

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO RENÉ RACHOU

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA ÁLCOOL
DESIDROGENASE (TcADH) E ASSOCIAÇÃO DA SUA BAIXA EXPRESSÃO COM O
FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA *in vitro* DO *Trypanosoma cruzi* AO BENZONIDAZOL

Por

FERNANDA MAGALHÃES FREIRE CAMPOS

Belo Horizonte

Março de 2007

Ministério da Saúde

Instituto René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Esta dissertação intitulada:

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A ENZIMA ÁLCOOL
DESIDROGENASE (TcADH) E ASSOCIAÇÃO DA SUA BAIXA EXPRESSÃO COM
O FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA *in vitro* DO *Trypanosoma cruzi* AO
BENZONIDAZOL”**

Apresentada por

Fernanda Magalhães Freire Campos

Dissertação apresentada com vistas
à obtenção do título de mestre em
Ciências na Área de Concentração
Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Silvane Maria
Fonseca Murta

Co-orientador: Dr. Alvaro José
Romanha.

Belo Horizonte

Março de 2007

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

Tab.
Cutter
Ano

Campos, Fernanda Magalhães Freire.

**Caracterização do gene que codifica a enzima
álcool desidrogenase (TcADH) e associação da
sua baixa expressão com o fenótipo de resistência
in vitro do *Trypanosoma cruzi* ao benzonidazol**

**Fernanda Magalhães Freire Campos. – Belo
Horizonte, 2007**

xiv, 77 f, 210 x 297mm.

Bibliografia: 63-77

Dissertação para obtenção do título de Mestre em
Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da
Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de
concentração: Biologia Celular e Molecular

**1. *Trypanosoma cruzi* 2. Álcool desidrogenase 3.
Resistência a drogas I. Título. II. Murta, Silvane
Maria Fonseca (Orientação). III. Romanha, Alvaro
José (Co-orientação)**

CDD – 22. ed. – ???

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que está sempre ao meu lado, guiando meus passos e pensamentos e por me permitir realizar mais este sonho;

Á Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, orientadora e amiga, pelo apoio, atenção e ensinamentos nesse período. Obrigada pela grande contribuição à minha formação profissional! Ao meu co-orientador Dr. Álvaro José Romanha, pelo incentivo e confiança, meus sinceros agradecimentos;

Ao Dr. Guilherme Corrêa de Oliveira, atual chefe do laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, pela oportunidade de realizar esse trabalho;

Á Maureen Rodarte, pela ajuda constante e pela boa vontade;

Aos amigos (as) e colegas de grupo Fernanda Barbosa, Juciane, Paula, Simara e Marcos pelo agradável convívio tanto nas horas boas como nas difíceis e pela vontade de quererem sempre me ajudar, vocês deixarão saudades!;

Ao Daniel Barbosa Liarte, pela valiosa colaboração neste trabalho e pela paciência dispensada a mim principalmente nos últimos momentos desta tese;

Ao Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares, pelos conselhos e pela doação fundamental da enzima álcool desidrogenase para os ensaios de atividade enzimática;

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular: Guilherme, Ângela, Jerônimo, Rosiane, Luciana, Sara, Rosana, Anderson, Rachel, Rômulo, Gabriela, Elizângela, Adhemar, Flavio, Nilton, Simone, Fernanda Ludolf, Lívia, Mariana, Regina, Fernanda Costa, Gustavo, Kelly, Lorenza, Luiza, Poliana, Renata, pela ajuda, conversas e agradável convívio;

À Silvia, que trabalha na limpeza do laboratório, pelas brincadeiras, carinho e por deixar meu jaleco sempre limpinho para o trabalho;

À Kenea, funcionária do laboratório, pelos momentos de descontração, conversas e pela ótima companhia;

Ao Segemar, pela dedicação constante e empenho em conseguir os artigos que precisei;

Ao Dr. Renato Mortara, por aceitar a valiosa colaboração para este trabalho através dos ensaios de imunofluorescência e por todos do seu laboratório pela paciência em me auxiliar nas técnicas;

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, representado pelo diretor Dr. Álvaro Romanha, pelo auxílio financeiro e estrutura para a realização deste trabalho;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Aos participantes da banca, por aceitarem o convite e pela dedicação à leitura desta dissertação;

À Marcilene, amiga que me acompanha nessa trajetória durante tantos anos, obrigada pelas palavras de amizade e por dividir comigo todos os momentos, de angústias a diversões e alegrias, valeu Marci!;

A amiga Marcela, pessoa muito especial, por participar da minha vida dentro e fora do laboratório. Foi um privilégio ter tido alguém como você por perto me ajudando no que fosse preciso. Nestes anos tive a certeza que nossa amizade está apenas começando!;

Agradeço em especial aos meus pais, Mariza e Ronaldo, pelo exemplo, apoio, incentivo e amor durante toda a minha vida e ao meu irmão André, pela amizade, compreensão e carinho;

Aos meus avós Mauro, Neusa e Elza, pela experiência de vida e valiosos conselhos. Aos tios e tias, primos e primas por estarem sempre presentes e por torcerem por mim;

Ao Felipe, namorado e amigo, companheiro em todas as horas. Obrigada pela paciência, amor e cumplicidade;

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O <i>T. cruzi</i> e a doença de Chagas.....	1
1.2 A organização genômica do <i>T. cruzi</i>	4
1.3 Heterogeneidade genética em <i>T. cruzi</i>	6
1.4 Aspectos celulares do <i>T. cruzi</i>	7
1.5 Quimioterapia da doença de Chagas.....	8
1.6 Seleção de cepas de <i>T. cruzi</i> resistentes a drogas.....	10
1.7 Resistência a drogas em parasitos.....	11
1.8 Análise da expressão diferencial.....	14
1.9 As álcool desidrogenases.....	17
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVO GERAL.....	21
3.1 Objetivos específicos.....	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Identificação da ADH de <i>Trypanosoma cruzi</i> e alinhamento de seqüências.....	22
4.2 Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
4.3 Ensaio da atividade das oxidoreduções do <i>T. cruzi</i>	24
4.4 Preparo de bactérias cálcio-competentes.....	24
4.5 Clonagem e expressão da proteína recombinante	25
4.6 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	26
4.7 Teste de solubilidade da proteína recombinante TcADH.....	26
4.7.1 Solubilização de proteínas sem sarcosil.....	26
4.7.2 Extração de proteínas recombinantes insolúveis com sarcosil.....	27
4.8 Purificação da proteína recombinante TcADH	27

4.9	Purificação da proteína Glutathione S-transferase (GST).....	27
4.10	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	28
4.11	Obtenção de anticorpo policlonal anti-proteína rTcADH.....	28
4.12	Extração de proteínas totais.....	29
4.13	Western blot.....	29
4.14	Análise Densitométrica.....	29
4.15	Ensaio de imunolocalização por microscopia confocal.....	30
4.16	Extração de RNA total.....	30
4.17	Extração de DNA.....	31
4.18	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
4.19	Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida.....	31
4.20	Purificação de produto de PCR.....	32
4.21	RT-PCR quantitativo em tempo real.....	32
4.22	Análises de Northern blot.....	33
4.23	Eletroforese de Pulso alternado- PFGE.....	33
4.24	Sondas e ensaios de hibridização	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Identificação da ADH de <i>Trypanosoma cruzi</i> e alinhamento de seqüências.....	35
5.2	Ensaio da atividade das oxidoreduases nas populações de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	39
5.3	Clonagem e expressão da proteína recombinante TcADH.....	39
5.4	Caracterização da proteína recombinante TcADH.....	41
5.4.1	Teste de solubilidade da proteína rTcADH.....	41
5.4.2	Purificação da proteína recombinante rTcADH.....	44
5.5	Nível de expressão da proteína rTcADH em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes.....	44
5.5.1	Imunização de coelhos para produção de anticorpo policlonal anti-rTcADH.....	44
5.5.2	Western blot.....	44
5.6	Imunolocalização da proteína TcADH no <i>T. cruzi</i>	46
5.7	Nível de mRNA do gene <i>TcADH</i> em populações do <i>Trypanosoma cruzi</i> sensíveis e resistentes ao benzonidazol.....	49
5.8	Número de cópias do gene <i>TcADH</i>	51
5.9	Localização do gene <i>TcADH</i> nos cromossomas do <i>T. cruzi</i>	51

6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÕES.....	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.....3

Figura 2. Esquema dos principais mecanismos de resistência a drogas.....12

Figura 3. Esquema da metodologia de microarray.....16

Figura 4. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da ADH.....36

Figura 5. Árvore filogenética das seqüências de ADH do *T. cruzi* e outros organismos.....37

Figura 6. Atividade de oxidoredução da TcADH e de outras oxidoredutases do *T. cruzi*.....40

Figura 7. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com azul de coomassie. Expressão da proteína recombinante.....42

Figura 8. Gel de poliacrilamida SDS corado com azul de coomassie. Teste de solubilidade da proteína rTcADH.....43

Figura 9. Gel de poliacrilamida-SDS corado com azul de coomassie. Proteína rTcADH purificada por eletroeluição.....45

Figura 10 Membrana de western blot incubada com anticorpo policlonal anti-TcADH, anti-TcHSP70 e anti-TcGST.....47

Figura 11. Imunolocalização da proteína TcADH nas formas epimastigotas de *T. cruzi*..... 48

Figura 12. Nível de mRNA do gene *TcADH* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas.....50

Figura 13. Amplificação do gene *TcADH* por RT-PCR quantitativo em tempo real52

Figura 14. Localização cromossômica do gene *TcADH* em cepas de *T. cruzi* de diferentes zimodemas e fenótipos de resistência a drogas.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Populações e clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas neste trabalho.....	23
Tabela 2. Percentual de identidade da ADH do <i>T. cruzi</i> (Accession Number XP_819264) com álcool desidrogenases identificadas em outros organismos.....	38
Tabela 3. Determinação do número de cópias do gene TcADH nas populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao benzonidazol.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADH**- Álcool desidrogenase
- AMP**- Ampicilina
- AP**- Fosfatase Alcalina
- ATP**- Adenosina trifosfato
- BSA**- Albumina bovina sérica
- BZ**- Benzimidazol
- cDNA**- DNA complementar
- DNA**- Ácido desoxirribonucléico
- dNTP**- Deoxinucleotídeos trifosfatos
- EDTA**- Ácido etilenodiaminotetracético
- HGPRT**- Hipoxantina guanina fosforribosil transferase
- IPTG**- Isopropyl BD-thiogalactopyranoside
- Kb**- Kilobases
- kDNA**- DNA do cinetoplasto
- LB**- Meio Luria-Bertani
- LIT**- Liver infusion triptose
- M**- Molar
- Mb**- Megabases
- mg**- Miligrama
- ml**- Mililitro
- MM**- marcador de massa molecular
- mM**- Milimolar
- mRNA**- Ácido ribonucléico mensageiro
- NFX**- Nifurtimox
- pb**- Pares de bases
- PBS**- Salina tamponada com fosfato
- PCR**- Reação em cadeia da polimerase
- PFGE**- Pulse field gel electrophoresis (eletroforese de campo alternado)
- RNA**- Ácido ribonucléico
- RT**- Transcriptase reversa
- rTcOYE**- Proteína recombinante “old yellow enzyme” de *T. cruzi*

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

TBE- Tampão tris-borato EDTA

UTR- Untranslated region (região não traduzida)

Z1- Zimodema 1

Z2- Zimodema 2

ZB- Zimodema B

µg- Micrograma

µl- Microlitro

³²P- Fósforo radioativo

RESUMO

Álcool desidrogenases (ADH) pertencem a um grupo de enzimas que catalizam a oxidação reversível de etanol a acetaldeído, com conseqüente redução de NAD. O gene *TcADH* que codifica a ADH do *T. cruzi*, foi selecionado pela metodologia *microarray* por apresentar um nível de transcrição 4 vezes menor na população do parasito com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) quando comparado com seu par sensível (17WTS). A *TcADH* codifica uma proteína de 393 aminoácidos que apresenta um domínio conservado “iron-containing alcohol desidrogenase”. A análise da estrutura primária mostrou que a TcADH é mais parecida com as ADHs de organismos procariotos do que com seus ortólogos identificados em *Leishmania*. A atividade enzimática da TcADH foi menor nas cepas de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17 LER). Análises de Western blot mostraram que o anticorpo policlonal anti-TcADH reconheceu um polipeptídeo de 41,7 kDa em todas as cepas do *T. cruzi* analisadas. O nível de expressão desse polipeptídeo foi 2 x menor na cepa do *T. cruzi* 17LER quando comparado com seu par 17WTS, confirmando os dados da atividade enzimática. Ensaios de imunolocalização por microscopia confocal revelaram que a enzima TcADH está presente no cinetoplasto do parasito. Análise de Northern blot mostrou que a sonda do gene *TcADH* reconheceu um transcrito de 1,9 Kb com a mesma intensidade para todas amostras do *T. cruzi* analisadas com exceção da população 17LER que foi 2 vezes menor. Análise quantitativa por PCR em tempo real (qPCR) também mostrou um nível de mRNA 2,5 vezes menor na população 17LER. Quantificação do número de cópias desse gene por qPCR, mostrou ser o mesmo para todas as cepas do *T. cruzi* analisadas. Neste trabalho, o gene *TcADH* foi caracterizado pela primeira vez em *T. cruzi* e foi observado uma menor expressão da enzima TcADH na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in-vitro* ao BZ.

ABSTRACT

Alcohol dehydrogenases (ADH) belongs to a group of enzymes that catalyze the reversible oxidation of ethanol to acetaldehyde, with consequent reduction of NAD. The *TcADH* gene that codes for the *T. cruzi* ADH of, was selected by microarray methodology as presenting a transcription level 4 four-fold lower in the *T. cruzi* population with *in vitro*- induced resistance to BZ (17 LER) than in the wild-type (17 WTS). The TcADH codes a protein of 393 aminoacids that presents a conserved “iron-containing alcohol desidrogenase” domain. Analysis of the primary structure showed that the TcADH is more similar to the of ADHs of procariotes than ADHs of other organisms as *Leishmania*. Assays of enzymatic activity showed that TcADH activity was lower in 17LER than in 17WTS. Western blot analysis of *T.cruzi* protein extracts probed with anti- TcADH rabbit polyclonal serum revealed a 41.7 kDa polypeptide present in all samples. The level of this polypeptide was similar for all samples except to 17LER that was nearly two-fold lower than the wild-type 17 WTS. Assays imunolocalization by confocal microscopy showed that the TcADH enzyme is present in parasite. Northern blot analyses showed that *TcADH* levels were 2.0 times lower in 17LER than in 17WTS. Real- time PCR confirmed our finding that *TcADH* transcription levels were lower in 17 LER than in 17 WTS. In contrast, we detected no differences in *TcADH* trancription level among other *T. cruzi* samples. Using real- time PCR, we found that the number of *TcADH* gene copies was similar in all samples. This difference of expression was confirmed by the. Our data show that a decreased expression of the TcADH enzyme was found only in a *T. cruzi* population with induced in vitro resistance to BZ. In this work, the TcADH gene was characterized for the first time in *T. cruzi* and was observed a smaller expression of the TcADH enzyme in a *T. cruzi* population with in vitro-induced resistance to BZ.

1- INTRODUÇÃO

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

Os protozoários parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae incluem várias espécies do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*. Nos tripanosomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, albergando uma complexa rede de moléculas circulares de DNA, denominada de cinetoplasto. Estes organismos são causadores de doenças ao homem, plantas e animais, sendo responsáveis por danos econômicos e consideráveis índices de mortalidade e morbidade humana em países tropicais (Donelson *et al.*, 1999).

A Tripanosomíase Americana, também conhecida como doença de Chagas, é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. (*T. cruzi*). Esse protozoário é transmitido ao homem e outros mamíferos pelos hospedeiros invertebrados - barbeiros, inseto triatomíneo da família Reduviidae. Estimativas sugerem que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com o parasito e 100 milhões vivem em áreas de risco de transmissão da doença (WHO, 2005). No Brasil, a doença de Chagas está distribuída em uma área endêmica de 3 milhões de quilômetros quadrados, compreendendo 2400 municípios, com cerca de 5 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (Dias, 1987).

O mecanismo de transmissão do *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do seu repasto sanguíneo. No entanto, existem outras formas alternativas de transmissão como a transfusão de sangue, transmissão congênita, acidentes de laboratório, transplantes de órgãos e por via oral (Brener *et al.*, 1992).

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta basicamente três formas evolutivas (tripomastigota, amastigota e epimastigota) entre o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado. Ao alimentar-se de sangue infectado, o inseto adquire a forma tripomastigota do parasito. Os parasitos tripomastigotas migram do intestino anterior para o intestino médio do inseto onde se diferenciam em epimastigotas e se multiplicam. Os vários parasitos epimastigotas migram para o intestino posterior do inseto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Essas formas são excretadas nas fezes no momento do próximo repasto sanguíneo do inseto e se conseguem penetrar a mucosa ou a pele do hospedeiro mamífero, atingirão a corrente sanguínea. Uma vez no sangue do hospedeiro, os parasitos invadem vários tipos celulares e se diferenciam em amastigotas. Após sucessivas multiplicações no citoplasma as formas

amastigotas transformam-se em tripomastigotas e a célula se rompe liberando na corrente sanguínea os parasitos que irão infectar tecidos adjacentes ou um barbeiro ainda não parasitado (Ley *et al.*, 1988) (Figura 1).

A doença de Chagas é caracterizada pelas fases aguda e crônica. A fase aguda compreende os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros meses de infecção e, do ponto de vista laboratorial, pela demonstração do parasito no sangue por meio de exame direto (WHO, 2005). Nesta fase os sintomas podem ser brandos e atípicos e, conseqüentemente a infecção não é reconhecida. Em crianças infectadas entretanto, podem ser observadas sérias complicações neurológicas (WHO, 2005). Ainda na fase aguda, o coração está quase sempre comprometido em maior ou menor extensão e pode exibir dilatação e efusão pericárdica. Edema subcutâneo, aumento de linfonodos e hepato-esplenomegalia são também freqüentes e encontrados com intensidade variável (Rassi & Luqueti., 1992). Posteriormente, o paciente entra na fase crônica, caracterizada por um baixo número de parasitos circulantes e de difícil detecção. A maioria dos pacientes na fase crônica não apresenta sintomas, podendo permanecer assintomáticos por décadas ou por toda a vida, caracterizando a forma indeterminada da doença. Em alguns casos, estes pacientes podem evoluir para uma forma sintomática da doença. As manifestações mais comuns são o comprometimento do sistema cardíaco (forma cardíaca), digestivo (forma digestiva) ou de ambos (forma cardio-digestiva) (Brener, 1987). A principal causa de morbidade e mortalidade da doença de Chagas é a cardiopatia inflamatória crônica.

A duração destas fases pode ser diferente entre os indivíduos, mas em geral o que se observa é um período de até 90 dias para a fase aguda, de até 20 anos para a fase crônica indeterminada e um período muito variável para a fase crônica sintomática, dependente da forma clínica e gravidade do quadro desenvolvido pelo paciente.

Não existindo uma vacina efetiva contra a doença de Chagas, a prevenção primária desta doença se faz basicamente pelo controle do vetor e pela prevenção da transmissão transfusional. Uma abordagem utilizada com sucesso no controle da transmissão da doença nas últimas décadas tem sido a eliminação dos vetores domiciliados através do uso de inseticidas (Souza *et al.*, 1984).

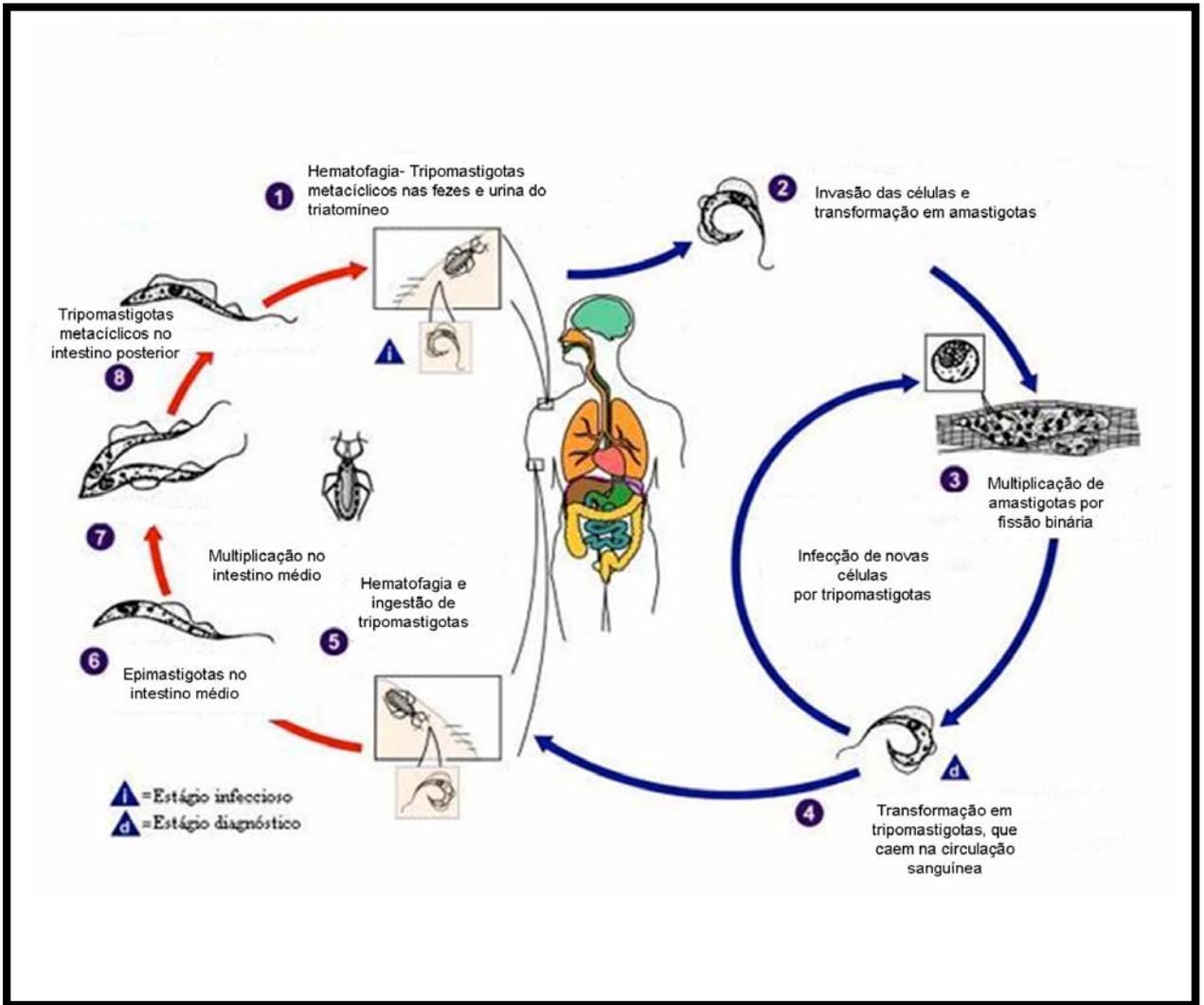


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: WHO, 2005.

