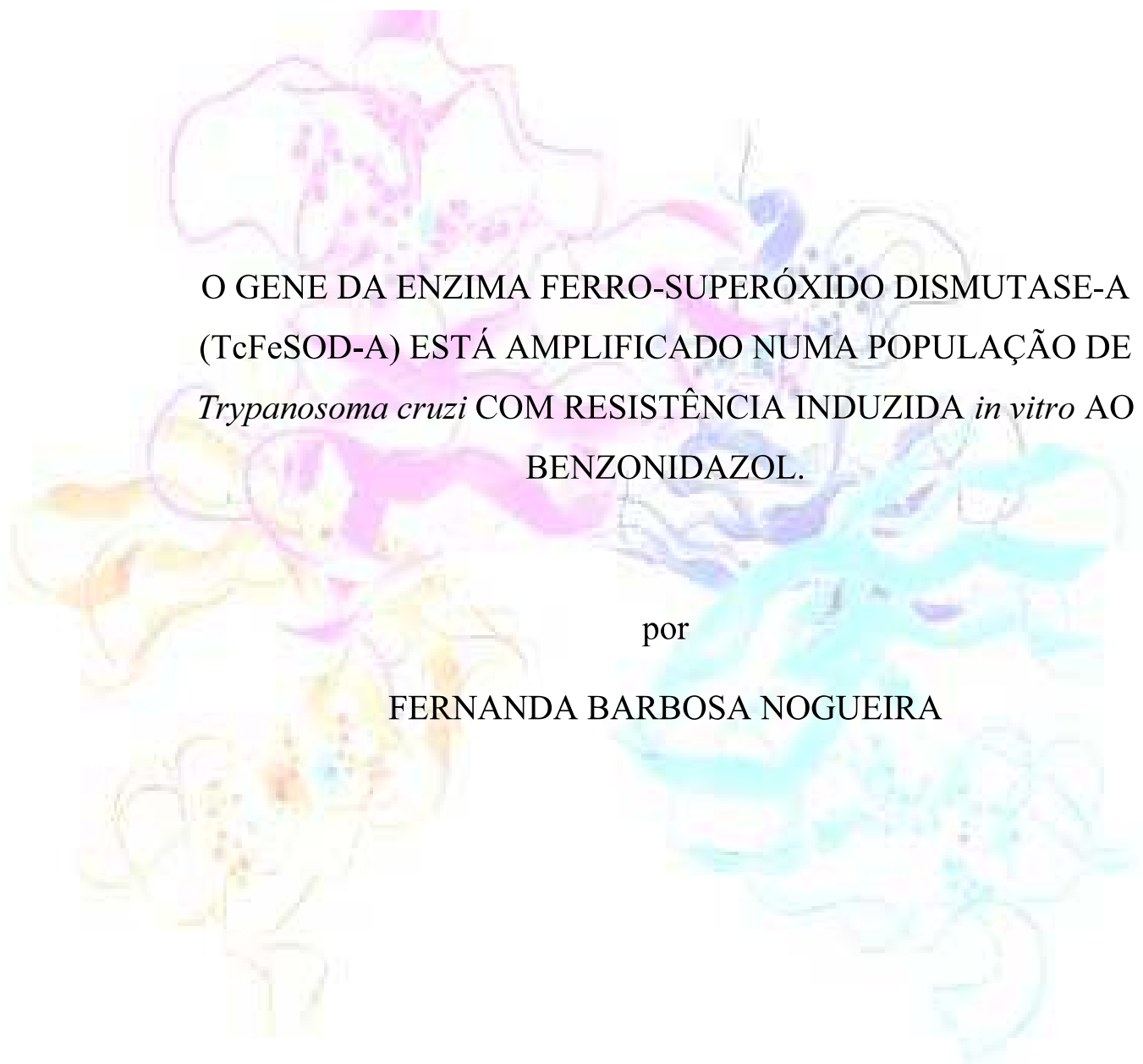


FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



O GENE DA ENZIMA FERRO-SUPERÓXIDO DISMUTASE-A
(TcFeSOD-A) ESTÁ AMPLIFICADO NUMA POPULAÇÃO DE
Trypanosoma cruzi COM RESISTÊNCIA INDUZIDA *in vitro* AO
BENZONIDAZOL.

por

FERNANDA BARBOSA NOGUEIRA

Belo Horizonte
Fevereiro de 2005

Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

“O GENE DA ENZIMA FERRO-SUPERÓXIDO DISMUTASE-A (TcFeSOD-A) ESTÁ AMPLIFICADO NUMA POPULAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* COM RESISTÊNCIA INDUZIDA *in vitro* AO BENZONIDAZOL. “

por

Fernanda Barbosa Nogueira

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

Orientadora: Dra. Silvane M. Fonseca Murta

Co-orientador: Dr. Alvaro José Romanha

Fevereiro, 2005

Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas René Rachou

Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Esta Dissertação intitulada:

“O GENE DA ENZIMA FERRO-SUPERÓXIDO DISMUTASE-A (TcFeSOD-A) ESTÁ AMPLIFICADO NUMA POPULAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* COM RESISTÊNCIA INDUZIDA *in vitro* AO BENZONIDAZOL. “

apresentada por

Fernanda Barbosa Nogueira

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Aristobolo Mendes da Silva

Dr. Carlos Renato Machado

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2005.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1- O <i>Trypanosoma 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>	7
1.4- Quimioterapia da Doença de Chagas	10
1.5- Resistência Natural do <i>T. cruzi</i> a drogas	13
1.6- Seleção de cepas do <i>T. cruzi</i> resistentes a drogas	15
1.7- Mecanismos de resistência a drogas	16
1.8- Expressão Diferencial dos genes do <i>T. cruzi</i>	20
1.9- O metabolismo oxidativo, a defesa antioxidante do <i>T. cruzi</i> e a enzima Superóxido Dismutase	21
 2- JUSTIFICATIVA	 33
 3- OBJETIVO GERAL	 34
3.1- Objetivos específicos	34
 4- METODOLOGIA	 35
4.1- Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
4.2- Extração de RNA Total	35
4.3- Extração de DNA	35
4.4- Reação em cadeia da polimerase (PCR)	36
4.5- Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida	36

4.6- Purificação do produto de PCR	36
4.7- RT-PCR quantitativo em tempo real	37
4.8- Análise de Northern blot	38
4.9- Southern blot	38
4.10- Sondas e ensaios de hibridização	39
4.11- Eletroforese de pulso alternado – PFGE	39
4.12- Preparação de bactérias eletrocompetentes	40
4.13- Clonagem e expressão da proteína recombinante	40
4.14- Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	42
4.15- Teste de solubilidade da proteína recombinante TcFeSOD-A	43
4.16- Purificação da proteína recombinante TcFeSOD-A	43
4.17- Dosagem de proteínas	44
4.18- Obtenção de anticorpo policlonal anti-proteína rTcFeSOD-A	44
4.19- Ensaio de ELISA	45
4.20- Extração de proteínas totais do <i>T. cruzi</i>	45
4.21- Western blot	46
4.22- Análise Densitométrica	46
4.23- Ensaio de atividade enzimática da TcFeSOD do <i>T. cruzi</i>	46
4.24- Sequenciamento.....	47
 5- RESULTADOS	 49
5.1- Nível de mRNA do gene TcFeSOD-A em populações do <i>Trypanosoma cruzi</i> sensíveis e resistentes ao benzonidazol	49
5.2- Organização genômica e número de cópias do gene TcFeSOD-A	51
5.3- Localização do gene TcFeSOD-A nos cromossomos do <i>T. cruzi</i>	55
5.4- Clonagem e expressão da proteína recombinante TcFeSOD-A	60
5.4.1- Caracterização da proteína recombinante TcFeSOD-A	62
5.4.1.1- Teste de solubilidade da proteína rTcFeSOD-A	62
5.4.1.2- Purificação da proteína recombinante rTcFeSOD-A	62
5.5- Nível de expressão da proteína rTcFeSOD-A em populações de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	65

5.5.1- Imunização de coelhos para a produção de anticorpo policlonal anti-rTcFeSOD-A e teste de ELISA	65
5.5.2- Western blot	65
5.6- Atividade enzimática da SOD nas populações de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ	67
5.7- Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene TcFeSOD-A das populações de <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ	72
 6- DISCUSSÃO	 79
 7- CONCLUSÕES	 94
 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Figura 2. Metabolismo antioxidante dos tripanosomatídeos.....	26
Figura 3. Nível de mRNA do gene TcFeSOD-A em populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ.....	50
Figura 4. Amplificação dos genes TcFeSOD-A e TcHGPRT de <i>T. cruzi</i> por RT-PCR quantitativo em tempo real.....	52
Figura 5. Southern blot do gene TcFeSOD-A de populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ. DNA total de cada cepa digerido com <i>Ava</i> I.....	53
Figura 6. Southern blot do gene TcFeSOD-A de populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ. DNA total de cada cepa digerido com <i>Xba</i> I.....	54
Figura 7. Localização cromossômica do gene TcFeSOD-A em populações do <i>T. cruzi</i> com diferentes zimodemas e resistência a droga.....	57
Figura 8. Localização cromossômica do gene TcFeSOD-A no genoma do <i>T. cruzi</i> , utilizando diferentes cepas do zimodema 1.....	58
Figura 9. Indução com IPTG da expressão da proteína recombinante rTcFeSOD-A do <i>T. cruzi</i> , pelas bactérias <i>E. coli</i> M15 transformadas	61
Figura 10. Teste de solubilidade da proteína recombinante rTcFeSOD-A do <i>T. cruzi</i>	63
Figura 11. Purificação da proteína recombinante rTcFeSOD-A com uma cauda de 6 histidinas, expressa por bactérias da cepa <i>E. coli</i> M15.....	64
Figura 12. Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas de populações do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ, Western blot, análise densitométrica da intensidade da banda da proteína TcFeSOD-A	68
Figura 13. Western blot e análise densitométrica da intensidade da banda da proteína TcFeSOD-A.....	69
Figura 14. Perfil eletroforético das proteínas totais do <i>T. cruzi</i> , Western blot e densitometria da proteína rTcFeSOD-A.....	70
Figura 15. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das populações e clones do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ e da TcFeSOD-A do <i>T. cruzi</i> depositada no GenBank.....	74

Figura 16. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das populações e clones do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao BZ e da TcFeSOD-A do <i>T. cruzi</i> depositada no banco de dados	76
Figura 17. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região codificante da TcFeSOD-A com a TcFeSOD-B do <i>T. cruzi</i>	77
Figura 18. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da TcFeSOD-A com a TcFeSOD-B do <i>T. cruzi</i>	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Populações e clones do <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas neste trabalho, a localização cromossômica e o tamanho dos fragmentos de DNA genômico do gene TcFeSOD-A gerados por <i>Ava</i> I	59
TABELA 2: Determinação dos níveis de anticorpos contra a proteína rTcFeSOD-A produzidos em coelhos, pela técnica de ELISA	66
TABELA 3: Atividade SOD de extratos protéicos brutos de populações e clones do <i>T. cruzi</i> sensíveis e resistentes ao benzonidazol	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-ethyl benzthiazoline - 6 - sulfonic acid)

AMP – Ampicilina

AP – Fosfatase alcalina

APS – Persulfato de amônio

ATP – Adenosina trifosfato

BCIP - 5-bromo-4chloro-3-indolyphosphate

BSA – Albumina bovina sérica

BZ – Benzonidazol

cDNA – DNA complementar

CIAP – Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal

C_T - Cycle threshold

Cu/ZnSOD – Cobre/zinco superóxido dismutase

DHFR-TS – Dihidrofolato redutase -timidilato sintetase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos

