTT-** Ditioneitol

**EDTA-** Ácido etilenodiaminotetracético

**HGPRT-** Hipoxantina guanina fosforribosil transferase

**HSP70-** Proteína de choque térmico de 70 Kilodalton

**Kb-** Kilobases

**Kg-** Kilograma

**L** – Litro

**LB-** Meio Luria-Bertani

**LIT-** Meio de Infusão de fígado e triptose

**M-** Molar

**Mb-** Megabases

**Mg**- Miligrama

**mL**- Mililitro

**MM**- Marcador de massa molecular

**mM**- Milimolar

**MOPS**- Ácido 3-N-morfolino propanosulfônico

**mRNA**- Ácido ribonucléico mensageiro

**NBT**- Nitro tetrazolium azul

**Ni<sup>2+</sup>**- **NTA**- Resina de ácido nitriloacético com níquel

**NFX**- Nifurtimox

**P<sup>32</sup>**- Fósforo radioativo

**PBS**- Salina tamponada com fosfato

**PCR**- Reação em cadeia da polimerase

**PFGE**- Eletroforese de pulso alternado

**PMSF**- fluoreto de Fenilmetilsufonil

**rRNA**- Ácido ribonucléico ribossomal

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

**SDS**- Duodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE**- Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

**SSC**- Tampão citrato de Sódio

**TAT**- Tirosina aminotransferase

**TLCK**- Tosil lisina clorometilcetona

**TPCK**- Tosil fenilalanil clorometilcetona

**TBE**- Tampão tris-borato EDTA, pH 8,0

**V**-Volts

**Z1**- Zimodema 1

**Z2**- Zimodema 2

**ZB**- Zimodema B

**μg**- Micrograma

**μL** – Microlitros

## Resumo

A Tirosina aminotransferase (TAT) é uma enzima importante no metabolismo de aminoácidos aromáticos. Existem várias diferenças bioquímicas entre a TAT de mamíferos e a de *Trypanosoma cruzi* (TcTAT). Além disso, o gene TcTAT está superexpresso em cepas do parasito que são resistentes ao benzonidazol (BZ), droga atualmente usada na quimioterapia da doença de Chagas. Dessa forma a TAT é indicada como um alvo potencial para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos. No presente estudo, caracterizamos o gene da TcTAT em 14 cepas e clones do *T. cruzi* resistentes e sensíveis ao BZ. Observamos um único transcrito de mRNA de 2,0 Kb em todas as amostras do parasito. Os níveis de mRNA de TcTAT foram similares em todas as amostras com exceção das cepas resistentes 17LER e BZR, que apresentaram níveis de mRNA duas vezes maior comparado com seus pares sensíveis 17WTS e BZS. O gene TcTAT está organizado em arranjos multicópias em tandem e está localizado em 8 bandas cromossômicas que variam de 785 a 2500Kb. Não observamos amplificação do TcTAT no genoma do parasito. Uma proteína expressa de 42KDa pelo TcTAT está presente em todas amostras do *T. cruzi*. Não observamos nenhuma correlação forte entre o gene TcTAT e resistência a drogas no *T. cruzi*. Entretanto os resultados não excluem que TcTAT possa atuar via mecanismo secundário, juntamente com genes de outras enzimas.

**Abstract**

Various biochemical differences exist between mammalian tyrosine aminotransferase (TAT) and its analogue in *Trypanosoma cruzi* (TcTAT), the causative agent of Chagas disease. Moreover, TcTAT is over-expressed in strains of the parasite that are resistant to benznidazole (BZ), a drug currently used in chemotherapy. TAT has thus been indicated as a potential target for the development of new chemotherapeutic agents. In the present study, the *TcTAT* gene has been characterised in 14 BZ-resistant and susceptible strains and clones of *T. cruzi*. A unique mRNA transcript of 2.0 Kb was observed in all samples, whilst the levels of *TcTAT* mRNA were very similar except for the BZ-resistant strains 17LER and BZR, which presented levels of mRNA that were 2-fold higher than their BZ-susceptible counterparts. The *TcTAT* gene is organised in a tandem multicopy array and is located on 8 chromosomal bands that vary from 785 to 2500Kb. No amplification of *TcTAT* was observed in the parasite genome. A 42 KDa protein expressed by *TcTAT* was present in all *T. cruzi* samples. The results suggest that TcTAT acts as a general secondary compensatory mechanism or stress response factor rather than as a key component of the specific primary resistance mechanism in *T. cruzi*.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

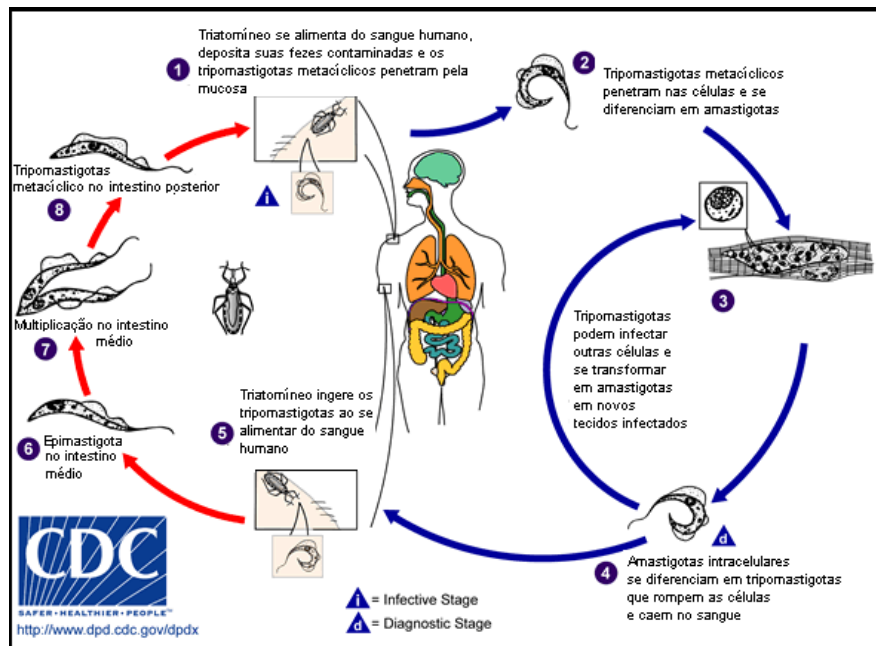
A Doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é um dos principais problemas de saúde pública na América Latina. A distribuição geográfica desta doença ocorre na América Central, do Sul e México. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com o parasito, 120 milhões vivem em áreas de risco de transmissão da doença e 21 000 mortes estão associadas com esta condição todo ano (WHO, 2002). No Brasil, a doença de Chagas atinge acerca de 5 milhões de pessoas (WHO, 1999).

O *T. cruzi* (*Protozoa, Sarcomastigophora, Kinetoplastida, Tripanosomatidae*) é um protozoário digenético e polifilético, largamente distribuído na natureza, ocorrendo sua circulação primitiva entre insetos vetores (*Triatominae, Hemiptera, Reduviidae*) e mamíferos silvestres. A transmissão do *T. cruzi* do inseto ao homem resulta, em geral, de processo contaminativo da conjuntiva, das mucosas ou de lesões cutâneas com as fezes do inseto no momento do repasto sanguíneo. Além disso, outras formas de contaminação foram observadas através transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidentes de laboratório, via oral e transplantes de órgãos (Dias, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* apresenta basicamente três formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. No hospedeiro vertebrado o ciclo tem início quando as formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes dos triatomíneos durante o repasto sanguíneo, atingem a pele e invadem as células locais se diferenciando em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. Posteriormente as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberadas no meio extracelular. As tripomastigotas podem infectar as células vizinhas ou caírem na circulação sanguínea, onde serão ingeridas pelo inseto vetor durante a alimentação, ou ainda infectarem células de outros tecidos do hospedeiro vertebrado (Figura 1) (Tanowitz *et al.*, 1992).

A doença de Chagas tem duas, sucessivas fases: aguda e crônica. A fase aguda dura de 6 a 8 semanas, com alto grau de parasitismo no sangue e pode apresentar uma sintomatologia tão fugaz que passa inteiramente despercebida. Quando sintomática há aparecimento de febre, astenia, mal estar geral, hiporexia, e

cefaléia. Além disso, podem aparecer alterações sistêmicas como edema subcutâneo, aumento de volume dos linfonodos, esplenomegalia, hepatomegalia, sinal de Romaña ou de outros tipos de chagoma de inoculação (Rassi *et al.*, 2000). Nas formas agudas graves, surgem quadros de miocardite, com taquicardia ou outras alterações do ritmo, aumento da área cardíaca e sinais de insuficiência circulatória (Rassi *et al.*, 2000). Na fase crônica o *T. cruzi* multiplica-se lentamente e apresenta, em geral, um parasitismo tecidual baixo. Nesta fase a maioria dos pacientes permanece assintomática por um tempo ou por toda a vida, evidenciando a forma indeterminada da doença, mas entre 20 a 50% de casos analisados de áreas endêmicas, desenvolvem características sintomáticas desta fase como: comprometimento do sistema cardíaco (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva) ou de ambos (forma cardio-digestiva) (Brener *et al.*, 1987).



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



## 1.2 Heterogeneidade genética em *T. cruzi*

O *T. cruzi* representa um grupo heterogêneo e complexo de populações que diferem entre si segundo critérios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e clínicos. Estudos utilizando populações clonadas de *T. cruzi*, reforçam esta heterogeneidade do parasita e demonstram que as cepas são compostas de uma variedade de subpopulações com características distintas (Finley & Dvorak, 1987).

Miles e col. (1977, 1978 e 1980) estudaram a variabilidade de isoenzimas entre as populações de *T. cruzi*. Os autores mostraram a existência de três diferentes grupos de cepas denominados zimodemas 1 (Z1), 2 (Z2) e 3 (Z3). Os zimodemas 1 e 3 foram observados em marsupiais e triatomíneos silvestres e em alguns casos humanos agudos, caracterizando o ciclo silvestre de transmissão. O zimodema 2 observado em mamíferos domésticos e humanos caracteriza o ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1980 e 1981; Devera *et al.*, 2003).

Romanha (1979 e 1982) e Carneiro *et al.* (1990), caracterizando amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos de uma área endêmica de Bambuí (MG), observaram a presença de quatro zimodemas distintos (ZA, ZB, ZC e ZD). O ZA mostrou-se similar ao Z2 e os demais zimodemas foram distintos entre si. Desta forma, admite-se que no Brasil, o *T. cruzi* esteja distribuído em pelo menos 6 grupos isoenzimáticos principais: Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD. O padrão heterozigoto ZB foi descrito na literatura baseado na descrição de seus perfis homozigotos parentais Z2 e ZC circulando em uma mesma região (Bambuí-MG) (Romanha, 1982).

Estudo dos genes que codificam o mini-exon e RNA ribossomal 24S $\alpha$ , permitiram a divisão das cepas de *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas distintas denominadas grupo I e grupo II (Devera *et al.*, 2003). O *T. cruzi* I (zimodema 1) é geralmente observado em mamíferos e triatomíneos silvestres, enquanto que *T. cruzi* II (zimodema 2) é normalmente encontrado em humanos (Devera *et al.*, 2003). Pedroso e col. (2003) observaram distâncias filogenéticas entre os grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e híbridos baseados nos dados de variação do tamanho dos cromossomas. Observaram que os cromossomas são caracteres valiosos para a identificação evolutiva dos grupos, em particular, grupos de *T. cruzi* híbridos. Esses dados reforçam a hipótese de que cada grupo pode ter evoluído independentemente.

### 1.3 Organização genômica do *T. cruzi*

O tamanho do genoma do *T. cruzi* (100-200 x 10<sup>6</sup> pb) é relativamente superior ao tamanho dos genomas de outros protozoários parasitas, como por exemplo, *Leishmania* (45-65 x 10<sup>6</sup> pb) ou *T. brucei* (25 x 10<sup>6</sup> pb).

A organização dos genes dos tripanosomatídeos difere daquela conhecida em outros eucariotos. Em torno de 50% do genoma consiste de seqüências repetidas, tais como retrotransposons e genes de famílias de moléculas de superfície como mucinas, trans-sialidases, gp63s e MASP- família de mucinas associadas a proteínas de superfície (El-Sayed *et al.*, 2005). O DNA satélite do *T. cruzi* apresenta repetições de 195 nucleotídeos presente aproximadamente em 10<sup>5</sup> cópias do genoma do parasito, correspondendo a 10% do total de DNA (Elias *et al.*, 2003). Muitas seqüências repetitivas e a maioria dos genes do *T. cruzi* que codificam proteínas estão presentes em múltiplas cópias na célula. A presença de múltiplas cópias gênicas pode ser uma maneira encontrada pelo parasito de compensar eventuais perdas de genes essenciais durante essas constantes mudanças do genoma devido à amplificação e translocação das seqüências gênicas. Essa organização em “tandem” também pode estar relacionada com a transcrição policistrônica (o mRNA codifica mais de uma proteína) existente nos tripanossomas, o que facilitaria a síntese e manutenção dos níveis de mRNAs na célula (Silveira, 2000). Genes que codificam tubulinas, calmodulinas, ubiquitinas existem em arranjos em “tandem” no genoma deste parasito (Ullu & Nilsen, 1995). Além disso os genes de cópia única são encontrados em *T. cruzi* e estão presentes em um único locus. Não são muitos os genes em cópia única descritos no *T. cruzi* até a presente data tais como a DNA polimerase II, hipoxantina guanina fosforibosil transferase - HGPRT e gp 72 (Silveira, 2000).