1.2- A organização genômica do *T. cruzi*

Os estudos do genoma do *T. cruzi* são fundamentais para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no complexo processo de diferenciação celular deste parasito.

Ao longo do processo evolutivo, o *T. cruzi*, assim como outros membros da família Trypanosomatidae divergiram muito cedo na linhagem principal que deu origem aos outros eucariotos. Provavelmente por essa razão, estes organismos apresentam muitas características bioquímicas e processos moleculares exclusivos que diferem bastante daqueles conhecidos em outros eucariotos (Brener *et al.*, 2000).

O tamanho do genoma do *T. cruzi* ($100-200 \times 10^6$ pb) é relativamente superior ao tamanho dos genomas de outros protozoários parasitos, como por exemplo, *Leishmania major* ($45-65 \times 10^6$ pb) ou *Trypanosoma brucei* (25×10^6 pb) (El-Sayed *et al.*, 2005). Uma característica comum da organização do genoma desses organismos é a presença de agrupamentos de genes que se arranjam em repetições *in tandem*. As regiões intergênicas são, em geral, bastante reduzidas e vários genes são transcritos em uma mesma unidade de transcrição policistrônica, a qual é posteriormente processada gerando mRNAs maduros monocistrônicos (Teixeira, 1998). Estas unidades policistrônicas podem ser bastante extensas, contendo de dezenas a centenas de genes, como indicado pelos dados gerados pelo sequenciamento completo do cromossomo 1 de *L. major* (Myler *et al.*, 1999), de parte do cromossomo 3 do *T. cruzi* (Andersson *et al.*, 1998) e atualmente pelo sequenciamento completo do genoma dos tripanosomatídeos (El-Sayed *et al.*, 2005). Em *T. cruzi* foi observado que pelo menos 50% do genoma é composto por seqüências repetitivas, correspondentes em sua maioria a famílias de genes de proteínas de membrana, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed *et al.*, 2005).

A caracterização do *T. cruzi* a nível citogenético tem sido difícil principalmente pelo fato dos seus cromossomos não se condensarem durante a divisão nuclear (Solari *et al.*, 1980). Entretanto, com a utilização da técnica de eletroforese de campo alternado (PFGE), foi possível verificar que o genoma do *T. cruzi* está organizado em pelo menos 20-25 bandas cromossomais, variando de 0,3 a 1,6 Mb (Gibson & Miles, 1986; Henriksson *et al.*, 1990 e 1995). Porcile e colaboradores (2003) realizaram a construção de um mapa físico e genético dos cromossomos do *T. cruzi* através da técnica de PFGE. Os autores viram que esse organismo é muito complexo, e possui vários elementos repetitivos e polimorfismos de genes entre os cromossomos homólogos. Outra característica marcante deste parasito 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, onde diferenças de 30-70% no conteúdo total de DNA foram observadas (McDaniel & Dvorak, 1993). Segundo Henriksson *et al.* (1996), este alto grau de variabilidade no conteúdo do DNA do *T. cruzi* teria implicações na organização genômica do parasito, como por exemplo, o número de repetições de determinados genes.

A escolha de um clone da cepa CL Brener como referência do genoma do *T. cruzi* mostrou-se extremamente útil, uma vez que os dados de seqüência revelaram que este clone é um híbrido cujos haplótipos se diferem em aproximadamente 5%. Os dados de montagem resultaram em uma estimativa para o genoma diplóide do clone CL Brener entre 106.4 e 110.7 Mb, valor significativamente maior que o esperado. Entretanto, não foi possível obter a montagem dos cromossomos inteiros do parasito devido ao alto conteúdo de seqüências repetitivas (> 50%) presentes no seu genoma, tendo sido geradas 8740 seqüências contíguas de DNA, ou *contigs*. As seqüências repetitivas são principalmente retrotransposons, frequentemente localizados em regiões sub-teloméricas, e fazem parte de genes que codificam as famílias multigênicas de moléculas de superfície como as *trans*-sialidases, mucinas, *gp63* e uma família (>1300 cópias) de MASP (*Mucin Associated Surface Protein*). Foi sugerido que esta diversidade de moléculas de superfície poderia proporcionar maior variabilidade antigênica ao parasito, e conseqüentemente, maiores chances de sobrevivência frente ao sistema imune do hospedeiro (El-Sayed *et al.*, 2005).

Estudos realizados principalmente com *T. cruzi*, *T. brucei* e algumas espécies de *Leishmania* revelaram que estes organismos apresentam algumas características em relação ao processo de expressão gênica que são compartilhadas entre organismos procariotos e eucariotos, além de apresentarem alguns aspectos peculiares ao seu grupo (Revisado por Teixeira, 1998 e Clayton, 2002). Uma vez que a família Trypanosomatidae se divergiu muito cedo da linhagem evolutiva que deu origem aos eucariotos superiores, é compreensível que os membros desta família apresentem aspectos da sua biologia molecular e celular diferentes se comparados aos eucariotos superiores.

Assim como nos procariotos, a transcrição dos genes nos tripanossomatídeos é policistrônica, gerando pré-mRNAs que deverão ser processados no núcleo para formar mRNAs maduros, monocistrônicos. Para que os mRNAs maduros sejam produzidos, são necessários dois eventos pós-transcricionais: adição da cauda poli-A à extremidade 3' dos mRNAs e de uma seqüência conservada de RNA de 39 nucleotídeos à extremidade 5', chamada de *spliced leader* (SL) ou mini-éxon. Esta seqüência, encontrada somente em tripanossomatídeos e em nematódeos, é idêntica em todos os mRNAs de um mesmo organismo, mas é diferente entre as espécies (Donelson and Zeng, 1990). Seus genes estão arrançados em repetições *in tandem* no

genoma destes parasitos. Sequências SL são ligadas aos fragmentos gerados pela clivagem do pré-mRNA numa reação denominada *trans-splicing*, processo bastante similar ao *cis-splicing* comum em eucariotos

1.3- Heterogeneidade genética em *T. cruzi*

As inúmeras cepas do *T. cruzi* conhecidas são distintas em aspectos morfológicos e bioquímicos. Em vista disso, vários marcadores como os perfis de isoenzimas (Miles *et al.*, 1978; Romanha *et al.*, 1979); kDNA (Carneiro, 1990); sondas multiclonais de minissatélites (Macedo *et al.*, 1992); rDNA de 24S α (Souto & Zingales, 1993) e a sequência do mini-éxon do “*splice leader*” (Souto *et al.*, 1996) têm sido utilizados para analisar essa variabilidade e agrupar as cepas do *T. cruzi* entre si.

O primeiro método experimental que demonstrou a extensa diversidade genética em *T. cruzi* foi o estudo do perfil eletroforético de enzimas celulares (isoenzimas), fornecendo um bom marcador epidemiológico para a doença de Chagas, além de fornecer informações valiosas sobre a biologia e genética do parasito. Através do estudo de isoenzimas, Miles *et al.* (1977, 1978, 1980) mostraram a existência de três diferentes grupos de cepas denominados zimodemas 1 (Z1), 2 (Z2) e 3 (Z3). Estudos epidemiológicos demonstraram que os zimodemas 1 e 3 estão associados com marsupiais e triatomíneos silvestres e em 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 1981a; Devera *et al.*, 2003).

Romanha (1979 e 1982) e Carneiro (1990), caracterizando amostras do *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).

Tibayrenc *et al.* (1986) e Tibayrenc e Ayala (1988), analisando os perfis isoenzimáticos de 645 amostras do *T. cruzi* isoladas de uma variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados, de regiões geográficas distintas, observaram uma alta variabilidade genética entre as amostras. Os autores identificaram pelo menos 43 variantes isoenzimáticas (zimodemas ou

“clonets”). A análise genética destes resultados sugeriu que a reprodução sexual em *T. cruzi* é rara ou ausente (Zhang *et al.*, 1988). Assim, a elevada variabilidade genética observada em *T. cruzi* seria explicada através de uma estrutura populacional multiclonal onde várias destas cepas teriam evoluído independentemente ao longo do tempo (Tibayrenc & Ayala 1988; Zhang *et al.*, 1988).

Posteriormente, outros marcadores moleculares como mini-exon, D7-24S rDNA, RAPD e microssatélites permitiram a divisão das cepas do *T. cruzi* em duas linhagens filogenéticas distintas nomeadas grupo I e grupo II (Souto *et al.*, 1996, 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 (Fernandes *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1998; Devera *et al.*, 2003). Fernandes *et al.* (1998), observaram a presença de ambos os grupos em diferentes hospedeiros, ilustrando a complexidade do ciclo natural do parasito. Esta descoberta pode ajudar no entendimento de como os ciclos silvestre e doméstico estão conectados e, no entanto, esta nova classificação do *T. cruzi* pode ser importante para a definição eco-epidemiológica da doença de Chagas (Devera *et al.*, 2003).

Pedroso e colaboradores (2003) observaram distâncias filogenéticas entre os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II e híbridos baseados nos dados de variação do tamanho dos cromossomas. Os autores observaram também que, como mostrado por Henriksson *et al.*, (2002), os cromossomas são caracteres valiosos para a identificação evolutiva dos grupos, em particular, grupos do *T. cruzi* híbridos. Esses dados reforçam a hipótese de que cada grupo pode ter evoluído independentemente.

1.4- Aspectos celulares do *Trypanosoma cruzi*

O protozoário *T. cruzi* é constituído de uma única célula. Como toda célula eucariótica, esse parasito possui um núcleo delimitado por uma membrana nuclear e organelas como retículo endoplasmático, complexo de golgi e mitocôndria (Clayton *et al.*, 1995). Entretanto, algumas organelas apresentam características específicas que são encontradas somente nos Kinetoplastídeos. Esses organismos possuem uma única e grande mitocôndria que se estende por todo o comprimento da célula e é bem desenvolvida, apresentando inúmeras cristas mitocondriais. Além disso, o compartimento mitocondrial alberga moléculas circulares de DNA que codificam os RNAs ribossômicos e as enzimas envolvidas na respiração celular (Benne *et al.*, 1986).

Entretanto, a mitocôndria dos tripanossomas difere dos demais eucariontes pela presença de uma rede formada por milhares de moléculas circulares de DNA denominada cinetoplasto. A

estrutura do cinetoplasto do *T. cruzi* varia de acordo com o estágio do ciclo evolutivo. Nas formas amastigotas e epimastigotas ele é alogando e possui um comprimento de 1µm e espessura de 0,1 µm (Simpson *et al.*, 1987). O DNA do cinetoplasto (kDNA) representa cerca de 20-25% do DNA total da célula e é composto por 2 tipos de moléculas circulares conhecidas como maxicírculos e minicírculos. Existem nos maxicírculos cerca de 15 genes que codificam as proteínas mitocondriais envolvidas na respiração celular (Stuart *et al.*, 1995).

Além da mitocôndria e do cinetoplasto, o *T. cruzi* possui algumas organelas que exercem importantes funções. O glicossoma possui papel no metabolismo da água oxigenada e na oxidação de aminoácidos (Souto *et al.*, 1980). O complexo de golgi está localizado entre o núcleo e o cinetoplasto, participando do processo de glicosilação de glicoconjugados (Brenner *et al.*, 2000). Existe ainda uma estrutura conhecida como acidocalcissoma, envolvida no acúmulo de cálcio da célula. As acidocalcissomas estão presentes em maior número nas formas amastigotas, fator que se justifica por essa forma viver em um ambiente intracelular, onde a concentração de cálcio é baixa (Scott *et al.*, 1997). O núcleo do *T. cruzi* apresenta uma organização estrutural similar à de outras células eucarióticas, e está envolvido principalmente no processo de divisão celular (Brenner *et al.*, 2000).

Os tripanossomatídeos são caracterizados ainda pela organização particular do citoesqueleto que é responsável pela manutenção e modulação da morfologia dos parasitos nos seus diferentes estágios. Para completar o ciclo de vida, estes parasitos precisam migrar entre diferentes órgãos no inseto vetor e entre diferentes tecidos no hospedeiro mamífero. Portanto, motilidade e contato com a superfície de células hospedeiras são funções adicionais mediadas pelo citoesqueleto destes parasitos. Os principais componentes do citoesqueleto dos tripanossomatídeos são os microtúbulos subpeliculares, o axonema, o corpo basal, o corpo paraflagelar, a zona de ligação do flagelo e os filamentos responsáveis pelo contato do parasito com os tecidos do inseto (Kohl and Gull, 1998).

1.5- Quimioterapia específica da doença de Chagas

O tratamento da doença de Chagas é uma questão ainda não completamente resolvida e tem sido alvo de pesquisas na busca de novas drogas que sejam eficazes contra o *T. cruzi*, principalmente durante a fase crônica da doença. Essa fase corresponde ao período em que a doença de Chagas é diagnosticada na maioria dos pacientes. Os primeiros compostos utilizados para o tratamento clínico não foram eficazes. Entre eles podemos citar atoxil, fucsina, antimoniais pentavalentes e cloreto de mercúrio (revisto por Lockman *et al.*, 2005).

Atualmente, a quimioterapia específica da doença de Chagas está limitada ao benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NFX). Infelizmente, ela é insatisfatória devido à baixa eficácia desses compostos na fase crônica da doença e aos seus efeitos colaterais tóxicos (Urbina *et al.*, 2003). Além disso, a eficácia é ainda menor em pacientes com imunossupressão medicamentosa ou ainda em portadores da AIDS. Um dos fatores que dificulta a obtenção da eficácia terapêutica é a grande variabilidade genética das populações do *T. cruzi* (Brener & Chiari, 1967). O benzonidazol (BZ), um derivado 2-nitroimidazólico, e o nifurtimox (NFX), um derivado 5-nitrofurano, fazem parte de uma mesma família, a dos nitroheterocíclicos, mas possuem diferentes grupos químicos e apresentam diferentes mecanismos de ação contra o *T. cruzi*. A ação tripanosomicida do nifurtimox deve-se a redução metabólica do grupo nitro gerando radicais nitroânion muito reativos, que causam a produção de compostos de oxigênio altamente tóxicos, como por exemplo, o superóxido, o peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila. Como o *T. cruzi* é deficiente nos mecanismos de detoxificação, ele se torna mais susceptível à ação tóxica destes compostos (Docampo & Stoppani, 1979; Docampo *et al.*, 1981; Morello, 1988). Acredita-se que o mecanismo de ação do benzonidazol está envolvido com a ligação de seus intermediários nitroreduzidos a vários componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos, provocando a inibição do crescimento dos parasitos (Dias de Toranzo *et al.*, 1988). Ambos os compostos são efetivos em reduzir a duração e a severidade clínica da doença de Chagas aguda e congênita, levando a aproximadamente 50% dos pacientes tratados à cura parasitológica (Urbina *et al.*, 2003). Foi relatado na última década, que o BZ teve uma atividade de cura significativa, com até 60% de cura parasitológica observada em crianças na fase crônica recente da doença de Chagas tratadas com esse composto na Argentina e no Brasil. Entretanto, esses compostos tem limitada eficácia terapêutica na fase crônica da doença, cujos índices de cura são muito baixos, entre 6 a 10% (Estani *et al.*, 1998).

Na literatura vários autores observaram a existência de cepas naturalmente resistentes ao benzonidazol e nifurtimox (Filardi & Brener, 1987). Algumas dessas cepas foram isoladas de áreas onde a doença de Chagas humana não existe, sugerindo assim que a resistência natural do *T. cruzi* aos derivados nitroheterocíclicos pode ser um importante fator para explicar as baixas porcentagens de cura detectadas em pacientes chagásicos tratados (Filardi & Brener, 1987). Além disso, também foi demonstrado que diferenças geográficas podem interferir na eficácia terapêutica da doença de Chagas (Rassi & Luquetti, 1992). Em nosso laboratório, 45 cepas do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao benzonidazol e nifurtimox foram analisadas em relação a diferentes marcadores moleculares. O perfil heterozigoto, ZB conteve exclusivamente cepas sensíveis e ocorreu predominantemente em áreas geográficas onde o tratamento clínico da

doença de chagas tem sido reportado como mais efetivo, sugerindo que este zimodema esteja associado com o fenótipo de sensibilidade do *T. cruzi* a drogas (Murta *et al.*, 1998). No entanto, os zimodemas 1 e 2 foram encontrados em populações do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes a drogas.

Atualmente estudos de bioquímica básica em *T. cruzi* têm identificado novos alvos para a quimioterapia da doença de Chagas que incluem enzimas como a Tripanotiona Redutase (TR), a Superóxido Dismutase (SOD), a Cisteína Protease de 51 a 57 kDa ou GP51/57 (Cruzipaína), a Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferase (HGPRT), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), DNA topoisomerasas, a Dihidrofolato Redutase-Timidilato Sintetase (DHFR-TS) e a Farnesilpirofosfato Sintase (DoCampo, 2001; Rodriguez, 2001; Coura & Castro, 2002). Além do estudo de enzimas alvo para a quimioterapia da doença de Chagas, pesquisas por compostos ativos sobre a biossíntese de ergosterol estão sendo realizadas. Esses compostos são muito eficazes na depleção do ergosterol endógeno ou no acúmulo de intermediários tóxicos (Urbina *et al.*, 1997). O ergosterol é uma substância fundamental para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do *T. cruzi*, além de ser importante para sua proliferação *in vitro*. Por essa razão, o ergosterol é um alvo potencial para a pesquisa de quimioterápicos (Urbina, 1999a).

1.6- Seleção de cepas do *T. cruzi* resistentes a drogas

Com a finalidade de estudar o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas, vários autores obtiveram cepas do *T. cruzi* com resistência *in vitro* ao BZ ou NFX. Abdo (1991), conseguiu selecionar *in vitro* uma população do *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 do *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 selecionadas *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 e alta de BZ. Na ausência de pressão do BZ, o fenótipo da população resistente BZR foi estável após 6 meses de

manutenção em meio de cultura LIT, após 20 passagens em camundongos e uma passagem pelo vetor invertebrado, *Triatoma infestans* (Murta & Romanha, 1998).

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

1.7- Resistência a drogas em parasitos

Um dos grandes obstáculos para o tratamento, prevenção e erradicação de doenças parasitárias humanas é a resistência a drogas. As alterações bioquímicas e o mecanismo molecular pelo qual os parasitos tornam-se resistentes são ainda muito 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 (revisado por Borst, 1991; 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 (Figura 2).

Engel e colaboradores (2000) descreveram o mecanismo de resistência ao inibidor da enzima cisteína protease, cruzipaina, em epimastigotas do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* a esse inibidor. Os autores observaram um aumento da regulação da via secretora nestes parasitos resistentes. Além disso, os parasitos resistentes ao inibidor da cruzipaina foram sensíveis ao NFX e ao BZ, sugerindo que essas drogas são mediadas por mecanismos diferentes.

A resistência a múltiplas drogas (MDR) em linhagens de células tumorais e em protozoários como *Leishmania*, *Plasmodium* e *Entamoeba*, está associada com a superexpressão da PGP de 170-180 kDa. A PGP funciona como uma bomba de efluxo de drogas, dependente de ATP, que reduz o acúmulo de compostos citotóxicos dentro da célula (Ullman, 1995).