DP – Desvio padrão

DTPA – Ácido dietilenotriamina pentaacético

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

FeSOD-A – Ferro superóxido dismutase A

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HGPRT – Hipoxantina guanina fosforribosil transferase

IMP – Inosinato desidrogenase

IPTG – Isopropyl bD-thiogalactopyranoside

KANA – Kanamicina

Kb – Kilobases

kDNA - Esquizodemas

LB – Meio Luria-Bertani

LIT – Liver infusion triptose

M – Molar

Mb – Megabases

MDR – Multiple resistance drugs (resistência a múltiplas drogas)

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MM – Marcador de massa molecular

mM – Milimolar

MnSOD – Manganês superóxido dismutase

MOPS – Ácido 3-N-morfolino propanosulfônico

MPA – Ácido micofenólico

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NBT - Nitro blue tetrazolium

NFX – Nifurtimox

Ni²⁺-NTA – Resina de ácido nitriloacético com níquel

NiSOD – Níquel superóxido dismutase

O₂⁻ - Ânion superóxido

OD – Densidade ótica

OH⁻ - Radical hidroxila

pb – Pares de bases

PBS – Salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFGE - Pulse field gel electrophoresis (eletroforese de campo alternado)

PGP – Fosfoglicoproteína de membrana

pmoles - Picomoles

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

RDE – Representation of differential expression (representação da expressão diferencial)

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

RT – Transcriptase reversa

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

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

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

SSC – Tampão citrato de sódio

TBE – tampão tris-borato EDTA, pH 8,0

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

TR – Tripanotona redutase

UTR – Untranslated region (região não traduzida)

V – Volts

xg - Gravidade

Z1 – Zimodema 1

Z2 – Zimodema 2

ZB – Zimodema B

µg – Micrograma

µl – Microlitro

³²P – Fósforo radioativo

RESUMO

A enzima Superóxido Dismutase (SOD) remove o excesso do ânion superóxido via dismutação para oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo o componente central da defesa antioxidante dos organismos. Em *T. cruzi* foi descrita a presença de duas isoformas dessa enzima, TcFeSOD-A e TcFeSOD-B (Ismail *et al.*, 1997). Murta *et al.* (2002) utilizando a metodologia de Representação da Expressão Diferencial (RDE) selecionaram o gene TcFeSOD-A, que foi superexpresso na população do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao benzonidazol (BZ) 17LER, comparado com seu par sensível 17WTS. No presente trabalho, o gene TcFeSOD-A, foi caracterizado em 25 populações e clones do *T. cruzi* sensíveis, naturalmente resistentes ou com resistência induzida *in vitro*, ou selecionada *in vivo* ao BZ. Análise de Northern blot com a sonda do gene TcFeSOD-A, mostrou a presença de dois transcritos um de 1,2 Kb e outro de 1,6 Kb para todas as amostras de *T. cruzi* analisadas. A população 17LER apresentou nível de mRNA três vezes maior em comparação com seu par sensível (17WTS). A mesma diferença no nível de mRNA foi observada por RT-PCR quantitativo em tempo real. As outras populações do *T. cruzi* apresentaram os mesmos níveis de mRNA, independente do fenótipo de resistência a drogas. O número de cópias estimado por Southern blot mostrou que o gene TcFeSOD-A está duas vezes mais amplificado na população 17LER comparado com a 17WTS. O gene TcFeSOD-A está localizado em um ou dois cromossomas, dependendo da cepa do parasita e não está associado com a resistência a drogas. O gene da TcFeSOD-A está presente em duas bandas cromossômicas que foram duas vezes mais intensas na população 17LER do que na 17WTS, confirmando os resultados de Southern blot. Análises de Western blot, mostraram que o anticorpo policlonal anti-TcFeSOD-A recombinante reconheceu um polipeptídeo de 23 kDa em todas as amostras de *T. cruzi* analisadas. A intensidade desse polipeptídeo foi similar em todas as amostras, exceto na população 17LER, que apresentou duas vezes mais expressão comparado com a 17WTS. Em concordância com esses dados, a atividade enzimática da TcFeSOD foi também duas vezes maior na população 17LER do que na 17WTS. As demais amostras apresentaram a mesma atividade enzimática, independente do fenótipo de resistência a drogas. Análises das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene TcFeSOD-A das cepas de *T. cruzi* mostraram um polimorfismo relacionado com o zimodema da cepa e não com o fenótipo de resistência a drogas. Nossos resultados mostram uma associação da amplificação do gene TcFeSOD-A com a resistência *in vitro* do *T. cruzi* ao BZ.

ABSTRACT

Superoxide Dismutase (SOD) enzyme removes the excess of the superoxide radicals via dismutation to oxygen and hydrogen peroxide, being the central component of the antioxidant defense of organisms. In *T. cruzi* the SOD is present in two isoforms, TcFeSOD-A and TcFeSOD-B (Ismail *et al.*, 1997). Murta *et al.* (2002) using the Representation of Differential Expression (RDE) methodology selected the TcFeSOD-A gene. It was overexpressed in the *T. cruzi* population with *in vitro* induced resistance to the benznidazole (BZ) 17LER, compared to susceptible pair 17WTS. In the present work, TcFeSOD-A gene was characterized in 25 *T. cruzi* populations and susceptible clones, naturally resistant or with *in vitro*-induced resistance, or *in vivo*-selected resistance to BZ. Northern blot analysis probed with the TcFeSOD-A gene, showed the presence of two transcripts one of 1,2 Kb and another of 1,6 Kb for all *T. cruzi* samples analyzed. However, the 17LER population presented mRNA level three-fold more in comparison to its susceptible pair (17WTS). Such a difference in mRNA level was confirmed by real time RT-PCR. The other *T. cruzi* populations presented the same mRNA levels, independent of their drug resistance phenotype. The estimate of the gene copy number showed that TcFeSOD-A is two-fold more amplified in 17LER population compared to 17WTS. TcFeSOD-A gene is located either in one or two chromosomes, depending on the parasite strain, but not on the drug-resistance phenotype. TcFeSOD-A gene is located in the two chromosomal bands that were two-fold more intense in 17LER population than in 17WTS, confirming Southern blot results. Western blot results, showed that an anti-TcFeSOD-A recombinant polyclonal antibody recognized a polipeptide of 23 kDa in all *T. cruzi* samples. The intensity of this polipeptide was similar in all the samples, except in the 17LER population, that presented a two-fold expression of these protein than 17WTS. In agreement with those data, the enzymatic activity of TcFeSOD was also two-fold higher in 17LER population than in 17WTS. The other samples presented the same enzymatic activity, independent of their drug resistance phenotype. Analyses of the nucleotide and amino acid sequences of the TcFeSOD-A showed a polymorphism associated with the zymodeme of the strain but not with the drug resistance phenotype. Altogether our results show an association of the TcFeSOD-A gene amplification with the *T. cruzi in vitro*-resistance to BZ.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanosomíase Americana, ocorre na América Central e do Sul, sendo endêmica em 21 países. Ela é a terceira maior doença tropical, depois da malária e da esquistossomose na América Latina. Estima-se que cerca de 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com o parasita e 100 milhões vivem em áreas de risco de transmissão da doença. No Brasil esta doença atinge cerca de 5 milhões de pessoas (WHO, 2000). Em 2000, 10 dos 12 estados endêmicos do Brasil foram certificados como livres da transmissão da doença de Chagas vetorial e transfusional (WHO, 2000). O Ministério da Saúde tenta combater os focos da doença de Chagas nos estados do Rio Grande do Sul e na Bahia (Conselho regional de farmácia do Tocantins, 2004). Atualmente, a prevalência da infecção foi estimada em cerca de 13 milhões de pessoas, com 3 milhões de casos sintomáticos e uma incidência anual de 200 mil novos casos em 15 países da América Central e do Sul (WHO, 2003).

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado, pertencente a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Membros desta família são amplamente distribuídos em diferentes áreas geográficas e causam doenças ao homem como a doença de Chagas, a doença do sono e as Leishmanioses (Vickerman, 1994). O parasita *T. cruzi* é transmitido ao homem e outros mamíferos pelos hospedeiros invertebrados - barbeiros, inseto triatomíneo da família Reduviidae.

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 sangüíneo. No entanto, existem outras formas alternativas de transmissão como a transfusão de sangue, transmissão congênita, acidentes de laboratório, transplante de órgãos ou por via oral (Brener *et al.*, 1992).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é muito complexo, apresentando três formas evolutivas distintas, entre o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado (Figura 1). Na luz do intestino médio do inseto vetor, as formas epimastigotas flageladas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. Após um período aproximado de quatro dias, os amastigotas se

diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberados no meio extracelular. Os tripomastigotas livres podem infectar as células vizinhas ou cair na circulação sanguínea, onde serão ingeridos pelo inseto vetor durante a alimentação, ou ainda infectarem células de outros tecidos do hospedeiro vertebrado (Tanowitz *et al.*, 1992). As células infectadas com os amastigotas além de liberarem os tripomastigotas para infectar outras células, liberam produtos que ativam enzimas, polipeptídeos, prostaglandinas, citocinas, enfim, diversos mediadores potenciais da inflamação, que também podem funcionar como antígenos ou gerar novos antígenos, assim provocando variadas e complexas respostas do sistema imune do hospedeiro. O indivíduo, uma vez infectado, permanece como tal por toda a vida, embora dados clínicos, sorológicos e parasitológicos sugestivos de auto-cura, em humanos, já tenham sido apresentados (Zeledón *et al.*, 1988; Brener *et al.*, 2000).

A doença de Chagas é caracterizada pelas fases aguda e crônica. Na fase aguda ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, com um alto parasitismo sanguíneo e tecidual nos primeiros meses de infecção (dois a quatro). O período de incubação do parasita varia entre 4 a 10 dias, sendo que na maioria das vezes o período inicial da infecção não é identificado. Nesta fase os pacientes podem apresentar uma sintomatologia que varia de assintomática até, em raros casos em crianças, uma miocardite grave que pode levar à morte. Quando sintomática, a infecção chagásica se inicia com um conjunto de manifestações, variáveis em frequência e intensidade, formado pelo sinal de porta de entrada da infecção, sintomas gerais e alterações sistêmicas (Rassi *et al.*, 2000). A porta de entrada da infecção pode ser aparente ou inaparente. Quando aparente, pode ser ocular (sinal de Romana) ou cutânea (chagoma de inoculação). Como sintomatologia geral, destaca-se o aparecimento de febre, acompanhada de mal-estar geral, cefaléia, astenia e hiporexia. Dentre as alterações sistêmicas, destacam-se o edema subcutâneo, o aumento de volume dos linfonodos, a hepatomegalia e a esplenomegalia, podendo ser observadas, ainda, manifestações de comprometimento cardíaco e de meningoencefalite (Rassi *et al.*, 2000). A fase aguda leva de 15 dias a 3-4 meses após a infecção (Rassi, 1979).