O estudo da expressão gênica dos tripanosomatídeos tem revelado a existência de mecanismos genéticos peculiares, como, por exemplo, a organização dos genes de proteínas em unidades transcricionais policistrônicas, o processamento dos transcritos através de trans-splicing e a edição de RNAs polimerases.

O processamento dos mRNAs nos tripanosomatídeos difere dos demais organismos eucariotos, pois transcrevem longos pré-mRNAs policistrônicos, que devem ser processados em mRNAs individuais antes de serem traduzidos (Nilsen, 1992). Durante este processo, uma seqüência nucleotídica líder, conhecida como “splice leader” (SL) ou mini-exon, pelo fato de não ser codificada de uma maneira

contínua com os genes estruturais, é transferida para a extremidade 5' de cada mRNA individual. Esta transferência ocorre através de uma reação denominada "trans-splicing". A SL é derivada de um RNA de 110 nucleotídeos codificado por genes localizados em um ou dois cromossomas, dependendo da cepa de *T. cruzi* (Wagner, 1990). A SL está teoricamente presente em todos os mRNAs dos tripanosomatídeos. Pouco se conhece sobre a origem evolutiva do trans-splicing e sua função biológica na célula. No entanto, este mecanismo de transcrição parece ter evoluído para acomodar a necessidade dos tripanosomas em processar seus pré-RNAs policistrônicos, servindo como um meio de individualizar os mRNAs e ao mesmo tempo adicionar a eles uma estrutura de quepe (cap), tornando-os maduros e competentes para tradução. Além da adição da SL na extremidade 5' dos mRNAs individuais, ocorre também nos tripanosomatídeos a adição da cauda poli-A na extremidade 3' dos mRNAs (Vanhamme & Pays, 1995).

Os cromossomas do *T. cruzi* não se condensam durante a divisão celular, dificultando a sua análise pelos métodos convencionais de citogenética (Solari, 1980). No entanto, com a utilização da técnica de *eletroforese de pulso alternado* (PFGE), foi possível verificar que o genoma do *T. cruzi* está organizado em pelo menos 20-25 bandas cromossômicas, variando de 0,45 a 1,6 Mb (Gibson & Miles, 1986; Henriksson *et al.*, 1990, 1995 e 1996). Uma outra peculiaridade marcante deste parasita é a grande variação no conteúdo de DNA entre as diferentes cepas (Dvorak *et al.*, 1982) e até mesmo entre clones de uma mesma cepa (McDaniel & Dvorak, 1993).

Atualmente, o genoma do protozoário patógeno *T. cruzi* foi seqüenciado e revelou que o genoma diplóide contém uma predição de 22.570 proteínas que são codificadas por genes e 12.570 representam pares alélicos (El-Sayed *et al.*, 2005).

#### **1.4 Quimioterapia da Doença de Chagas**

Os primeiros compostos analisados experimentalmente para o tratamento da Doença de Chagas se deram logo depois da descoberta da doença por Carlos Chagas em 1909. Entre eles citamos atoxil, fucsina, antimônio pentavalente e cloreto de mercúrio (revisado por Coura & Castro, 2002). Em 1957, o uso de Nitrofurazona apresentou resultados promissores, mas depois foi substituído por outro nitrofurano, o Nifurtimox (Brener, 1984).

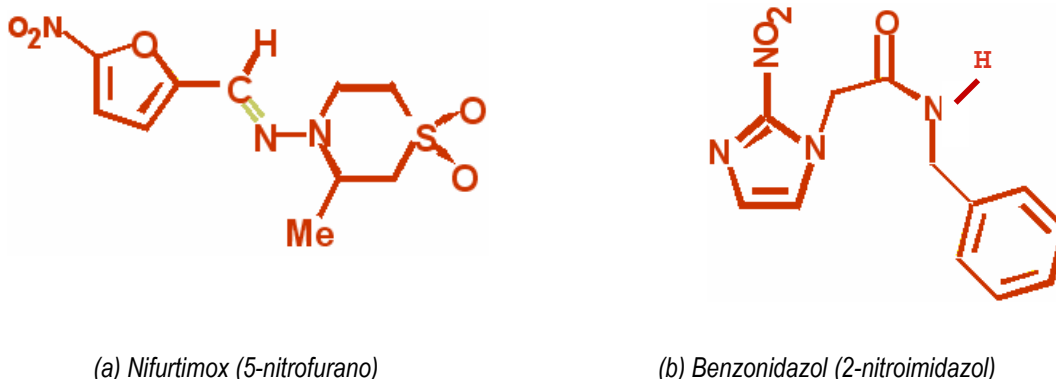
Desde de 1960, duas drogas nitroheterocíclicas têm sido disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas: um nitrofurano, [nifurtimox (NFX)] e um nitroimidazol, [benzonidazol (BZ)] (Figura 2). Estes compostos são da mesma família dos nitroheterocíclicos, mas possuem diferentes grupos químicos e diferentes mecanismos de ação contra *T. cruzi*. O mecanismo de ação do NFX age na via de redução do grupo nitro por nitroredutases, gerando radicais nitroânion, que na presença do oxigênio causam a produção de compostos altamente tóxicos, tais como: superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila. O BZ está envolvido com modificação de macromoléculas através da ligação de seus intermediários nitroreduzidos (Maya *et al.*, 2003).

O NFX e BZ são compostos efetivos em reduzir a duração e a severidade clínica da doença de Chagas aguda e congênita, levando aproximadamente a 50% dos pacientes tratados à cura parasitológica (Kirchhoff, 1993 e Urbina *et al.*, 2003). Em uma avaliação do tratamento da doença de Chagas com o BZ foi observado cura em 76% dos pacientes tratados na fase aguda e apenas 8% dos pacientes tratados na fase crônica (Cançado, 2002). Além da baixa eficácia de cura, o mecanismo de ambos compostos pode estar relacionado não somente aos efeitos tóxicos mas também com ações deletérias no *T. cruzi*, os quais são responsáveis para suas ações quimioterapêuticas. Efeitos sérios e indesejáveis destes compostos foram relatadas durante seu uso clínico por médicos ou pacientes. Anorexia e perda de peso, náuseas e vômitos, excitação nervosa, insônia, depressão psíquica, adinamia, paraestésias, convulsões, vertigem e esquecimento foram os efeitos mais freqüentes observados (Castro *et al.*, 2006).

Atualmente, os alvos bioquímicos da quimioterapia incluem, enzimas como a tripanotona redutase, superóxido dismutase, cisteína protease, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerasas, dihidrofolato redutase e farnesilpirofosfato sintase (Coura & de Castro, 2002). Alguns inibidores da biossíntese de esterol podem ser útil para tratamento da Doença de Chagas. Além disso, derivados de ázóis como D0870 e SCH 56592 (posaconazol) foram capazes de induzir cura parasitológica em modelos murinos de ambas as fases aguda e crônica da doença de Chagas (Liendo *et al.*, 1998 e Urbina, 2001).

A resistência à droga é um complicador para o tratamento de doenças parasitárias, inclusive na doença de Chagas (Ouellette, 2001). Filardi & Brener (1987) descreveram a presença de cepas do *T. cruzi* com resistência natural ao benzonidazol e nifurtimox. Tem sido sugerido que essa resistência natural à droga é

um fator importante para explicar as baixas percentagens de cura detectadas em pacientes chagásicos tratados. Outros autores demonstraram diferenças na susceptibilidade à droga por cepas de *T. cruzi* (Hauschka, 1949; Neal & Van Bueren, 1988). Murta e Romanha (1998) selecionaram *in vivo* uma população e clones de *T. cruzi* com resistência ao benzonidazol para servir de modelo experimental para estudo do mecanismo de resistência a droga neste parasito. Posteriormente esses autores mostraram que ao contrário do que ocorre em outros protozoários (Ullman, 1995), a superexpressão dos genes que codificam a fosfoglicoproteína de membrana (PGP) não está associada com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* à drogas (Murta *et al.*, 2001).



**Figura 2:** Estrutura química dos compostos utilizados para o tratamento da Doença de Chagas

### 1.5 Seleção de cepas de *T. cruzi* resistentes a drogas

Com o intuito de estudar o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas, vários autores obtiveram cepas de *T. cruzi* com resistência *in vitro* ao BZ ou NFX. Abdo (1991), conseguiu selecionar *in vitro* uma população de *T. cruzi* 8 vezes mais resistente ao BZ e outra 3 vezes mais resistente ao NFX, do que a cepa selvagem. Nirdé *et al.* (1995) conseguiram obter *in vitro* um clone de *T. cruzi* 23 vezes mais resistente ao BZ do que o clone da cepa selvagem. Os autores observaram que o fenótipo de resistência foi estável mesmo após diferenciação de epimastigotas para amastigotas.

Em nosso laboratório, com o objetivo de estudar o mecanismo de resistência do *T. cruzi* a drogas, uma população (BZR) e clones resistentes ao BZ foram selecionados *in vivo* a partir da cepa Y do *T. cruzi*. Foi utilizada a cepa Y do *T. cruzi*, por ser uma cepa medianamente resistente *in vivo* ao BZ e NFX e apresentar um alto pico de parasitemia, no 7º dia após a infecção. O protocolo foi baseado em 25 tratamentos sucessivos com uma dose única de 500 mg/Kg de BZ. Na ausência de pressão do BZ, o fenótipo da população resistente BZR foi estável após 6 meses de manutenção em meio de cultura LIT, após 20 passagens em camundongos e uma passagem pelo vetor invertebrado, *Triatoma infestans* (Murta & Romanha, 1998).

### **1.6 Resistência a drogas contra *T. cruzi***

A resistência à droga é um complicador para o tratamento de doenças parasitárias, inclusive na doença de Chagas. As alterações bioquímicas e o mecanismo molecular pelo qual os parasitas tornam-se resistentes são ainda pouco conhecidos. Diante disso, o estudo do mecanismo de resistência a drogas é muito importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes na cura de várias doenças. Este estudo fornece conhecimento sobre os alvos intracelulares da droga e os mecanismos de defesa da célula ou do parasito, permitindo o desenvolvimento de análogos da droga que não são afetados por estes mecanismos.

O estudo da resistência a drogas é muito complexo, uma vez que existem vários mecanismos de resistência a drogas e a resistência a uma única droga pode envolver mecanismos distintos. Os principais mecanismos de resistência a drogas (Borst & Ouellette, 1995) são: diminuição da entrada da droga na célula, eliminação da droga pela fosfoglicoproteína de membrana (PGP) ou outras proteínas transportadoras dependentes de ATP, diminuição da ativação da droga, inativação da droga, alteração da formação do complexo alvo-droga e eficiência no sistema de reparo.

Uma questão importante foi o comportamento de resistência cruzada entre NFX e BZ. Ambos os compostos apesar de pertencerem a uma mesma família, possuem diferentes grupos químicos e diferentes mecanismos de ação contra o parasita (Pontes & Andrade, 1984; Filardi & Brener, 1987; Neal & Van Bueren, 1988)

## 1.7 Expressão diferencial de proteínas por proteômica

A análise proteômica de diferentes estágios do ciclo de vida de organismos como *Plasmodium falciparum* (Lasonder *et al.*, 2002 e Florens *et al.*, 2002), *Leishmania donovani* (Thiel & Bruchhaus 2001 e Bente *et al.*, 2003), *Leishmania infantum* (El Fakhry *et al.*, 2002), *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (Gongora *et al.*, 2003) e *T. cruzi* (Atwood *et al.*, 2005) tem sido descritos. O uso da ferramenta proteômica para identificar alvos terapêuticos e para o entendimento do mecanismo de resistência a drogas de alguns organismos tem sido relatado em *Helicobacter pylori*, *Leishmania major* e *Staphylococcus aureus* (McAtee *et al.*, 2001; Drummelsmith *et al.*, 2003; Scherl *et al.*, 2006). Em *T. cruzi*, Parodi-Talice e cols. (2004) fizeram a padronização das condições de eletroforese bi-dimensional para análise de proteínas das formas epimastigotas do *T. cruzi*. Os autores identificaram 45 proteínas do *T. cruzi* por espectrometria de massa. Paba e cols. (2004) reportaram a análise proteômica comparativa dos estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* utilizando eletroforese bi-dimensional e espectrometria de massa. Os autores identificaram 26 proteínas e observaram que a maioria das proteínas do *T. cruzi* analisadas apresentaram expressão conservada nas 3 formas de desenvolvimento do parasito. Atwood e cols. (2005) identificaram a expressão de 2.784 proteínas totais na análise proteômica dos estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* através da cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massa. Dessas proteínas identificadas a tirosina aminotransferase foi encontrada expressa em todos estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*.

Em nosso laboratório, na busca de possíveis alvos envolvidos no fenótipo de resistência a drogas, foi realizado um estudo proteômico de populações e clones de *T. cruzi* sensíveis (S) e com resistência (R) selecionada *in vivo* e induzida *in vitro* ao benzonidazol (BZ), utilizando a eletroforese bi-dimensional (2-DE) e a espectrometria de massa (EM). A eletroforese bi-dimensional foi uma ferramenta utilizada para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de populações e clones do *T. cruzi* S e R ao BZ. Esta técnica promoveu a separação de milhares de diferentes proteínas. Numa primeira etapa as proteínas foram separadas de acordo com o ponto isoelétrico (pI) e numa segunda etapa de acordo com o peso molecular. A eletroforese bi-dimensional foi complementada pela espectrometria de massa (MS) para identificação das proteínas que permitiu analisar as pequenas quantidades de proteínas e peptídeos (Figura 3). Posteriormente, foi realizada a comparação dos perfis bi-dimensionais das populações do *T. cruzi* S e R identificando diferenças

significativas entre os géis. Na análise do perfil proteômico foram identificadas 27 proteínas superexpressas em populações do parasito resistentes ao BZ. (de Andrade *et al.*, 2005) Neste trabalho selecionamos para caracterização a enzima Tirosina Aminotransferase que foi identificada como superexpressa em populações do *T. cruzi* resistentes ao BZ, com intuito de investigar o papel desempenhado por esta enzima no fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas.