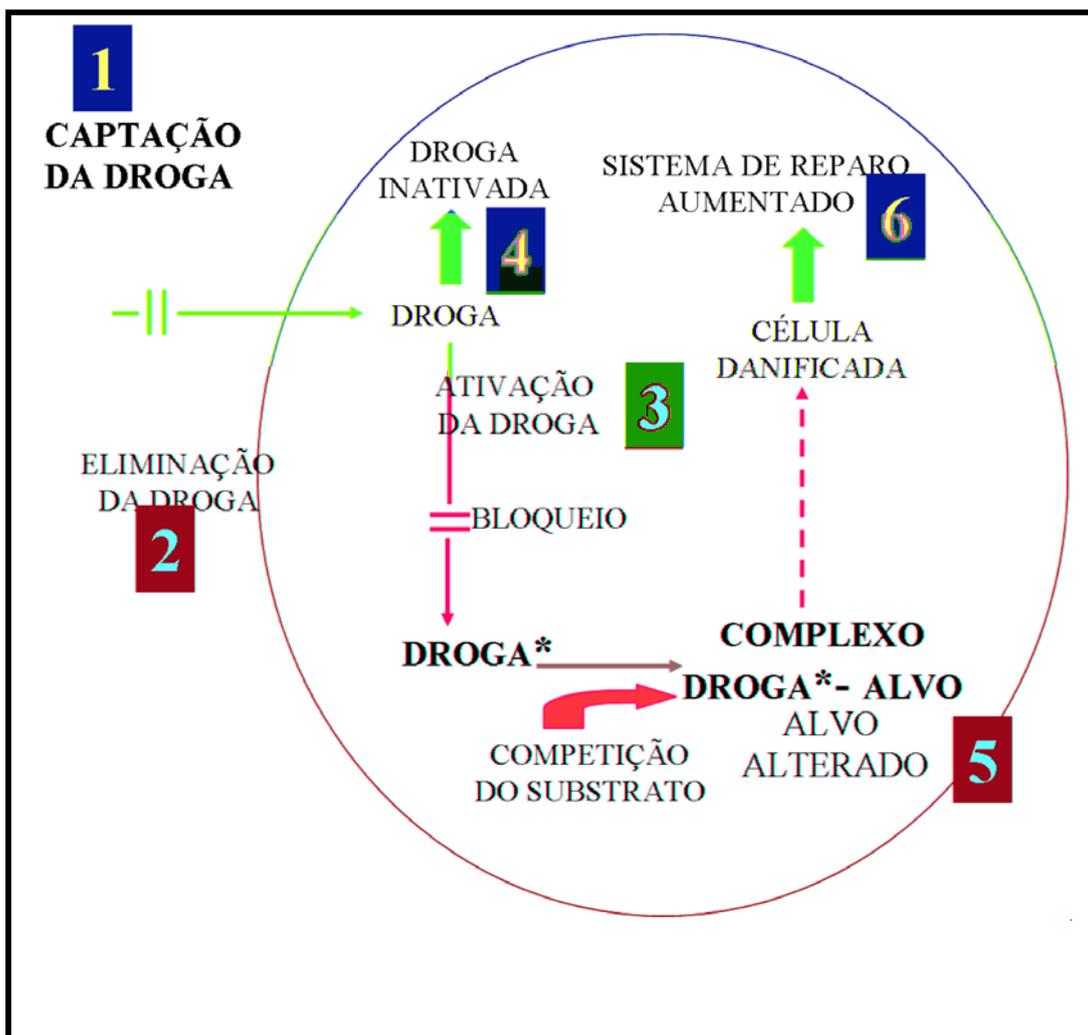


Figura 2: Esquema dos principais mecanismos de resistência a drogas. Borst, 1991; Borst & Ouellette, 1995.

Em um trabalho realizado em nosso laboratório por Murta *et al.* (2001), vinte e sete cepas e clones do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao BZ e NFX e com a resistência induzida *in vitro* ou selecionada *in vivo* ao BZ, foram analisadas em relação ao nível de expressão da P-glicoproteína (PGP). Além disso, os autores analisaram mudanças na amplificação e expressão dos genes *Tcpgp1* e *Tcpgp2*, bem como sua localização cromossômica. Os resultados mostraram que a resistência do *T. cruzi* a drogas não está associada com a amplificação ou superexpressão dos genes PGP. Diante disso, nosso grupo vem trabalhando com genes que possam estar associados com o fenótipo de resistência ou susceptibilidade do *T. cruzi* ao BZ. Sendo assim, recentemente em nosso laboratório, Nogueira e colaboradores (2006) mostraram que um dos mecanismos de resistência do *T. cruzi* a drogas está associado com a amplificação do gene TcSOD que codifica a enzima superóxido dismutase. A TcSOD é um componente central da defesa antioxidante de muitos organismos. Os autores observaram ainda uma maior expressão desse gene e de sua proteína nas populações resistentes ao BZ.

Em *Entamoeba histolytica*, um protozoário que causa difteria e abscessos no fígado, foram descritos 6 genes pgps, 4 completos e 2 incompletos. Os genes completos Ehpgp1 e Ehpgp2 foram clonados e seqüenciados, e codificam P-glicoproteínas semelhantes a PGPs humanas. O fenótipo de *E. histolytica* resistente a emetina está associado com a resistência a múltiplas drogas, é revertido por bloqueadores do canal de cálcio e está relacionado com um aumento do efluxo e diminuição do acúmulo de droga. Assim, o fenótipo MDR de *E. histolytica* é semelhante ao fenótipo clássico descrito para células tumorais humanas (Samuelson *et al.*, 1990).

Em *Candida albicans* genes que codificam enzimas alvo para a biossíntese de ergosterol estão superexpressos nos parasitos resistentes e são associados com resistência desse parasito ao fluconazol (Cowen *et al.*, 2000).

O metronidazol, um derivado 5-nitroimidazólico, possui mecanismo de ação parecido com o do benzonidazol. Ambas as drogas precisam ser reduzidas para serem ativadas. Um dos mecanismos de resistência *in vitro* de *Trichomonas vaginalis* ao metronidazol envolve a baixa expressão de enzimas como piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR), hidrogenases e ferredoxinas que estão envolvidas na ativação dessa droga (Rasoloson *et al.*, 2002).

Guimond e colaboradores (2003) estudando espécies de *Leishmania* resistentes ao metotrexato encontraram a superexpressão dos genes γ -glutamilsteína sintetase, P-glicoproteína A, pterina redutase 1 e dihidrofolato-redutase-timidilato-sintase mediada pela sua amplificação e por outros mecanismos. Os autores observaram também a presença de três novos

genes (glutathiona sintase, S-adenosilhomocistéina hidrolase e S-adenosilmetionina sintase) que são superexpressos em parasitos resistentes à droga, no qual o gene não está amplificado no genoma do parasito. Além disso os autores observaram que o gene transportador de ácido fólico FT5 foi deletado na linhagem de parasitos resistentes ao metotrexato.

Em *T. cruzi* foi bem definida a presença de cepas com resistência natural e o fenômeno de resistência cruzada entre o BZ e o NFX. Porém, o mecanismo molecular de resistência do *T. cruzi* a drogas ainda é muito pouco conhecido. Diferente dos protozoários *Plasmodium*, *Leishmania* e *Entamoeba*, relativamente poucos trabalhos foram publicados em relação ao fenômeno de resistência a drogas em *T. cruzi*.

Recentemente, Villarreal *et al.*, (2005) analisaram a diferença de expressão gênica nas cepas de *T. cruzi* com resistência selecionada e induzida ao BZ. Semelhante aos nossos resultados, os autores observaram que os mecanismos envolvidos na resistência natural a drogas são diferentes daqueles envolvidos na resistência induzida. É importante ressaltar que o mecanismo de resistência a drogas como o BZ é um fenômeno complexo, que envolve não só mecanismos bioquímicos, como também outros fatores como o sistema imune do hospedeiro, que pode interferir na susceptibilidade do parasito a drogas (Murta *et al.*, 2005).

1.8- Análise da expressão diferencial

A identificação de genes diferencialmente expressos em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas pode auxiliar no entendimento das bases moleculares de resistência a drogas nesse parasito, levando a descoberta de novos alvos para a quimioterapia.

Diante da ausência de correlação da expressão da PGP com o fenótipo de resistência a drogas em *T. cruzi*, o objetivo do nosso grupo foi investigar a presença de outros genes que pudessem estar associados com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas. Os autores realizaram um estudo da expressão gênica diferencial em populações do *T. cruzi* sensíveis (S) e resistentes (R) a drogas, utilizando várias metodologias, dentre elas a metodologia de microarranjo de DNA (*Microarray*) (Murta e colaboradores, 2003) (Não publicado).

A metodologia *microarray*, também chamada *biochip*, é uma das técnicas mais avançadas utilizada na atualidade para detectar a expressão diferencial de genes de um organismo. Ela consiste na organização dos fragmentos de DNA (ESTs – expressed sequence tags) em uma lâmina de vidro. Os DNAs são aplicados de forma ordenada na lâmina por um computador e identificados por um software. Paralelamente o RNA das amostras (referência e teste) é extraído e marcado com um fluoróforo. Ao serem hibridizados nas lâminas, eles

reconhecem seus DNAs complementares. Um leitor laser detecta então a fluorescência e baseado nas cores identificam os genes envolvidos no processo estudado (Figura 3). Esta metodologia permite medir simultaneamente o nível de expressão de milhares de genes.

O *microarray* é uma técnica que começou a ser explorada por Schena e colaboradores em 1995. Esses autores obtiveram 45 genes diferencialmente expressos da planta *Arabidopsis*. A partir de então, a metodologia tem sido amplamente utilizada na pesquisa genômica.

A metodologia de *microarray* pode ser aplicada em diversos campos da pesquisa e dentre estes podemos citar: comparação da expressão gênica durante o ciclo de vida dos parasitos; identificação de genes sexo-específicos envolvidos na reprodução em *Schistosoma*, investigação dos mecanismos de resistência a drogas e busca por novas drogas e vacinas (Revisto por Gobert *et al.*, 2005).

Minning e colaboradores (2003) utilizaram a tecnologia de *microarray* para analisar a expressão de genes estágio-específicos durante o processo de diferenciação das formas tripomastigotas para amastigotas de *T. cruzi*. Os autores viram que os transcritos mais expressos em tripomastigotas são membros da família das trans-sialidasas. Um deles, o que codifica a proteína de membrana gp85, está relacionado com a invasão dos parasitos tripomastigotas nas células dos hospedeiros mamíferos.

Garg *et al.*, (2003), através da metodologia de *microarray*, estudaram a resposta do hospedeiro mamífero à infecção *in vivo* pelo *T. cruzi*. Os autores analisaram o perfil de expressão gênica em camundongos com cardiopatia chagásica crônica. Os resultados mostraram que a infecção no tecido cardíaco induz principalmente genes que codificam mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas. Além disso, houve uma diminuição na expressão de genes que codificam elementos chaves do citoesqueleto, como troponinas cardíacas, o que leva ao rompimento dos filamentos sarcoméricos do coração. Os mesmos autores também observaram uma baixa regulação de transcritos que codificam componentes da via de fosforilação oxidativa mitocondrial, especificamente NADH-ubiquinona oxidoreductase e citocromo c oxidase, o que sugere que as funções mitocondriais são seriamente comprometidas no coração infectado pelo *T. cruzi*. Esse estudo foi importante para a compreensão dos fenômenos moleculares que ocorrem durante a infecção do *T. cruzi* ao tecido cardíaco e a progressão para a doença cardíaca crônica (Garg *et al.*, 2003).

A metodologia de *microarray* tem sido ainda utilizada no estudo de genes diferencialmente expressos envolvidos no fenótipo de resistência a drogas em *Leishmania* (Guimond *et al.*, 2003) e *Candida albicans* (Barker *et al.*, 2004).

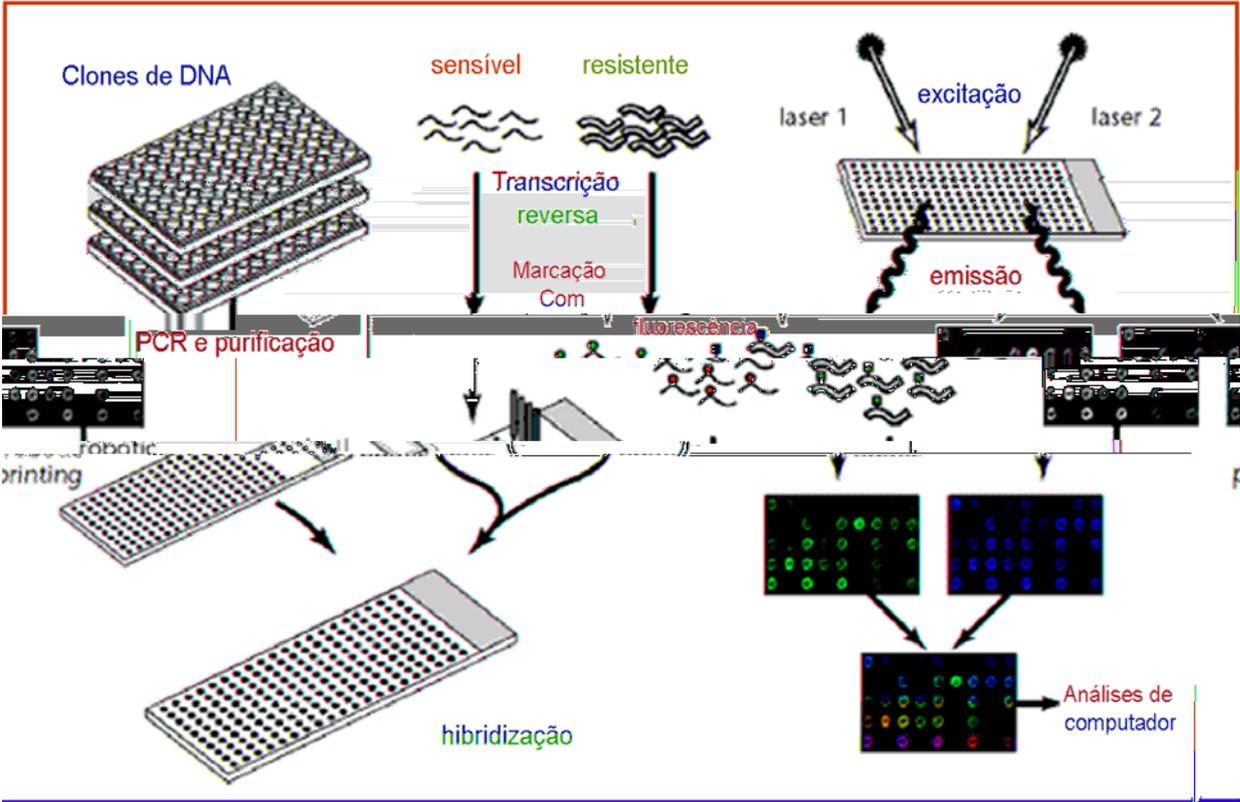


Figura 3: Esquema da metodologia de microarray. Fonte: Duggan, DJ *et al.* Nature Genetics 21 (1999)

Diante disso, utilizando um biochip de cDNA de *T. cruzi* construído por Krieger *et al.*, (2003) (dados não publicados), nosso grupo realizou experimentos de hibridização competitiva com amostras de RNA total extraídas das populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Neste projeto selecionamos um gene que foi menos expresso nos parasitos resistentes ao BZ, para investigarmos o possível papel biológico desempenhado por ele no fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas. Esse gene apresentou homologia significativa com a seqüência da enzima álcool desidrogenase (ADH) do *T. cruzi* depositada em banco de dados (GenBank, número de acesso: XP_819264).

1.8- As álcool desidrogenases

As interconversões de álcoois, aldeídos e cetonas são processos essenciais em procariotos e eucariotos. As oxidoredutases são enzimas responsáveis por essas reações, sendo a enzima álcool desidrogenase (ADH) pertencente a um grupo de enzimas que catalisam a oxidação reversível de etanol a acetaldeído, com conseqüente redução de NAD (Reid *et al.*, 1994). Essas reações resultam na produção principalmente de álcoois e cofatores oxidados como NAD⁺. Esse processo ocorre durante a fermentação de bactérias anaeróbicas e leveduras, onde a regeneração de NAD⁺ é essencial para o metabolismo e crescimento desses organismos. ADHs também possuem importância industrial, por participarem da produção de álcool e solventes orgânicos (Clark, 1989).

Essas enzimas podem ser classificadas em três principais categorias: NAD(P)-dependente ADH, NAD(P)-independente ADH e FAD- dependente álcool oxidases. As NAD(P)-dependentes ADHs são as melhores caracterizadas. Elas podem ainda serem divididas em três grupos estruturalmente e cataliticamente diferentes: grupo I, ADH de cadeia longa dependente de zinco; grupo II, ADH de cadeia curta independente de zinco e grupo III, ADH ativada por ferro (Jörnvall *et al.*, 1987).

Diferentes ADHs do tipo I são encontradas em vários organismos e elas existem nas formas dimérica e tetramérica, representadas pela ADH de fígado de cavalo (HLADH) e ADH de *Saccharomyces cerevisiae* (SADHI) respectivamente. Entretanto, somente a estrutura terciária da HLADH é bem conhecida neste grupo (Eklund *et al.*, 1974, 1976, 1981). Outras proteínas como as treonina desidrogenases e sorbitol desidrogenases estão relacionadas a ADH I por apresentarem identidade de seqüência e similaridades estruturais e funcionais (Aronson *et al.*, 1989; Jörnvall *et al.*, 1981; Eklund *et al.*, 1985; Jeffery and Jörnvall, 1988; Karlsson *et al.*, 1991).

As ADHs I podem oxidar uma variedade de álcoois primários, alguns álcoois aromáticos, vitaminas A e etanediol. O mecanismo de ação da HLADH é o melhor estudado. A oxidação do etanol resulta na redução de coenzimas e na liberação de prótons na solução. O átomo de zinco é essencial para a estabilização e orientação do álcool durante a oxidação (Eklund *et al.*, 1976)

O grupo II das ADH é representado pelas álcool desidrogenases de *Drosophila* spp. Elas foram primeiramente isoladas de procariotos, mas atualmente sabe-se que existem ADHs II no fígado e na placenta de mamíferos e em outros tecidos (Marks *et al.*, 1992). A enzima ADH II ativa é encontrada nas formas diméricas ou tetraméricas e não há evidências de que elas necessitem de algum metal para a sua atividade (Peltoketo *et al.*, 1988).

As álcool desidrogenases ferro-dependentes ou ADHs III estão presentes em vários organismos como *E. coli* (AdhE) e *Clostridium perfringens*, como também em protozoários patogênicos. A primeira enzima deste grupo a ser sequenciada foi a adhB de *Zimomonas mobilis* (ZMADHII) (Conway *et al.*, 1987). É importante ressaltar ainda que a ausência dessa enzima em vertebrados faz com que sejam um alvo atrativo para a quimioterapia antimicrobiana (Chen *et al.*, 2004). Echave *et al.*, (2003) observaram que essa enzima ADH de *E. coli* (AdhE) possui um importante papel de proteção contra o estresse oxidativo. Os autores mostraram que quando o gene da AdhE foi deletado do genoma dos parasitos, as células não cresceram e apresentaram defeitos na divisão celular. Tamarati *et al.*, (1998) observaram um aumento na síntese da AdhE quando a bactéria *E. coli*, em condições anaeróbicas de crescimento, era exposta ao peróxido de hidrogênio.

Em *Entamoeba histolytica* são conhecidos três ADHs (EhADH1, EhADH2 e EhADH3). Todas as três pertencem ao grupo das ADHs ativadas por ferro. *E. histolytica* não possui mitocôndria e sua obtenção de energia se dá através da fermentação da glicose, produzindo CO₂, acetato e etanol como produtos finais. As ADHs desse protozoário são enzimas que possuem importante papel nessa via de obtenção de energia. Kumar e colaboradores (1992) demonstraram que as enzimas envolvidas na fermentação da glicose são importantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra a amebíase. Diante disso, os autores caracterizaram o gene EhADH1 e mostraram que esse gene é simples cópia e codifica uma proteína de 39 kDa. Espinosa *et al.*, (2004) mostraram que os compostos cicloalkanóis ciclopropil (CPC) e ciclobutil (CBC) inibem o crescimento dos trofozoítos de *Entamoeba*. Os autores sugeriram que esses compostos bloqueiam o metabolismo fermentativo por inibirem a enzima EhADH2. Diante disso, essa enzima é também essencial para o crescimento e sobrevivência de *E. histolytica*, podendo ser um novo alvo para drogas contra a amebíase.

Niño *et al.*, (2003) mostraram que a AdhE está presente em *Giardia lamblia* auxiliando no metabolismo do piruvato. Os autores demonstraram que essa enzima é importante na transformação de cistos em trofozoítos, processo este fundamental na infecção da *Giardia* no hospedeiro humano. Em *Trichomonas vaginalis*, a enzima AdhE participa de um sistema de transporte de elétrons, sendo capaz de mediar a redução da droga metronidazol, levando a sua ativação (Rasoloson *et al.*, 2002).

Poucas ADHs tem sido descritas em tripanosomatídeos. Molinas *et al.*, (2003) purificaram e caracterizaram uma ADH mitocondrial de *Phytomonas*, um tripanosomatídeo isolado da planta *Euphorbia characias*. Esta foi a primeira ADH caracterizada em tripanosomatídeos e pouco se sabe sobre seu papel fisiológico e funcional em *Phytomonas*.

Em *Leishmania*, o gene da ADH ainda não foi caracterizado, apesar de sua seqüência já ter sido depositada em banco de dados (*L. major* (LmjF30.2090), *L. infantum* (LinJ30.2440) e *L. braziliensis* (LbrM30 v2.2040)). Em *T. brucei* a seqüência do gene da ADH ainda não foi depositada no banco de dados.

Arauzo *et al.*, (1989) descreveram uma NADP-aldeído-redutase de *T. cruzi*, a qual utiliza álcoois n-propil como substratos preferenciais. Entretanto, com o recente sequenciamento do genoma desse parasito, a seqüência correspondente ao gene da álcool desidrogenase foi depositada no banco de dados (El-Sayed *et al.*, 2005). Diante disso, sabe-se que em *T. cruzi* a enzima TcADH apresenta o íon ferro na sua estrutura, pertencendo ao grupo III das ADHs. Nosso trabalho descreve pela primeira vez a caracterização do gene *TcADH* que codifica a enzima álcool desidrogenase em *T. cruzi*.