Posteriormente, o paciente entra na fase crônica da doença, caracterizada por um baixo número de parasitas 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, cerca de 20-30% destes 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 cardíaco-digestiva) (Brener, 1987). A cardiopatia chagásica crônica constitui a forma

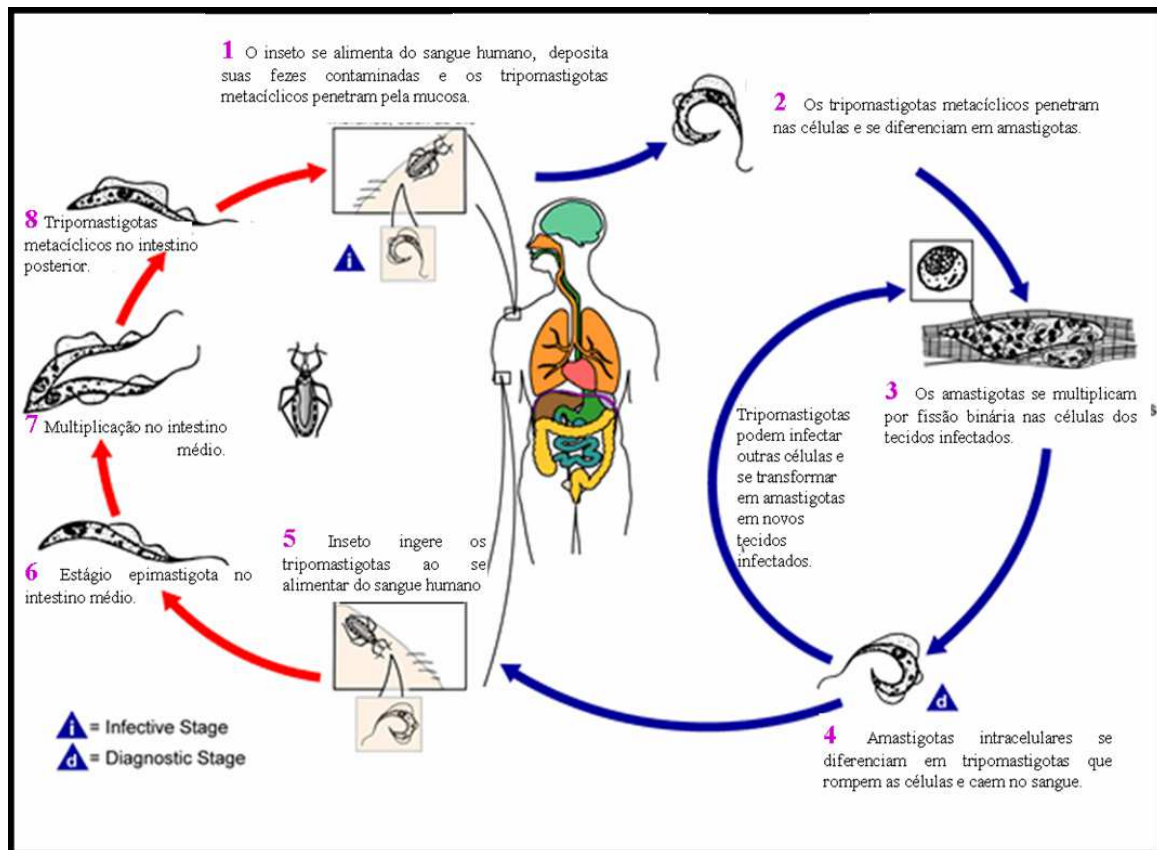


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: WHO, 2000.

clínica tardia da infecção pelo *T. cruzi*, resultando de dano miocárdico progressivo a incessante miocardite fibrosante. Na forma digestiva da doença, as alterações que ocorrem no trato digestivo são devidas à destruição das células nervosas do sistema nervoso entérico.

A principal causa de morbidade e mortalidade da doença de Chagas é a cardiopatia inflamatória crônica. Ainda não existe profilaxia eficiente por vacinação ou tratamento quimioterápico efetivo contra a doença de Chagas.

1.2 A organização genômica do *T. cruzi*

O tamanho do genoma do *T. cruzi* ($100\text{--}200 \times 10^6$ pb) é relativamente superior ao tamanho dos genomas de outros protozoários parasitas, como, por exemplo, *Leishmania* ($45\text{--}65 \times 10^6$ pb) e *T. brucei* (25×10^6 pb). Porém, a complexidade do genoma do *T. cruzi* é significativamente inferior à do genoma humano, cujo tamanho é da ordem de 3.000×10^6 pb (Silveira, 2000).

A organização dos genes dos tripanosomatídeos difere daquela conhecida em outros eucariotos. Sequências repetitivas representam cerca de 44% do genoma nuclear do *T. cruzi* e podem estar agrupadas ou dispersas no genoma, de acordo com o mecanismo responsável pela sua amplificação e dispersão no genoma (Castro *et al.*, 1981; Lanar *et al.*, 1981). Muitas sequências repetitivas e a maioria dos genes do *T. cruzi* que codificam proteínas estão presentes em múltiplas cópias na célula. Genes que codificam tubulinas, calmodulinas, ubiquitinas, antígenos de superfície de membrana e enzimas da via glicolítica existem em arranjos em “tandem” no genoma deste parasita (Ullu & Nilsen, 1995; Silveira, 2000).

Os genes codificadores de proteínas no genoma do *T. cruzi* podem ser encontrados em cópia única ou duplicados. Os genes de cópia única estão presentes em um único *locus* que contém uma única cópia deste. A maioria dos genes codificadores de proteínas ou RNA caracterizados neste parasita estão presentes em duas ou mais cópias, as quais podem estar localizadas em uma única região do cromossoma (um único *locus* contendo 2 ou mais cópias duplicadas do gene) ou em diferentes cromossomas (2 ou mais *loci* contendo cada um deles duas ou mais cópias duplicadas do gene) (Silveira, 2000).

A tendência do *T. cruzi* em duplicar os seus genes e agrupá-los em “tandem” pode estar relacionada com vários fatores e necessidades do parasita. O genoma do parasita parece ser

bastante flexível, ocorrendo constantes modificações devido à amplificação e translocação das seqüências gênicas. A presença de múltiplas cópias gênicas pode ser uma maneira encontrada pelo parasita de compensar eventuais perdas de genes essenciais durante essas constantes mudanças do genoma. Essa organização em “tandem” também pode estar relacionada com a transcrição policistrônica existente nos tripanossomas, o que facilitaria a síntese e manutenção dos níveis de mRNAs na célula (Silveira, 2000).

Outra singularidade dos tripanosomatídeos refere-se a estrutura dos seus pouco conhecidos promotores gênicos, que parecem não conter a caixa TATA e outros elementos característicos comumente encontrados nos promotores eucariotos (Ajioka & Swindle, 1993; Nakaar *et al.*, 1994).

O processamento dos mRNAs nos tripanosomatídeos é outro ponto importante que difere dos demais organismos eucariotos. Os tripanossomatídeos transcrevem longos pré-mRNAs policistrônicos, que devem ser processados em mRNAs individuais antes de serem traduzidos (Nilsen, 1992). Durante este processo, uma seqüência nucleotídica líder, conhecida como “splice leader” (SL) ou miniexon, pelo fato de não ser codificada de uma maneira contínua com os genes estruturais, é transferida para a extremidade 5’ de cada mRNA individual. Esta transferência ocorre através de uma reação denominada “trans-splicing”. Pouco se conhece sobre a origem evolutiva do trans-splicing e sua função biológica na célula. No entanto, este mecanismo de transcrição parece ter evoluído para acomodar a necessidade dos tripanosomas em processar seus pré-RNAs policistrônicos, servindo como um meio de individualizar os mRNAs e ao mesmo tempo adicionar a eles uma estrutura de quepe (cap), tornando-os maduros e competentes para tradução. Além deste processamento diferencial do mRNA, não tem sido observado a presença de introns nos genes dos tripanosomatídeos estudados (Perry & Agabian, 1991).

A seqüência líder (SL) é derivada de um RNA codificado por genes localizados em um ou dois cromossomas, dependendo da cepa do *T. cruzi* (Wagner & So, 1990; Cano *et al.*, 1995). A SL está teoricamente presente em todos os mRNAs do *T. cruzi* (Walder *et al.*, 1986) e sua função exata não é conhecida. Existem evidências de que a SL confere estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação, auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomas. Transcritos desprovidos da SL, perdem a sua estabilidade e não são traduzidos (Ullu *et al.*, 1996; Silveira, 2000).

Os mRNAs dos tripanosomatídeos apresentam na sua extremidade 3’ uma cauda composta por cerca de 30 resíduos de adenina (cauda poli A). Porém, ao contrário dos

eucariontes superiores, os mRNAs dos tripanosomatídeos não apresentam uma sequência consenso para adição de resíduos de adenina (Vanhame & Pays, 1995; Silveira, 2000).

Vários mRNAs do *T. cruzi* possuem uma extensa região 3' não traduzida (Franco *et al.*, 1993; Araya *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1995; Brener *et al.*, 2000). Essa região está situada entre o códon de terminação e o início da cauda poli A, chamada de 3' UTR (3' untranslated region). Experiências com parasitas transfectados com o gene amastina mostraram a presença na região 3' UTR de sequências específicas capazes de regular a expressão gênica de maneira estágio-específica (Teixeira *et al.*, 1995; Nozaki & Cross, 1995; Silveira, 2000). Essas sequências podem interagir com fatores capazes de estimular ou inibir a expressão gênica, influenciando na estabilidade do mRNA (Silveira, 2000).

A regulação da expressão gênica no *T. cruzi* ocorre principalmente a níveis pós-transcricionais. Essa regulação ocorre no nível do processamento de transcritos primários (trans-splicing e poliadenilação), da estabilidade do mRNA ou da estabilidade dos produtos da tradução (Vanhame & Pays, 1995; Teixeira, 1998; Ávila *et al.*, 2001). Sabe-se que os mRNAs do *T. cruzi* podem ser estocados no citoplasma numa forma de reprimir a transcrição (Goldenberg *et al.*, 1985), sugerindo que a mobilização do mRNA pelos polissomas pode ser um mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão de alguns genes em tripanosomatídeos (Ávila *et al.*, 2001).

Estudos envolvendo a questão da ploidia do *T. cruzi*, um tópico bastante controverso ainda hoje, têm suportado a idéia de que esse parasita seja diplóide. Estes estudos são derivados de medidas quantitativas de DNA (Borst *et al.*, 1982), análises de polimorfismo de isoenzimas (Bogliolo *et al.*, 1996) e análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e PFGE (pulse field gel electrophoresis) com sondas unilocais (Henriksson *et al.*, 1990 e 1996). No entanto, dados sugerindo a ocorrência natural de aneuploidia também têm sido apresentados. Um exemplo é o polimorfismo do DNA observado entre parasitas derivados de um único clone (Y-02) da cepa Y do *T. cruzi* (McDaniel & Dvorak, 1993; Henriksson *et al.*, 1996). Dessa forma, não se exclui a hipótese da existência de cromossomas aneuplóides e/ou poliplóides (Silveira, 2000).

Uma das particularidades observadas no *T. cruzi* é que seus cromossomas não se condensam durante a divisão nuclear (Solari, 1980). Entretanto, com a utilização da técnica de pulse field gel electrophoresis (PFGE), foi possível verificar que o genoma do *T. cruzi* está organizado em pelo menos 20-25 bandas cromossômicas, variando de 0,45 a 1,6 Mb (Gibson & Miles, 1986; Henriksson *et al.*, 1990, 1995 e 1996). Outra característica marcante deste parasita é

a grande variação no conteúdo de DNA entre as diferentes cepas (Dvorak *et al.*, 1982) e até mesmo entre clones de uma mesma cepa, 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 parasita, como por exemplo, o número de repetições de determinados genes.

Um estudo realizado com três isolados clonais de *T. cruzi* analisados em relação a 34 diferentes marcadores cromossômicos, mostrou que todos os marcadores testados reconheceram um grupo de cepas conservadas, assim como reconheceu 26 cepas diferentes. Este fato sugere que a maioria dos cromossomos tem uma estrutura cromossômica conservada, apesar da marcante presença de polimorfismo no tamanho dos cromossomos deste parasita (Henriksson *et al.*, 1995).