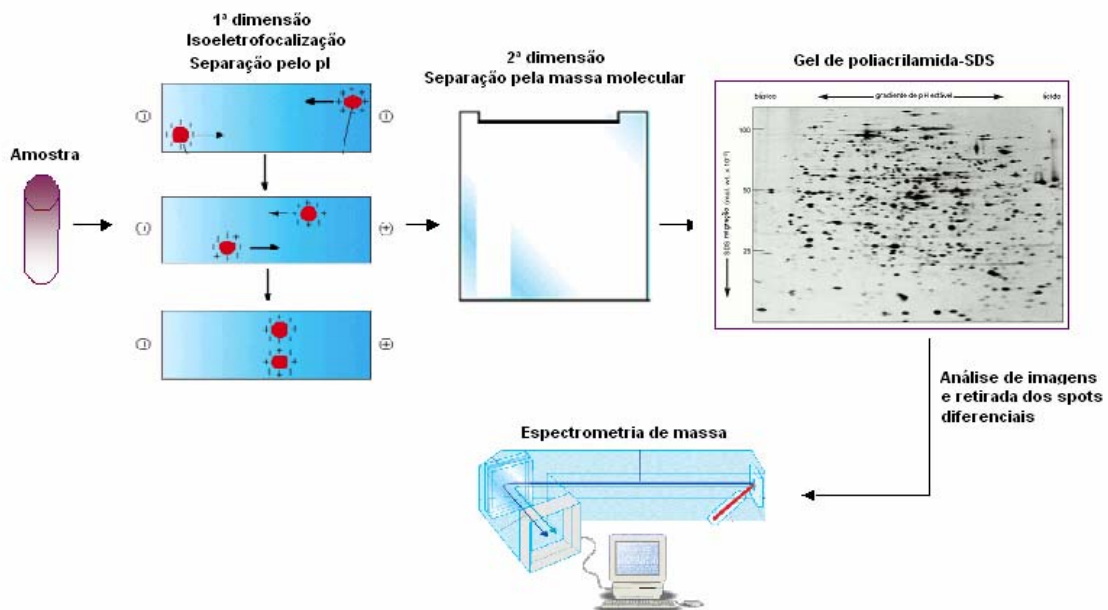


Figura 3. Esquema da eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas na 1ª dimensão pelo ponto isoelétrico e na 2ª pela massa molecular em gel de poliacrilamida-SDS. As proteínas se apresentam como manchas ou spots nos géis que são analisadas e retiradas para identificação por espectrometria de massa.

### 1.8 Tirosina aminotransferase

A Tirosina aminotransferase (TAT) é uma enzima chave em vias metabólicas, pois participa da biossíntese, degradação de aminoácidos aromáticos. Além disso compostos intermediários da via metabólica da TAT participa do



metabolismo de carboidratos (Sobrado *et al.*, 2003). Essa enzima tem sido encontrada em vários organismos tais como: mamíferos, plantas e protozoários (*Tetrahymena pyriformis* e *Crithidia fasciculata*) (Mavrides & D'Iorio, 1969; Constantsas *et al.*, 1971). Em humanos, a deficiência da atividade enzimática da Tirosina aminotransferase provoca uma doença autossômica recessiva, a Síndrome de Richner-Hanhart e seus sintomas são aliviados pela administração de uma dieta pobre em tirosina e fenilalanina (Hunziker, 1980). Liu e colaboradores (1992) observaram que em plantas, o ácido rosmarínico é formado a partir da via da TAT, um metabólito fenólico, que protege a planta contra estresse oxidativo. Em outro trabalho foi detectado o aumento da atividade da TAT e do Tocoferol (antioxidante) em plantas da espécie *Arabidopsis thaliana* sob estresse oxidativo (Hollander-Czytko *et al.*, 2005).

A presença e a localização subcelular da atividade enzimática da TAT em *T. cruzi* foi detectada no citosol e em baixas atividades na mitocôndria, descrita por Nowicki e colaboradores (1992). Posteriormente, o gene TcTAT foi seqüenciado e purificado de formas epimastigotas do parasito (Montemartini *et al.*, 1993). Bontempi e colaboradores (1993) ao caracterizarem o gene TcTAT observaram um transcrito de 2,0 Kb. O perfil de southern blot sugeriu a organização do gene em arranjos em tandem. Os autores também observaram que o número de cópias do gene por célula varia de 50-80 e o gene está presente em cromossomos de 900, 1000 e 2000 Kb. Em *T. cruzi*, a TAT está envolvida no metabolismo energético, sendo responsável pela conversão do produto final glicolítico, o piruvato, em lactato, um dos principais compostos excretados pelo parasito em meios de cultura (Frydman *et al.*, 1990). Os produtos restantes desta reação de transaminação, derivados piruvato-aromático, são reduzidos a lactatos aromáticos e uma desidrogenase específica conduz a redução de NADH citosólico dos parasitos (Montemartini *et al.*, 1994). Ambas reações podem representar uma rota secundária utilizada pelo *T. cruzi* para compensar a baixa atividade do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória (Figura 4) (Cazzulo *et al.*, 1994).

A TAT de tripanossomatídeos também está envolvida com a reciclagem de metionina, um aminoácido essencial para realização de inúmeros processos celulares, incluindo biossíntese de poliamina (Berger *et al.*, 1998). Esta função é importante particularmente para bactérias, parasitos e células cancerígenas que necessitam de rápido crescimento celular e por isso utiliza uma grande quantidade de poliamina.

Nowicki e colaboradores (2001) observaram que existem diferenças nos substratos específicos, propriedades catalíticas e papéis funcionais da TAT de *T. cruzi* em comparação com seu análogo de mamífero, sugerindo que essa enzima é alvo potencial para quimioterapia da doença de Chagas.

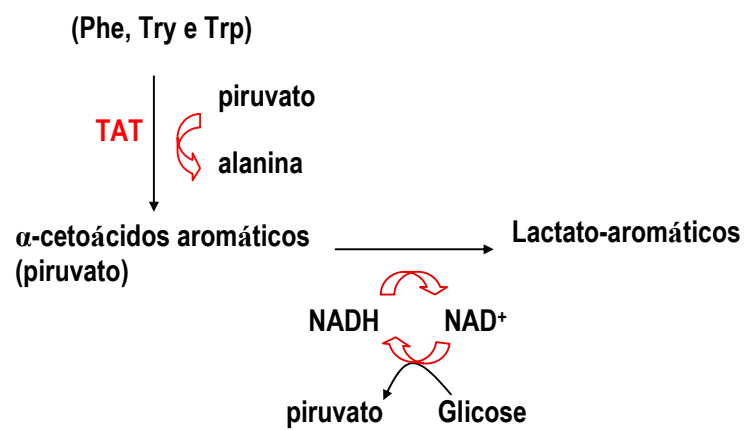


Figura 4: Metabolismo da Tirosina aminotransferase-TAT em *T. cruzi*

## **2 JUSTIFICATIVA**

A quimioterapia da doença de Chagas envolve algumas limitações tais como: a baixa eficácia do tratamento de casos humanos com BZ e NFX, efeitos colaterais consideráveis no tratamento humano, a existência de cepas do *T. cruzi* com resistência natural e a resistência cruzada entre o BZ e o NFX. A resistência à droga é um complicador para o tratamento da doença de Chagas, uma vez que os mecanismos moleculares ou alterações bioquímicas pelos quais os parasitos tornam-se resistentes ou susceptíveis a drogas, são ainda pouco conhecidos.

Em nosso laboratório, na busca de alvos que pudessem estar envolvidos com fenótipo de resistência a drogas, de Andrade e cols. (2005) realizaram um estudo proteômico de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Os autores identificaram a proteína Tirosina Aminotransferase como sendo superexpressa nas populações resistentes do *T. cruzi* ao BZ.

A Tirosina Aminotransferase (TAT) é uma enzima importante no metabolismo de aminoácidos aromáticos e compostos intermediários da via metabólica da TAT participa do metabolismo de carboidratos. Além disso, existem diferenças bioquímicas entre a TAT de mamíferos e a de *T. cruzi* (TcTAT) sugerindo que essa enzima é um alvo potencial para quimioterapia da doença de Chagas. Previamente, Bontempi e cols. (1993) realizaram uma caracterização da TAT do *T. cruzi*, entretanto não foi feito nenhum estudo de relação desse gene com o fenótipo de resistência ou susceptibilidade do *T. cruzi* a drogas. Diante disso, no presente trabalho selecionamos e caracterizamos a TAT no intuito de investigarmos seu papel no fenótipo de resistência a drogas.

### **3 OBJETIVOS**

#### *Geral*

Caracterizar o gene que codifica a enzima Tirosina aminotransferase (TcTAT) em populações e clones do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

#### *Específicos*

- Determinar o nível de mRNA do gene TcTAT em populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ;
- Determinar se há amplificação do gene TcTAT
- Localizar esse gene nos cromossomas do *T. cruzi*;
- Clonar, expressar e caracterizar a proteína recombinante rTcTAT;
- Avaliar o nível de expressão dessa proteína em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ ;

## 4 MÉTODOS

### 4.1- Amostras do *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho foram utilizadas populações e clones de *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol (BZR e Clone27R) e seus pares sensíveis (BZS e Clone9S) (Murta & Romanha, 1998) e um par de populações com resistência induzida *in vitro* ao benzonidazol o (17LER) resistente e seu par sensível (17WT) (Nirdé *et al.*, 1995). Além disso, foram utilizadas 9 cepas do *T. cruzi*, previamente caracterizadas por Filardi & Brener (1987) como sendo 4 naturalmente resistentes: Yuyu; Colombiana; VL-10 e Noel (Filardi & Brener, 1987) e 5 sensíveis: Cl Brener; Romano; Quaraizinho; Berenice e Buriti.

### 4.2- Cultivo das formas epimastigotas

As formas epimastigotas das cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foram cultivadas em meio Liver Infusion Triptose (LIT) e obtidas na fase exponencial de crescimento. Os parasitos foram lavados em PBS por 3 vezes e o sedimento foi congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3- Extração de RNA total

O RNA total das diferentes cepas do *T. cruzi* foi extraído com TRIZOL de acordo com o protocolo da INVITROGEN. O sedimento ( $1 \times 10^9$  epimastigotas) foi ressuspendido com 1 mL TRIZOL. Após adição de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, a suspensão foi homeogeneizada e incubada por 15 min no gelo e posteriormente centrifugada a 10.000 *g* por 10 min. Depois, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo o mesmo volume de isopropanol 95% e incubado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 12-18h. O RNA assim precipitado foi então lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em água, tratada com dietil pirocarbonato (DEPC), autoclavada e estéril. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorbância a 260nm = 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 4.4- Extração de DNA

O sedimento de epimastigota das populações sensíveis e resistentes foi ressuspendido em tampão de extração contendo 50mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0 e incubado com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteinase K por 12h a  $37^{\circ}\text{C}$ . 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  $-20^{\circ}\text{C}$  por 12h. Então o DNA foi lavado 2 vezes com etanol 70% e submetido a centrifugação, e depois foi ressuscitado em 100 $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0). A concentração do DNA total foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorvância a 260nm= 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **4.5- Northern blot**

O RNA total (15  $\mu\text{g}$ ) das diferentes cepas do parasito foi submetido à eletroforese em gel de agarose desnaturante e transferido para uma membrana de náilon (Hybond- Amersham Biosciences). Inicialmente, foi preparado um gel de agarose 1% (Sigma, St Louis, MO, E.U.A) em tampão MOPS 1X (0,04M MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM acetato de sódio pH 7,0) contendo 7,7% de formaldeído. As amostras de RNA contendo tampão de amostra foram aplicadas nas canaletas do gel e submetidas à eletroforese 50V por 4 h em tampão MOPS 1X (0,04M MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM acetato de sódio pH 7,0) acrescido de formaldeído 18,7% (vol/vol). As amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de náilon por capilaridade, durante a noite, usando tampão SSC 10X. Posteriormente, as membranas foram hibridizadas com a sonda específica do gene TcTAT marcada com fósforo radioativo  $\text{P}^{32}$ , segundo protocolo descrito por Dos Santos & Buck (1999).

#### **4.6- Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Os iniciadores TcTAT-F senso 5'CATGAGCTCGTGGGACGTTTC 3' e TcTAT-R antisenso 5'CTAAACGGCCGCGTGACGCT 3' foram desenhados a partir da seqüência nucleotídica depositada no banco de dados (GenBank, accession number XM\_816375). Esses iniciadores foram utilizados na PCR para amplificar o gene *TcTAT* para os ensaios de PCR de colônia e sondas. Cada reação continha tampão de reação (50mM KCl; e 10mM de Tris-HCl pH 8,5); 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ ; dNTPs (200 $\mu\text{M}$  de cada um dos desoxiribonucleotídeos); 10 pmoles de cada iniciador; 5U/ $\mu\text{L}$  de enzima Taq DNA Polimerase (INVITROGEN); DNA de *T. cruzi* (1ng/ $\mu\text{L}$ ) em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler (Eppendorf) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a

95°C por 5 min; 30 ciclos de 95° por 1 min, anelamento 50°C por 1 min e extensão 72°C por 1 min, e ao final dos 30 ciclos uma extensão final por 5 min a 72°C.