Nesse trabalho, inicialmente realizamos uma análise filogenética comparando a ADH do *T. cruzi* com outros organismos e fizemos ensaios da atividade enzimática da TcADH nas populações sensíveis e resistentes ao BZ. Posteriormente avaliamos os níveis de expressão da proteína TcADH e fizemos ensaios de imunolocalização dessa enzima no parasito. Finalmente investigamos os níveis de mRNA do gene *TcADH*, número de cópias bem como sua localização cromossômica.

2- JUSTIFICATIVA

A quimioterapia específica da doença de Chagas envolve questões importantes como: a baixa eficácia do tratamento de casos humanos com BZ e NFX, a considerável toxicidade desses compostos, a existência de cepas com resistência natural e a resistência cruzada entre o BZ e o NFX. Tem sido sugerido que a resistência natural do parasito a drogas pode ser um importante fator para explicar as baixas taxas de cura detectadas em pacientes chagásicos. As alterações bioquímicas e o mecanismo molecular pelo qual os parasitos tornam-se resistentes ou susceptíveis a drogas são ainda muito pouco conhecidos.

Nosso grupo vem trabalhando há alguns anos em projetos de pesquisa relacionados com a quimioterapia experimental da Doença de Chagas. Em um estudo prévio realizado em nosso laboratório, Murta *et al.*, (2001) investigaram o papel da fosfoglicoproteína de membrana (PGP) na resistência do *T. cruzi* a drogas. Essa proteína está associada com resistência a drogas em muitos organismos, por aumentar o efluxo da droga para fora da célula. Entretanto, os autores observaram que a resistência do *T. cruzi* a drogas não está associada com a amplificação ou a superexpressão dos genes PGP (Murta *et al.*, 2001). Diante disso, os autores analisaram a expressão gênica diferencial nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, com o objetivo de identificar genes associados com o fenótipo de susceptibilidade ou resistência do parasito. Utilizando a metodologia de *microarray* de DNA, os autores obtiveram vários genes diferencialmente expressos. O gene da álcool desidrogenase de *T. cruzi* (TcADH) foi selecionado como sendo menos expresso nos parasitos resistentes ao BZ.

A enzima ADH pertence a um grupo de enzimas que catalisam a oxidação reversível de etanol a acetaldeído, com conseqüente redução de NAD (Reid *et al.*, 1994). Poucas ADHs tem sido descritas em tripanosomatídeos. A primeira caracterização da ADH nesses organismos foi feita por Molinas *et al.*, (2003), que isolou e caracterizou uma isopropil ADH (iPDH) mitocondrial de *Phytomonas*, um tripanosomatídeo isolado da planta *Euphorbia characias*. Outros estudos mostraram que em *Trichomonas vaginalis* a enzima ADH participa de um sistema de transporte de elétrons, sendo capaz de mediar a redução da droga metronidazol, levando a sua ativação (Rasoloson *et al.*, 2002). Entretanto, o envolvimento da enzima ADH no fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas ainda não foi descrito. Neste projeto estamos caracterizando pela primeira vez o gene que codifica a enzima ADH de *T. cruzi*.

3- OBJETIVO GERAL

Caracterizar o gene *TcADH* que codifica a enzima álcool desidrogenase (TcADH) em cepas do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

3.1- Objetivos específicos

- Comparar a ADH de *T. cruzi* com a de outros organismos através de alinhamentos de seqüências e análises filogenéticas.
- Determinar a atividade enzimática da ADH bem como a de outras oxidoreduases nas populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Produzir a proteína TcADH recombinante para geração de anticorpo policlonal.
- Avaliar o nível de expressão da proteína TcADH em cepas do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Determinar a localização celular da TcADH nas formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Avaliar o nível de mRNA do gene *TcADH* em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Determinar o número de cópias desse gene nas populações do *T. cruzi*.

4- METODOLOGIA

4.1- Identificação da ADH de *Trypanosoma cruzi* e alinhamento de seqüências

A partir das seqüências nucleotídicas (XM_814171) e peptídicas (XP_819264 e XP_821876) da ADH do *T. cruzi* depositadas no banco de dados GenBank, foram identificados genes ortólogos em *L. major* (LmjF30.2090), *L. infantum* (LinJ30.2440) e *L. braziliensis* (LbrM30 v2.2040). Além destas, seqüências peptídicas de álcool desidrogenases foram selecionadas de *Candida albicans* (EAK99442), *Chromobacterium violaceum* (NP_902398), *Clostridium perfringens* (NP_561365), *Drosophila melanogaster* (NP_477209), *Entamoeba histolytica* (XP_652262), *Escherichia coli* (NP_756272), *Giardia lamblia* (XP_770830), *Shewanella amazonensis* (ZP_00585549) e *Trichomonas vaginalis* (AAO21494). As seqüências foram comparadas utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) e WU-BLAST do Instituto de Pesquisa Genômica (TIGR). Foram comparadas as seqüências nucleotídicas (BLASTX) e peptídicas (BLASTP) da TcADH com seqüências não redundantes de proteínas depositadas no GenBank e nos bancos de dados de *Leishmania* do Genedb (www.genedb.org). As Álcool desidrogenases de algumas espécies apresentam baixa similaridade com a TcADH e foram selecionadas por pesquisa direta no banco de dados GenBank. As seqüências obtidas foram alinhadas utilizando o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) e a árvore filogenética foi construída utilizando o programa MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2004)

4.2- Cepas do *Trypanosoma cruzi*

As onze cepas do *T. cruzi* utilizadas nesse estudo estão listadas na tabela 1. Utilizamos uma população do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol (BZR) e seu par sensível (BZS) (Murta e Romanha, 1998) e um par de cepas (17LER/17WTS) com resistência induzida *in vitro* ao benzonidazol (Nirdé *et al.*, 1995). As outras cepas utilizadas nesse estudo foram previamente caracterizadas de acordo com a susceptibilidade *in vivo* ao BZ (Filardi *et al.*, 1987), sendo cinco sensíveis ao BZ (Quaraizinho, Berenice, Ernane, Buriti e CL-Brener) e duas naturalmente resistentes (Yuyu e VL-10).

Tabela 1

Populações e clones do *Trypanosoma cruzi* utilizadas neste trabalho.

<i>T. cruzi</i>	Origem	Hospedeiro	Sus ^a	Zim ^b	Localização cromossômica do TcADH (Kb)
17 WTS	Mex	Triatomíneo	S	1	1890; 1120
17 LER	Mex	Triatomíneo	R	1	1890; 1120
Yuyu	BA	<i>Triatoma infestans</i>	R	1	1270; 1540
Quaraizinho	RGS	<i>Triatoma infestans</i>	S	1	1110
BZS população	SP	Caso agudo humano	S	2	1420
BZR população	SP	Caso agudo humano	R	2	1420
Berenice	MG	Caso crônico humano	S	2	1420
Ernane	GO	Caso crônico humano	S	2	1120; 1230
VL-10	MG	Caso crônico humano	R	2	1270
Buriti	RGS	<i>Triatoma infestans</i>	S	B	1270;1540
CL Brener	RGS	<i>Triatoma infestans</i>	S	B	1270;1540

1- Origem das cepas: Mex- Mexico; SP- São Paulo; BA- Bahia; SC- Santa Catarina; Arg- Argentina; GO- Goiás; RGS- Rio Grande do Sul; Col- Colombia; MG- Minas Gerais; SP, BA, SC, GO, RGS and MG are different states of Brazil;

2- Susceptibilidade, *in vivo* das cepas de *T. cruzi* a droga (Filardi & Brener, 1987): S, sensível; R, resistente;

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

ND- não determinado;

F.A- Fase aguda e F.C- Fase crônica.

Todas as cepas do *T. cruzi* foram previamente classificadas como zimodemas Z1, Z2 e ZB de acordo com seus perfis isoenzimáticos (Murta *et al.*, 1998).

Estas cepas foram cultivadas em meio LIT para obtenção de massa dos parasitos. Os parasitos em fase exponencial de crescimento foram centrifugados e lavados duas vezes com PBS. A massa de parasitos (10^9) foi congelada a -70°C e submetida à extração de DNA, RNA ou proteína.

4.3- Ensaio da atividade das oxidoredutases do *T. cruzi*.

A atividade da TcADH, bem como de outras oxidoredutases presentes no extrato protéico total do *T. cruzi*, foi determinada principalmente pela capacidade da enzima ADH em reduzir o NAD^+ em NADH. O ensaio foi realizado conforme descrito por Arauzo *et al.*, 1988 com algumas modificações. Resumidamente, o ensaio foi realizado em placa de 96 poços, cada poço contendo: 50 mM de tampão glicina/NaOH, pH 9,5; 0,2 mM de NAD^+ ; 0,1 M de etanol e 60 μg de extratos protéicos das populações do *T. cruzi* 17WTS, 17LER, BZS e BZR eluídos em água ddw, em um volume final de 200 μl . A leitura foi realizada a intervalos de 5, 10, 20 e 30 minutos em leitor de ELISA (Molecular Device, Versamax tunable microplate reader) a 340 nm. Como controle foram utilizados poços contendo PBS 1X substituindo os extratos protéicos. Cada amostra foi testada em triplicata e os resultados apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes. A atividade enzimática da TcADH (expressa em unidades) nas amostras foi calculada utilizando uma curva-padrão construída a partir de diluições seriadas da enzima ADH de levedura purificada (Sigma, 6mg/ml).

4.4- Preparo de bactérias cálcio-competentes

As bactérias *E. coli* da linhagem Top10F' e BL-21 foram preparadas para a transformação por choque térmico. Uma colônia de bactéria foi colocada em 50mL de meio LB por 12h a 37°C sob agitação. Desta cultura saturada, 1 mL de células foi incubado em 100 mL de meio LB, a 37°C sob agitação por 2 ou 3 horas. O crescimento das bactérias foi monitorado através de medidas espectrofotométricas, até ser atingida a absorbância OD_{600} 0,4 a 0,7nm. Atingindo este crescimento as bactérias foram incubadas no gelo por 10 min e posteriormente centrifugadas a 6500 xg a 4°C por 7 min. O sedimento foi ressuscitado em 50 mL de CaCl_2 100 mM / HEPES 10mM pH 7,0 e centrifugado a 6000 xg por 7 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado e lavado novamente com 100 mM CaCl_2 / 10 mM

HEPES pH 7,0 / Glicerol 10%. Após a lavagem a mistura foi incubada a 4°C por 2h. As células foram aliquotadas (100 µL/tubo) e armazenadas a -70°C.

4.5- Clonagem e expressão da proteína recombinante

Para a clonagem do gene *TcADH* do *T. cruzi*

4.6- Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para verificar a eficiência da expressão da proteína recombinante, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Inicialmente foi preparado um gel a partir da mistura de 0,8% de N,N'-metileno-bis-acrilamida e 30% de acrilamida (p/v). O gel de separação (12%) foi feito adicionando-se a esta mistura TRIS-HCl pH 8,8 e SDS (Duodecil Sulfato de Sódio) nas concentrações finais de 0,375 M e 0,01% respectivamente. O gel foi polimerizado pela adição de Persulfato de amônio a 10% em água destilada (0,5% v/v) e TEMED (N,N,N',N' – tetrametil-etilenodiamina 0,05% v/v). O gel de concentração (4% de acrilamida), foi preparado como descrito anteriormente para o gel de separação, utilizando-se porém tampão TRIS-HCl pH 6,8 na concentração final de 0,125 M.

Para a eletroforese, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (SDS 2%, TRIS-HCl 65 mM pH 6,8 azul de bromo fenol 0,05%, 2-mercaptoetanol 5,0% e glicerol 10%), fervidas em banho Maria por 5 minutos e aplicadas às canaletas do gel de concentração. A eletroforese foi realizada a 50V para o gel de concentração e a 120 V para o gel de separação, sendo a corrida acompanhada pelo azul de bromofenol presente no tampão da amostra. O tampão de corrida continha 25mM de TRIS-HCl, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS em PH 8,3. Após a eletroforese, o gel foi corado durante 4 horas pelo azul de Coomassie (Azul de Coomassie brilhante R-250 0,1%, metanol 40% e ácido acético 10%) à temperatura ambiente e em seguida descorado com várias trocas de solução descorante (metanol 40% e ácido acético 10%) até o fundo do gel se tornar incolor.

4.7- Teste de solubilidade da proteína recombinante TcADH

4.7.1 - Solubilização de proteínas sem sarcosil

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

4.7.2 - Extração de proteínas recombinantes insolúveis com sarcosil

As bactérias induzidas com IPTG totalizando um volume de 50 mL, foram centrifugadas à 4000xg por 10 min. O sedimento foi ressuspensionado em 2,5 mL de PBS 1X pH 8.0, acrescido de 1 mM de PMSF e 20 µg/mL de lizosima e incubado no gelo por 15 min. A amostra f

e)20fmoiml de

8.59(0s)78.9aPomn(7/49)-0.7.3t((cb69)-.7(if)-.7(ugad a(1o)-207(4000xgdutr)78.7antde 0 mi a(4°)-106(C)16n.)-1071(çã(

22.2mbinba19na19 fo((s)1174(ubm(a1(tzida19 àa19 (a1(lp)0(a1(tp)0rofor(a15s)1174(ea19 (a1(mp)0(ge)0 o)-2(dea19

A dosagem da proteína recombinante rTcADH e das proteínas totais do *T. cruzi* foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando uma placa de ELISA com 96 poços. Uma curva-padrão foi feita com a albumina de soro bovino (BSA), em triplicatas nas seguintes concentrações: 0.4; 0.8; 1.2 e 1.6 µg de BSA por poço. Para a dosagem da proteína rTcADH, foram utilizados os volumes de 1µl, 5µl e 10µl da proteína concentrada. Enquanto que para a dosagem das proteínas totais do *T. cruzi* (extraídas conforme item 3.20), foram utilizados os volumes de 0,2µl, 1µl e 2µl da proteína concentrada. Na placa, pipetamos 20µL das amostras diluídas em PBS e 180µl do reagente de Bradford (100mg Coomassie Brilliant Blue G 250; 50mL etanol 95% e 100mL ácido fosfórico 85%). A placa foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min e posteriormente submetida à leitura a 595nm em um leitor de ELISA (BIO-RAD). A concentração das proteínas foi calculada com base na curva-padrão da BSA.

4.11- Obtenção de anticorpo policlonal anti-proteína rTcADH

Para produção de soro policlonal, a proteína recombinante TcADH foi inoculada em coelhos (New Zealand White rabbits) provenientes da fazenda da UFMG em Igarapé. Os coelhos receberam 3 injeções 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 injeção utilizamos o adjuvante completo de Freund e nos dias subsequentes o adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). Em nossos experimentos utilizamos três coelhos: um inoculado apenas com o adjuvante, outro com a proteína e o adjuvante e um terceiro imunizado apenas com a GST, para servir como controle, uma vez que a proteína TcADH está fusionada a GST de *S. japonicum*. O soro foi obtido 15 e 30 dias após a última imunização. Antes das imunizações, 5mL de sangue dos coelhos foi coletado para servir como controle pré-imune. No primeiro dia de inoculação foi utilizado o adjuvante completo de Freund e nos dias subsequentes o adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). O sangue foi coletado 15 e 30 dias após a última inoculação. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 6000xg durante 5min à 4°C e o soro aliquoteado armazenado a -20°C.

4.12- Extração de proteínas totais

As formas epimastigotas das cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT), lavadas em PBS e congeladas a -70°C . Ao sedimento obtido, foi adicionado 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 $\mu\text{g/ml}$, TPCK 2,0 mg/ml e TLCK 0,5 mg/ml) e homogeneizados com uma micropipeta automática. A lise dos parasitas foi monitorada ao microscópio óptico. Os homogenatos foram centrifugados a 45000g por 1 hora a 4°C e o sobrenadante, extrato protéico solúvel, aliquoteado e armazenado a -70°C .

4.13- Western blot

A análise da expressão da proteína TcADH no parasito foi feita por *Western blot*, utilizando soro de coelho imunizado com a proteína rTcADH. O perfil das proteínas totais foi resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 10% (Laemmli, 1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979) a 100V por 2h no gelo em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM Glicina; Metanol 20%; pH 8,3).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado por 1h e lavadas em PBS-T por 3x de 5 min. Em seguida foram incubadas com o soro de coelho imunizado com a proteína recombinante rTcADH diluído a 1:5000 à temperatura ambiente por 1h. As membranas foram lavadas e incubadas por 1h com o conjugado anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina, diluído a 1:5000 (Promega). Depois de lavadas, as membranas foram reveladas com 100 μl dos substratos 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) e nitro blue tetrazolium (NBT), respectivamente, em tampão fosfatase alcalina (AP), de acordo com o protocolo do fabricante (Bio-Rad).

4.14- Análise Densitométrica

A análise densitométrica da intensidade das bandas do gene e da proteína TcADH visualizadas nos ensaios de *Northern blot*, *Southern blot* e *Western blot* foi realizada através do aparelho ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech), utilizando o programa “ImageMaster VDS software”. A imagem foi capturada pelo aparelho VDS e as análises realizadas pelo programa, sendo que foi considerado como significativo os valores de densidade ótica das bandas superiores a 1,5.

4.15- Ensaio de imunolocalização por microscopia confocal

T. cruzi

μ

4.16- Extração de RNA total

T. cruzi

μ

μ

4.17- Extração de DNA

O sedimento de epimastigotas das populações sensíveis e resistentes foi ressuscitado em tampão de extração contendo 50mM de Tris-HCl, 50mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0 e incubado com 100 µg/mL de proteínase K por 12h a 37°C. Posteriormente, o DNA foi extraído com fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 1:1:24 e clorofórmio/álcool isoamílico 1:24 e precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 100% e acetato de sódio 0,3M a 20°C por 12h. O DNA foi então lavado 2X com etanol 70% e ressuscitado em 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0). A concentração do DNA obtido foi determinada por espectrofotômetro considerando 1 unidade de absorvância 260 nm = 50 µg/mL.

4.18- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR foi utilizada para amplificação do fragmento do gene *TcADH* utilizado para vários ensaios. Para o preparo das sondas e PCR de colônia utilizamos os seguintes iniciadores: *TcADH* forward: 5' CGCGGATCCCCATGTTTCGCTTCTCACGCCC 3'; e *TcADH* reverse: 5' CCGGAATTCTACATTGACTCACGGTAGAT 3'. Ambos iniciadores foram desenhados a partir da seqüência completa de nucleotídeos depositada no GeneBank (número de acesso XP_819264). O tamanho esperado do fragmento era de 1220 pb.

Para cada reação de PCR em um volume final de 10µl, utilizamos os seguintes reagentes: tampão de reação 1X (50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ e 10 mM de Tris-HCl pH 8,5), 200 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos (dNTPs), 10 pmoles de cada iniciador específico, 1 ng de DNA do *T. cruzi*, 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (INVITROGEN) e água deionizada e bidestilada qsp (10 µl)

A reação foi submetida à amplificação no termociclador (Perkin Elmer®) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de três etapas (desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento 65 °C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min). Após os 30 ciclos foi feita uma extensão final por 5 min a 72°C.

4.19- Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

Após a PCR, para a visualização dos produtos amplificados, 3µl da amostra foram ressuscitados em volume igual de tampão de amostra 2x (0,08% de azul de bromofenol, 0,08% de xileno cianol e 10% de ficol) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 4% em sistema de minigel a 100V por 40 minutos. Em seguida, os géis foram fixados em uma solução de etanol 10% e ácido acético 0,5% durante 10 minutos sob agitação branda, corados

com 0,2% de nitrato de prata durante 10 minutos, lavados por 2 minutos em água deionizada e revelados com 0,75 M de NaOH e 0,1 M de formaldeído por 10 minutos sob agitação branda. Como padrão de peso molecular foi utilizado o DNA do bacteriófago Φ X174 digerido com a enzima de restrição *HaeIII*.

4.20- Purificação de produto de PCR

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados em colunas QIAquick spin (QIAGEN) utilizando microcentrífuga, de acordo com o protocolo da fabricante (Kit purificação QIAquick -QIAGEN). O DNA de interesse permaneceu ligado na coluna QIAquick spin e os outros componentes da reação de PCR (magnésio, tampão de reação e outros) foram lavados com tampão. Posteriormente, o DNA foi eluído da coluna com 50 μ l de água deionizada aquecida a 95°C por 2 minutos.

4.21- RT-PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para quantificar o nível de mRNA e número de cópias do gene *TcADH* em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

Para quantificação do mRNA, foi feita primeiramente uma RT-PCR. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi preparado um mix nas seguintes condições: 2 μ g de RNA total, 0,5 mM de oligo d(T), 1X tampão RT, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 40 U RNase e 200 U de transcriptase reversa Superscript II, em um volume final de 20 μ l. Todos os reagentes usados foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA). A reação do cDNA foi incubada a 42°C por 60 min. Após a síntese da primeira fita, a reação foi inativada a 70°C por 20 min, e o cDNA foi diluído 15X em água deionizada.