Análises no cariótipo sugerem que o *T. cruzi* é diplóide e que o genoma está distribuído em pares homólogos de cromossomos, que geralmente diferem em tamanho. A hibridização de bandas cromossômicas com sondas específicas de DNA revelou uma grande diversidade no cariótipo entre as cepas do *T. cruzi*. No entanto, uma certa correlação foi encontrada entre pares de hibridização e a divisão das cepas em duas maiores linhagens (Henriksson *et al.*, 1996). Recentemente, dados do estudo de polimorfismo no tamanho dos cromossomos têm sido usados para obter informações evolucionárias dos grupos de *T. cruzi* (Henriksson *et al.*, 2002; Pedroso *et al.*, 2003).

Análises na variação do tamanho dos cromossomos têm sido utilizadas para medir a distância entre duas espécies de *Leishmania* (Dujardin *et al.*, 1995). Esta pesquisa foi baseada na hipótese de que o genoma dos tripanosomatídeos é diplóide e que o polimorfismo no tamanho dos cromossomos é um reflexo de rearranjos dos genes. Os autores assumem que quanto maior a diferença no tamanho entre os cromossomos homólogos de diferentes cepas, mais divergente serão estas cepas (Dujardin *et al.*, 1995).

1.3 Heterogeneidade genética em *T. cruzi*

O *T. cruzi* é constituído por uma população heterogênea, composta por um grupo de cepas que circula nos ciclos doméstico e silvestre, envolvendo o homem, vetores e reservatórios animais do parasita. O isolamento e estudo de populações do *T. cruzi* de diferentes origens demonstraram a presença de uma grande variedade de cepas com características biológicas,

imunológicas, bioquímicas e farmacológicas distintas. Estudos utilizando populações clonadas de *T. cruzi*, reforçam esta heterogeneidade do parasita e demonstram que as cepas são compostas de uma variedade de subpopulações com características distintas (Doyle *et al.*, 1984; Postan *et al.*, 1986; Finley & Dvorak, 1987).

Estudos da variabilidade de isoenzimas entre populações de *T. cruzi* isoladas de diferentes regiões do Brasil, mostraram a existência de três diferentes grupos de cepas denominados zimodemas 1 (Z1), 2 (Z2) e 3 (Z3). Os zimodemas 1 e 3 foram observados em marsupiais e triatomíneos silvestres e em casos humanos agudos, caracterizando o ciclo silvestre de transmissão. O zimodema 2 observado em mamíferos domésticos e humanos caracteriza o ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1977, 1978, 1980 e 1981; Devera *et al.*, 2003). Romanha (1979 e 1982) e Carneiro *et al.* (1990), caracterizando amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos, verificaram a presença de 4 zimodemas distintos (ZA, ZB, ZC e ZD). A comparação dos zimodemas descritos por Romanha (1979 e 1982), com aqueles descritos por Miles *et al.* (1977 e 1978), mostrou grande similaridade entre os zimodemas ZA e Z2. 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.

Posteriormente outras metodologias foram utilizadas para a caracterização do *T. cruzi* e demonstraram a grande diversidade genética desse parasita. Além das isoenzimas, outras abordagens como kDNA (esquizodemas) (Morel *et al.*, 1980); DNA “fingerprinting” (Macedo *et al.*, 1992); random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Steindel *et al.*, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1993); microssatélites (Oliveira *et al.*, 1998), entre outras tem sido utilizadas.

Estudos utilizando marcadores nucleares, como genes que codificam o RNA ribossomal 24Sα e o miniexon, permitiram a divisão das cepas de *T. cruzi* em dois grupos distintos chamados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996, Devera *et al.*, 2003). Em abril de 1999, durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, no Rio de Janeiro, foi adotada a subdivisão da espécie de *T. cruzi* em duas linhagens principais. Foi oficializada a nomenclatura *T. cruzi* I referente ao parasita do ciclo silvestre e *T. cruzi* II associado a cepas do ciclo doméstico da doença. Os dois grupos de *T. cruzi* (I e II) definidos por marcadores genotípicos apresentam grande correlação com os zimodemas Z1 e Z2, anteriormente descritos na literatura baseado no perfil de isoenzimas, critério fenotípico (Miles *et al.*, 1978).

Fernandes *et al.* (1999), observaram a presença dos grupos *T. cruzi* I e II em diferentes hospedeiros, ilustrando a complexidade do ciclo natural do parasita. 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).

Estudos epidemiológicos têm mostrado evidências da associação preferencial do grupo *T. cruzi* II com mamíferos placentários e, em particular, com a infecção humana (Zingales *et al.*, 1998; Kawashita *et al.*, 2001; Buscaglia & Di Noia, 2003). Estes estudos também revelaram uma pequena proporção de infecção por *T. cruzi* I e/ou a co-infecção por *T. cruzi* I/II na população com doença de Chagas na fase aguda, enquanto que a maioria das pessoas chagásicas durante a fase crônica mostraram infecções restritas por *T. cruzi* II (Oliveira *et al.*, 1998; Breniere *et al.*, 1998; Buscaglia & Di Noia, 2003). Poucos casos de infecção restrita por *T. cruzi* I tem sido descritos e freqüentemente ocorre uma infecção assintomática (Coura *et al.*, 2002; Buscaglia & Di Noia, 2003). Esses resultados sugerem que os isolados do grupo *T. cruzi* I podem ser considerados como parasitas oportunistas para os humanos, tomando como vantagem diminuir a competência imunológica das pessoas infectadas por *T. cruzi* II durante a fase aguda da doença. No entanto, estas pessoas não desenvolveram a forma crônica (Buscaglia & Di Noia, 2003).

Tem sido descrita a existência de algumas cepas híbridas carregando genes do RNA ribossomal (rRNA) de ambos os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Brisse *et al.*, 2000; Henriksson *et al.*, 2002; Buscaglia & Di Noia, 2003). Adicionalmente, análises de MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) e RAPD (random amplified polymorphic DNA) de uma grande quantidade de amostras de *T. cruzi* demonstraram a distinção de cinco subdivisões filogenéticas do grupo *T. cruzi* II (IIa – IIe) (Brisse *et al.*, 2000). Sturm e colaboradores (2003) caracterizando a variabilidade genética das regiões intergênicas do *T. cruzi* observaram que o grupo *T. cruzi* I e o subgrupo IIb aparecem como linhagens puras, enquanto que subgrupos IIa/IIc e IId/IIe são linhagens híbridas.

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

Brisse e colaboradores (2000) identificaram seis linhagens filogenéticas do *T. cruzi* utilizando novos marcadores nucleares específicos (fragmentos A10-e, U7-e e F13-e, obtidos por RAPD) na PCR. Enquanto que Dost e colaboradores (2004), não encontraram nenhuma

correlação específica entre a expressão de genes particulares e a classificação dos grupos de *T. cruzi* onde eles são encontrados.

Outros estudos demonstraram que a heterogeneidade e os múltiplos clones de populações de *T. cruzi* determinam as diferenças no tropismo por tecidos do hospedeiro vertebrado e, conseqüentemente, variações na manifestação clínica da doença (Andrade *et al.*, 1999; Devera *et al.*, 2003).

Vargas e colaboradores (2004) comparando o cariótipo molecular dos grupos do *T. cruzi* mostraram que o grupo *T. cruzi* II tem 19 a 22 bandas cromossômicas com alto peso molecular (acima de 3,3 Mb) e que o grupo *T. cruzi* I possui 17 a 18 bandas com tamanho acima de 2,7 Mb. O tamanho do genoma das cepas pertencentes ao grupo *T. cruzi* I foi menor que o do *T. cruzi* II, como previsto por Pedroso *et al.* (2003). Foi observado ainda que o aumento no número e no tamanho dos cromossomas em cepas do *T. cruzi* II, pode refletir um evento de especiação e suporta a distante relação entre os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Henriksson *et al.*, 2002; Pedroso *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2004).

1.4 Quimioterapia da Doença de Chagas

A quimioterapia da doença de Chagas é um ponto que não está resolvido e tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de drogas eficientes contra o *T. cruzi*, principalmente para ser utilizado na fase crônica da doença.

O tratamento específico da doença de Chagas está limitado ao benzonidazol (BZ) e ao nifurtimox (NFX), que possuem baixa eficácia de cura. Estes compostos são efetivos em reduzir a duração e a severidade clínica da doença de Chagas aguda e congênita, levando aproximadamente 50% dos pacientes tratados à cura parasitológica (Kirchhoff, 1993). Em crianças de baixa idade com infecção crônica recente foi demonstrado cerca de 55,8% de cura após o tratamento com benzonidazol (Andrade *et al.*, 1996). Entretanto, o benzonidazol e o nifurtimox tem limitada eficácia terapêutica na fase crônica da doença, curando somente 6 a 10% dos pacientes (Cançado, 1999). Além da baixa eficácia, ambos compostos apresentam diversos efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, vômito, emagrecimento, leucopenia, neuropatia e dermatopatia alérgica (Rassi & Luquetti, 1992).

O nifurtimox (NFX) é um derivado 5-nitrofurano e o benzonidazol (BZ), um derivado 2-nitroimidazólico, ambos fazem parte de uma mesma família, a dos nitroheterocíclicos, mas possuem diferentes grupos químicos e apresentam diferentes mecanismos de ação contra o *T. cruzi*. O NFX é reduzido pela enzima tripanotiona redutase (Henderson *et al.*, 1988; Docampo *et al.*, 1981). O radical gerado pode reagir com o oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido (O_2^-) e este produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer a interação do H_2O_2 com o O_2^- produzindo o radical hidroxila ($OH^\cdot$). Este radical hidroxila é um dos mais perigosos radicais de baixa massa molecular, produzido por radiações ionizantes. Todos esses passos podem causar danos ao DNA (Olive, 1978) e lipídeos e formar peróxido orgânico (Tappel, 1973; Docampo *et al.*, 1981). 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).

O mecanismo de ação do benzonidazol ainda não está claro. Sabe-se que o BZ inibe o crescimento do *T. cruzi* sem estimular a produção de O_2^- e H_2O_2 . Assim, o efeito tripanosomicida do BZ não depende de radicais de oxigênio como o NFX (Moreno *et al.*, 1982; Maya *et al.*, 2003). Provavelmente metabólitos reduzidos do BZ estão envolvidos no mecanismo, através de ligações covalentes com componentes do parasita ou ligando ao DNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (Diaz de Toranzo *et al.*, 1988; Aldunate & Morello, 1993; Maya *et al.*, 1997 e 2003). Dessa forma, o BZ não produz um estresse oxidativo ao parasita, mas apresenta efeitos tóxicos.

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

Maya e colaboradores (2003) mostraram o efeito e o modo de ação dos nitroimidazoles (BZ e megazol) e derivados nitrofuranos (NFX) em *T. cruzi*. Em testes de atividade, o megazol foi três vezes mais potente do que o NFX, dependendo da cepa do parasita usada. O modo de ação do megazol consiste na inibição da respiração mitocondrial, não aumentando o oxigênio livre e na depleção da enzima tripanotiona, essencial para os processos de detoxificação do parasita. O megazol é um composto extremamente ativo contra o *T. cruzi*, mesmo em cepas do parasita que são altamente resistentes ao BZ e NFX (Filardi & Brener, 1982). Apesar da eficácia terapêutica, este composto apresenta graves efeitos colaterais, como surgimento de linfomas e outros tipos de tumores (Filardi & Brener, 1982).