#### **4.7- Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida**

Três microlitros do produto de PCR, com tampão de amostra 2x, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% . Na polimerização do gel foi utilizado persulfato de amônio (APS) 10% (v/v) e TEMED (N,N,N', N',- tetrametil-etilenodiamina 0,05% v/v. Após a corrida eletroforética de 100V durante 40min, o gel foi fixado em 150mL de etanol a 10% (v/v) com 0,5% de ácido acético (v/v), e impregnado com nitrato de prata a 0,3%. Posteriormente, o gel foi lavado em água deionizada e revelado em solução aquosa de hidróxido de sódio 3% (p/v) com 0,5 % de formaldeído(v/v), até o aparecimento das bandas.

#### **4.8- Purificação do produto de PCR**

Os fragmentos de DNA, amplificados por PCR, foram purificados utilizando o Kit QIAquick, de acordo com as recomendações do fabricante (QIAGEN). Inicialmente foi adicionado um tampão com detergente PB ao produto de PCR, para ligação do DNA na coluna. O DNA ficou ligado na coluna e os outros componentes da reação de PCR (magnésio, tampão de reação e outros) foram lavados com tampão PE contendo etanol por centrifugação a 13 000 rpm por 1 min. Finalmente, o DNA foi eluído em 50 µL de água deionizada aquecida a 95°C.

#### **4.9- RT-PCR quantitativo em tempo real**

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para quantificar o mRNA do gene TcTAT. Inicialmente foi realizado a síntese de cDNA, utilizando 2µg de RNA total, 0,5 µg oligo d(T)<sub>11</sub> e a enzima transcriptase reversa SuperScript II conforme especificação da Invitrogen. Posteriormente, o cDNA foi submetido à amplificação por PCR quantitativo (ABI Prism 7000 - Applied BiosysteEM) com iniciadores TATRT-F senso 5' GATCCGGAGGCTCAAGGAC 3' e TATRT-R antisenso 3' TGAAGACCATGCCAGCGTAG 5' para amplificar o gene TcTAT. Para normalizar a quantidade de amostra analisada, foram utilizados iniciadores específicos do gene constitutivo hipoxantina guanina fosforibosil transferase do *T. cruzi* (TcHGPRT), com a seguinte seqüência de nucleotídeos TcHGPRT1 senso

5'CTACAAGGGAAAGGGTCTGC3' e TcHGPRT2 antisenso  
5'ACCGTAGCCAATCACAAAGG 3'.

As reações foram preparadas utilizando o Kit SYBR GREEN conforme instruções da Applied Biosystem. O corante SYBR GREEN intercala na fita dupla de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. As amostras foram submetidas aos ciclos de amplificação: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg e anelamento/extensão a 60°C por 1 min. As curvas padrão foram utilizadas na quantificação para cada experimento com uso das quantidades conhecidas do plasmídeo TOPO PCR 2.1 (Invitrogen) contendo o gene constitutivo de *T. cruzi* TcHGPRT e o gene TcTAT clonado.

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

#### 4.10- Southern blot

O número de cópias do gene TcTAT no genoma de *T. cruzi* foi estimado através da análise do perfil de restrição gerado pela endonuclease: *Xho*I. Aproximadamente 5µg de DNA total das diferentes cepas do *T. cruzi* foi digerido com a enzima de restrição *Xho*I, que corta internamente uma vez a seqüência do gene TcTAT, durante 16h à 37°C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, transferidos para uma membrana de náilon (Hybond-Amersham Biosciences) e hibridizados com a sonda do gene TcTAT marcada com fósforo radioativo P<sup>32</sup>.

#### 4.11- Sondas e Ensaios de hibridização

A sonda utilizada, com tamanho de 1251pb, nos ensaios de Southern e Northern blot foi preparada a partir da amplificação por PCR do DNA da cepa 17LER de *T. cruzi* com os iniciadores específicos para o gene TcTAT. Os produtos de PCR foram precipitados, purificados e marcados com [<sup>32</sup>P] dCTP conforme protocolo descrito por Feinberg & Vogelstein (1983). As membranas foram pré-hibridizadas em 15mL de solução G (1% BSA, 500mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA e 7% EDTA) (Church & Gilbert, 1984) durante 2h a 50°C. Posteriormente, a sonda foi desnaturada (95°C durante 5 min e depois 5 min no gelo), foi adicionada à solução G e incubada durante 14h à 60°C para Northern blot e 65°C para Southern blot. Após a



hibridização as membranas foram lavadas 4 vezes com SSC 2x (SSC 1X 150mM NaCl, 15 mM citrato de sódio) e 0,1% SDS à temperatura ambiente. Depois as membranas foram incubadas ao filme raio X (Kodak), a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 3 dias.

#### **4.12- Eletroforese de pulso alternado – PFGE**

A PFGE foi utilizada para localizar os genes da TAT nos cromossomas das diferentes amostras de *T. cruzi*. Os blocos de agarose contendo DNA dos parasitos foram preparados de acordo com protocolo descrito por Dos Santos & Buck (1999) e separados os cromossomas no aparelho “gene navigator™ system” (Pharmacia). Os blocos contendo as amostras foram colocados nos poços do gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 180V a  $9^{\circ}\text{C}$ . Conforme as condições padronizadas no LPCM, foi aplicado pulsos homogêneos (N/S e L/O) de 70 s por 9h, 90 s por 24 h, 200 s por 17 h e 400 s por 22 h. O gel foi corado com brometo de etídio ( $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e transferido, os cromossomas separados, para membrana de náilon. Posteriormente ensaios de hibridização foram preparados utilizando a sonda do gene TcTAT marcada com fósforo radioativo  $\text{P}^{32}$ .

#### **4.13- Obtenção do anticorpo policlonal anti-rTcTAT**

##### **4.13.1- Clonagem e expressão da proteína recombinante**

Inicialmente, os iniciadores foram desenhados TcTAT-1 senso 5'CGCGTCGACCATGAGCTCGTGGGACGTTTC 3' e TcTAT-2 antisenso 5'CGCAAAGCTTTCTAAACGGCCGCGTGACGCT 3'eos(GCT)6R6oi6(3.3(Mc4.9(i6(3.39iza)-4a

1 h e posteriormente, aquecemos a reação em 70°C por 15 min para inativação da enzima.

Para purificação, o produto de PCR e o plasmídeo digeridos foram utilizados na relação de quantidade de 3:1 e separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Após a separação do gel as bandas correspondentes foram excisadas e purificadas em coluna, conforme as recomendações do fabricante (Kit Qiaquick, QIAGEN).

O vetor pQE e o inserto foram submetidos à ligação utilizando 3 U/μL da enzima T4 DNA ligase (PROMEGA), a 15°C durante 12 h. As bactérias da linhagem TOP 10F' foram utilizadas para a transformação com o produto de ligação. Resumidamente, foram incubados 10 μL da reação da ligação em 100 μL de bactérias cálcio-competentes durante 30 min no gelo. Depois o tubo foi incubado à 42°C durante 30 segundos e resfriados no gelo. Posteriormente foi adicionado 1mL de meio Luria Bertani (LB) sem antibiótico e o tubo foi incubado a 37°C por 1h sob 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. Para confirmar a clonagem foi realizado PCR das colônias transformadas com iniciadores específicos para o gene TcTAT.

O plasmídeo contendo o gene TcTAT foi inserido em bactérias *E. coli* da cepa M15, com intuito de induzir a expressão da proteína recombinante. As bactérias da cepa M15 apresentam o plasmídeo pREP4, que possui o gene repressor Lac e o gene de resistência ao antibiótico Kanamicina. A transformação foi feita através de choque térmico nas seguintes condições: 5 μL do plasmídeo pQE 31 foi incubado com 100 μL de células cálcio competentes durante 30 minutos no gelo. Em seguida a amostra foi incubada a 42°C por 30 seg para choque térmico. A amostra foi adicionada em 1mL de meio LB sem antibiótico e incubada a 37°C por 1h com agitação. Posteriormente, as bactérias foram plaqueadas em meio LB agar contendo 100 μg/mL de ampicilina e 10 μg/mL de Kanamicina e incubadas na estufa a 37° C por 12h.

Para induzir a expressão da proteína recombinante, foi incubado uma colônia da bactéria cepa M15, positiva para o gene TcTAT, em meio LB com 100μg/mL de ampicilina e 10 μg/mL de Kanamicina, durante 14h a 37°C. Utilizamos 100 μL desse pré-inóculo para 100mL de meio LB com antibióticos. As bactérias foram incubadas à 37°C por 3h sob agitação. Quando atingiram OD<sub>600nm</sub> de 0,5 a 0,7 foi retirado 1mL da amostra não induzida para análise em SDS-PAGE. À cultura foi

adicionado 5mM IPTG para induzir a expressão das proteínas durante 2, 4 e 6h à 37°C. Após a indução, foi coletado 1mL da amostra para análise em SDS-PAGE. O restante da cultura foi centrifugado a 4000 xg por 20min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado a -20°C para purificação da proteína recombinante.

#### **4.13.2- Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.**

O gel foi preparado a partir de 0,8% de N.N'- metileno-bisacrilamida e 30% de acrilamida (p/v). No gel de separação a 10% foi adicionado 1,5M de Tris-HCl pH 8,8 e 0,01% de SDS . Para polimerização foi adicionado persulfato de amônio em água destilada (0,5% v/v) e TEMED (N,N,N',N' -tetrametil-etilenodiamina 0,05% v/v). Um gel de concentração 4% foi preparado utilizando 0,5M tris-HCl pH 6,8. Para eletroforese as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (SDS 10%, 0,5mM Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 1%, 2β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%), fervidas em banho-maria por 5 min e aplicadas nas canaletas do gel. A eletroforese foi submetida a 50V para o gel de concentração e a 100V para o gel de separação, em tampão de corrida (25mM de Tris-HCl, 192mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3). O gel foi corado com azul de Coomassie (azul de Coomassie brilhante R-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) à temperatura ambiente e descorado com a solução metanol 10% e ácido acético 5%.

#### **4.13.3- Teste de solubilidade da proteína recombinante rTcTAT**

Os sedimentos utilizados foram resultantes da expressão da proteína conforme item 4.13.1 .O sedimento foi resuspendido em 2mL de PBS 1x pH 8,0, adicionado 100µg/mL de lisozima e incubado no gelo durante 15 min. Posteriormente foi adicionado à solução 1mM de PMSF e 5mM de DTT (dithiothreitol). As amostras foram homogeneizadas e sonicadas 3x por 15 seg com pausas de 15seg no gelo. Em seguida a mistura foi passada por 20 vezes em uma seringa de 5mL e centrifugada a 8000 xg durante 10 min a 4°C. O sedimento e o sobrenadante foram coletados para análise em gel SDS-PAGE.

#### **4.13.4 Purificação da proteína recombinante rTcTAT**

##### **4.13.4.1 Purificação por cromatografia de afinidade**

A proteína rTcTAT foi purificada em condições desnaturantes, por cromatografia de afinidade em coluna contendo uma resina de ácido nitrilotriacético

com níquel ( $\text{Ni}^{2+}$  - NTA) (Qiagen), que se associa ao peptídeo de 6 histidinas presente na proteína recombinante rTcTAT. O sedimento resultantes das bactérias foram induzidas com IPTG e ressuspendidas em tampão de lise pH 8,0 contendo 100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris-HCl e 8M uréia (Tampão B). A partir do tampão B foi preparado os tampões C, D e E, com diferentes pH: 6,3 ; 5,9 e 4,5; respectivamente conforme as recomendações do fabricante (Qiagen). Os sedimentos foram eluídos nos tampões com diferentes pH e sendo as frações obtidas, analisadas em gel SDS-PAGE.

#### **4.13.4.2-Purificação por eletroeluição**

A proteína rTcTAT foi purificada por eletroeluição. A proteína recombinante foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida conforme item 4.13.2 . Posteriormente o gel foi incubado com uma solução de KCl 0,1M a 4°C que precipita as proteínas do gel tornando-as esbranquiçadas, sendo então realizada uma excisão da região do gel correspondente à proteína TcTAT. O fragmento do gel foi colocado em membrana de diálise com 3mL de tampão de corrida 1x filtrado (25mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS em pH 8,3) com as extremidades fechadas. A amostra foi submetida à eletroforese horizontal contendo tampão de corrida de proteína 1x durante 3h à 100V. Depois a corrente foi invertida por 10seg para que as proteínas se desprendessem da parede da membrana de diálise. O tampão contendo a proteína foi coletado e armazenado a -20°C.

#### **4.13.5- Dosagem de proteínas**

As proteínas totais e recombinante do *T. cruzi* foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Utilizando uma placa de ELISA de 96 poços foi confeccionada uma curva padrão utilizando albumina de soro bovino (BSA), em triplicatas nas seguintes concentrações: 0.4; 0.8; 1.2 e 1.6  $\mu\text{g}$  de BSA por poço. Para dosagem das proteínas totais do *T. cruzi*, foram utilizadas diluições 5,10 e 50 vezes da proteína concentrada. Para dosagem da proteína rTcTAT, foram utilizados os volumes de 5, 10 e 15  $\mu\text{l}$  da proteína concentrada e diluições de 5 e 10 vezes. Posteriormente, foi pipetado 20  $\mu\text{l}$  das amostras na placa e adicionado 180  $\mu\text{l}$  do reagente de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 50 mL etanol 95% e 100 mL ácido fosfórico 85%). A placa foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min e posteriormente submetida à leitura a 595nm em um leitor de ELISA (BIO-

RAD). A concentração das proteínas foi calculada com base na curva padrão da BSA.