A amplificação foi realizada pelo sistema de detecção da Sequência Gene-Amp 5700 (PE Applied Biosystems). Os iniciadores foram desenhados a partir da sequência completa de nucleotídeos do gene *TcADH* depositada no banco de dados (número de acesso no GenBank XP_819264): RT *TcADH* senso 5' GCAAGAATCTTGTGGCACGAG 3' e RT *TcADH* antisenso 5' AAGCTGATGAGCCATTGCG 3'. Esse par de iniciadores gerou um fragmento de 107 pb. O gene constitutivo unicópia hipoxantina guanina fosforribosil transferase do *T. cruzi* (*TcHGPRT*) foi usado para normalizar a quantidade de amostra analisada. O iniciador *TcHGPRT1* senso: 5' CTACAAGGGAAAGGGTCTGC 3', e o iniciador *TcHGPRT2* antisenso: 5' ACCGTAGCCAATCACAAAGG 3', foram desenhados a partir da sequência

completa de nucleotídeos do gene (número de acesso no GenBank, L07486). As reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador, tampão 1X SYBR GREEN (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 1 U AmpliTaq Gold DNA polymerase, 5 μl de DNA diluído 15X e água deionizada para completar o volume final da reação de 25 μl.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, e o anelamento/extensão a 60°C por 1 min. Curvas padrão foram utilizadas para cada experimento utilizando quantidades conhecidas dos plasmídeos (TOPO PCR 2.1-Invitrogen) contendo os genes de interesse clonados *TcADH* e *TcHGPRT*. Utilizamos diluições ao décimo desses plasmídeos (*TcADH* 10⁸-10⁵ moléculas e *TcHGPRT* 10⁹-10⁶ moléculas).

O número de cópias do mRNA e DNA foram obtidas através do programa “Sequence Detection System” (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo e quantificar o número de cópias conforme a curva padrão.

4.22- Análises de Northern blot

O RNA das diferentes cepas do *T. cruzi* foi submetido à eletroforese em gel de agarose-formaldeído e transferido para uma membrana de náilon. 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 contendo de 10 a 20 μg de RNA foram aplicadas nas canaletas do gel e submetidas à eletroforese 20V por 4h em tampão MOPS 1X acrescido de formaldeído 18,7% (vol/vol). O gel contendo as amostras foi transferido para membrana de náilon por capilaridade, durante 12h, usando tampão SSC 10X concentrado. Posteriormente, as membranas foram hibridizadas com a sonda do gene *TcADH* marcada com fósforo radioativo (³²P), segundo protocolo descrito por Dos Santos & Buck (1999).

4.23- Eletroforese de Pulso alternado- PFGE

A metodologia PFGE foi utilizada para localizar o gene *TcADH* nos cromossomas do *T. cruzi*. Inicialmente, para a preparação dos blocos, os parasitas (~2x10⁸) foram lavados em solução salina 0,9% e ressuspensos em solução de PSG (NaCl 130mM, Na₂HPO₄ 142mM, NaH₂PO₄ 8mM e glicose 2%). Posteriormente foi adicionado 1% de agarose de baixo ponto de

fusão e a solução foi transferida para o molde de acrílico. Após a solidificação, os blocos foram incubados com a solução de lise (sarcosil 3%, Proteinase K 1mg/ml e EDTA 500mM pH 8,0) por 48h a 50°C. Em seguida os blocos foram estocados em solução de EDTA 500mM a 4°C até o uso. A eletroforese de pulso alternado foi realizada utilizando o aparelho “gene navigatorTM system” (Pharmacia). Os blocos contendo as amostras foram colocados nos poços do gel de agarose à 1% em tampão TBE 1X. A corrida eletroforética foi realizada com uma voltagem constante (180V) a 9°C. Conforme as condições padronizadas no laboratório foram aplicados pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 70 seg por 15h, 90 seg por 24h, 200 seg por 15h e 400 seg por 15h, sem interpolação. O gel foi corado com brometo de etídio (1µg/ml) e submetido a desnaturação ácida, básica e neutralização. Posteriormente o DNA foi transferido para membrana de náilon (Maniatis, 1989) e submetido aos ensaios de hibridização.

4.24- Sondas e ensaios de hibridização

As sondas utilizadas nos ensaios de northern e southern blot foram preparadas a partir da amplificação por PCR do DNA da cepa 17WTS do *T. cruzi* com os iniciadores específicos para o gene da *TcADH* (*TcADH* forward: 5' CGCGGATCCCCATGTTTCGCTTCTCACGCCC 3'; e *TcADH* reverse: 5' CCGGAATTCTACATTGACTCACGGTAGAT 3'). Após a amplificação, os produtos da PCR foram precipitados e purificados com fenol: clorofórmio e marcados com [³²P] dCTP conforme protocolo descrito por Feingberg & Vogelstein (1983). Pré-hibridização e hibridização das membranas foram feitas em 15 ml da solução constituída por 1% BSA, 500 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA e 7% SDS (Church & Gilbert, 1984). A pré- hibridização foi realizada à 60^o C durante 2 horas. Após a adição da sonda nesta solução, a membrana foi hibridizada durante 14h a 65^oC. Após a hibridização, as membranas foram lavadas 4 vezes com 2 X SSC (SSC 150mM NaCl, 15mM citrato de sódio) e 0,1% SDS a temperatura ambiente. Após a lavagem a membrana foi exposta ao filme de raio X e incubada a -70°C.

5- RESULTADOS

5.1- Identificação da ADH de *Trypanosoma cruzi* e alinhamento de seqüências.

Inicialmente, em uma pesquisa nos bancos de dados foram encontradas 2 seqüências peptídicas de *T. cruzi* que codificam a ADH (Numero de acesso do GenBank XP_819264 and XP_821876). O alinhamento destas seqüências mostrou que elas são 99% idênticas, apresentando apenas duas substituições nos aminoácidos 299 (asparagina/serina- N/S) e 347 (prolina/serina- P/S). Por conveniência, a seqüência com número de acesso XP_819264 foi preferencialmente utilizada neste trabalho. A enzima TcADH possui um único domínio “Iron-containing alcohol dehydrogenase”, conservado nas seqüências analisadas e que constitui quase toda a proteína (aa 17 a 384). Na estrutura primária da TcADH não foram identificados peptídeo sinal, domínios transmembrana ou âncoras GPI, indicando que ela não é uma proteína de membrana. O gene da ADH em *T. cruzi* codifica uma proteína de 392 aminoácidos, com uma massa predita de 41,7 kDa. A Figura 4 mostra o alinhamento das seqüências peptídicas da TcADH com seqüências de álcool desidrogenases identificadas em 12 diferentes espécies de procariotos e eucariotos (ver metodologia). Dos 392 aminoácidos da TcADH, 188 (aproximadamente 48%) são conservados em pelo menos metade das seqüências analisadas; 69 aminoácidos (aproximadamente 18%) são conservados em pelo menos 75% e apenas 4 aminoácidos (aproximadamente 1%) são conservados em todas as espécies analisadas. A TcADH é 52% a 57% idêntica às seqüências de álcool desidrogenases identificadas em procariotos, porém é apenas 35% idêntica aos genes ortólogos identificados nas três espécies de *Leishmania* e 11% a 31% idêntica às ADHs identificadas nas demais espécies de eucariotos (tabela 2). Utilizando o programa BLAST, a TcADH foi comparada com seqüências de bancos de dados de outros organismos do gênero *Trypanosoma*, como *T. brucei*, *T. congolense*, *T. rangeli* e *T. vivax*, porém não foi encontrado nenhuma proteína similar nesses organismos.

Uma árvore filogenética Neighbor-Joining foi construída com base nas 13 seqüências de álcool desidrogenases selecionadas (ver metodologia). Como pode ser visto na Figura 5, as ADHs de organismos procariotos e eucariotos estão agrupadas em ramos filogeneticamente distintos. Interessantemente, dentro do grupo dos eucariotos, é a ADH do *T. cruzi* a álcool desidrogenase filogeneticamente mais próxima das ADHs de procariotos, estando inclusive mais próxima das ADHs de bactérias do que das três espécies de *Leishmania*, seus parentes mais próximos.



Figura 4- Alinhamento das seqüências de aminoácidos da álcool desidrogenase. A figura mostra a ADH do *T. cruzi* alinhada com vários organismos. O alinhamento está destacado de acordo com a identidade: letras brancas em fundo preto representa identidade total, letras brancas em fundo cinza-escuro representa 75% de identidade e letras pretas em fundo cinza-claro representa 50% de identidade.

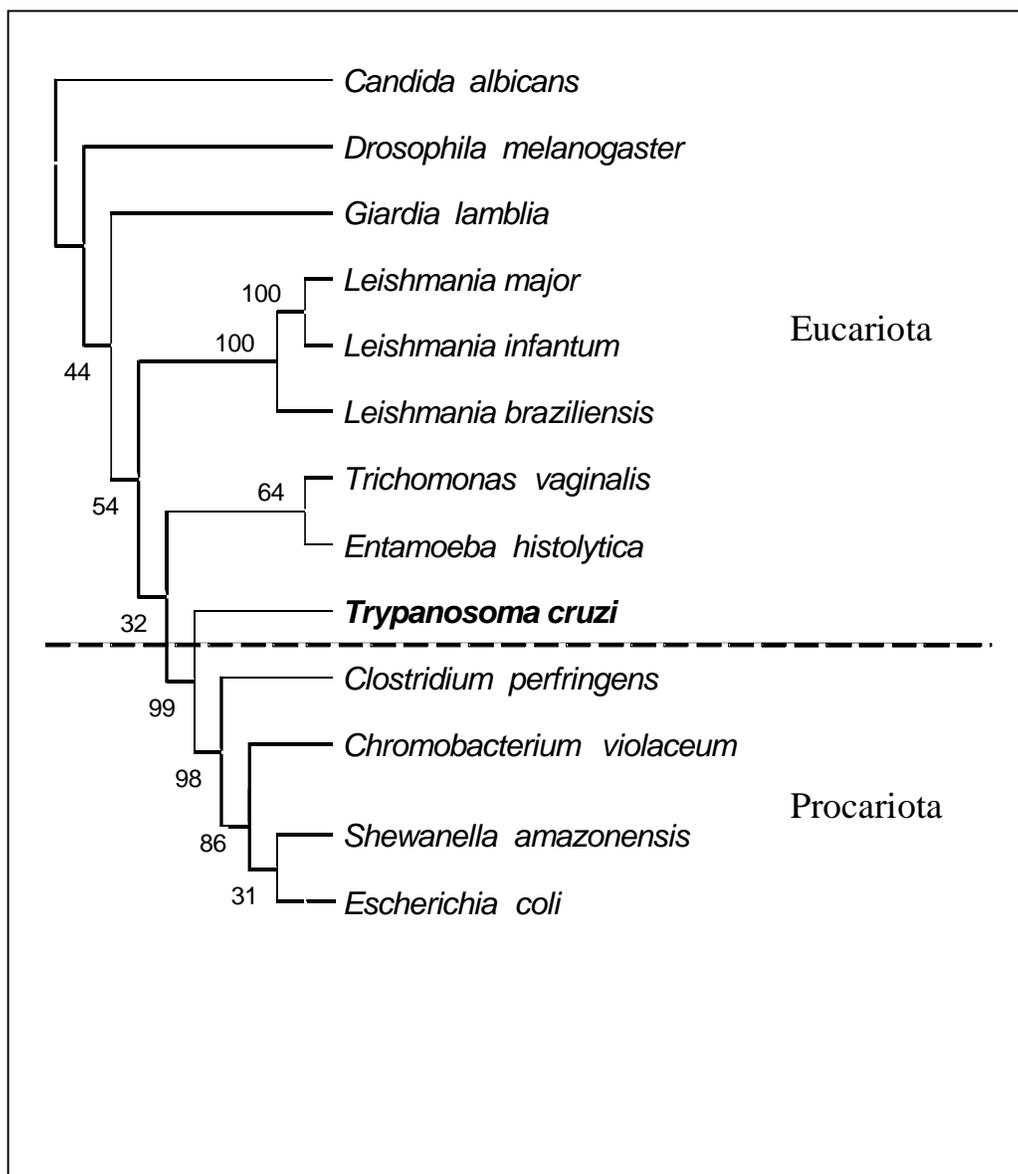


Figura 5- Árvore filogenética Neighbor-Joining das seqüências de ADH do *T. cruzi* e outros organismos com alta similaridade. Os números representam o valor de Bootstrap encontrados.

Tabela 2

Percentual de identidade da ADH do *T. cruzi* (Accession Number XP_819264) com álcool desidrogenases identificadas em outros organismos

Organismo	% de Indentidade
<i>S. amazonensis</i>	57
<i>C. violaceum</i>	57
<i>V. parahaemolyticus</i>	56
<i>E. coli</i>	56
<i>S. boydii</i>	55
<i>C. perfringens</i>	52
<i>L. braziliensis</i>	35
<i>L. infantum</i>	35
<i>L. major</i>	35
<i>T. vaginalis</i>	31
<i>E. histolytica</i>	26
<i>D. melanogaster</i>	23
<i>G. lamblia</i>	22
<i>C. albicans</i>	11

5.2- Ensaio da atividade das oxidoreduptases nas populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

A atividade enzimática da TcADH, bem como de outras oxidoreduptases presentes no extrato protéico do *T. cruzi* foi determinada utilizando como referência uma curva-padrão construída a partir de concentrações conhecidas da enzima ADH purificada. Foi observada nesta curva-padrão uma correlação linear entre a absorvância das amostras e a concentração da enzima ADH extraída de levedura (coeficiente de correlação = 0,998), dentro dos limites de concentração da enzima utilizados (28 a 225 unidades) (dados não mostrados). Para comparar a atividade enzimática em populações sensíveis e resistentes do *T. cruzi*, utilizamos amostras de proteínas de 4 cepas do *T. cruzi*: duas populações com resistência induzida *in vitro* (17LER) e *in vivo* (BZR), com seus respectivos pares sensíveis (17WTS e BZS). A Figura 6 mostra a absorvância das amostras ao longo do ensaio. Conforme pode ser observado, a absorvância das amostras de proteínas do *T. cruzi* se encontra no intervalo de valores de absorvância da enzima ADH de levedura (entre 112,5 e 225 unidades). A atividade enzimática, em unidades (U), foi então calculada a partir da variação na absorvância das amostras no intervalo de 0 a 30 minutos. Os resultados obtidos foram os seguintes: 17WTS = 226 U; 17 LER = 131 U; BZS = 188 U e BZR = 192 U. A razão entre as populações sensíveis e seus respectivos pares resistentes foi de 1,7 X para o par 17WTS / 17LER, e de 1,0 X para o par BZS / BZR. Por se tratar de extrato protéico total, a atividade enzimática acima descrita não é exclusiva da TcADH, podendo haver outras oxidoreduptases envolvidas na reação.

5.3- Clonagem e expressão da proteína recombinante TcADH

Com o objetivo de investigar os níveis de expressão da proteína TcADH nas cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas, inicialmente clonamos o gene *TcADH* e expressamos a proteína recombinante em bactérias. O plasmídeo utilizado para a clonagem foi o pGEX (Amersham), que permite a expressão da proteína recombinante em fusão com a Glutathione-S-Transferase (GST) de *Schistosoma japonicum*. Essa fusão contribui para a expressão eficiente da proteína recombinante, pois são formados corpúsculos de inclusão que impedirão que a proteína associe-se à membrana das células bacterianas ou interaja com o sistema bacteriano, reduzindo possíveis efeitos tóxicos. Além disso, os corpúsculos de inclusão dificultam o acesso de proteases à proteína, aumentando os níveis de expressão (Montigny *et al.*, 2004).

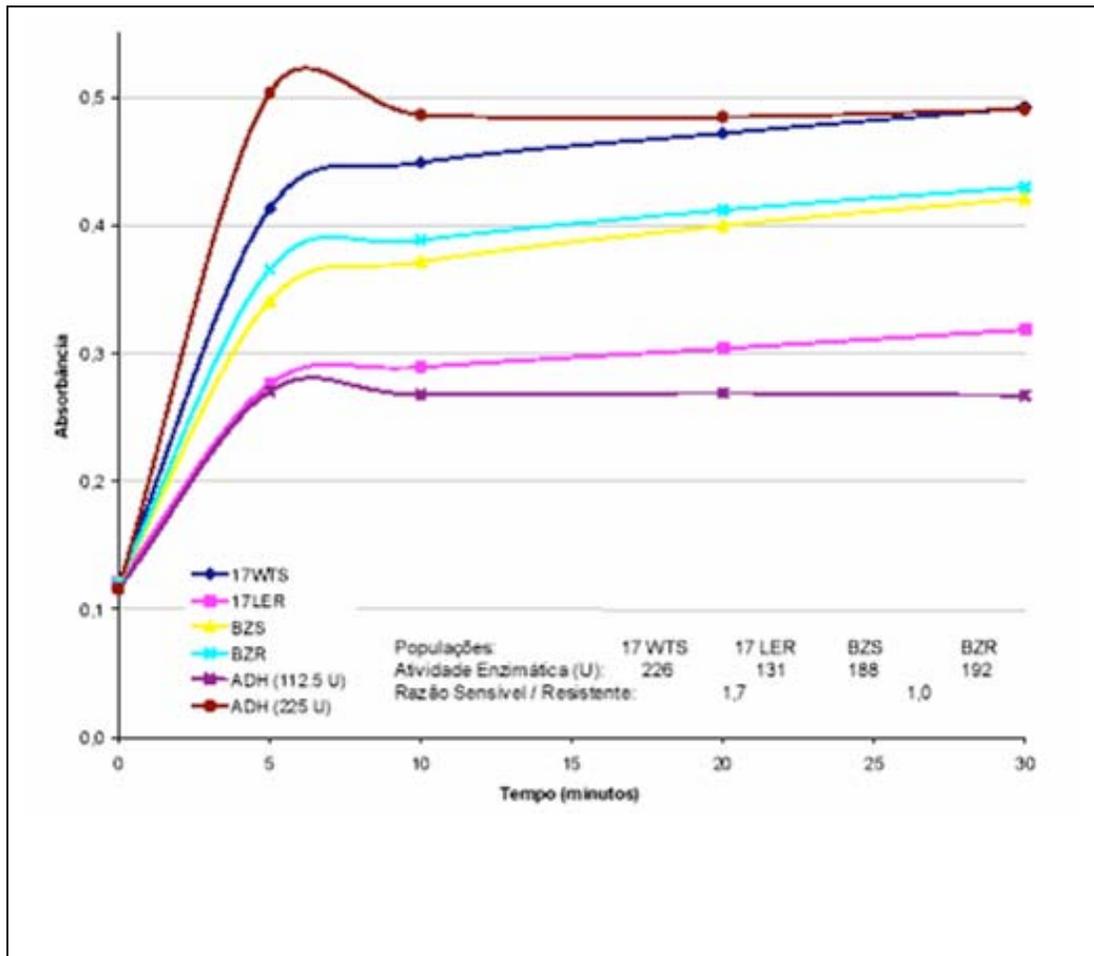


Figura 6- Atividade de oxidoredução da TcADH e de outras oxidoredutases do *T. cruzi*. Absorbância das amostras ao longo do ensaio de 30 minutos.

É importante ressaltar que a GST de *S. japonicum* codificada pelo vetor pGEX (Amersham) possui aproximadamente 29 KDa, mas pode quebrar-se liberando um fragmento de 26 kDa (Pharmacia GST Gene Fusion System).

O plasmídeo pGEX e o produto de PCR do gene *TcADH* foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. Após a purificação, eles foram submetidos a reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase. Posteriormente, o plasmídeo recombinante foi transferido para *E. coli*. A clonagem foi confirmada através do PCR de colônia conforme descrito nos Materiais e Métodos. O PCR de colônia mostrou uma ótima eficiência da clonagem, uma vez que observamos a presença do fragmento de 1220 pb, correspondente a região codificante do gene *TcADH*, em todas as colônias de bactérias analisadas (dado não mostrado).

A expressão da proteína recombinante foi realizada em *E. coli*, cepa BL-21 por indução a 37°C com 5mM de IPTG, durante 6 horas. A figura 7 mostra o perfil eletroforético das proteínas totais de duas diferentes colônias da bactéria na presença (canaletas 2 e 3) e ausência de IPTG (canaleta 1). Os resultados mostram que as bactérias incubadas com IPTG expressaram a proteína recombinante de maneira eficiente. O polipeptídeo de aproximadamente 70 KDa mais forte corresponde à rTcADH (41,7 kDa) fusionada com a glutathione S transferase (29 kDa).

5.4- Caracterização da proteína recombinante TcADH.

5.4.1- Teste de solubilidade da proteína rTcADH.

Após expressar a proteína de forma eficiente, realizamos ensaios para verificar a solubilidade dessa proteína. Os procedimentos para a extração da proteína recombinante foram realizados como descrito em Materiais e Métodos. A parte solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) obtidas da amostra foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE. Observamos a presença da proteína recombinante rTcADH fusionada à GST (70 KDa) no sedimento (canaletas 2 a 4, Figura 8), mostrando que ela está insolúvel nas condições utilizadas na expressão. Na fração solúvel (canaleta 1, 5, 6 e 7, Figura 8), visualizamos apenas as proteínas específicas das bactérias.