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

Inibidores da biossíntese de esterol comercialmente disponíveis, como o cetoconazol ou itraconazol utilizados no tratamento de doenças causadas por fungos, não conseguiram erradicar o *T. cruzi* em animais experimentalmente infectados ou em pacientes humanos (Urbina, 1999a; 2000). Novos derivados de azol, como o D0870 e o SCH 56592 (posaconazol) foram capazes de induzir a cura parasitológica em modelos murinos de ambas as fases aguda e crônica da doença de Chagas (Urbina *et al.*, 1996; Urbina, 1999b; 2000; 2001) e foram os primeiros compostos a mostrarem atividade. Esta atividade antiparasítica resultou da potente e seletiva atividade anti-*T. cruzi* e das propriedades especiais farmacocinéticas desses compostos, seu longo período de meia-vida e grandes volumes de distribuição da droga no organismo do hospedeiro (Urbina *et al.*, 1996; Urbina, 1999a; 2000; 2001). Um outro derivado do triazol, o ravuconazol mostrou ser ativo contra a forma epimastigota do *T. cruzi in vitro*, mas sua atividade *in vivo* contra a forma amastigota do parasita é limitada devido às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis no modelo murino (Urbina, 2001; Urbina *et al.*, 2003).

Outro alvo para o desenvolvimento de drogas são os análogos de lisofosfolipídeos (miltefosina, edelfosina e ilmofosina), que agem seletivamente bloqueando a biossíntese de fosfatidilcolina no parasita. Esses compostos apresentaram atividade *in vitro* e *in vivo* contra parasitas tripanosomatídeos incluindo o *T. cruzi* (Santa-Rita *et al.*, 2000; Lira *et al.*, 2001; Escobar *et al.*, 2001).

Estudos têm avaliado a atividade tripanosomicida *in vitro* do hidrossolúvel Etanidazol, um nitroimidazol que possui atividade por longos períodos sem gerar sérios efeitos tóxicos (Petray *et*

al., 2004). O etanidazol apresentou atividade letal contra os isolados de tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, sem afetar a viabilidade das células hospedeiras (células Vero ou macrófagos J774). Também tem sido descrita por Paveto e colaboradores (2004), a atividade anti-*T. cruzi* de catequinas de chá verde (*Camellia sinensis*). Esta planta possui compostos biologicamente ativos que agem em lipídeos do plasma, têm efeitos antiinflamatórios, antimicrobianos, anticâncer e atividade antioxidante. Vários derivados do composto catequina, da família flavan-3-ols, foram testados *in vitro* contra os tripomastigotas sanguíneos e em amastigotas intracelulares. Foi observada atividade biológica das catequinas contra os efeitos tripanosomicidas, podendo usar estes compostos como agentes terapêuticos para a doença de Chagas, ou ainda para esterilização de sangue.

Recentemente, trabalhos estão sendo realizados com compostos dicatiônicos e um inibidor de farnesil-pirofosfato sintase. Os compostos dicatiônicos são derivados de pentamidina e se associam ao DNA do parasita, impedindo a sua replicação celular. Cinco compostos dicatiônicos foram testados *in vitro* contra cepas do *T. cruzi* e se mostraram efetivos em inibir o crescimento do parasita em doses não tóxicas para a célula hospedeira. O composto mais efetivo foi o DB709, que inibiu a liberação do parasita em baixas concentrações (0,8 ng/ml) (Rowland *et al.*, 2003). Outro inibidor da farnesil-pirofosfato sintase, o risedronato foi capaz de reduzir a parasitemia e a mortalidade dos camundongos infectados com *T. cruzi*, sem causar nenhum efeito deletério nas condições físicas dos animais tratados (Garzoni *et al.*, 2004).

Estratégias alternativas têm sido desenvolvidas para identificar candidatos entre drogas já disponíveis no mercado para ser utilizado em combinação, promovendo um efeito sinérgico e melhorando a eficácia da quimioterapia da doença de Chagas. Vários autores testaram a combinação de drogas como por exemplo, o BZ associado com o cetoconazol (Araújo *et al.*, 2000); NFX com corticóide (Rassi *et al.*, 2002); BZ com itraconazol (Toledo *et al.*, 2003); BZ com ácido tióico (Sosa-Estani *et al.*, 2004); entre outros. A maioria dos testes foram ineficazes, com exceção do tratamento com a combinação BZ e cetoconazol, que induziu um efeito sinérgico em camundongos infectados com cepas de *T. cruzi* sensível (cepa CI) e moderadamente resistente (cepa Y) ao BZ e NFX (Araújo *et al.*, 2000). Michailowsky e colaboradores (1998) testaram a ação combinada da droga BZ com a interleucina 12 (IL-12) em camundongos infectados com cepas de *T. cruzi* com diferença na susceptibilidade. Foi observado que a IL-12 aumentou a atividade do BZ contra cepas sensíveis e parcialmente resistentes do parasita, apresentando uma percentagem de cura maior do que nos animais tratados apenas com o BZ.

1.5 Resistência Natural do *T. cruzi* a drogas

O tratamento da doença de Chagas tem se mostrado problemático devido a baixa eficácia do tratamento com BZ e o NFX, principalmente na fase crônica da doença; considerável toxicidade destes compostos; existência de cepas do *T. cruzi* naturalmente resistentes a drogas e a resistência cruzada entre o BZ e o NFX. É interessante observar que a eficácia do tratamento específico da doença de Chagas difere entre as cepas, nos diversos países e em diferentes áreas geográficas dentro de um mesmo país.

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

Em um estudo realizado em nosso laboratório, 45 cepas de *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao BZ e NFX foram analisadas em relação a 6 diferentes marcadores moleculares. O perfil heterozigoto (ZB), agrupou exclusivamente cepas sensíveis e ocorreu predominantemente em áreas geográficas onde o tratamento da doença de Chagas tem sido relatado como mais eficaz, sugerindo que este zimodema esteja associado com o fenótipo de sensibilidade a drogas (Murta *et al.*, 1998). No entanto, os zimodemas 1 e 2 foram encontrados em populações de *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes a drogas.

Um fato importante descrito pelos autores Pontes & Andrade (1984), Filardi & Brener (1987) e Neal & Van Bueren (1988), foi o comportamento de resistência cruzada entre NFX e

BZ. Ambos os compostos apesar de pertencerem a uma mesma família, possuem diferentes grupos químicos e diferentes mecanismos de ação contra o parasita.

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

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

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

Andrade e Magalhães (1997) isolaram cepas de *T. cruzi* de camundongos previamente tratados com o BZ e mostraram um aumento na resistência para o tratamento com a mesma droga. Em um estudo realizado por Camandaroba e colaboradores (2003) foi observada a predominância de clones resistentes ao tratamento com o BZ, em camundongos infectados com a cepa naturalmente resistente Colombiana. Foi demonstrada também uma diferença na virulência entre vários clones dessa cepa resistente do *T. cruzi*. Assim, a alta resistência dos clones sugere a

predominância de um clone principal, muito resistente à quimioterapia na cepa Colombiana. Isso dificulta as possibilidades de cura de pacientes infectados com esta cepa, pertencente ao zimodema 1.

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

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

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 dos camundongos, com uma dose única e alta de BZ. Na ausência de pressão do BZ, o fenótipo da população resistente BZR foi estável após 6 meses de manutenção em meio de cultura LIT, após 20 passagens em camundongos e uma passagem pelo vetor invertebrado, *Triatoma infestans* (Murta & Romanha, 1998).

1.7 Mecanismos de resistência a drogas

Dados encontrados na literatura descrevem os mecanismos de resistência a drogas em protozoários parasitas como: a diminuição da entrada da droga na célula, o aumento da sua eliminação, a diminuição da sua ativação e alterações na enzima alvo para diminuir a interação enzima-droga (Ullman, 1995; Engel *et al.*, 2000). Estes mecanismos ainda não estão bem

esclarecidos. No entanto, vários autores desenvolvem estudos e investigam os mecanismos de resistência a determinadas drogas em vários parasitas resistentes.

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

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

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

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

Em um trabalho realizado em nosso laboratório por Murta *et al.* (2001a), foram analisados 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, em relação ao nível de expressão da P-glicoproteína (PGP), 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.

Em *T. brucei gambiense*, Wilson e colaboradores (1994) observaram a amplificação do gene inosinato desidrogenase (IMP) em parasitas resistentes ao ácido micofenólico (MPA), que inibe a atividade da enzima IMP. Os autores propõem a amplificação do DNA como um mecanismo molecular do *T. brucei* se tornar resistente a drogas citotóxicas e a amplificação do número de cópias no cromossoma como um novo mecanismo de resistência a drogas em protozoários parasitas. Em *Leishmania*, tem sido observada a amplificação do DNA para superexpressar determinados genes envolvidos na resistência a droga (Beverley, 1991; Borst & Ouellette, 1995). Em *Leishmania donovani* resistentes ao α -difluorometilornitina foi observada a amplificação não estável do gene ornitina descarboxilase contendo dois novos DNAs extracromossômicos (Hanson *et al.*, 1992). Guimond e colaboradores (2003) estudando parasitas resistentes ao metotrexato encontraram a superexpressão dos genes γ -glutamilcisteína 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 (glutamina sintase, S-adenosilhomocisteína hidrolase e S-adenosilmetionina sintase) que são superexpressos em parasitas resistentes à droga, no qual o gene não está amplificado no genoma do parasita. Além disso, eles mostraram que o gene transportador de ácido fólico FT5 foi deletado na linhagem de parasitas resistentes ao metotrexato.

Milner e Hajduk (1999) sugerem que a resistência do *T. brucei rhodesiense* ao fator lítico (TLF), mecanismo de defesa inata específica dos hospedeiros, pode ocorrer devido ao aumento do nível de expressão de moléculas da superfície celular, selecionando os parasitas. Em 2003, Drew e colaboradores sugerem que a toxicidade da tubercidina (7-deazaadenosina) na forma procíclica do *T. brucei* pode afetar o metabolismo de glicose no parasita, inibindo a enzima da via glicolítica fosfoglicerato kinase. Os autores observaram que o mecanismo de resistência do parasita a tubercidina foi o silenciamento do gene transportador de hexose, responsável pelo transporte de glicose. Além disso, o transportador de hexose apresenta baixa afinidade pela tubercidina, podendo ser responsável pelo seu transporte no parasita. Dessa forma, os parasitas resistentes podem sobreviver em baixas concentrações de glicose através de um processo que envolve o aumento da regulação do metabolismo de aminoácidos ou de transporte.

Chow e colaboradores (1993) investigando o mecanismo de resistência a droga em *Leishmania enriettii* resistente a vinblastina (inibidor de microtúbulo), observaram que esses parasitas também foram resistentes a puomicina (inibidor da síntese protéica). O mecanismo proposto para essa resistência cruzada foi o efluxo de drogas mediado pelo aumento da expressão de uma molécula P-glicoproteína que codifica um gene de resistência a múltiplas drogas (mdr).