#### **4.13.6- Imunização dos coelhos com a proteína recombinante purificada**

A proteína recombinante foi purificada conforme item anterior sendo inoculada (300µg) em coelhos (New Zeland White) para produção de soro policlonal específico anti- TcTAT. Os coelhos receberam 3 inoculações subcutâneas nos dias 0, 7 e 21, contendo 300µg das proteínas e  $\frac{1}{5}$  do volume de adjuvante de Freund (SIGMA). No primeiro dia de inoculação foi utilizado o adjuvante completo de Freund e nos dias subsequentes o adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). Como controle do adjuvante, um grupo de coelhos foi injetado apenas com a proteína e outro apenas com o adjuvante. O sangue dos coelhos foi coletado antes das inoculações (soro pré-imune), 15 e 30 dias após a última inoculação, sendo o soro congelado à -20°C para os ensaios de Western blot.

#### **4.14- Extração de proteínas totais**

O sedimento de parasitos foi ressuspensionado em 0,3 mL de tampão de lise contendo (50 mM de NaCl, 20 mM TRIS-HCl pH 8,0 e 1% de detergente NONIDET P-40), acrescido de 3 µl de uma solução estoque de coquetel de inibidores de proteases (PMSF 44,2 mg/mL, Pepstatina 68, 6 µg/mL, TPCK 2,0 mg/mL e TLCK 0,5 mg/mL) e homogeneizados com uma micropipeta automática. As amostras foram centrifugadas a 45000g por 1 hora a 4°C, o sobrenadante contendo o extrato protéico solúvel foi aliqotado e armazenado a -70°C.

#### **4.15- Western blot**

Ensaio de western blot foram realizados para determinar o nível de expressão da proteína TcTAT nas diferentes amostras do *T. cruzi*. As proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Posteriormente, a membrana foi corada com o corante Ponceau S (10% ácido acético e 1% de Ponceau S) para a confirmar a transferência das proteínas. Após lavagem com água, a membrana foi bloqueada com TBS-Tween 0,05% contendo 5% de leite desnatado por 1 h. Após lavagem em TBS-Tween, a membrana foi incubada com o soro de coelho anti-TcTAT diluído 1:5000 durante 1h. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-Tween 0,05% e incubada por 1 h com o conjugado anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina diluído a 1:5000 (Promega). Depois a membrana foi revelada

adicionando 33µl de BCIP (50 mg/mL em dimetil formamida 100%), 50µl de NBT (75mg/mL em dimetil formamida 70%) e 10 mL de tampão de revelação (TRIS-HCl 100mM pH 9,1 e MgCl<sub>2</sub> 5mM em água destilada).

#### **4.16- Análise Densitométrica**

A análise densitométrica da intensidade das bandas do gene e da proteína TcTAT visualizadas nos ensaios de Northern blot, Southern blot, localização cromossômica e Western blot foi realizada através do aparelho ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech), utilizando o programa “ImageMaster VDS software”. A imagem foi capturada pelo aparelho VDS e as análises realizadas pelo programa. Diferenças em densidade ótica  $\geq 1,5$  foram consideradas significativas.

#### **4.17- Sequenciamento**

Para confirmar o gene de estudo, o TcTAT da cepa WT do *T. cruzi* foi sequenciado. O produto de PCR do gene TcTAT foi clonado em bactérias *E. coli* da cepa TOP10F' utilizando o plasmídeo TOPO. O DNA plasmidial de 5ml de cultura de bactérias crescidas por 12 h foi extraído através do Kit comercial de mini-prep (Qiagen). O sequenciamento foi repetido 3 vezes com cada primer (forward e reverse). A seqüência foi comparada com o banco de dados do NCBI.

## 5 RESULTADOS

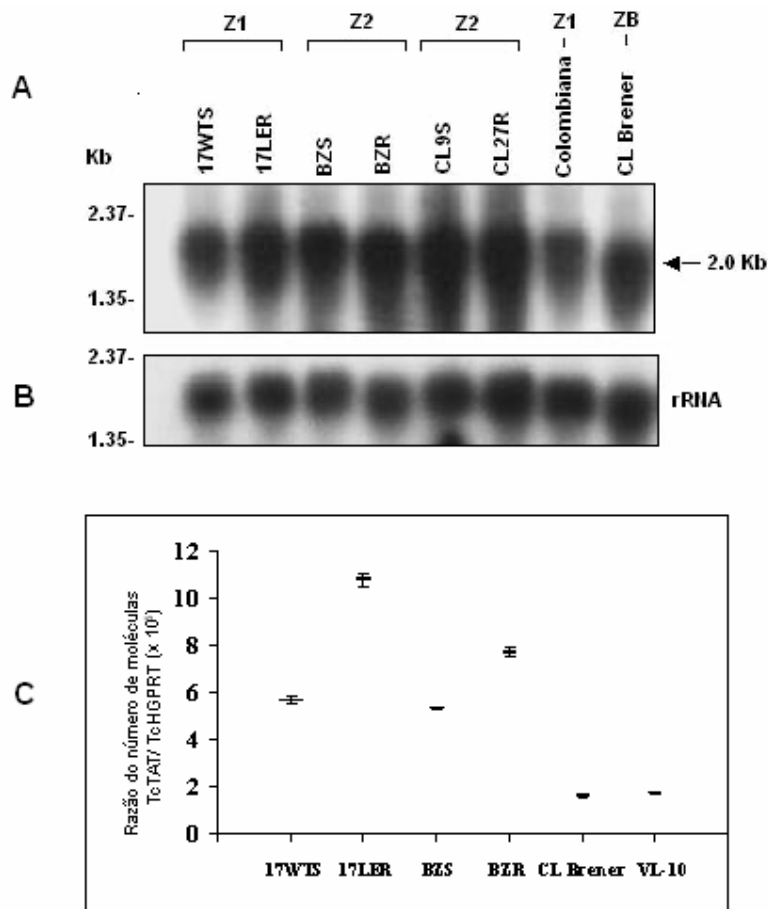
### 5.1- Análise do nível de mRNA do gene TcTAT em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol

Com intuito de determinar o nível de mRNA do gene TcTAT nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, realizamos ensaios de Northern blot e RT-PCR quantitativo em tempo real.

O perfil do RNA hibridizado do gene TcTAT nas amostras estudadas revelou um transcrito de 2,0Kb (Figura 5A). A análise densitométrica da intensidade do transcrito normalizado com o controle quantitativo, o RNA ribossomal (Figura 5B), mostrou que o nível do mRNA do gene TcTAT na população 17LER foi 1,5 vezes maior, em relação ao seu par sensível 17WTS. Não detectamos diferenças significativas no nível de mRNA dos transcritos das demais populações quando comparamos os pares BZS/BZR, Clone 27R/9S e Colombiana(R)/Cl Brener(S).

Para o ensaio de PCR quantitativo em tempo real, inicialmente foi obtido uma curva padrão com as diluições ao décimo do plasmídeo dos genes clonados TcTAT ( $10^7$  a  $10^4$ ) e TcHGPRT ( $10^9$  a  $10^6$ ). Para ambos os genes, a intensidade de fluorescência de cada amostra foi devida ao composto fluorescente, "SYBR green" que se intercala na dupla fita de DNA. Esta fluorescência é proporcional à quantidade de cDNA que foi expresso pelo valor do ciclo da PCR na fase exponencial utilizando como base de análise do  $C_T$  (cycle threshold) que é o ponto que permite a quantificação exata de moléculas baseado na fluorescência. Observamos que ambas as curvas padrão apresentaram uma boa linearidade ( $r^2=0,9385$  para TcTAT e  $r^2=0,9931$  para TcHGPRT) para uma ampla faixa de concentração de plasmídeos (dados não mostrados). Além disso, analisamos a curva de dissociação de cada gene. Observamos para ambos os genes TcTAT e TcHGPRT um único produto de PCR amplificado mostrando a especificidade da reação com os iniciadores utilizados (dados não mostrados).

Por interpolação na curva padrão a quantidade de moléculas de cDNA do TcTAT foi obtida para diferentes cepas de *T. cruzi*. Os valores de  $C_T$  obtidos foram utilizados a partir da curva padrão gerada com as quantidades conhecidas dos plasmídeos do gene TcTAT e normalizados com os valores do gene constitutivo, unicópia, TcHGPRT do *T. cruzi*. O gráfico (Figura 5C) mostra nível de mRNA do gene TcTAT duas vezes maior na população 17LER, comparado com a população



**Figura 5:** Nível de mRNA do gene TcTAT em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. (A) Perfil do northern blot hibridizado com uma sonda específica do gene TcTAT marcada com  $^{32}\text{P}$ . (B) Como controle quantitativo a mesma membrana foi marcada com uma sonda do gene do RNA ribossomal do *T. cruzi*. (C) Número de moléculas do gene TcTAT normalizadas com o gene constitutivo, unicópia, TcHGPRT em populações do *T. cruzi* S e R ao BZ, quantificado por RT-PCR em tempo real.



17WTS. Além disso, um aumento de 1,5 vezes foi observado desse gene na população BZR, em relação ao seu par sensível BZS.

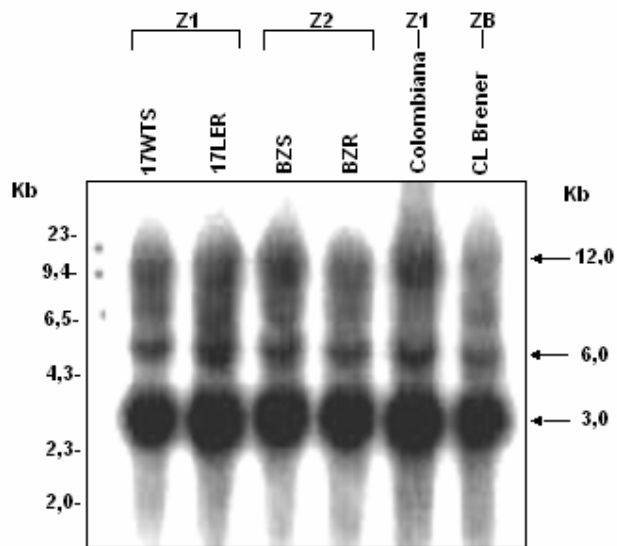
## **5.2- Organização genômica e número de cópias do gene TcTAT**

O número de cópias do gene TcTAT foi analisado com o objetivo de observar se esse gene está amplificado no genoma da população de *T. cruzi* resistente ao BZ. Ensaio de Southern blot foram realizados a partir da digestão do DNA genômico de cepas do *T. cruzi* com a enzima de restrição *Xho*I, que apresenta apenas um sítio de restrição na seqüência do gene TcTAT. O perfil hibridizado com a sonda do gene TcTAT revelou fragmentos de 3, 6 e 12 Kb em todas as populações analisadas (Figura 6), sendo um perfil típico de múltiplas cópias em “tandem”. As amostras observadas apresentaram a mesma intensidade e número de bandas. Os resultados mostram que não houve diferença no número de cópias desse gene entre as diferentes cepas do *T. cruzi* analisadas e que a banda de 3,0 Kb foi a mais intensa. Observamos que o perfil de Southern blot não teve associação com fenótipo de resistência e nem com zimodema.

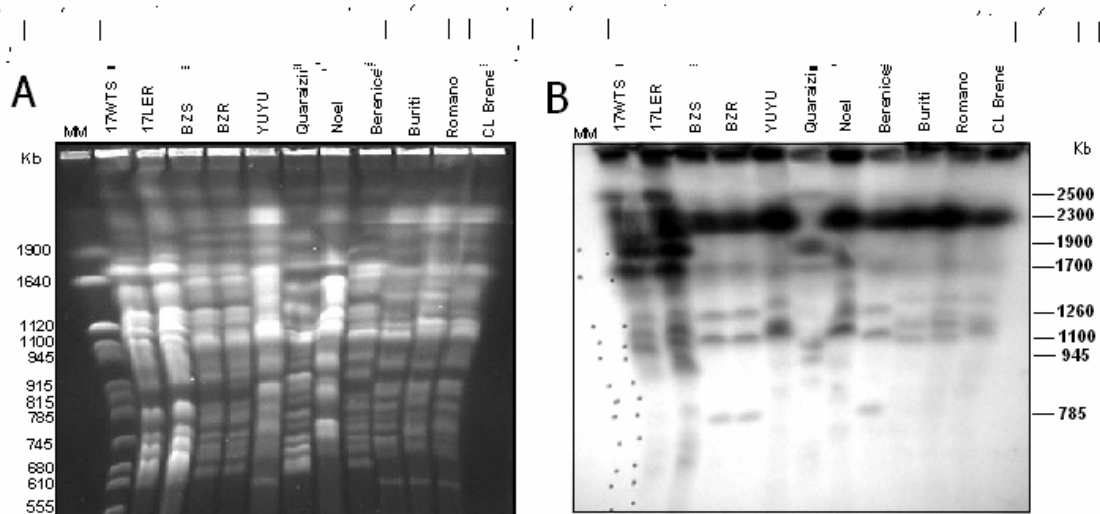
## **5.3- Localização do gene TcTAT nos cromossomas do *T. cruzi***

Com intuito de avaliar a distribuição cromossômica do gene TcTAT no genoma do parasita, os cromossomas das diferentes cepas do *T. cruzi* foram separados por eletroforese de pulso alternado (PFGE) conforme descrito no item 4.12.

A Figura 7A mostra o perfil dos cromossomas das amostras de *T. cruzi* separados por PFGE e corado com brometo de etídio. A hibridização dos cromossomas com a sonda do gene TcTAT-P<sup>32</sup> mostrou que esse gene está presente em 8 bandas cromossômicas que variaram de 785 a 2500 Kb (Figura 7B e Tabela 1). Não houve relação entre perfil observado e resistência drogas ou o zimodema da amostra. As bandas mais intensas variaram de 1700 a 2500Kb. As amostras 17WTS e 17LER apresentaram perfis mais complexos e a amostra quaraizinho menos complexo.