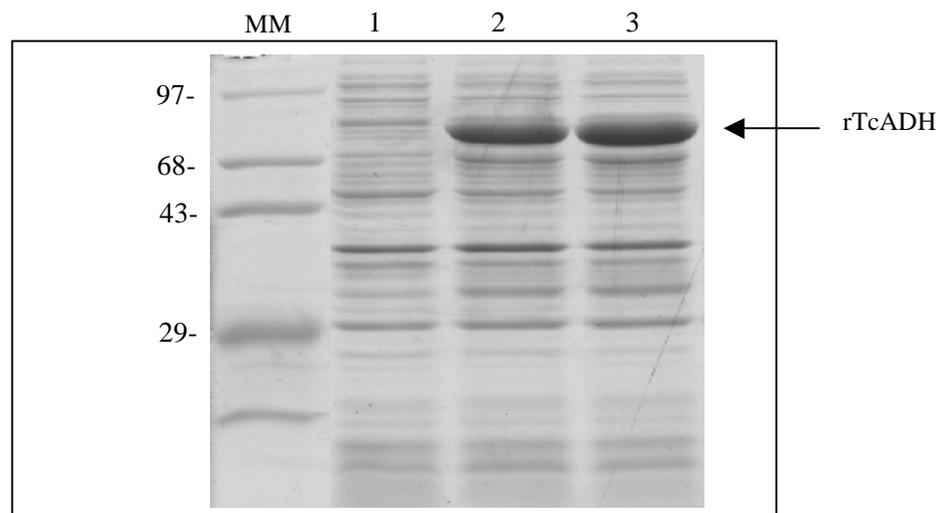


Figura 7- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com azul de coomassie. Expressão da proteína recombinante TcADH em bactérias BL21. Canaleta 1, bactérias não induzidas; canaletas 2 e 3, duas diferentes colônias de bactérias induzidas com IPTG.

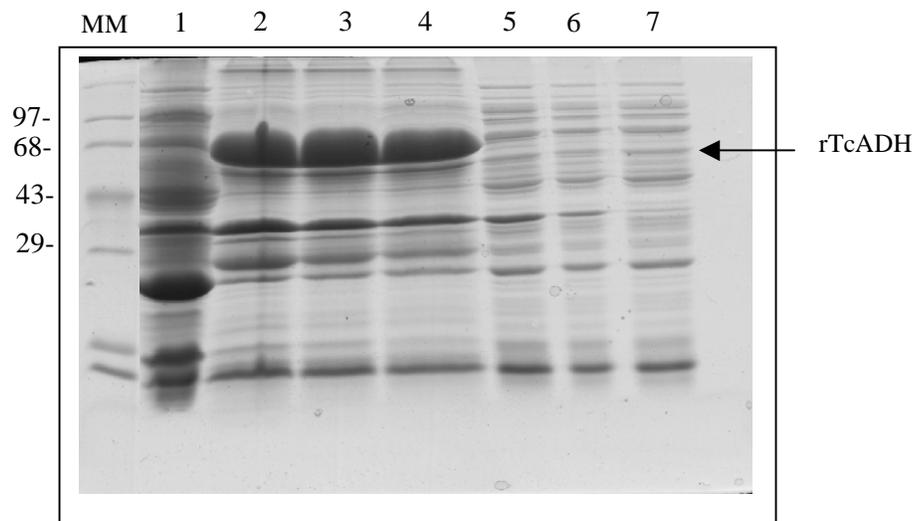


Figura 8- Gel de poliacrilamida SDS corado com azul de coomassie. Teste de solubilidade da proteína rTcADH. Canaleta 1, sobrenadante; canaleta 2, sedimento; canaleta 3, sedimento sonicado 1x; canaleta 4, sedimento não sonicado; canaleta 5, sobrenadante; canaleta 6, sobrenadante sonicado; canaleta 7, sobrenadante não sonicado.

5.4.2- Purificação da proteína recombinante rTcADH.

Diante da insolubilidade da proteína rTcADH, optamos pela purificação da proteína insolúvel por eletroeluição. É importante ressaltar que antes da eletroeluição tentamos purificar a proteína utilizando colunas glutationa sefarose 4B, que possuem afinidade pela GST presente no vetor pGEX (dado não mostrado). Entretanto a eficiência da purificação não foi boa, pois observamos que a proteína rTcADH foi purificada junto com outras proteínas da bactéria. Diante disso, realizamos uma re-purificação da proteína recombinante rTcADH por eletroeluição (BIORAD) conforme instruções do fabricante. Realizamos quatro experimentos de purificação que no final foram agrupados e submetidos a dosagem pelo método de Bradford. A figura 9 ilustra o resultado da eletroeluição mostrando uma banda forte principal de aproximadamente 70 kDa, correspondente a proteína recombinante purificada das demais proteínas da bactéria. A proteína rTcADH purificada apresentou uma concentração de 0,3 µg/µl.

5.5- Nível de expressão da proteína rTcADH em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes.

5.5.1- Imunização de coelhos para produção de anticorpo policlonal anti-rTcADH.

A proteína rTcADH foi utilizada para a imunização de coelhos para produção do anticorpo policlonal anti-rTcADH. Foram feitas 3 inoculações em coelhos em doses de 300 µg como descrito em Material e Métodos. Após a primeira dose, considerada como tempo zero, as demais foram ministradas nos dias 7 e 21. Foram utilizados três coelhos, sendo um inoculado somente com a proteína, outro inoculado com a proteína e o adjuvante e o terceiro inoculado com a proteína GST. Quinze dias após a última inoculação, o sangue dos coelhos foi coletado e o soro foi utilizado nos ensaios de western blot.

5.5.2- Western blot

Baseado nas diferenças observadas no nível de mRNA do gene *TcADH* decidimos determinar o nível de expressão da proteína TcADH em cepas do *T. cruzi* S e R a drogas.

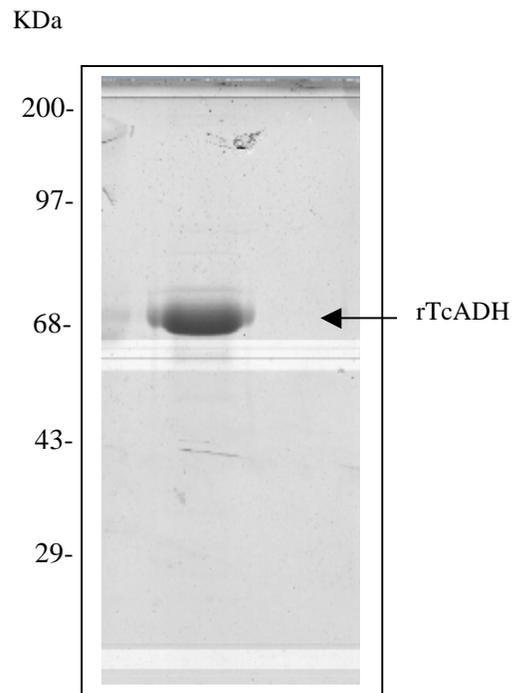


Figura 9- Gel de poliacrilamida-SDS corado com azul de coomassie. Proteína rTcADH purificada por eletroeluição.

Diante disso, realizamos ensaios de western blot, utilizando o soro de coelho imunizado com a proteína rTcADH. O perfil eletroforético das proteínas totais de *T. cruzi* em gel SDS-PAGE mostrou proteínas com massa molecular de 10 a 100 kDa. Esse gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose que foi incubada com anticorpo policlonal anti-ADH. Observamos que esse anticorpo reconheceu uma banda de 41,7 kDa para todas as amostras do *T. cruzi* analisadas (Fig 10A). Para quantificar os níveis de expressão da proteína recombinante TcADH, a mesma membrana foi incubada com anticorpo policlonal anti-TcHSP70 (diluição de 1:10.000). O nível de expressão da proteína TcHSP70 foi previamente observado, sendo o mesmo para as amostras de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ analisadas (FMF Campos, comunicação pessoal).

Análise de densitometria utilizando a proteína TcHSP70 como referência mostrou que houve uma diminuição de aproximadamente 2 X na expressão da proteína TcADH na população 17LER quando comparado com seu par sensível 17WTS (Fig 10A). As outras populações de *T. cruzi* apresentaram o mesmo nível de expressão da proteína TcADH, independente do fenótipo de resistência a drogas (BZS/BZR, Quaraizinho/Yuyu, Berenice/VL-10). A figura 10B mostra o perfil de western blot das proteínas de *T. cruzi* incubado com soro policlonal anti-GST. Observamos que o soro anti-GST reconheceu fracamente a proteína recombinante purificada TcADH de 70 kDa. Entretanto, observamos que esse anticorpo não reconheceu nenhuma proteína do *T. cruzi*. Esse resultado mostra que anticorpos anti-GST não interferiram na análise dos resultados dos anticorpos anti-TcADH.

5.6- Imunolocalização da proteína TcADH no *T. cruzi*

Com o objetivo de determinar a localização da proteína TcADH, como também investigar suas possíveis funções biológicas no parasito *T. cruzi*, realizamos ensaios de imunolocalização de acordo com o item 4.2 da metodologia. Na Figura 11, nos painéis B e D, podemos perceber que a proteína TcADH está localizada no cinetoplasto das formas epimastigotas de *T. cruzi*, em comparação com o controle negativo, feito com o soro pré-imune do mesmo coelho (Figura 6, painéis E e F). No painel C podemos perceber a marcação feita pelo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), permitindo a visualização do núcleo.

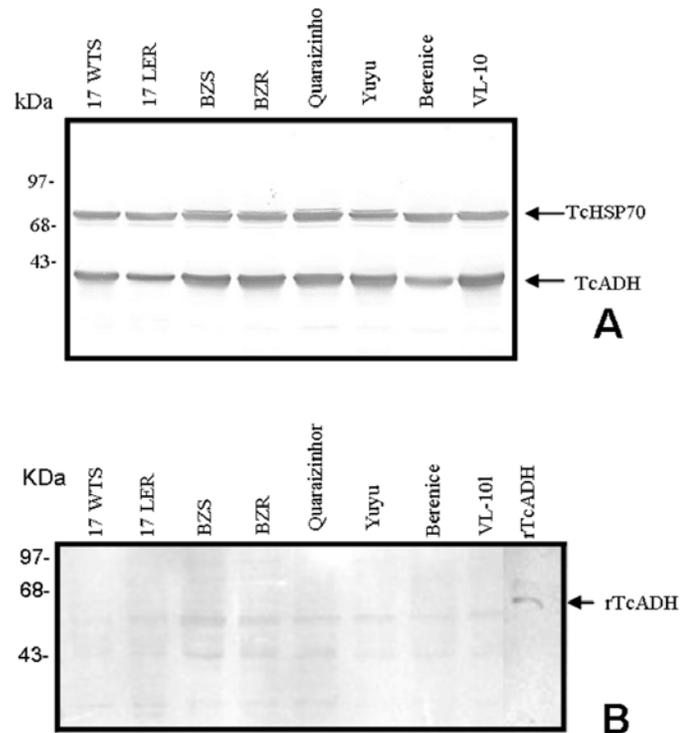


Figura 10- Membrana de western blot incubada com anticorpo policlonal anti-TcADH e anti-TcHSP70 (A) e anti-TcGST (B).

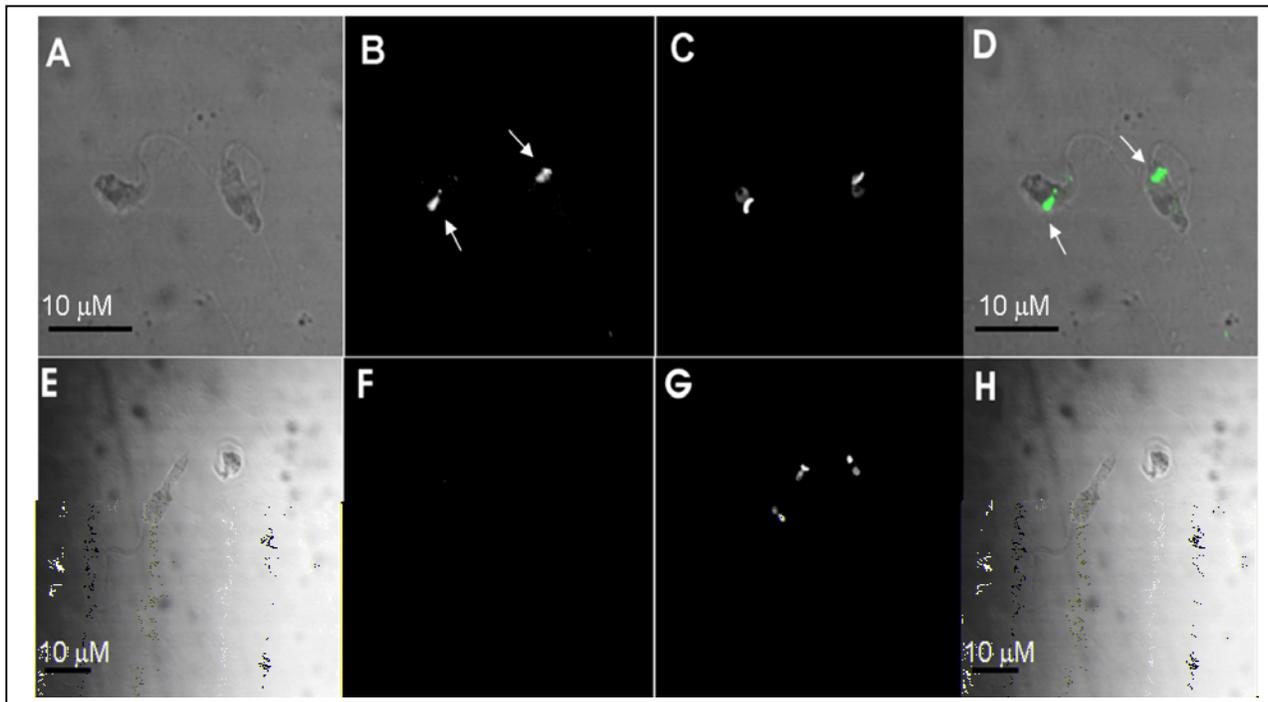


Figura 11- Imunolocalização da proteína TcADH nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Imagens de fluorescência por microscopia confocal (B, C, F e G) e contraste diferencial de interferência (DIC) (A, D, E e H). Parasitos foram fixados e marcados com o soro anti-TcADH (diluído a 1:50) e com o anticorpo secundário conjugado a CY3 (Sigma) para detectar a proteína TcADH (painéis

5.7- Nível de mRNA do gene *TcADH* em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol

Com o objetivo de determinar os níveis de expressão do mRNA do gene *TcADH* nas cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol, realizamos ensaios de northern blot.

O perfil de hibridização do RNA total das cepas de *T. cruzi* com a sonda do gene *TcADH* mostrou um transcrito de 1,9 Kb (Figura 12A). Podemos observar uma diferença na intensidade desse transcrito das populações 17WTS e 17LER. Como controle quantitativo, a mesma membrana foi hibridizada com a sonda correspondente ao gene do RNA ribossomal do *T. cruzi* (Figura 12B). A Figura 12C representa um gráfico com valores da análise densitométrica da intensidade das bandas, mostrando que o nível de mRNA do gene *TcADH* foi duas vezes menor na população de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ - 17LER comparado com seu par sensível 17WTS. Os pares BZS e BZR, Cl-Brener (S) e VL-10 (R) apresentaram o mesmo nível de mRNA.

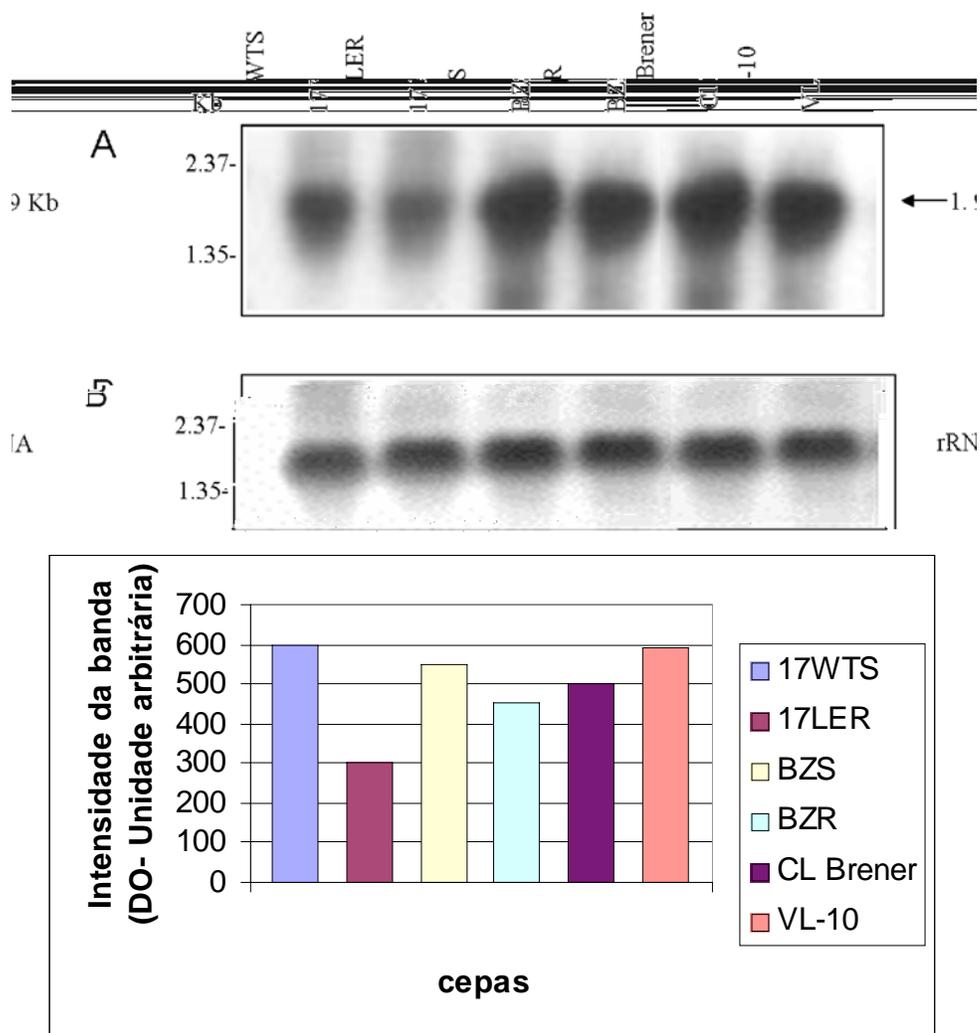


Figura 12- Nível de mRNA do gene *TcADH* em cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas. A- Perfil de northern blot das cepas de *T. cruzi* hibridizadas com a sonda específica do gene *TcADH* marcada com ^{32}P . B- controle quantitativo da mesma membrana hibridizada com a sonda para o gene do RNA ribossomal de *T. cruzi*. C- Análise densitométrica da intensidade do mRNA do gene *TcADH*.

A quantidade de moléculas de cDNA do gene *TcADH* para as diferentes cepas de *T. cruzi* foi determinada por análises de regressão linear utilizando os valores de C_T obtidos pela curva padrão gerada com as quantidades conhecidas dos plasmídeos do *TcADH*, normalizado com os valores de *TcHGPRT*. O nível de mRNA na população 17LER foi 2,5 menor quando comparada com seu par 17WTS. Não observamos diferença significativa nos níveis de mRNA nas outras amostras de *T. cruzi* analisadas (BZS/BZR e Cl-Brener (S) /VL-10 (R) (Fig. 13).

5.8- Número de cópias do gene *TcADH*

A metodologia de PCR em tempo real também foi utilizada para quantificar o número de cópias do gene *TcADH* no genoma das populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Utilizando o gene *TcHGPRT* como normalizador, calculamos o número de cópias do gene *TcADH* utilizando 200, 100 e 50 ng de DNA genômico (Tabela 3). Observamos que a razão do número de cópias do gene *TcADH* foi a mesma para os pares de amostras analisados. Esse resultado mostra que esse gene não está deletado no genoma dos parasitas resistentes ao benzonidazol.

5.9- Localização do gene *TcADH* nos cromossomas do *T. cruzi*.

Os cromossomas das cepas de *T. cruzi* foram separados por eletroforese de pulso alternado (PFGE), utilizando o equipamento “Gene Navigator TM system” (Amersham Biosciences). As condições da eletroforese utilizadas para o gene *TcADH* foram: 70 seg. por 15h, 90 seg. por 24h, 200 seg. por 15h e 400 seg. por 15h. Como descrito na literatura, podemos observar um polimorfismo cromossômico entre as diferentes cepas de *T. cruzi*. Os cromossomas foram transferidos do gel de agarose (Fig. 14A) para a membrana de náilon, conforme descrito em Materiais e Métodos. A hibridização dos cromossomas com a sonda *TcADH*, mostrou heterogeneidade de tamanho e número dos cromossomas entre as diferentes populações do *T. cruzi* que contém este gene (Fig. 14B). A mesma quantidade de parasitos por bloco foi aplicada em cada canaleta do gel. Observamos vários perfis de hibridização, que não estão associados com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas e nem com o zimodema da cepa. Através de análise comparativa de densitometria, observamos que não houve diferença de intensidade das bandas entre as cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas (Figura 14B). A tabela 1 (ver Materiais e Métodos) resume os resultados da localização cromossômica.