Os autores observaram que o gene *mdr* está amplificado de forma extracromossômica em parasitas resistentes a vinblastina. Estudos mostraram que o gene transportador ABC (codifica uma P-glicoproteína – PGP) foi amplificado em espécies de *Leishmania* resistentes a drogas (Detke *et al.*, 1989; Ouellette *et al.*, 1990). Em 2003, Anacleto e colaboradores observaram a amplificação extracromossômica do gene PGPA, que foi superexpresso em *Leishmania (Viannia) guyanensis* resistente a glucantina. No entanto, em *Leishmania tarentolae* evidências sugerem que a amplificação do gene PGPA não é o único mecanismo de resistência à droga. Tem sido mostrado que um sistema de efluxo ativo independente da amplificação da PGPA tem um papel na resistência (Dey *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram que em linhagens de *Leishmania* resistente ao metotrexato ocorre a amplificação e a superexpressão do gene da pteridina redutase-1 (*ptr1*) junto com o gene da P-glicoproteína (*pgpA*), como um elemento extracromossômico (Papadopolou *et al.*, 1992; Chiquero *et al.*, 1994; Robello *et al.*, 1997). O gene *pgpA* não está envolvido no mecanismo de resistência ao metotrexato, mas confere resistência a antimoniais e arsenatos (Callahan & Beverley, 1991; Papadopolou *et al.*, 1994; Robello *et al.*, 1997). A presença desses dois genes envolvidos na resistência a drogas no mesmo locus do genoma de *Leishmania* sugere que os genes descritos para o mecanismo de detoxificação podem ser co-expressos nestes parasitas (Robello *et al.*, 1997). Gourley e colaboradores (2001) mostraram o mecanismo da pteridina redutase correlacionado com o metabolismo da pteridina em parasitas tripanosomatídeos resistentes à droga. Os autores determinaram dois mecanismos redutores distintos: a primeira redução utiliza um mecanismo de redutase de cadeia curta, e a segunda age de forma similar ao mecanismo proposto para a dihidrofolato redutase.

Em promastigotas de *Leishmania donovani* resistentes a amfotericina-B, Mbongo e colaboradores (1998) observaram um aumento no efluxo da droga nos parasitas resistentes em comparação com os sensíveis. Os autores mostraram que os parasitas resistentes promoveram a modificação na biossíntese de lipídeos (substituindo um esteroide pelo ergosterol na membrana celular), resultando no aumento da fluidez da membrana e na diminuição da sensibilidade a amfotericina-B.

Shaked-Mishan e colaboradores (2001) mostraram que em *L. donovani* resistente ao pentostam, o antimônio pentavalente (Sb^{V}) usado no tratamento da leishmaniose, inibe a toxicidade do antimônio trivalente (Sb^{III}), mas não do arsenato (As^{III}). Dados da literatura mostraram que várias espécies de *Leishmania* apresentam resistência cruzada entre essas três drogas, Sb^{V} , Sb^{III} e As^{III} (Borst & Ouellette., 1995; Sereno *et al.*, 1998; Haimeur & Ouellette,

1998). Os resultados de Shaked-Mishan e colaboradores (2001) indicaram que a atividade anti-leishmania do Sb^V foi dependente da sua redução para Sb^{III} . O mecanismo proposto para a redução do Sb^V pode ocorrer de forma enzimática ou não-enzimática, em um metabolismo intracelular. Em ambas as formas promastigotas e amastigotas do parasita ocorrem um acúmulo de Sb^V . A redução enzimática ocorre em ambas os estágios, mas a atividade redutora é muito maior nos amastigotas. A subsequente ligação do Sb^{III} a tripanotiona e o sistema de efluxo ativo desse complexo tem sido proposto (Dey *et al.*, 1996; Ouellette *et al.*, 1998; Shaked-Mishan *et al.*, 2001).

Em 2002, Cauchetier e colaboradores mostraram que a biossíntese de esterol foi diminuída em promastigotas de *L. infantum* com resistência ao atovaquone. O colesterol foi o esterol de membrana majoritário encontrado nesses parasitas, o que resultou na diminuição da fluidez da membrana e subsequentemente no bloqueio da passagem da droga pela membrana.

Singh e colaboradores (2003) estudando espécies de *Leishmania* resistentes ao antimônio gluconato de sódio (SAG) identificaram um novo gene amplificado nesses parasitas resistentes. Em parasitas selvagens transfectados com esse gene, os autores observaram resistência ao antimônio (SAG). A sequência de aminoácidos da proteína não apresentou similaridade com nenhuma sequência relacionada com resistência a droga em banco de dados. Os autores observaram sítios de fosforilação como característica estrutural da proteína, sugerindo que esta pode ter um papel na via de transdução de sinal no parasita após a exposição à droga, conferindo resistência.

Dados da literatura mostraram que transportadores intracelulares estão implicados na resistência a drogas. O transportador ABC em *Leishmania*, PGPA (resistente a arsenato e antimoniais) tem sido localizado em organelas intracelulares (Legare *et al.*, 2001). Dois transportadores ABC em *Plasmodium falciparum*, PfMDR1 (resistente a cloroquina) e PFGCN20, tem sido localizado no vacúolo digestivo do *Plasmodium* (Cowman *et al.*, 1991) e associado a estruturas de membrana em hemácias do hospedeiro (Legare *et al.*, 2001), respectivamente. Interessantemente, o aumento do número de cópias do PfMDR1 confere sensibilidade a cloroquina, mas aumenta a resistência para a mefloquina (Reed *et al.*, 2000). Em *Leishmania*, Dodge e colaboradores (2004) mostraram que a proteína 1 está localizada na via secretora de parasitas resistentes.

1.8 Expressão diferencial dos genes do *T. cruzi*

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 de investigar a presença de outros genes que pudessem estar associados com o fenótipo de resistência ou susceptibilidade a drogas. Diante disso, 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 Representação da Expressão Diferencial (RDE) (Murta *et al.*, 2001b).

A metodologia RDE (Krieger & Goldenberg, 1998), foi descrita para a análise de genes diferencialmente expressos. Esta metodologia se baseia na hibridização subtrativa de moléculas de cDNA, seguida da amplificação seletiva por PCR das moléculas provenientes dos mRNAs diferencialmente expressos. Os autores utilizando esta técnica, isolaram vários clones de genes diferencialmente expressos durante a metaciclogênese. Eles observaram que alguns genes são expressos transientemente, enquanto outros estão presentes em células em diferenciação e em tripomastigotas metacíclicos (Krieger *et al.*, 1999).

Ávila e colaboradores (2001) conseguiram isolar genes expressos em diferentes estágios da metaciclogênese do *T. cruzi*, através da metodologia RDE. Os autores isolaram e caracterizaram o gene da metaciclogenina, cujo mRNA está especificamente associado com os polissomas de epimastigotas, permitindo a diferenciação para tripomastigotas metacíclicos. Yamada-Ogatta e colaboradores (2004), utilizando a RDE, clonaram e caracterizaram dois genes que são mais regulados em tripomastigotas metacíclicos: metaciclogenina-II e III. Os autores observaram que o mRNA e a proteína desses genes estão expressos nos tripomastigotas metacíclicos, mas não em epimastigotas.

Murta e colaboradores (2001b), utilizaram a RDE descrita por Krieger & Goldenberg (1998). Inicialmente, foi acoplado um adaptador em populações de cDNAs provenientes dos parasitas resistentes (17LER, BZR e clo16R). Para obter um enriquecimento quantitativo e qualitativo de moléculas específicas, os cDNAs dos parasitas resistentes foram hibridizados com um excesso molar (80x) de moléculas de cDNA dos parasitas sensíveis (17WTS, BZS e clo16S). Após a hibridização, as moléculas foram amplificadas por PCR usando iniciadores complementares aos adaptadores adicionados aos cDNAs dos parasitas resistentes. As moléculas de cDNA dos parasitas resistentes, foram exponencialmente amplificadas. Os cDNAs comuns à população sensível e resistente foram linearmente amplificados, enquanto que os cDNAs da população sensível não foram amplificados, uma vez que elas não apresentam adaptadores. Depois de um ciclo de hibridização e amplificação por PCR das seqüências selecionadas, a

população foi altamente enriquecida com seqüências de DNA específicas da população resistente. Os cDNAs das populações resistentes não hibridizadas, foram posteriormente amplificados por PCR, clonados e sequenciados. Foram obtidos 74 clones: 22 do par 17LER-17WTS; 28 do par BZR-BZS e 24 do par clo16R-clo4S. A análise das 74 seqüências nucleotídicas mostrou que 27 seqüências formaram 8 contigs e 47 foram únicas, totalizando 55 seqüências. Análise de homologia destas 55 seqüências em banco de dados mostrou que 5 apresentaram homologia com genes de *T. cruzi*, 6 com genes de outros organismos e 44 não apresentaram de homologia significativa (Murta *et al.*, 2001b). Portanto, Murta e colaboradores em nosso laboratório, pela metodologia de RDE, conseguiram selecionar 55 fragmentos de genes candidatos a estarem relacionados com o fenótipo de resistência ou susceptibilidade do *T. cruzi* ao BZ.

Neste projeto selecionamos um gene superexpresso nos parasitas resistentes ao BZ, para investigarmos o possível papel biológico desempenhado por esse gene no fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas. Este gene apresentou homologia significativa com a seqüência da enzima superóxido dismutase (SOD) do *T. cruzi*, depositada em bancos de dados (GenBank, número de acesso: U90722).

1.9- O metabolismo oxidativo, a defesa antioxidante do *T. cruzi* e a enzima Superóxido Dismutase

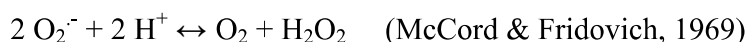
A maioria dos protozoários parasitas são organismos aeróbicos e vivem em ambientes oxigenados. O metabolismo aeróbico utiliza oxigênio molecular comoceptor de elétrons, que é reduzido de quatro elétrons para duas moléculas de água. Entretanto, o oxigênio molecular pode ser parcialmente reduzido por espécies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

O ânion superóxido não é muito reativo por si, mas ele é um precursor de dois fortes oxidantes. O superóxido pode reagir com o óxido nítrico para produzir peroxinitrito, um agente gerado por macrófagos como a primeira linha de defesa durante a fagocitose. Adicionalmente, o ânion superóxido é um precursor do peróxido de hidrogênio e na presença de metais, as duas

espécies reativas de oxigênio são responsáveis pela formação de radicais hidroxila (Turrens, 2004).

Os radicais livres de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o ânion hidroxila) são produzidos como intermediários de muitos processos fisiológicos e principalmente quando os organismos são expostos a condições ambientais com compostos ativos (ozônio, óxido de enxofre, herbicidas, fumaça de cigarro, etc.), radiação e outros agentes estressantes. Em geral, enzimas antioxidantes são essenciais para a sobrevivência das células, promovendo a proteção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam danos oxidativos a estruturas celulares como a oxidação de muitas moléculas biológicas (DNA, RNA, proteínas e lipídeos de membrana). A oxidação de macromoléculas biológicas, se não reparadas, coloca o organismo sob risco e pode resultar no surgimento de várias doenças neurodegenerativas (Olanow, 1997), mutações, carcinogênese, apoptose (Jacobson, 1997), morte celular (Fleming *et al.*, 1982; Harman, 1982), entre outros (Goulielmos *et al.*, 2003).