**Figura 6:** Southern blot do gene TcTAT de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. O DNA genômico de cada cepa foi digerido com a endonuclease *Xho*I e hibridizado com a sonda do gene TcTAT, marcada com  $^{32}\text{P}$ .



**Figura 7:** Localização cromossômica do gene TcTAT no genoma do *T. cruzi* de diferentes cepas e zimodemas. (A) Bandas cromossômicas do *T. cruzi* separadas por PFGE em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídio.(b) Perfil hibridizado com a sonda específica do gene TcTAT marcada com  $^{32}\text{P}$ . Padrão de massa molecular representa os cromossomas do *Saccharomyces cerevisiae* (AMERSHAM).

TABELA 1. Populações e clones do *Trypanosoma cruzi* utilizadas neste estudo e a localização cromossômica do gene *TcTAT*.

Cepas <i>T. cruzi</i>	Origem <sup>a</sup>	Hosp <sup>b</sup>	Susceptibilidade <sup>c</sup>	Zimodema <sup>d</sup>	Localização cromossômica TcTAT (Kb)
<b>17 WTS</b>	Mex	Triatomínio	S	1	945; 1000; 1100; 1260; 1700; 1900; 2300; 2500
<b>17 LER</b>	Mex	Triatomínio	R	1	945; 1000; 1100; 1260; 1700; 1900; 2300; 2500
<b>Yuyu</b>	BA	<i>Triatoma infestans</i>	R	1	1100;1260;1700; 2300;
<b>Colombiana</b>	Col	Human F.C	R	1	ND <sup>e</sup>
<b>Quaraizinho</b>	RS	<i>T. infestans</i>	S	1	945; 1100;1700;1900;2500
<b>Berenice</b>	MG	Human F. A.	S	2	785; 1100;1260;1700; 2300
<b>BZS</b>	SP	Human F. A.	S	2	785; 1100;1260;1700; 2300
<b>BZR</b>	SP	Human F. A.	R	2	785; 1100;1260;1700; 2300
<b>Clone 9S</b>	SP	Human F. A.	S	2	785; 1100;1260;1700; 2300
<b>Clone 27R</b>	SP	Human F. A.	R	2	785; 1100; 1260; 1700; 2300
<b>Noel</b>	MG	Human F. A.	R	2	1000; 1260; 1700; 2300
<b>VL-10</b>	MG	Human F.C	R	2	ND <sup>e</sup>
<b>Cl Brener</b>	RS	<i>T. infestans</i>	S	B	1000; 1100;1300; 2300
<b>Romano</b>	Arg	Human F. A.	S	B	1000; 1100;1300; 2300
<b>Buriti</b>	RS	<i>T. infestans</i>	S	B	1000; 1100;1300; 2300

<sup>a</sup> Origem das cepas: Mex- Mexico; SP- São Paulo; BA- Bahia; Arg- Argentina; RGS- Rio Grande do Sul; Col- Colombia; <sup>b</sup> F.A.- Fase aguda e F.C.- Fase crônica da doença de Chagas. <sup>c</sup> Susceptibilidade, *in vivo* das cepas de *T. cruzi* a droga (Filardi and Brener, 1987); S, sensíveis; R, resistentes; <sup>d</sup>Classificação de zimodema das cepas de *T. cruzi* (Murta *et al.*, 1998), <sup>e</sup>ND- não determinado,

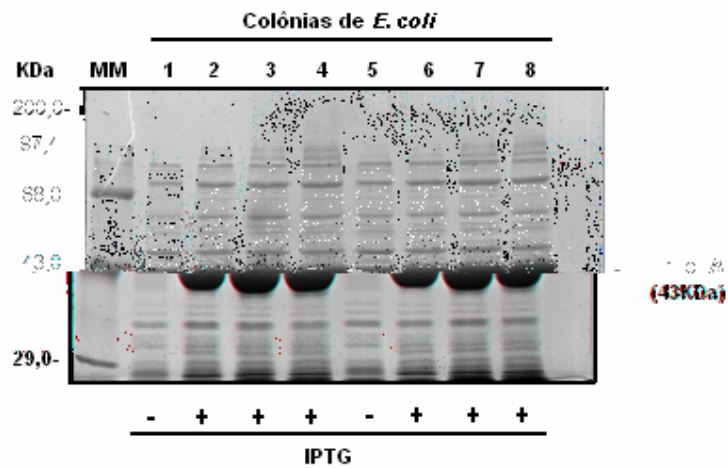
#### **5.4-Clonagem e expressão da proteína recombinante TcTAT**

Com objetivo de avaliar os níveis expressão da proteína TAT nas populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, clonamos e expressamos a proteína recombinante rTcTAT em bactérias, para produção de anticorpos policlonais. Para clonagem, digerimos o plasmídeo pQE e o produto de PCR do gene TcTAT com as enzimas de restrição *Sall* e *HindIII*. Posteriormente, realizamos uma reação de ligação do produto de PCR no vetor pQE. O plasmídeo recombinante foi transferido para *E. coli*. Confirmamos a eficiência da clonagem através da PCR de colônia conforme descrito no Item 4.6. A análise do gel de poliacrilamida com os produtos de PCR mostrou a presença do fragmento de 1251pb em todas as colônias de bactérias analisadas, correspondente à seqüência codificante do gene TcTAT (dados não mostrados).

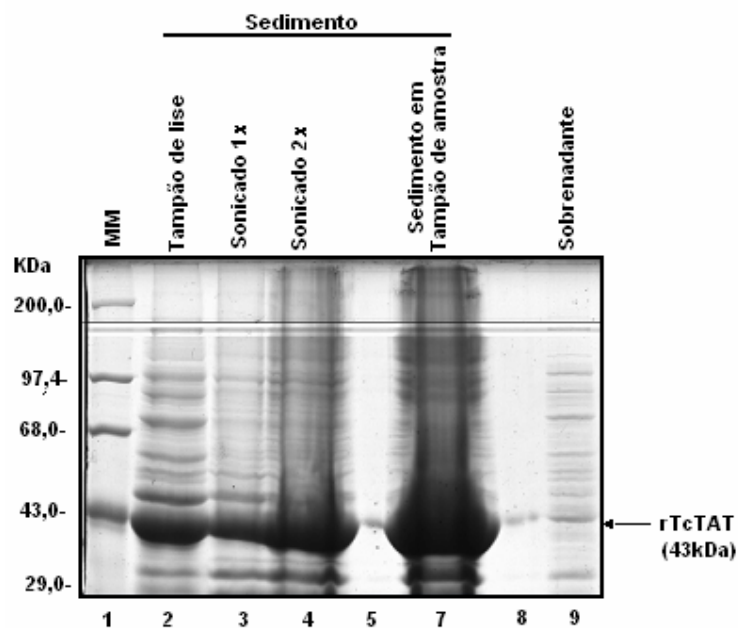
A expressão da proteína recombinante foi realizada em bactérias *E. coli* cepa M15 induzidas com IPTG. O IPTG é um análogo da lactose, que se liga à proteína repressora Lac. Essa proteína repressora Lac na ausência de lactose permanece ligada à região operadora, impedindo a transcrição do gene. Na presença do IPTG, esta proteína repressora se desliga e induz a transcrição e expressão da proteína recombinante. Após a indução das culturas transformadas, os extratos bacterianos foram preparados e submetidos à eletroforese SDS-PAGE (Figura 8). Análise do perfil eletroforético dos extratos protéicos na presença de IPTG mostrou um polipeptídeo de ~43kDa de intensidade forte. Esse tamanho corresponde à proteína recombinante rTcTAT fusionada a um peptídeo de 6 histidinas na sua porção aminoterminal (canaletas 2, 3, 4, 6, 7 e 8). Como esperado, a proteína recombinante não foi expressa pelas bactérias na ausência de IPTG (canaletas 1 e 5). Através do sequenciamento do produto de PCR da cepa WT de *T. cruzi* e blast da seqüência no NCBI confirmamos que o gene em estudo é o TcTAT (resultados não mostrados).

#### **5.5- Teste de solubilidade da proteína rTcTAT**

Com intuito de verificar a solubilidade da rTcTAT um ensaio foi realizado como descrito no item 4.13.3. A parte solúvel (sobrenadante) e a insolúvel (sedimento) da amostra foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE 10% (Figura 9). Observamos a presença da proteína recombinante rTcTAT (~43kDa) no sedimento (canaletas 2, 3, 4, 6, Figura 9), verificando que a proteína é insolúvel



**Figura 8:** Expressão da proteína recombinante rTcTAT do *T. cruzi*, em *E. coli* M15, induzida com IPTG. SDS-PAGE 10% corado com Coomassie blue. MM-Marcador de massa molecular.



**Figura 9** : Teste de solubilidade da proteína recombinante rTcTAT do *T. cruzi*. SDS-PAGE 10% corado com Coomassie blue. MM- marcador de massa molecular (canaleta 1), sedimento de bactérias da cepa M15 com tampão de lise (canaleta 2). sedimento em tampão de lise sonificado 1 e 2 × (canaletas 3 e 4), sedimento em tampão de amostra (canaleta 7) e sobrenadante (canaleta 9).

nas condições utilizadas na expressão. Na fração solúvel, visualizamos apenas as proteínas específicas das bactérias.

## **5.6- Purificação da proteína recombinante rTcTAT**

### **5.6.1- Purificação por resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni<sup>2+</sup> -NTA)**

A proteína recombinante rTcTAT foi purificada utilizando uma resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni<sup>2+</sup> -NTA) conforme descrito no item 4.13.4.1. A proteína rTcTAT foi eluída em tampão uréia 8M contendo Tris e fosfato, com pH decrescente (8,0; 6,3; 5,9 e 4,5). As frações de pH 4,5 foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE (canaletas 2, 3, Figura 10). Observamos a eluição da proteína rTcTAT com a presença de uma banda fraca de aproximadamente (~43kDa), verificando que este método de purificação não foi eficiente.

### **5.6.2- Purificação por eletroeluição**

A proteína recombinante rTcTAT foi purificada por eletroeluição como descrito no item 4.13.4.2. Observamos que a purificação da proteína rTcTAT por eletroeluição apresentou uma banda forte de 43kDa, mostrando maior eficiência nesta purificação (canaleta 4, Figura 10). Posteriormente, a preparação de proteína recombinante TcTAT foi quantificada pelo método de Bradford que apresentou uma concentração de 0,3µg/ µL. A partir de 500mL de cultura de bactérias foi obtido 1,2 mg de proteína recombinante purificada.

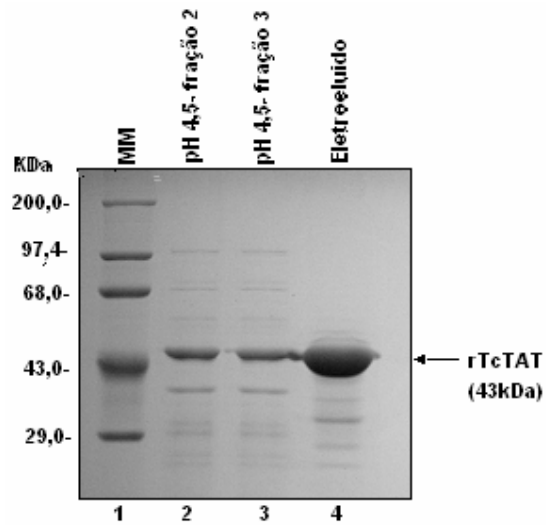
## **5.7- Nível de expressão da proteína rTcTAT em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.**

Inicialmente a produção de anticorpo policlonal anti-rTcTAT foi induzida imunizando coelhos com a proteína recombinante como descrito no item 4.13.6. Posteriormente, a expressão da proteína recombinante rTcTAT foi avaliada nas diferentes cepas do *T. cruzi* através de ensaios de Western blot. Os extratos protéicos totais das formas epimastigotas de diferentes populações do parasita foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE (Figura 11A). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-rTcTAT. Observamos que o anticorpo foi bastante específico reconhecendo apenas um polipeptídeo com tamanho esperado (~42kDa) para todas as cepas do *T. cruzi* analisadas (Figura 11B). Como controle positivo utilizamos a proteína recombinante rTcTAT purificada que apresentou uma massa molecular de (~43kDa), cerca de 1kDa maior do que a proteína nativa devido à presença do

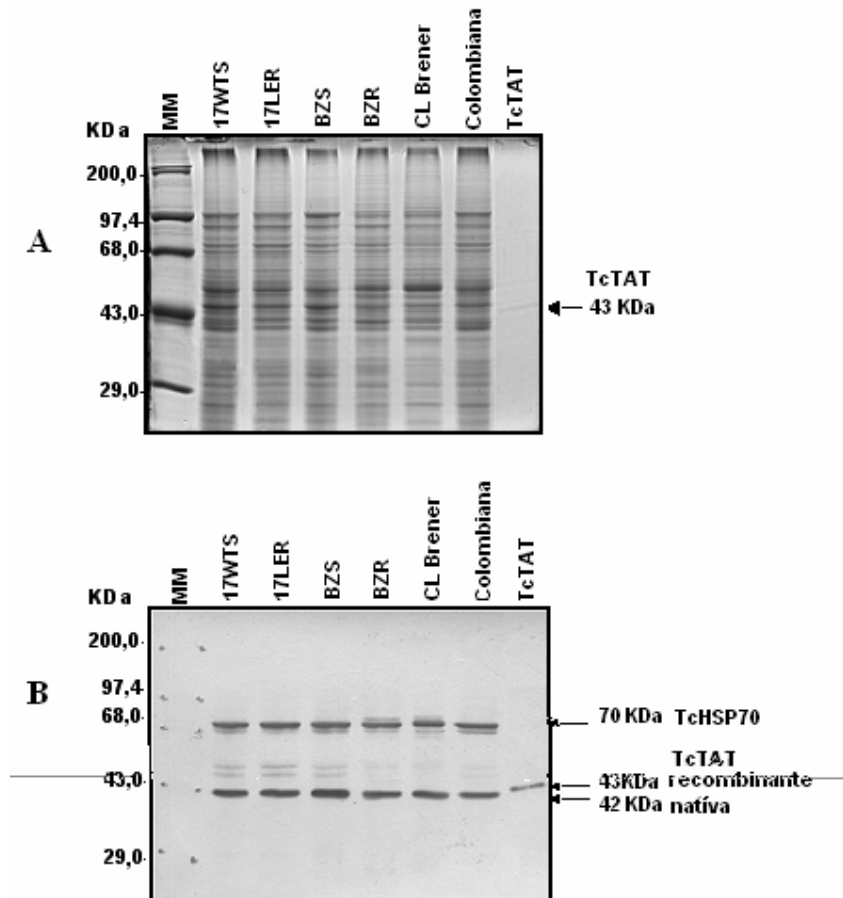


hexapeptídeo de histidina. Para melhor quantificar o nível de expressão da proteína incubamos a mesma membrana com anticorpo policlonal de coelho anti-rTcHsP70. O nível de expressão da proteína TcHSP70 em cepas do *T. cruzi* S/R- BZ foi realizado por Fernanda Freire em sua monografia em 2004, em nosso laboratório. Freire observou que não houve diferença no nível de expressão da proteína TcHsP70 entre cepas sensíveis e resistentes ao BZ.