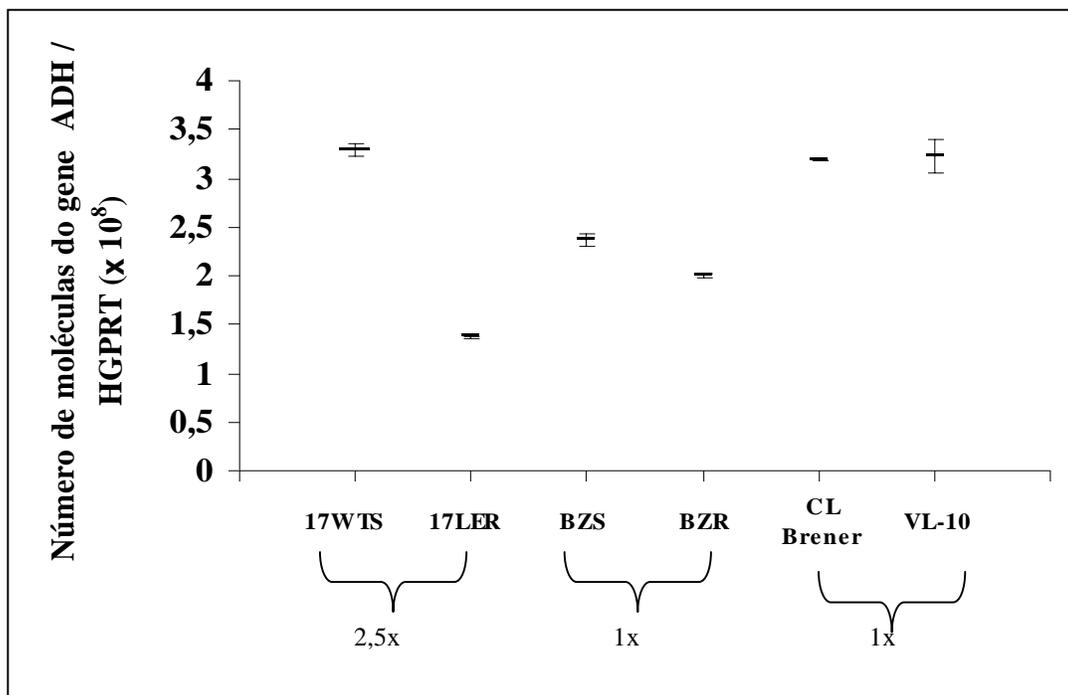


Figura 13- Amplificação do gene *TcADH* por RT-PCR quantitativo em tempo real. O gráfico mostra o número de moléculas do gene *TcADH* em populações do *T. cruzi* normalizadas com o *TcHGPRT*. Os dados do RT-PCR quantitativo em tempo real foram obtidos em triplicata de três experimentos independentes. A barra de erro é o desvio padrão da média (\pm dpm).

Tabela 3

Determinação do número de cópias do gene *TcADH* nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

DNA (ng)	Razão do número de cópias do gene <i>TcADH</i> normalizado com o gene <i>TcHGPRT</i> (10^6)	
	17 WTS/17 LER	BZS/BZR
200	1,3x	1,2x
100	1,4x	1,2x
50	1x	1x

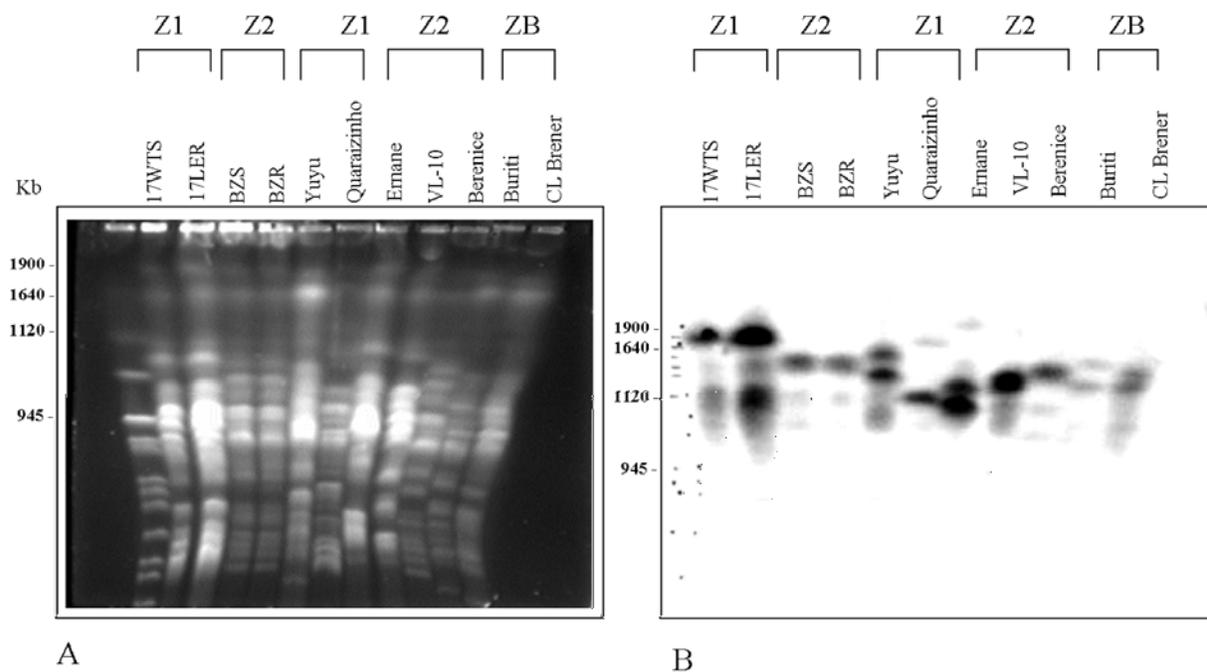


Figura 14- Localização cromossômica do gene *TcADH* em cepas de *T. cruzi* de diferentes zimodemas e fenótipos de resistência a drogas. A- bandas cromossomais de *T. cruzi* separadas por PFGE coradas com brometo de etídeo. B- perfil de southern blot dos cromossomas de *T. cruzi* hibridizados com a sonda específica para o gene *TcADH* marcada com ^{32}P . O marcador de peso molecular foi obtido dos cromossomas de *Saccharomyces cerevisiae*.

6- DISCUSSÃO

A quimioterapia específica da doença de Chagas está limitada ao BZ e NFX. Ambos compostos apresentam baixa eficácia de cura principalmente na fase crônica da doença, além de considerável toxicidade (Urbina & Docampo, 2003). Além disso, tem sido descrito em *T. cruzi* a existência de cepas naturalmente resistentes ao BZ e NFX e o fenômeno de resistência cruzada a ambas as drogas (Filardi *et al.*, 1987). Entretanto os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência do *T. cruzi* a drogas são ainda muito pouco conhecidos.

A metodologia de *microarray* tem sido aplicada em diversos campos da pesquisa, dentre eles: entendimento do ciclo de vida e desenvolvimento dos parasitos, relações parasito-hospedeiro, comparação genômica da virulência de organismos, desenvolvimento de vacinas e estudo da resposta à infecção por parasitos e microorganismos (Jaros *et al.*, 2006). A técnica de *microarray* foi utilizada para analisar a expressão de genes das células do hospedeiro durante a infecção por *T. cruzi* (Imai *et al.*, 2005). Os autores observaram que alguns genes foram superexpressos nessas células, como genes que codificam proteínas da via de sinalização das caderinas e proteínas envolvidas no metabolismo de colesterol. Essas proteínas são importantes para a replicação e persistência da forma intracelular amastigota no interior das células do hospedeiro (Imai *et al.*, 2005). Saxena e colaboradores (2003) utilizaram a técnica de *microarray* para avaliar a expressão gênica diferencial durante a transformação das formas promastigotas procíclicas em promastigotas metacíclicas em *Leishmania major*. Os autores mostraram que os genes superexpressos nas formas metacíclicas estão envolvidos no crescimento e divisão das células, metabolismo, síntese de proteínas, transdução de sinal e processamento de RNA.

Murta e colaboradores em 2003 (comunicação pessoal) utilizaram a metodologia de *microarray* para identificar genes diferencialmente expressos em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas. Os autores demonstraram que 20 genes foram diferencialmente expressos quando as duas populações foram comparadas. Um dos genes obtidos foi o *TcADH*, que codifica a enzima álcool desidrogenase (ADH). Os autores observaram que esse gene foi 4 vezes menos expresso na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) em relação ao seu par sensível (17WTS). Neste trabalho, caracterizamos pela primeira vez o gene *TcADH* em *T. cruzi*. Inicialmente, fizemos uma análise comparativa da *TcADH* com sequências da ADH de diversos organismos depositadas no banco de dados e fizemos a atividade enzimática da *TcADH* nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Em seguida analisamos a

expressão da enzima e realizamos a localização celular da mesma no *T. cruzi*. Posteriormente analisamos o nível de mRNA, número de cópias do gene e localização cromossômica.

Álcool desidrogenases são enzimas que pertencem ao grupo das oxidoredutases, participando de reações que resultam na produção principalmente de álcoois e cofatores oxidados como NAD⁺ (Reid *et al.*, 1994). Esse processo ocorre durante a fermentação de bactérias anaeróbicas e leveduras, onde a regeneração de NAD⁺ é essencial para o metabolismo e crescimento desses organismos. ADHs também possuem importância industrial, por participarem da produção de álcool e solventes orgânicos (Clark *et al.*, 1989). As álcool desidrogenases ferro-dependentes estão presentes em vários organismos como *E. coli* (AdhE) e *Clostridium perfringens*, como também em protozoários patogênicos como *Cândida albicans* e *Entamoeba histolytica*. É importante ressaltar ainda que a ausência dessa enzima em vertebrados faz com que ela seja um alvo atrativo para a quimioterapia antimicrobiana (Chen *et al.*, 2004).

Molinas *et al.*, (2003) descreveram uma Isopropil álcool desidrogenase (iPDH) do tripanosomatídeo *Phytomonas* sp. Esse parasito é encontrado na planta da espécie *Euphorbia characias*. Essa proteína é uma álcool desidrogenase mitocondrial que utiliza álcoois primários e secundários como substratos preferenciais. Os autores observaram que a iPDH auxilia no metabolismo de aminoácidos como leucina, lisina e fenilalanina, que auxiliam no crescimento do *Phytomonas*. A iPDH elimina a acetona tóxica resultante desse metabolismo. Arauzo *et al.*, (1989) caracterizaram pela primeira vez uma NADP-aldeído redutase de *T. cruzi*. Essa enzima é ativa com álcoois/aldeídos e está envolvida nos processos de detoxificação do parasito. Em *Leishmania*, o gene da ADH ainda não foi caracterizado, apesar de sua sequência já ter sido depositada em banco de dados (*L. major* (LmjF30.2090), *L. infantum* (LinJ30.2440) e *L. braziliensis* (LbrM30 v2.2040). Entretanto, Nare e colaboradores (1997) caracterizaram uma pteridina redutase (PTR1) de *Leishmania major*, cuja sequência assemelha-se a sequência de uma álcool desidrogenase de cadeia curta e sua principal função é reduzir pteridinas como biopterinas e folatos. Os autores demonstraram que essa enzima pode estar envolvida na resistência a drogas nesse organismo.

Em nosso trabalho a TcADH foi caracterizada pela primeira vez em *T. cruzi*. Com o sequenciamento completo do genoma do *T. cruzi*, a sequência nucleotídica da TcADH foi disponibilizada nos banco de dados, mas nenhum trabalho de caracterização deste gene tinha sido feito ainda (El-Sayed *et al.*, 2005). Diante disso, sabe-se que em *T. cruzi* a enzima TcADH apresenta o íon ferro na sua estrutura, pertencendo ao grupo III das ADHs.

Os estudos de filogenia e a análise da estrutura primária da ADH de 13 organismos distintos (9 eucariotas e 4 procariotas) mostram que a TcADH do *T. cruzi* está mais próxima das

ADH de procariotas do que eucariotas. Dos 392 aminoácidos da TcADH, 188 (aproximadamente 48%) são conservados em pelo menos metade das seqüências analisadas; 69 aminoácidos (aproximadamente 18%) são conservados em pelo menos 75% e apenas 4 aminoácidos (aproximadamente 1%) são conservados em todas as espécies analisadas. A TcADH é 52% a 57% idêntica às seqüências de álcool desidrogenases identificadas em procariotas, porém é apenas 35% idêntica aos genes ortólogos identificados nas três espécies de *Leishmania* e 11% a 31% idêntica às ADHs identificadas nas demais espécies de eucariotas. Além disso, estas análises mostraram que o gene ADH sofreu diferentes modificações ao longo do processo evolutivo. Na família tripanosomatidae, estas modificações resultaram na ausência do gene em *T. brucei*, *T. rangeli* e outros tripanosomas, e na baixa similaridade observada entre as três espécies de *Leishmania* analisadas e o *T. cruzi*. Diante disso, acreditamos que a atividade destas enzimas pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento específico de cada parasito.

Estes resultados não são surpreendentes uma vez que El-Sayed *et al.*, (2005), através do estudo comparativo do genoma dos tripanosomatídeos (*T. cruzi*, *Leishmania major* e *T. brucei*), demonstrou que inserções, substituições e deleções gênicas são processos comuns que ocorrem nesses organismos, e esses eventos podem resultar em diferenças fisiológicas e bioquímicas entre esses parasitos. Molinas *et al.*, (2003) purificaram e caracterizaram uma isopropil álcool desidrogenase mitocondrial de *Phytomonas* sp, um tripanosomatídeo isolado da planta *Euphorbia characias*. Os autores mostraram através de estudos filogenéticos que essa enzima foi mais similar às ADHs de procariotas do que as de eucariotas. Os autores sugerem que esse fenômeno pode ser resultado da transferência horizontal de genes entre bactérias aeróbicas e tripanosomatídeos. É importante enfatizar que a associação entre resistência a drogas e a expressão da ADH, demonstrada inicialmente em procariotas e agora em nosso trabalho com uma população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ, a ausência desse gene no homem e as modificações observadas entre os tripanosomatídeos, torna a caracterização deste gene particularmente interessante para futuros estudos de quimioterapia e resistência a drogas.

O nível de expressão da proteína TcADH está aproximadamente 2 vezes diminuído nos parasitos resistentes ao BZ. Nossos ensaios de atividade enzimática também mostraram uma diminuição da atividade da enzima TcADH nos parasitos com resistência induzida *in vitro* ao BZ. Em *E. histolytica* e *Trichomonas foetus*, a álcool desidrogenase participa da via de desidrogenação, possuindo função de oxidoredução levando a ativação da droga metronidazol (Kulda *et al.*, 1999). Denton *et al.*, (2004) identificaram e caracterizaram uma enzima denominada tiol redutase (TDR1) que catalisa a redução de antimoniais pentavalentes. O mecanismo de ação dessas drogas é dependente da conversão da forma pentavalente na forma

trivalente, que é tóxica para o parasito. Os autores viram que a atividade dessa enzima foi 10 vezes maior na forma amastigota, explicando assim porque esse estágio é mais sensível à droga do que o estágio promastigota.

Em um recente trabalho realizado em nosso laboratório, Murta e colaboradores (2005) mostraram que um dos mecanismos de resistência do *T. cruzi* a drogas está associado com a deleção de cópias do gene TcOYE que codifica a “old yellow enzyme”, uma NAD(P) flavina oxidoreductase. A TcOYE cataliza a síntese de prostaglandina PGF2 α e reduz uma variedade de drogas tripanosomicidas (Murta *et al.*, 2005). Sendo assim, acreditamos que a enzima álcool desidrogenase de *T. cruzi*, assim como outras oxidoreductases, estejam envolvidas no metabolismo do BZ gerando radicais nitro anions da droga tóxicos, que fazem com que parasitas sensíveis morram. Este mesmo mecanismo de escape tem sido observado em *E. histolytica* resistente ao metronidazol. Neste caso, a flavina redutase está envolvida na ativação do metronidazol e nos parasitos resistentes essa enzima apresenta baixos níveis de expressão (Samarawickrema *et al.*, 1997).

Para determinarmos a localização celular da proteína TcADH, realizamos ensaios de imunolocalização. Os resultados mostraram que a proteína TcADH está localizada no cinetoplasto das formas epimastigotas do *T. cruzi*. O *T. cruzi*, bem como todos os membros da família Trypanosomatidae, apresentam uma única mitocôndria que se ramifica por todo o corpo do protozoário. Como em todas as células eucarióticas, a mitocôndria dos tripanosomatídeos também apresenta um DNA mitocondrial. No entanto, além de um DNA que corresponde àquele encontrado em outras mitocôndrias, há uma grande quantidade de um DNA que se organiza na forma de minicírculos e se concentra em uma determinada região da mitocôndria, localizada abaixo do corpúsculo basal, dando origem a uma estrutura intramitocondrial chamada cinetoplasto (Brenner *et al.*, 2000). A concentração de DNA encontrada em um cinetoplasto pode representar cerca de 30% do DNA total da célula (Schnauffer *et al.*, 2002). O fato da enzima TcADH se concentrar (localizar-se preferencialmente) no cinetoplasto não significa que ela não esteja presente no restante das ramificações da mitocôndria. Entretanto, pela técnica utilizada, não estamos conseguindo vê-la nestes locais.

Alguns estudos mostraram que não existem variações significativas da mitocôndria ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*. Estudos realizados em *T. brucei* apontam para algumas alterações na mitocôndria, que é bem desenvolvida nas formas multiplicativas encontradas no inseto e praticamente inexistente nas formas multiplicativas encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado (revisto por Van Hellemond *et al.*, 2005). Essas variações, que podem acontecer em outros membros da família Trypanosomatidae, indicam a capacidade que esses

protozoários apresentam de alternar entre um metabolismo mais oxidativo para um metabolismo fermentativo (revisto por Lukes *et al.*, 2005).

Estudos citoquímicos e bioquímicos têm mostrado a presença de algumas enzimas mitocondriais no cinetoplasto como citocromo oxidase, succinato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, NADPH diaforase, alfa glicerolfosfato desidrogenase e beta hidroxibutirato desidrogenase. Essas enzimas exercem funções metabólicas e respiratórias, oferecendo ao parasito alternativas para a adaptação aos diferentes ambientes que encontra ao longo do seu ciclo de vida (Lukes *et al.*, 2005, Motyka *et al.*, 2006). Em *Trichomonas vaginalis* a ADH, juntamente com outras enzimas envolvidas no metabolismo da droga, está localizada em uma organela chamada hidrogenossomo. Essa organela se assemelha à mitocôndria, sendo um local onde ocorre o metabolismo de carboidratos e a ativação do metronidazol (Rasoloson, *et al.*, 2002).

Parasitas como *Leishmania spp.*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Cândida albicans* e *Giardia lamblia*, têm desenvolvido a capacidade de adquirir resistência às drogas utilizadas para o seu tratamento, selecionando mecanismos apropriados para sobreviver aos compostos anti-parasitários (Buckner *et al.*, 1998). Diferenças na susceptibilidade a drogas por cepas de *T. cruzi* foram demonstradas por diversos autores (Brener *et al.*, 1976, Andrade *et al.*, 1985 e Filardi & Brener, 1987). Filardi & Brener (1987) mostraram que a resistência ao NFX e ao BZ pode ocorrer em cepas que nunca tiveram contato prévio com os dois compostos, isto é, cepas que apresentaram resistência natural. Algumas destas cepas foram isoladas de vetores silvestres do estado de Santa Catarina, onde não existe doença de Chagas humana autóctone sugerindo que a resistência natural do *T. cruzi* aos derivados nitroheterocíclicos pode ser um fator importante para explicar as baixas percentagens de cura detectadas em pacientes chagásicos (Filardi & Brener, 1987).

Os principais mecanismos de resistência a drogas 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 (revisado por Borst, 1991; Borst & Ouellette, 1995). A resistência a múltiplas drogas (MDR) em linhagens de células tumorais está associada com a superexpressão da PGP, uma fosfoglicoproteína de membrana de 170-180 kDa, que funciona como uma bomba de efluxo de drogas, dependente de ATP, que reduz o acúmulo de compostos citotóxicos dentro da célula (Englund *et al.*, 2006). A resistência do *Plasmodium falciparum* à cloroquina está relacionada ao rápido efluxo e baixo acúmulo de droga em parasitos resistentes. Nesse organismo foram descritos dois genes *pfmdr1* e

pfmdr2, que codificam uma P-glicoproteína denominada PGH1 (Elandaloussi *et al.*, 2006). A associação da superexpressão da PGP na resistência a drogas foi também descrita em *Leishmania* resistente ao arsenato e a antimoniais (Cortes-Selva *et al.*, 2005). Entretanto, Murta e colaboradores (2001) observaram que o fenótipo de resistência do *T. cruzi* ao BZ não está associado com a amplificação ou superexpressão dos genes PGP.

Em nosso estudo observamos que o gene *TcADH* tem uma ORF de 1200 bp, um transcrito de 1,9 Kb que codifica uma proteína de 41,7 kDa. Além disso, observamos que o gene *TcADH* está localizado em cromosomas de diferentes tamanhos dependendo da cepa de *T. cruzi* analisada e apresenta-se como simples cópia no genoma dos parasitos sensíveis e resistentes a drogas. Em *Giardia lamblia*, um protista que utiliza a enzima álcool desidrogenase para a formação de etanol e acetato, o gene da ADH está também presente como simples cópia no genoma (Sánchez *et al.*, 1998).

Malherbe *et al.*, (2004) mostraram que a enzima ADH é essencial para a tolerância ao etanol em *Drosophila melanogaster*. Nossos resultados mostraram que houve uma diminuição na atividade da enzima ADH nas cepas com resistência induzida *in vitro* (17LER). Em *Trichomonas vaginalis* a enzima ADH está bem caracterizada. Nesses parasitos a presença de um sistema de transporte de elétrons é capaz de mediar a redução da droga metronidazol. O metronidazol, assim como o BZ, é um derivado nitroimidazólico que precisa ser metabolizado para ser ativo. Essa droga é potente contra as infecções por protozoários e bactérias. Rasoloson e colaboradores (2002) mostraram que os elétrons requeridos para a ativação do metronidazol são gerados por enzimas encontradas no hidrogenossomo, uma organela do parasito com funções mitocondriais. Essas enzimas participam da via metabólica que converte piruvato a acetil CoA e CO₂. A perda da atividade de enzimas como a ADH, piruvato ferredoxina oxidoreductase, piruvato descarboxilase e malato desidrogenase está associada com o desenvolvimento da resistência *in vitro* ao metronidazol (Kulda *et al.*, 1999). Em *Entamoeba histolytica*, a resistência ao metronidazol está associada com o decréscimo da expressão das enzimas ferredoxina e Flavina reductase (Wassmann *et al.*, 1999).