A superóxido dismutase (SOD) pertence a um grupo de metaloenzima que tem sido isolada em diversos organismos (Bannister *et al.*, 1987; Ismail *et al.*, 1997). Esta enzima é um componente central de defesa antioxidante em eucariotos e procariotos (Fridovich, 1997; Temperton *et al.*, 1998) e possui a função de remover o excesso de ânion superóxido (O_2^-) via dismutação, para oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como mostra a reação:



A SOD pode ser classificada de acordo com o metal encontrado no seu sítio ativo: manganês (MnSOD), ferro (FeSOD), cobre/zinco (Cu/ZnSOD) e o tipo níquel (NiSOD) (Youn *et al.*, 1996; Goulielmos *et al.*, 2003). O metal funciona como um cofator necessário para a atividade da enzima. Na maioria dos organismos investigados, duas ou mais isoformas da SOD têm sido encontradas (Bannister *et al.*, 1987; Ismail *et al.*, 1997). A isoforma Cu/ZnSOD foi encontrada no citosol de todas as células eucarióticas, mas geralmente não é encontrada em células procarióticas, com poucas exceções (*Photobacter leiognathi*, *Pseudomonas diminuta*, *P. maltophilia*, *Caulobacter crescentous*, e várias espécies de *Brusella* e *Haemophilous*). Benov e Fridovich (1996) encontraram a Cu/ZnSOD no periplasma de *E. coli*, e mostraram que esta isoforma é comumente atribuída a bactérias gram-negativas. Além disso, a isoforma MnSOD ocorre em bactérias, cloroplastos de algumas plantas, algas eucarióticas, e em mitocôndrias. A enzima FeSOD foi encontrada em bactérias, algumas plantas superiores, algas procarióticas e em tripanosomatídeos (Kanematsu & Asada, 1979; Salin & Bridges, 1980; Le Trant *et al.*, 1983; Temperton *et al.*, 1998) e o novo tipo de NiSOD citoplasmática foi encontrada em bactérias

filamentosas gram-positivas, *Streptomyces* spp. (Leclere *et al.*, 1999; Goulielmos *et al.*, 2003). No entanto, estas isoformas da SOD não se diferenciam apenas pelo metal associado ao seu sítio ativo. Miller (2004) comparando a estrutura das enzimas FeSOD, MnSOD e Cu/ZnSOD mostrou que as isoformas FeSOD e MnSOD possuem monômeros de aproximadamente 200 aminoácidos e ocorrem como dímeros ou tetrâmeros. Enquanto que a Cu/ZnSOD apresenta monômeros de aproximadamente 150 aminoácidos e ocorre como dímeros. A estrutura da NiSOD está sendo estudada e ainda não foi publicada. A comparação da sequência de aminoácidos e estudos de difração de raio-X têm sugerido que a FeSOD e a MnSOD possuem alta homologia e são estruturalmente e evolucionariamente distintas da Cu/ZnSOD (Parker & Blake, 1988; Paramchuk *et al.*, 1997). Além disso, apesar de apresentarem similaridades, a FeSOD e a MnSOD possuem diferenças cruciais no mecanismo e regulação da reação de dismutação, devido as diferenças entre $\text{Fe}^{3+/2+}$ e $\text{Mn}^{3+/2+}$ (Miller, 2004).

Uma maneira de diferenciar as isoformas da SOD pode ser feita pelo teste de atividade enzimática utilizando diferentes inibidores. Sabe-se que a Cu/ZnSOD é sensível a cianeto e peróxido de hidrogênio, a FeSOD é insensível ao cianeto, mas sensível ao peróxido de hidrogênio e que a MnSOD é insensível ao cianeto e ao peróxido de hidrogênio (Bannister *et al.*, 1987; Kabiri & Steverding, 2001). Dessa forma, vários autores têm identificado o tipo de SOD presente nos organismos baseado no seu inibidor.

As SODs encontradas em protozoários parasitas tem a função de protegê-los do ataque de células hospedeiras pela ação de ambos agentes oxidantes e antiinflamatórios (Paramchuk *et al.*, 1997), podendo conferir capacidades imunológicas (Pérez-Fuentes *et al.*, 2003). Em geral, todos os protozoários parasitas estudados atualmente apresentaram apenas a isoforma FeSOD (Le Trant *et al.*, 1983; Paramchuk *et al.*, 1997; Kabiri & Steverding, 2001; Quesada *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2004).

Meshnick e Eaton (1981) encontraram pela primeira vez em *Leishmania* a atividade enzimática da superóxido dismutase sensível à inibição por peróxido de hidrogênio, propriedade que sugere a presença da FeSOD. Em 1983, Le Trant e colaboradores detectaram a FeSOD em *Crithidia fasciculata* e compararam com a SOD de outros tripanosomatídeos. Desde a descoberta da isoforma FeSOD nos protozoários parasitas e a diferença encontrada com a SOD dos hospedeiros vertebrados, não apenas na estrutura mas também no inibidor, a SOD tem sido apontada como um potencial alvo quimioterapêutico (Kabiri & Steverding, 2001; Marin *et al.*, 2004). Adicionalmente, em alguns protozoários parasitas, tem sido demonstrado que algumas proteínas envolvidas no ataque oxidativo (SODs) são altamente imunogênicas, levantando a

possibilidade de utilizá-las no diagnóstico de doenças (Pérez-Fuentes *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2004).

Algumas drogas podem aumentar o estresse oxidativo nos parasitas. Drogas anti-tripanosomicidas normalmente usadas, como o NFX (Docampo & Moreno, 1984), produzem a formação de radicais livre de oxigênio que podem desencadear a morte do parasita. O *T. cruzi* apresenta um mecanismo de detoxificação diferente daquele encontrado no hospedeiro vertebrado, uma vez que este parasita apesar de possuir a SOD não apresenta as enzimas glutathione peroxidase e catalase, responsáveis pela detoxificação do peróxido de hidrogênio (Turrens, 2004).

Em células de mamíferos, o estresse oxidativo é prevenido por quatro enzimas antioxidantes: Cu/ZnSOD (Fridovich, 1995) responsável pela conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é encontrado no citoplasma e espaço intermembrana da mitocôndria; a MnSOD com a mesma função da Cu/ZnSOD, mas encontrada apenas na matriz mitocondrial; a glutathione peroxidase responsável pela redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos e a catalase, que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio para oxigênio e água (Chance *et al.*, 1979; Turrens, 2004).

Os protozoários parasitas apresentam diferenças em termos de defesa antioxidante, não apenas quando comparado com os hospedeiros mamíferos, mas entre si. Os tripanosomatídeos, bem como o *Plasmodium*, apresentam a isoforma FeSOD (Meshnick *et al.*, 1983; Becuwe *et al.*, 1996), normalmente encontrada em bactérias e ausente em outras células eucarióticas. A enzima catalase é ausente nos tripanosomatídeos (Boveris *et al.*, 1980) e no *Plasmodium*, mas é encontrada em *T. gondii* (Kwok *et al.*, 2004). Várias isoformas de glutathione peroxidase dependente de selênio (Se) têm sido detectadas em *Plasmodium* (Flohe *et al.*, 2003), mas ausente em todos os tripanosomatídeos (Boveris *et al.*, 1980; Flohe *et al.*, 2003). Tem sido detectada em tripanosomas Africanos e Americanos uma peroxidase independente de selênio. Esta forma de peroxidase dependente de glutathione pode metabolizar hidroperóxidos de ácidos graxos e fosfolipídeos, mas não reduz o peróxido de hidrogênio (Wilkinson *et al.*, 2000b; Wilkinson *et al.*, 2003).

Os membros da ordem Kinetoplastida apresentam um diferente sistema antioxidante dependente de “tiol” para eliminar o peróxido de hidrogênio. Todos os tripanosomatídeos sintetizam a enzima tripanotiona, um ditiol derivado da glutathione que tem sido proposta como um alvo para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de leishmanioses e tripanosomíases (Fairlamb & Cerami, 1992; Steenkamp, 2003; Turrens, 2004).

A enzima SOD participa do mecanismo de defesa antioxidante do *T. cruzi* (Temperton *et al.*, 1998). A partir da reação desencadeada pela FeSOD, que acarreta a produção de peróxido de hidrogênio, ocorrem duas reações não enzimáticas que são vitais para o processo antioxidante dos tripanosomatídeos. Em *T. cruzi*, a dehidroascorbato é produzida durante a redução do peróxido de hidrogênio catalizado pela enzima ascorbato peroxidase (Docampo *et al.*, 1976; Boveris *et al.*, 1980; Wilkinson *et al.*, 2000b), e a tripanotiona pode regenerar o ácido ascórbico. Adicionalmente, o mais importante sistema de detoxificação de peróxido, comum em todos os tripanosomatídeos, envolve uma enzima chamada triparedoxina peroxidase. Esta enzima é uma peroxiredoxina, uma família de proteínas contendo cisteína com massa molecular altamente preservada (cerca de 20-30kDa) (Rhee *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2002; Turrens, 2004). A tripanotiona redutase é responsável pela redução da triparedoxina oxidada em triparedoxina peroxidase, que atua metabolizando o peróxido de hidrogênio em água (Turrens, 2004).

Sabe-se que em tripanosomatídeos como o *T. cruzi*, a atividade da glutathione redutase não tem sido detectada e que a glutathione é mantida na forma reduzida por interação com a tripanotiona. Isto pode ocorrer não enzimaticamente ou via a atividade de uma tiol transferase (Moutiez *et al.*, 1995; 1997). Qualquer um dos dois mecanismos pode ocorrer, no qual a glutathione é reduzida no parasita pela dihidrotripanotiona e esta última mantém a glutathione dependente de peroxidase na sua forma ativa reduzida. Esta glutathione peroxidase pode metabolizar ácidos graxos e fosfolípidos, mas não peróxido de hidrogênio (Wilkinson *et al.*, 2000b).

Dessa forma, o parasita apresenta um mecanismo efetivo e complexo para lidar com o estresse oxidativo na ausência das enzimas catalase e glutathione redutase (Finzi *et al.*, 2004). A ação combinada das enzimas tripanotiona redutase, triparedoxina peroxidase e ascorbato peroxidase é responsável pelo metabolismo do peróxido de hidrogênio, como mostra a figura 2 (Turrens, 2004). A defesa antioxidante dos tripanosomatídeos é eficiente, permitindo manter baixas concentrações de hidroperóxidos.

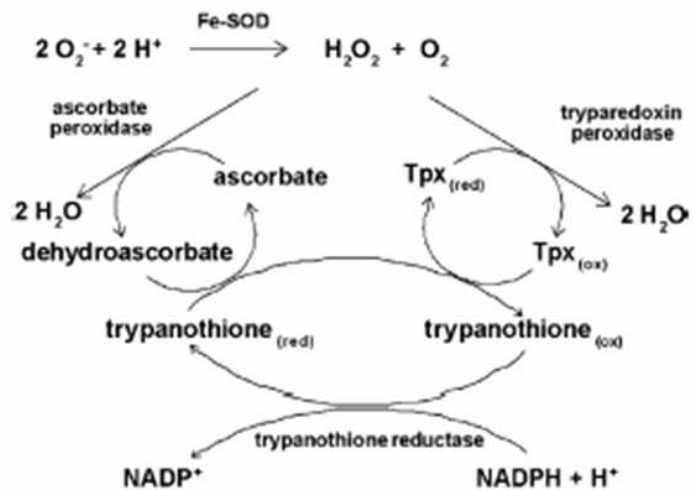


Figura 2: Metabolismo antioxidante dos tripanosomatídeos. Fonte: Turrens, 2004.

Finzi e colaboradores (2004) realizaram um estudo do envolvimento da enzima triparedoxina peroxidase em *T. cruzi* frente a uma injúria mediada por oxidantes. Eles observaram que em baixas concentrações de H_2O_2 ocorre a proliferação das células e o aumento da resistência do parasita a doses sub-letais de H_2O_2 (100 μ M), se previamente tratados com concentrações não tóxicas de H_2O_2 (20 μ M). Os autores mostraram também que o tratamento das células com diferentes concentrações de H_2O_2 induz um aumento dos níveis de triparedoxina peroxidase de maneira dose-dependente. Eles realizaram a superexpressão da enzima triparedoxina peroxidase em *T. cruzi*, mostrando um aumento no nível de mRNA (129%), sem o correspondente aumento na expressão da proteína, sugerindo que a regulação da expressão do gene ocorre em níveis pós-transcricionais. Os altos níveis de mRNA correlacionado com os níveis da proteína foram observados apenas em incubações com H_2O_2 por um longo período (1-2h), sugerindo que a tradução da proteína triparedoxina peroxidase ocorre de acordo com a necessidade do parasita.