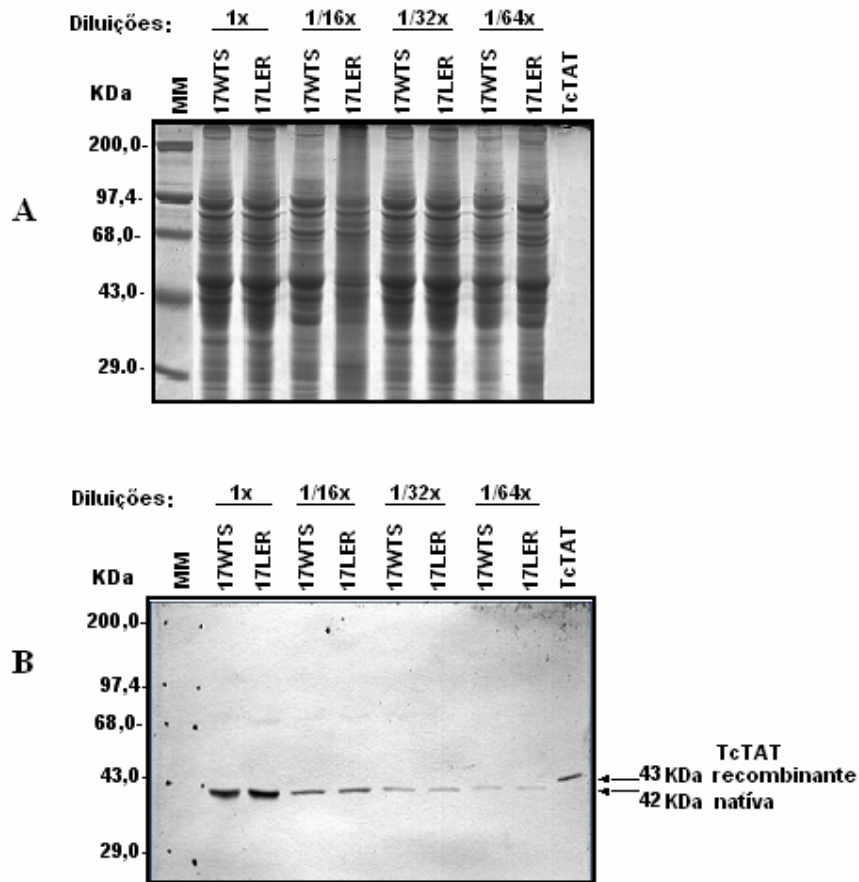
No ensaio de Western blot foi realizada análise densitométrica utilizando TcHsP70 como normalizador e que as populações de *T. cruzi* estudadas apresentaram o mesmo nível de expressão da proteína TcTAT, independente do fenótipo de resistência a drogas (Figura 11B). Com intuito de comprovar o nível de expressão da proteína TcTAT, realizamos diluições seriadas de extratos protéicos das populações 17WTS e 17LER (Figura 12A). Após a incubação com anticorpo anti-rTcTAT, foi observado que não há diferença na intensidade da banda entre as populações 17WTS e 17LER (Figura 12B).



**Figura 10:** Purificação da proteína recombinante rTcTAT fusionada a 6 histidinas. SDS-PAGE 10% corado com Coomassie blue. Utilizamos para purificação uma resina de ácido nitrilotriacético com níquel ( $\text{Ni}^{2+}$  - NTA) (canaletas 2 e 3) e a proteína purificada por eletroeluição (canaleta 4). MM- Marcador de massa molecular (canaleta 1).



**Figura 11:** (A) Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas de populações *do T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. SDS-PAGE 10% corado por Coomassie blue; MM-Marcador de massa molecular; (B) Western blot utilizando anticorpo policlonal de coelho contra a proteína recombinante rTcTAT e como controle quantitativo incubamos posteriormente a mesma membrana com anticorpo policlonal de coelho contra a proteína recombinante rTcHSP70;



**Figura 12:** (A) Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas das duas populações do *T. cruzi* diluídas, 17WTS e 17LER. SDS-PAGE 10% corado por Coomassie blue; MM-Marcador de massa molecular; (B) Western blot de extrato proteico das populações 17WTS e 17LER diluídas 16,32 e 64 x e incubadas com o anticorpo anti-TcTAT;

## 6 DISCUSSÃO

A quimioterapia da doença de Chagas está restrita ao Benzonidazol (BZ) e ao Nifurtimox (NFX). Ambos os compostos apresentam limitações como à baixa eficácia de cura na fase crônica da doença (8%), efeitos colaterais consideráveis e a existência de cepas naturalmente resistentes. Os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência do *T. cruzi* a drogas ainda não são conhecidos.

A abordagem proteômica é uma poderosa ferramenta para estudo da função das proteínas (Tyers and Mann, 2003). Estudos proteômicos de resistência a drogas têm identificado proteínas diferencialmente expressas em *Helicobacter pylori*, *Leishmania major* e *Staphylococcus aureus* (McAtee *et al.*, 2001; Drummel-Smith *et al.*, 2003; Scherl *et al.*, 2006). Recentemente em nosso laboratório foi utilizado a proteômica (bi-dimensional e espectrometria de massa) para identificar proteínas diferencialmente expressas nas populações do *T. cruzi* sensíveis (S) e resistentes (R) ao BZ. Na análise do perfil proteômico foram identificadas 27 proteínas superexpressas em populações do *T. cruzi* R (de Andrade *et al.*, 2005). Neste projeto selecionamos para caracterização a proteína Tirosina Aminotransferase que foi superexpressa em populações do *T. cruzi* R ao BZ.

As Tirosina Aminotransferases são proteínas chaves em vias metabólicas, pois estão envolvidas na biossíntese, degradação de aminoácidos e metabolismo de carboidratos (Sobrado *et al.*, 2003). Esta enzima catalisa a transferência de uma amina do aminoácido para um cetoácido participando da via metabólica de catabolismo de aminoácidos aromáticos juntamente com uma  $\alpha$ -hidroxiácido desidrogenase (Cazzulo *et al.*, 1994).

Em nosso estudo as análises de Northern blot do gene TcTAT mostraram um transcrito de 2,0 Kb para todas as 8 cepas do *T. cruzi* S ou R analisadas. Estes resultados estão de acordo com os dados descritos por Bomtempo e cols. (1993) que utilizaram a forma epimastigota de clones CA-1/72 e Dm28c e as cepas Tulahuén 2 e RA do *T. cruzi*. Os resultados de RT-PCR quantitativo em tempo real e Northern blot revelaram um aumento de aproximadamente duas vezes no nível de mRNA do gene TcTAT na população 17LER, comparada com a 17WTS e um aumento de 1,5 vezes desse gene na população BZR comparada com a BZS. Baki e Alexis (1994) relataram aumento de 5 vezes nos níveis de mRNA total e nuclear da TAT em ratos após serem tratados com tetrahydroxi, triamcinolone acetona e cicloheximida, e serem submetidos a uma parcial hepatectomia. Baki e cols. (1996) observaram um

aumento no nível de mRNA da TAT em hepatócitos primários de ratos após tratamento com glucocorticóides. Lopukhina e cols. (2001) reportaram o isolamento e caracterização da TAT da planta, *Arabidopsis thaliana*, que foi detectada por diferencial display, a partir de plantas tratadas com coronatina, um composto fitotóxico. Os autores observaram aumento nos níveis de mRNA e da proteína da TAT em plantas tratadas com esse composto. Os autores sugerem que a planta sob estresse produz um composto na via da TAT, a prenilquinona, que neutraliza as espécies reativas de oxigênio produzidas. Uma alta concentração deste composto aumenta a atividade da TAT. A maioria das plantas reagem ao estresse pela ativação da transcrição de determinados genes que tem papel na defesa ou no reparo. Hollander-Czytko e cols. (2005) observaram um aumento da atividade da TAT e do Tocoferol (antioxidante) em *A. thaliana* sob estresse oxidativo. Duret e cols. (2006) observaram que os azóis, antifúngicos, miconazol e ketoconazol inibem a expressão do mRNA da TAT em hepatócitos humanos. Em *T. cruzi* observamos um aumento no mRNA da TAT das populações resistentes 17LER e BZR, mas que não correspondeu a um aumento do nível de expressão da proteína. Então sugerimos que a ação de estresse produzido pelo BZ possa provocar esse aumento da transcrição da TAT.

Análises do nível de expressão da proteína rTcTAT em cepas do *T. cruzi* mostraram que o anticorpo policlonal anti-rTcTAT foi bastante específico e reconheceu uma banda de ~42kDa em todas as cepas do *T. cruzi* analisadas, estando de acordo com os dados da literatura (Bontempi *et al.*, 1993). Nenhuma diferença significativa foi observada no nível de expressão da proteína TcTAT entre as populações analisadas. Entretanto o nível de mRNA do gene TcTAT foi o dobro nas populações do *T. cruzi* resistentes (17LER e BZR). É possível que processos de trans-splicing, ação de proteasoma, mutações nas regiões 5' ou 3' UTR ou degradação do mRNA do gene TcTAT das cepas resistentes possam estar ocorrendo, não produzindo um aumento proporcional da expressão da proteína TcTAT nessas cepas. Alguns estudos reforçam nossa hipótese, pois a regulação da expressão gênica de tripanosomatídeos acontece principalmente a nível pós-transcricional (Vanhame & Pays, 1995). Baki e cols. (1996) mostraram o envolvimento do mecanismo pós-transcricional na regulação do mRNA da TAT em hepatócitos de ratos induzidas por glucocorticóides. Outros estudos mostram a degradação da TAT mediada por sistemas proteolíticos de ubiquitina (Ciechanover *et al.*, 1997; Gross-Mesilaty *et al.*, 1997). Além disso a instabilidade do mRNA pode

contribuir para esta diminuição da proteína uma vez que existem relatos do efeito de fatores de ligação de RNA. No estudo proteômico realizado em nosso laboratório foi identificada a proteína TcTAT como sendo superexpressa na população resistente ao BZ. Entretanto, os nossos resultados de western blot mostram níveis iguais desta proteína nas cepas de *T. cruzi* analisadas. Isto pode ser devido a pequenas variações na intensidade dos spots observados sejam por variações experimentais na quantificação da proteína. Além disso, os ensaios de western blot apresentam maior sensibilidade para determinar a diferença de expressão da proteína, uma vez que foi utilizado anticorpo policlonal específico anti-TcTAT.

Análises de Southern blot do DNA genômico de 6 cepas do *T. cruzi* S ou R ao BZ digeridas com endonuclease foram realizadas. O perfil hibridizado com a sonda do gene TcTAT revelou um perfil típico de múltiplas cópias em “tandem”, estando de acordo com dados descritos por Bontempi e cols. (1993) que utilizaram DNA genômico da cepa Tulahuen do *T. cruzi*. Os autores estimaram o número de cópias do gene *TcTAT* entre 50 a 80 por parasito com 20 a 25 repetições por arranjos. Outro estudo mostrou que a TAT de *T. rangeli* apresenta a mesma organização gênica do *T. cruzi* (Bontempi *et al.*, 2000). A organização genômica apresentada pelo gene TcTAT é muito comum no *T. cruzi*, pois a maioria dos genes apresentam uma organização em tandem como cisteína-proteinases ubiquitina, proteínas de choque térmico e outros (Campetella *et al.*, 1992; Swindle *et al.*, 1988; Dragon *et al.*, 1987). Por outro lado, alguns genes como o da DNA Topoisomerase II (Fragoso *et al.*, 1992), HGPRT e outros estão presentes em uma única cópia no genoma do parasito. Guimond e cols. (2003) utilizaram a metodologia de microarranjo de DNA para estudar a expressão de 44 genes envolvidos na resistência de *Leishmania spp.* ao metotrexato. Os autores observaram que desses genes quatro ( $\gamma$ - glutamilcisteína sintetase, P-glicoproteína A, pteridina redutase 1 e dihidrofolato-redutase-timidilato-sintase ) estavam superexpressos e amplificados no genoma dos parasitas resistentes. Enquanto outros três genes (glutathiona sintetase, S-adenosilhomocisteína hidrolase e S-adenosilmetionina sintetase) apesar de estarem superexpressos nos parasitas R, eles não estão amplificados no genoma. Os autores sugerem que mutações nas regiões 5' ou 3' UTR podem explicar o aumento no nível de mRNA sem que haja a amplificação desses genes no genoma do parasita. Nossos resultados apesar de mostrarem um aumento do nível de mRNA do gene TcTAT nas populações resistentes do *T. cruzi* 17LER e BZR, os resultados de

Southern indicam que este gene não está amplificado nas populações 17LER e BZR.