Nossos resultados mostraram que apesar de não ter diferença no número de cópias do gene *TcADH* em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, houve uma diminuição do nível de mRNA. Interessantemente, Guimond e colaboradores (2003) utilizando a metodologia de microarranjo de DNA selecionaram três genes envolvidos na resistência de *Leishmania* ao Metotrexato. Os autores observaram que apesar desses genes estarem superexpressos nos parasitas R a drogas, eles não estão amplificados no genoma desses parasitos. Os autores sugerem que mutações nas regiões 5' ou 3' UTR (regiões não traduzidas) podem explicar as

diferenças entre os níveis de mRNA e DNA, ou seja, o aumento ou diminuição dos níveis de mRNA podem não acompanhar a amplificação ou deleção de genes no genoma.

Nozaki *et al.*, (1996) conseguiram obter uma população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao NFX. Os autores analisaram o cariótipo molecular dessas populações e observaram que a resistência ao NFX era acompanhada por mudanças no DNA como rearranjos nos cromossomas e aneuploidias. Nossos resultados mostraram que o gene *TcADH* está localizado em várias bandas cromossomais dependendo da cepa de *T. cruzi*. Estudos da estrutura do genoma do *T. cruzi* mostram que esse parasito tem uma grande plasticidade e organização diferente dos seus genes. Muitos genes incluindo *housekeeping* são presentes em múltiplas cópias e distribuídos em vários cromossomas. Entretanto, alguns genes envolvidos no metabolismo do parasito estão presentes em apenas um cromossoma (Porcile *et al.*, 2003). Neste trabalho vimos que a localização do gene *TcADH* não esta associada com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas.

Nossos dados mostraram que o gene da *TcADH* possui uma baixa regulação na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ, o que não ocorre na população com resistência selecionada. Recentemente, Villarreal *et al.*, (2005) publicaram um estudo analisando a diferença de expressão gênica nas cepas de *T. cruzi* com resistência selecionada e induzida ao BZ. Interessantemente, os autores observaram que cada cepa atua independente da sua herança genética quando submetidas ao estresse da droga. Rasoloson *et al.*, (2002) observaram que em *Trichomonas vaginalis* a perda da atividade das enzimas envolvidas na ativação do metronidazol só acontece em parasitos com resistência induzida *in vitro*. É importante ressaltar que o mecanismo de resistência a drogas em *T. cruzi* e em outros organismos é um fenômeno complexo, que envolve não só mecanismos bioquímicos, como também outros fatores como o sistema imune do hospedeiro, que pode interferir na susceptibilidade do parasito a drogas (Murta *et al.*, 2005). Diante dos nossos resultados, sugerimos que a enzima TcADH, juntamente com a TcOYE e outras desidrogenases, podem estar envolvidas na redução do BZ ou dos seus metabólitos, levando a sua ativação e como consequência a morte do parasito sensível, que tem níveis normais da enzima.

7- CONCLUSÕES

- A TcADH é 52% a 57% idêntica às seqüências de álcool desidrogenases identificadas em procariotos, porém é apenas 35% idêntica aos genes ortólogos identificados nas três espécies de *Leishmania* e 11% a 31% idêntica às ADHs identificadas nas demais espécies de eucariotos;
- A atividade enzimática da TcADH bem como de outras oxidoreduases é 1,7 vezes menor na população 17LER do que na sensível 17WTS;
- O gene *TcADH* codifica uma proteína de 41,7 kDa para todas as cepas do *T. cruzi* analisadas, entretanto ela está aproximadamente duas vezes menos expressa na população resistente 17LER do que na sensível 17WTS;
- A proteína TcADH está localizada no cinetoplasto das formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- O perfil de hibridização do RNA total das cepas de *T. cruzi* com a sonda do gene *TcADH* mostrou um transcrito de 1,9 Kb;
- O nível de mRNA do gene *TcADH* na população 17LER foi aproximadamente 2 vezes menor quando comparado com seu par 17WTS;
- A razão do número de cópias do gene *TcADH* foi a mesma para os pares de amostras sensíveis e resistentes analisados;
- Observamos um perfil heterogêneo de bandas cromossômicas entre as diferentes cepas do parasito, variando de 800 a 2,000 Kb. Observamos vários perfis de hibridização, que não estão associados com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas e nem com o zimodema da cepa;
- O nível de mRNA do gene *TcADH*, o número de cópias e a expressão da proteína é semelhante para todas as cepas de *T. cruzi* sensíveis, naturalmente resistentes e com resistência selecionada *in vivo* ao BZ analisadas neste estudo.

Conclusão final

- A proteína TcADH está menos expressa na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdo MCB 1991. Caracterização da sensibilidade e resistência *in vitro* de cepas e linhagens de *Trypanosoma cruzi* aos compostos nitroheterocíclicos nifurtimox e benzonidazol. 89p. Dissertação, Mestrado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Andersson B, Aslund L, Tammi M, Tran AN, Hoheisel JD, Pettersson U 1998. Complete sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region. *Genome Res.* 8: 809-16.
- Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG 1985. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Braz J Med Biol Res.* 18: 499-506.
- Arauzo S, Cazzulo JJ 1989. The NADP-linked aldehyde reductase from *Trypanosoma cruzi*: subcellular localization and some properties. *FEMS Microbiol Lett.* 49: 283-286.
- Aronson B, Somerville RL, Epperly BR, Dekker EE 1989. The primary structure of *Escherichia coli* L-threonine dehydrogenase. *J Biol Chem.* 264: 5226-5232.
- Barker KS, Crisp S, Wiederhold N, Lewis RE, Bareither B, Eckstein J, Barbuch R, Bard M, Rogers PD 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 54: 376-385.
- Benne R, Van den Burg J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC 1986. Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell.* 46: 819-826.
- Borst P 1991. Genetic mechanisms of drug resistance. *Rev. Oncology.* 4: 87-105.
- Borst P & Ouellette M 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 49: 427-460.

- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
- Brener Z, Chiari E 1967. Susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to various chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 9: 197-207.
- Brener Z 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 82: 205-212.
- Brener Z, Camargo ME and Rassi A 1992. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo, ISTB Brazil-SBHH, 13-29.
- Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 431 p.
- Buckner FS, Wilson AJ, White TC, Van Voorhis WC 1998. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 3245-50.
- Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, da Silva AA, Pereira CM, More CM, Romanha AJ 1990. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta. Trop.* 47: 35-45.
- Chen M, Li E, Stanley SL 2004. Structural analysis of the acetaldehyde dehydrogenase activity of *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2), a member of the ADHE enzyme family. *Mol. Bioch. Parasitol.* 137: 201-205.
- Church GM & Gilbert W 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci.* 81: 1991-5.
- Clark DP 1989. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 223-234.
- Clayton C, Hausler T, Blattner J 1995. Protein trafficking in Kinetoplastid protozoa. *Microbiol. Rev.* 59: 325-344.

- Clayton CE 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21: 1881-8.
- Conway T, Sewell GW, Osman YA, Ingram LO 1987. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol.* 169: 2591-7.
- Cortes-Selva F, Munoz-Martinez F, Ilias A, Jimenez AI, Varadi A, Gamarro F, Castanys S 2005. Functional expression of a multidrug P-glycoprotein transporter of *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun.* 329: 502-507.
- Cowen LE, Sanglard D, Calabrese D, Sirjusingh C, Anderson JB, Kohn LM 2000. Evolution of drug resistance in experimental populations of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 182: 1515-22.
- Denton H, McGregor JC, Coombs GH 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J.* 381: 405-12.
- Devera R, Fernandes O & Coura JR 2003. 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*, Rio de Janeiro, 98: 1-12.
- Dias de Toranzo EGD, Castro JA, Franke de Cazzuolo BM, Cazulo JJ 1988. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experimentia.* 44: 880-881.
- Dias JCP 1987. Control of Chagas’ disease in Brazil, *Parasitology Today*, 3(11): 336-341.
- Docampo R & Stopani AOM 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochem. and Biophys.* 197: 317-321.
- Docampo R, Moreno SNJ, Stopani AOM, Leon W, Cruz FS, Villaalta F, Muniz RFA 1981. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* 30: 1947-1951.

- Docampo R 2001. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des.* 7: 1157-64.
- Donelson JE, Gardner MJ, El-Sayed NM 1999. More surprises from Kinetoplastida. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 96: 2579-81.
- Donelson JE, Zeng W 1990. A comparison of trans-RNA splicing in trypanosomes and nematodes. *Parasitol Today.* 6: 327-34.
- Dos Santos W & Buck G 1999. Polymorphisms at the topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. *J Eukaryot Microbiol.* 46: 17-23.
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 21: 10-4.
- Dvorak JA, Hall TE, Cranes MS *et al* 1982 . *Trypanosoma cruzi* flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mitramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* 24: 430-437.
- Echave P, Tamarit J, Cabisco E, Ros J 2003. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 278: 30193-8.
- Eklund H, Nordstrom B, Zeppezauer E, Soderlund G, Ohlsson I, Boiwe T, Branden CI 1974. The structure of horse liver alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* 44: 200-204.
- Eklund H, Nordstrom B, Zeppezauer E, Soderlund G, Ohlsson I, Boiwe T, Soderberg BO, Tapia O, Branden CI, Akeson A 1976. Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol.* 102: 27-59.
- Eklund H, Samma JP, Wallen L, Branden CI, Akeson A, Jones TA 1981. Structure of a triclinic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 146(4): 561-87.

- Eklund H, Horjales E, Jornvall H, Branden CI, Jeffery J 1985. Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Biochemistry*. 24: 8005-12.
- Elandalousi LM, Lindt M, Collins M, Smith PJ 2006. Analysis of P-glycoprotein expression in purified parasite plasma membrane and food vacuole from *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*. 99: 631-637.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J et al 2005. Comparative genomics of Trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 309: 404-409.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D et al 2005. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*. 309: 409-414.
- Engel JC, Torres C, Hsieh I, Doyle PS, McKerrow JH 2000. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell. Sci*. 113:1345-54.
- Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A, Ronnblom A 2006. Efflux transporters in ulcerative colitis: Decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis*. In press.
- Espinosa A, Clark D, Stanley SL Jr 2004. Entamoeba histolytica alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) as a target for anti-amoebic agents. *J Antimicrob Chemother*. 54: 56-9.
- Estani S et al. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 59, 526-529, 1998.
- Feinberg AP & Vogelstein B 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1; 132: 6-13.

- Fernandes O, Souto RP, Castro JÁ, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TB, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 807-811.
- Filardi LS & Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 81: 755-759.
- Garg N, Popov VL, Papaconstantinou J 2003. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1638: 106-120.
- Gibson WC, Miles MA 1986. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 6:1299-305.
- Gobert GN, Moertel LP, McManus DP 2005. Microarrays: new tools to unravel parasite transcriptomes. *Parasitology.* 131:1-10.
- Guimond C, Trudel N *et al* 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Research.* 31:5886-5896.
- Henriksson J, Aslund L, Marcina RA *et a* 1990. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42: 213-224.
- Henriksson J, Porcel B, Rydaker M *et al* 1995. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 63-74.
- Henriksson NJ, Aslund L and Pettersson U 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today.* 12: 108-114.

- Henriksson J, Dujardin JC, Barnabe C, Brisse S, Timperman G, Venegas J, Pettersson U, Tibayrenc M, Solari A 2002. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology*. 124: 277-86.
- Hoffmann KF, McCarty TC, Segal DH, Chiamonte M, Hesse M, Davis EM, Cheever AW, Meltzer PS, Morse Hc 3rd, Wynn Ta 2001. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB Journal*. 15: 2545-2547.
- Imai K, Mimori T, Kawai M, Koga H 2005. Microarray analysis of host gene-expression during intracellular nests formation of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Microbiol Immunol*. 49: 623-31.
- Jaros S 2006. DNA microarrays in parasitology and medical sciences. *Wiad Parazytol*. 52: 13-29.
- Jeffery J and Jörnvall H 1988. Sorbitol dehydrogenase. *Adv Enzymol*. 61: 47-106.
- Jörnvall H, Persson B, Jeffery J 1981. Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78: 4226-4230.
- Jörnvall H, Persson B, Jeffery J 1987. Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur J Biochem*. 167: 195-201.
- Karlsson C, Jörnvall H, Hoog JO 1991. Sorbitol dehydrogenase: cDNA coding for the rat enzyme. Variations within the alcohol dehydrogenase family independent of quaternary structure and metal content. *Eur J Biochem*. 198: 761-765.
- Kohl L and Gull K 1998. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol and Bioch Parasitol*. 93:1-9.
- Kulda J 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. *Int. J. Parasitol*. 29: 199-212.

- Kumar A, Shen PS, Descoteaux S, Pohl J, Bailey G, Samuelson J 1992. Cloning and expression of an NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 10188-92.
- Kumar S, Tamura K, Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*. 168(2):649-59.
- Lockman JW, Hamilton AD 2005. Recent developments in the identification of chemotherapeutics for Chagas disease. *Curr Med Chem*. 12: 945-59.
- Lukes J, Hashimi H, Zikova A 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet*. 48: 277-99.
- Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol*. 1-2:147-53.
- Malherbe Y, Kamping A, Van Delden W, Van de Zande L 2005. ADH enzyme activity and *Adh* gene expression in *Drosophila melanogaster* lines differentially selected for increased alcohol tolerance, *J.Evol.Biol*. 18: 811-819.
- Marks AR, McIntyre JO, Duncan TM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Fleischer S 1992. Molecular cloning and characterization of (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase from human heart. *J Biol Chem*. 267:15459-63.
- McDaniel JP & Dvorak JA 1993. Identification, isolation and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol*. 57: 213-222.

- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG 1977. 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.* 71: 217-225.
- Miles MA, Souza AA, Povia M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 272: 819-821.
- Miles MA, Lanhan SM, de Souza AA and Povia DG 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 221-242.
- Miles MA, Cedillos RA, Povia M, Souza AA, Prata A, Macedo V 1981a. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* (Zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet i*, 1338-1340.
- Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL 2003. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 131: 55-64.
- Molinas SM, Altabe SG, Opperdoes FR, Rider MH, Michels PA, Uttaro AD 2003. The multifunctional isopropyl alcohol dehydrogenase of *Phytomonas* sp. could be the result of a horizontal gene transfer from a bacterium to the trypanosomatid lineage. *J Biol Chem.* 278(38): 36169-75.
- Montigny C, Penin F, Lethias C, Falson P 2004. Overcoming the toxicity of membrane peptide expression in bacteria by upstream insertion of Asp-Pro sequence. *Biochim Biophys Acta.* 1660: 53-65.
- Morello A 1988. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90C: 1-12.

- Motyka SA, Drew ME, Yildirim G, Englund PT 2006. Overexpression of a cytochrome b5 reductase-like protein causes kinetoplast DNA loss in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 281: 18499-506.
- Murta SMF & Romanha AJ 1998. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology*, 116: 165-171.
- Murta SMF, Dos Santos WG, Anacleto C, Nirdé P, Moreira ESA & Romanha AJ 2001. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of phosphoglycoprotein (PGP) genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 117: 223-228.
- Murta SMF, Krieger MA, Costa VG, Yamada-Ogatta SF, Muto NH, Oliveira RC, Nunes LR, S Goldenberg, Romanha AJ 2002. Functional genomic analysis of drug resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 44: 24.
- Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Ávila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirde P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ 2005. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 146: 151-162.
- Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, Magness C, Rickel E, Sisk E, Sunkin S, Swartzell S, Westlake T, Bastien P, Fu G, Ivens A, Stuart K 1999. Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(6):2902-6.
- Nare B, Hardy LW, Beverley SM 1997. The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J Biol Chem*. 272: 13883-91.
- Neal RA & Van Bueren J 1988. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 709-714.

- Nino CA, Wasserman M 2003. Transcription of metabolic enzyme genes during the excystation of *Giardia lamblia*. *Parasitol Int.* 52: 291-8.
- Nirdé P, Larroque C & Barnabé C 1995. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *Medical Sciences*, 318: 1239-44.
- Nogueira FB, Krieger MA, Nirde P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM 2006. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop.* 100(1-2):119-32.
- Nozaki T, Engel J & Dvorak J 1996. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Med. Hyg.* 55: 111-117.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B 2003. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol Biochem Parasitol.* 129: 79-90.
- Peltoketo H, Isomaa V, Maentausta O, Vihko R 1988. Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett.* 239: 73-7.
- Pontes AL & Andrade SG 1984. Response to chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice inoculated with strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from previously treated animals. *Resumo do XX Congresso da Soc. Bras. Med. Trop.* p.25.
- Porcile PE, Santos MR, Souza RT, Verbisck NV, Brandao A, Urmenyi T, Silva R, Rondinelli E, Lorenzi H, Levin MJ, Degraive W, Franco da Silveira J 2003. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene.* 308: 53-65.
- Rasoloson D, Vanacova S, Tomkova E, Razga J, Hrdy I, Tachezy J, Kulda J 2002. Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology.* 148: 2467-77.

- Rassi A & Luquetti AO 1992. Therapy of Chagas disease. *In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine* (ed.). ISBT Brazil, São Paulo, 237-247.
- Reid MF, Fewson CA 1994. Molecular characterization of Microbial Alcohol dehydrogenases. *Critical Reviews in Microbiology*. 20: 13-56.
- Rodriguez JB 2001. Specific molecular targets to control tropical diseases. *Curr Pharm Des*. 7: 1105-16.
- Rodrigues Coura J, de Castro SL 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97(1):3-24.
- Romanha AJ, Silva-Pereira AA, Chiari E, Kilgour V 1979. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi* changes after prolonged subculture. *Com. Biochem. Physiol*. 62B: 139-142.
- Romanha AJ 1982. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. 110p. Tese PhD, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd M, Upcroft P 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemoth*. 40: 833-840.
- Sambrook J, Fritsch EF 1989. Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuelson J, Ayala P, Orozco E, Wirth D 1990. Emetine-resistant mutants of *Entamoeba histolytica* overexpress mRNAs for multidrug resistance. *Mol Biochem Parasitol*. 38: 281-90.

- Sánchez LB 1998. Aldehyde dehydrogenase (CoA-Acetylating) and the mechanism of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*, Archives of biochemistry and biophysics. 354: 57-64.
- Saxena A, Worthey EA, Yan S, Leland A, Stuart KD, Myler PJ 2003. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol Biochem Parasitol*. 129: 103-14.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complimentary DNA microarray. *Science*. 270: 467-470
- Schnauffer A, Domingo GJ, Stuart K 2002. Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. *Int J Parasitol*. 2002 32: 1071-84.
- Scott DA, Docampo R, Dvorak JÁ, Shi S, Leapman RD 1997. In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 272:28020-28029.
- Simpson L 1987. The mitochondrial genome of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Rev Microbiol*. 41: 363-382.
- Solari A 1980. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma*. 78: 239-255.
- Souto-Padron T, de Lima VMQ, Roitman I, De Souza W 1980. An electron microscopic and cytochemical study of *Leptomonas samueli*. *Z Parasitenkd*. 62:127-143.
- Souto RP, Zingales B 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 62: 45-52.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 83: 141-152.

- Souza AG, Valerio-Wanderley DM, Duralli GM, Andrade JCP 1984. Consolidation of the control of Chagas' disease vectors in the state of São Paulo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 79: 125-131.
- Stuart K 1995. RNA editing: an overview, status report, and personal perspective. Em: Boothroyd JC, Komuniecki R (eds). *Molecular Approaches to Parasitology*. Wiley-Liss, Inc, NY, pp 243-254.
- Tamarit J, Cabiscol E, Ros J 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem.* 273: 3027-32.
- Teixeira SMR. Control of gene expression in Trypanosomatidae 1998. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1503-16.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 25: 4876-4882.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala F 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agente of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1335-1339.
- Tibayrenc M & Ayala FJ 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution.* 42: 277-292.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 76: 4350-4.
- Ullman Buddy 1995. Multidrug resistance and P-glicoprotein in parasitic. Protozoa. *J. Bioenerg. Biomemb.* 27: 77-84.
- Urbina JA 1997. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology.* 114 Suppl:S91-9. Review.

- Urbina JA 1999a. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J. Mol. Med.* 77: 332-338.
- Urbina JA & Docampo R 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Parasitology.* 19: 495- 501.
- Van Hellemond JJ, Opperdoes FR, Tielens AG 2005. The extraordinary mitochondrion and unusual citricacid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans.* 33: 967-71.
- Villarreal D , Nirde P, Hide M, Barnabe C, Tibayrenc M 2005. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2701-2709.
- Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I 1999. Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem.* 274: 26051-6.
- WHO 2005. Organização Mundial da Saúde. Disponível em [http: www.who.gov.br](http://www.who.gov.br)
- Zhang Q, Tibayrenc M, Ayala F 1988. Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (flagellate), the agent of Chagas' disease. *J. Protozool.* 35: 81-85.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Inter. J. Parasitol.* 28: 105-112.