Nossos resultados de cariótipo molecular de 10 cepas do *T. cruzi* S ou R revelaram que o gene TcTAT está presente em 8 bandas cromossômicas que variaram de 785 a 2500 Kb, concordando com os resultados de Bontempi e cols. (1993) que utilizaram outras 9 cepas. Em nosso estudo não houve relação entre o perfil observado, a resistência a drogas ou zimodema. Henriksson e cols. (1996) no estudo de cariótipo observaram uma grande diversidade no cariótipo entre as cepas do *T. cruzi*. Essa variabilidade cromossômica pode ocorrer devido à presença de cromossomas homólogos com diferentes tamanhos, à variação do tamanho do telômero ou a ocorrência de pequenas deleções ou inserções.

Em resumo, nossos resultados mostram que a TcTAT não está diretamente associada com o fenótipo de resistência a drogas. Entretanto, isto não exclui que a TcTAT possa atuar via mecanismo compensatório secundário, juntamente com outros genes ou participar de um mecanismo de resposta a estresse produzido pelo BZ. Pois, sabemos que o fenótipo de resistência a drogas em *T. cruzi* é complexo e pode envolver vários genes e diferentes vias metabólicas.



## 7 CONCLUSÕES

- O mRNA do gene TcTAT apresentou um aumento na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* (2,0x) e selecionada *in vivo* (1,5x) ao benzonidazol.
- O Gene TcTAT é um gene multicópias organizado em repetições em tandem. Não observamos diferença no número de cópias desse gene entre as cepas sensíveis e resistentes ao BZ;
- O gene TcTAT está localizado em 8 cromossomas que variam de 785 a 2500Kb do *T. cruzi* e sua localização não está associado como fenótipo de resistência a droga.
- A análise da proteína TcTAT em *T. cruzi* mostrou que não há diferença no nível de expressão da proteína entre as cepas sensíveis e resistentes.
- Não observamos uma associação direta entre o gene TcTAT e o fenótipo de resistência a drogas em cepas de *T. cruzi*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdo MCB. Caracterização da sensibilidade e resistência *in vitro* de cepas e linhagens de *Trypanosoma cruzi* aos compostos nitroheterocíclicos nifurtimox e benzonidazol.. Dissertação, Mestrado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1991. p. 89

Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science. 2005; 309 (5733): 473-6.

Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J, Bruchhaus I. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. Proteomics. 2003 Sep;3(9):1811-29.

Baki L, Alexis MN. The efficiency of nuclear processing of the tyrosine aminotransferase mRNA transcript increases after partial hepatectomy. Eur J Biochem. 1994 Nov 1;225(3):797-803.

Baki L, Alexis MN. Regulation of tyrosine aminotransferase gene expression by glucocorticoids in quiescent and regenerating liver. Biochem J. 1996; 320 (Pt 3): 745-53.

Berger BJ, Dai WW, Wilson J. Methionine formation from  $\alpha$ -Ketomethiobutyrate in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. FEMS Microbiology Letter. 1998; 165: 305-312.

Bontempi EJ, Bua J, Aslund L, Porcel B, Segura EL, Henriksson J, Orn A, Pettersson U, Ruiz AM. Isolation and characterization of a gene from *Trypanosoma cruzi* encoding a 46-kilodalton protein with homology to human and rat tyrosine aminotransferase. Mol Biochem Parasitol. 1993; 59(2): 253-62.

Bontempi EJ, Garcia GA, Buschiazzi A, Henriksson J, Pravia CA, Ruiz AM, Pettersson U, Pszeny V. The tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma rangeli*: sequence and genomic characterization. FEMS Microbiology Letter. 2000; 189 (2): 253-7.

Borst P and Ouellette M. New mechanism of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995; 49: 427-460.

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

Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1987; 82: 205-212.

Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch AC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Molecular and biochemical parasitology.* 1992; 50(2): 225-34.

Cancado JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2002; 44 (1): 29-37.

Carneiro M, Chiari E, Goncalves AM, da Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.* 1990 Jan;47(1):35-45.

Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 2006 Aug; 25(8):471-9.

Cazzulo JJ. Intermediate Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr.* 1994; 26 (2): 157-65.

Ciechanover A, Hargrove JL, Gross-Mesilaty S. Ubiquitin-mediated degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) *in vitro* and *in vivo*. *Molecular biology reports.* 1997; 24 (1-2): 27-33.

Constantsas NS, Levis GM, Vakirtzi-Lemonias CS. *Crithidia fasciculata* tyrosine transaminase. I. Development, characterization and differentiation from alanine transaminase. *Biochim Biophys Acta.* 1971; 230: 137-45.

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

de Andrade HM, Murta SMF, Nirdé P, Perales JH, Chapeurouge A, Rego JV, Romanha AJ. *Trypanosoma cruzi* Proteins Associated to Benzonidazole Resistance. Alves MJM, Silveira JF, Wunderlich G, Uliana SRB, Goldenberg S, editores. XXI Annual Meeting of the Brazzilian Society of Protozoology/ XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. 2005 Nov 7-9; Caxambu- MG: SBPz; 2005. p. 1-197

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Jan;98(1):1-12.

Dos Santos WG, Buck GA. Polymorphisms at the topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. J Eukaryot Microbiol. 1999 Jan-Feb;46(1):17-23.

Dvorak JA, Hall TE, Crane MS, Engel JC, McDaniel JP, Uriegas R. *Trypanosoma cruzi* flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mitramycin-induced fluorescence. J. Protozool. 1982; 24: 430-437.

Dias JC, Machado EM, Fernandes AL, Vinhaes MC. General situation and perspectives of chagas disease in Northeastern Region, Brazil. Cad Saude Publica. 2000; 16 Suppl 2:13-34. Portuguese.

Duret C, Daujat-Chavanieu M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Balaguer P, Fabre JM, et al. Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: consequences on the expression and function of the constitutive androstane receptor and the pregnane X receptor. Molecular pharmacology. 2006; 70 (1): 329-39.

Dragon EA, Sias SR, Kato EA, Gabe JD. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Molecular and cellular biology*. 1987; 7(3): 1271-5.

Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drugs targets and resistance mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2003; 2 (3): 146-155.

Elias MC, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Jun;129(1):1-9.

El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2002; 2: 1007-1017.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005 Jul 15; 309(5733):409-15.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1983 Jul 1;132(1):6-13.

Florens L, Washburn MP, Raine JD, Anthony RM, Grainger M, Haynes JD, et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):520-6.

Filardi L, and Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987; 81: 755-759.

Finley RW, Dvorak JA. *Trypanosoma cruzi*: analysis of the population dynamics of heterogeneous mixtures. *J Protozool*. 1987 Nov; 34(4): 409-15.

Fragoso SP, Goldenberg S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 55 (1-2): 127-34.

Frydman B, de los Santos C, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-<sup>13</sup>C]glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO<sub>2</sub> fixation reactions. *Eur J Biochem.* 1990;192(2): 363-8.

Gongora R, Acestor N, Quadroni M, Fasel N, Saravia NG, Walker J. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica.* 2003 Jun;23(2):153-60.

Gibson AC and Miles MA. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 1986; 5: 1299-1305.

Gross-Mesilaty S, Hargrove JL, Ciechanover A. Degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) via the ubiquitin-proteasome pathway. *FEBS Letters.* 1997; 405 (2): 175-80.

Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, Fadili AE, Peytavi R, et al. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Research.* 2003; 31: 5886-5896.

Hauschka TS. Persistence of strain-specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *The Journal of parasitology.* 1949; 35 (6): 593-9.

Henriksson J, Aslund L, Marcina RA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990; 42: 213-224.

Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today.* 1996; 12: 108-114.

Hollander-Czytko H, Grabowski J, Sandorf I, Weckermann K, Weiler EW. Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions. *Journal of plant physiology*. 2005;162 (7): 767-70.

Hunziker N. Richner-Hanhart syndrome and tyrosinemia type II. *Dermatologica*. 1980;160(3):180-9.

Kirchhoff LV. Chagas disease: american trypanosomiasis. *Infect Dis Clin North Am* 1993; 7: 487-501.

Lasonder E, Ishihama Y, Andersen JS, Vermunt AM, Pain A, Sauerwein RW, et al. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*. 2002 Oct 3;419(6906):537-42.

Liendo A, Lazard K, Urbina JA. In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother*. 1998 Feb;41(2):197-205.

Liu GT, Zhang TM, Wang BE, Wang YW. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochemical pharmacology*. 1992; 43:147-152.

Lopukhina A, Dettenberg M, Weiler EW, Hollander-Czytko H. Cloning and characterization of a coronatine-regulated tyrosine aminotransferase from *Arabidopsis*. *Plant physiology* 2001;126 (4): 1678-87.

Mavrides C and D'Iorio, A.. The regulation of tyrosine aminotransferase in *Tetrahymena pyriformis*. *Abbreviation: Biochem Biophys Res Commun*. 1969; 35(4): 467-73.

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

McAtee CP, Hoffman PS, Berg DE. Identification of differentially regulated proteins in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* by proteome techniques. *Proteomics* 2001;1: 516 –521.

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

Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1977;71(3):217-25.

Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Lainson R, Tøye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 1978 Apr 27; 272(5656):819-21.

Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(2):221-37.

Miles MA, Póvoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. Chagas's disease in the Amazon Basin: li. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Para State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(5):667-74.

Montemartini M, Santome JA, Cazzulo JJ, Nowicki C. Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal.* 1993; 292: 901-906.

Montemartini M, Santome JA, Cazzulo JJ, Nowicki C. Production of aromatic  $\alpha$ -hydroxyacids by epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, and its possible role in NADH reoxidation. *FEMS Microbiology Letter.* 1994.118: 89-92.

Murta SM and Romanha AJ. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology.* 1998. 116: 165-171.



Murta S, Gazzinelli R, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1998; 93: 203-214.

Murta SM, dos Santos, W.G., Anacleto, C., Nirde, P., Moreira, E.S., Romanha, A.J., Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001; 117 (2): 223-8.

Neal RA, and Van Bueren J.. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* *in vitro* and *in vivo*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988; 82: 709-714.

Nilsen TW. Trans-splicing in protozoa and helminths. *Infect Agents Dis*. 1992 Aug;1(4):212-8.

Nirdé P, Larroque C, Barnabé C. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 1995; Série III 318: 1239-1244.

Nowicki C, Montemartini M, Duschak V, Santomé JA, Cazzulo JJ. Presence and subcellular location of tyrosine aminotransferase and p-hydroxyphenyllactate dehydrogenase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letter*. 1992; 92: 119-124.

Nowicki C, Hunter GR, Montemartini-Kalisz M, Blankenfeldt W, Hecht Hans-Jurgen, Kalisz HM. Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 2001.1546: 268-281.

Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Tropical Medicine and International Health* 2001; 6: 874-882.

Paba J, Santana JM, Teixeira ARL, Fontes W, Sousa MV, Ricart CAO. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*. 2004; 4: 1052-1059.

Parodi-Talice A, Durán R, Arrambide N, Prieto V, Piñeyro MD, Pritsch O, et al. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34: 881-886.

Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Jun;129(1):79-90.

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

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

Romanha AJ, da Silva Pereira AA, Chiari E, Kilgour V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol B*. 1979;62(2):139-42.

Romanha AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese PhD, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1982.

Silveira JF. Biologia Molecular do *T. cruzi*. In *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. 2.<sup>a</sup> edição. Brener, Z., Andrade, ZA., Barral-Netto, M. Rio de Janeiro. 2000. 127-147.

Sobrado VR, Montemartini-Kalisz M, Kalisz HM, De La Fuente MC, Hecht HJ, Nowicki C. Involvement of conserved asparagine and arginine residues from the N-terminal region in the catalytic mechanism of rat liver and *Trypanosoma cruzi* tyrosine aminotransferases. *Protein Science* 2003;12 (5): 1039-50.

Scherl A, Francois P, Charbonnier Y, Deshusses JM, Koessler T, Huyghe A, et al. Exploring glycopeptide-resistance in *Staphylococcus aureus*: a combined proteomics and transcriptomics approach for the identification of resistance-related markers. *BMC Genomics*. 2006 Nov 22;7:296.

Solari A. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma*. 1980; 78: 239-255.

Swindle J, Ajioka J, Eisen H, Sanwal B, Jacquemot C, Browder Z, Buck G. The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *The EMBO journal*. 1988; 7 (4): 1121-7.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*. 1992 Oct; 5(4):400-19.

Thiel M, Bruchhaus I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2001 Nov;190(1-2):33-6.

Tyers M and Mann M. From genomics to proteomics. *Nature*. 2003; 422 (6928): 193-7.

Ullu E & Nilsen T .Molecular biology of protozoan and helminth parasites. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. New York: Academic Press LTD, 1995. 115-129.

Ullman B. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1995. (1): 77-84.

Urbina JA. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr. Opin. Infect. Disease*. 2001; 14: 733-741.

Urbina JA and Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. 2003; 19: 495-501.

Vanhamme L and Pays E. Control of gene expression in Trypanosomes. Microbiological reviews. 1995; 59: 223-240.

WHO. Organização Mundial da Saúde. Disponível em <http://www.who.int/ctd/chagas/dates.htm>. 1999.

WHO. Organização Mundial da Saúde. Disponível em <http://www.who.gov.br>. 2002

Wagner W and So M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. Infect. Immun. 1990; 58: 3217-3224.