A atividade da metaloenzima SOD tem sido detectada em *T. cruzi* (Boveris & Stoppani, 1977; Temperton *et al.*, 1998) e um gene homólogo a isoforma FeSOD foi isolado e caracterizado neste parasita (Temperton *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1997). A presença da FeSOD foi detectada em todos os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (Ismail *et al.*, 1997). O sítio ativo da FeSOD apresenta um simples íon Fe (ferro) coordenado em uma bipirâmide trigonal de três histidinas, um Asp⁻ (aspartato) e uma molécula de OH⁻/H₂O que é suportada por conservadas pontes de hidrogênio incluindo resíduos de Gln69 (glutamina) e Tyr34 (tirosina) (Miller, 2004).

A caracterização inicial do gene FeSOD da cepa Cl Brener de *T. cruzi* foi realizada por Temperton e colaboradores (1996). Eles mostraram que esse gene está presente em um baixo número de cópias no genoma do *T. cruzi*. Por análise de northern blot mostraram a presença de dois transcritos nos epimastigotas (1,2 e 1,9 Kb) e que o gene da FeSOD está localizado em dois cromossomos na cepa Cl Brener (460 e 1200 Kb).

Ismail e colaboradores (1997) com o objetivo de entender o papel estrutural e funcional da SOD na patogênese do *T. cruzi*, realizaram ensaios para caracterização da SOD. Por análises das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos do *T. cruzi* com as seqüências das SODs de outros organismos, os autores identificaram duas isoformas da FeSOD: FeSOD-A e FeSOD-B (GenBank, accession number: U90722 e U90723, respectivamente). A seqüência de nucleotídeos completa da FeSOD-A possui 825pb e 212 aminoácidos, enquanto que a seqüência completa da FeSOD-B apresenta 894pb e 196 aminoácidos. Comparando a seqüência de aminoácidos das

duas isoformas, foi visualizado apenas 41% de identidade entre a FeSOD-A e FeSOD-B. A isoforma FeSOD-A apresenta uma extensão de 31 aminoácidos na porção amino terminal, enquanto que a TcFeSOD-B é desprovida desta extensão. Diferente dos dados de Temperton e colaboradores (1996), os autores mostraram também que estas isoformas estão presentes no genoma do *T. cruzi* como múltiplas unidades repetitivas. Eles observaram a presença de um único transcrito (1,2Kb) para ambas isoformas. E que o gene FeSOD-B está superexpresso no estágio de epimastigota do *T. cruzi*; enquanto que o gene FeSOD-A é constitutivamente expresso em baixos níveis em todos os estágios de desenvolvimento do parasita. (Ismail *et al.*, 1997).

Um ensaio funcional da enzima FeSOD-B do *T. cruzi* em bactérias transformadas foi realizado por Ismail e colaboradores (1997), em gel desnaturante utilizando inibidores específicos para as isoformas da SOD. Eles observaram que a enzima FeSOD-B estava ativa e que apresentou sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, confirmando ser a isoforma FeSOD. Além disso, testaram os efeitos da enzima FeSOD-B em resposta ao paraquat e mostraram uma proteção das bactérias transformadas com essa isoforma contra a alta toxicidade do paraquat. O paraquat é um herbicida que age como um gerador intracelular de O_2^- , H_2O_2 e secundariamente radicais OH^- (Goldstein *et al.*, 2002). Dessa forma, a SOD protege o *T. cruzi* dos efeitos deletérios do ânion superóxido ou de seus derivados como radicais hidroxila ou peroxinitrito, permitindo o parasita sobreviver livremente ou no interior de fagócitos (Radie *et al.*, 1991; Ismail *et al.*, 1997).

Em *Trypanosoma brucei*, a atividade da SOD tem sido detectada nas formas tripomastigotas e a sua presença em outros estágios de desenvolvimento do parasita não é conhecida (Le Trant *et al.*, 1983). Kabiri e Steverding (2001) identificaram a FeSOD em *T. brucei* e mostraram que esta enzima é regulada durante o ciclo de vida do parasita. Análises das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos da SOD mostraram uma proteína com 198 resíduos de aminoácidos (22kDa) e uma alta homologia com a SOD de outros organismos. Eles visualizaram uma alta similaridade com a FeSOD de dois tripanosomatídeos, sendo 82% de identidade com a SOD do *T. cruzi* e 80% de identidade com a SOD de *Leishmania donovani*. Os resíduos de ligação do metal estão conservados na proteína do *T. brucei*.

Através do ensaio indireto de atividade enzimática da SOD, medido pela habilidade da SOD inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar, Kabiri e Steverding (2001) confirmaram que o *T. brucei* apresenta a isoforma FeSOD. A ocorrência da proteína SOD durante o ciclo de vida do parasita foi observada, apresentando duas proteínas (22 e 24kDa) nos lisados da forma procíclica do parasita, enquanto que nos outros estágios de desenvolvimento foi observada apenas

uma proteína SOD (22kDa). Durante a diferenciação das formas largas em procíclica a proteína de 24kDa foi visualizada, quando o nível da proteína de 22kDa começa a aumentar. Em relação ao nível de mRNA nas formas de desenvolvimento do parasita, os autores não observaram nenhuma diferença no nível de mRNA da SOD entre as formas largas e finas do parasita. Já na forma procíclica presente no inseto, o nível de mRNA da SOD foi menor.

A enzima SOD de *Leishmania donovani chagasi* também foi caracterizada (Ismail *et al.*, 1994). Os autores observaram a presença de um único transcrito de 1,4 Kb e levantaram a hipótese da presença de mais de um gene para a FeSOD no genoma do parasita. A enzima recombinante FeSOD também protegeu as bactérias *E. coli* transformadas contra a alta toxicidade do paraquat. Uma hibridização cruzada entre espécies mostrou que a FeSOD é altamente conservada no gênero *Leishmania*.

Paramchuk e colaboradores (1997) isolaram e caracterizaram em *Leishmania chagasi* as duas isoformas do gene FeSOD, a LcFeSOD-A e a LcFeSOD-B (GenBank, accession numbers AF003964 e AF003963, respectivamente). A LcFeSOD-A mostrou diferenças da LcFeSOD-B, apresentando apenas 37% de identidade na sequência de aminoácidos. A diferença na identidade pode ser explicada pela presença de uma extensão de 31 aminoácidos na porção amino terminal da LcFeSOD-A, que está ausente na LcFeSOD-B. Esta extensão de aminoácidos é hidrofóbica e apresenta homologia com um peptídeo transitório mitocondrial (Bowler *et al.*, 1989; Paramchuk *et al.*, 1997). Isto sugere que a LcFeSOD-A pode ser mitocondrial, enquanto que a LcFeSOD-B seja citoplasmática.

Ensaio de localização cromossômica e organização genômica do gene FeSOD em *L. chagasi* também foram realizados por Paramchuk e colaboradores (1997). Eles mostraram que a LcFeSOD-A está localizada em uma única banda cromossômica de 582 kb e que a LcFeSOD-B na banda de 920 kb. Os autores sugeriram que a LcFeSOD-A pode estar como uma única cópia no genoma do parasita, enquanto que a LcFeSOD-B pode estar presente em múltiplas cópias. Isto suporta a idéia em que o gene LcFeSOD-B é constitutivamente expresso, funcionando como um mecanismo de defesa inicial. Ao contrário, a isoforma LcFeSOD-A pode ser expressa sobre condições de estresse, uma vez que localiza-se em um cromossoma com baixo peso molecular e apresenta uma simples cópia. Os autores mostraram também que os níveis de mRNA das isoformas LcFeSOD-A e LcFeSOD-B foram 1,5 e 3 x maior, respectivamente, em promastigotas e amastigotas na fase logarítmica em relação à fase estacionária. Os níveis de mRNA de ambas isoformas da SOD também foram maiores no estágio de amastigota, em comparação com os promastigotas na fase estacionária. Foi encontrado um transcrito de 1,7 Kb para a LcFeSOD-A e

outro de 3,8 Kb para a LcFeSOD-B. Ensaios de atividade enzimática em gel desnaturante foram realizados por estes autores, confirmando o tipo da SOD, FeSOD. A expressão das isoformas da SOD em *E. coli*, que não apresenta esta enzima, protegeu as bactérias contra agentes geradores de radicais livres (como o paraquat) (Paramchuk *et al.*, 1997).

A enzima SOD tem sido detectada em vários outros organismos. Goscin e Fridovich (1972) isolaram em leveduras uma Cu/ZnSOD. Em 1975, Ravindranath e Fridovich isolaram e caracterizaram a MnSOD localizada na mitocôndria da levedura. Le Tant e colaboradores (1983) caracterizaram a FeSOD em *Crithidia fasciculata*, similar a isoforma da SOD encontrada nos outros tripanosomatídeos. Eles encontraram duas proteínas SOD em *C. fasciculata*, que apresentaram diferenças na composição de aminoácidos, o que indica a presença de isoformas diferentes.

Marín e colaboradores em 2004, isolaram e caracterizaram bioquimicamente a atividade de duas FeSOD (SODI e SODII) em um tripanosomatídeo parasita de planta, *Phytomonas*. Eles detectaram uma capacidade imunogênica da isoenzima FeSODII e a positividade do soro anti-SODII até altas diluições (1:40.000). Eles testaram a positividade do soro anti-SODII contra frações de antígenos obtidos de vários tripanosomatídeos. A reação mostrou reatividade positiva apenas com tripanosomatídeos isolados de plantas considerados do gênero *Phytomonas*, enquanto que nenhuma reação foi observada contra as frações antigênicas de outras espécies como *T. cruzi*, *L. donovani*, *Herpetomonas samuelpessoai*, *H. davidi*, *C. luciliae* e *Leptomonas collosoma*. Os autores detectaram que a FeSODII está localizada principalmente sobre toda a superfície do parasita, bem como no núcleo, glicossomos e membranas. Dessa forma, a FeSODII pode ser uma ferramenta molecular utilizada para o diagnóstico e identificação e como um potencial alvo para o desenho de drogas para controlar não apenas doenças causadas por espécies de *Phytomonas*, mas também para metabólitos similares de outros tripanosomatídeos de animais e humanos (Marín *et al.*, 2004).

Em bactérias estritamente anaeróbicas *Desulfovibrio gigas*, Dos Santos e colaboradores (2000) purificaram e caracterizaram a FeSOD. Eles observaram que a proteína FeSOD com peso molecular de 22 kDa, foi resistente à inativação térmica, sendo termoestável assim como a Cu/ZnSOD de *E. coli*. Mostraram também que o pH ideal para obter 80% ou mais de atividade enzimática da FeSOD foi de 3.0 a 9.0, sendo que a maioria das FeSODs conhecidas diminuem rapidamente sua atividade com o aumento do pH.

Cianobactérias fixadoras de nitrogênio *Anabaena* sp. pertencente a cepa PCC 7120 apresentam dois genes da SOD: *sodB* (codifica a FeSOD) e *sodA* (codifica a MnSOD) (Li *et al.*,

2002). Os autores observaram que a sodB durante a indução da diferenciação do heterocisto teve um aumento de 6 a 8 vezes, após a mudança da condição repleta de nitrogênio para a condição depletada de nitrogênio. No entanto, a quantidade da proteína FeSOD nos filamentos com heterocisto maduro foi a mesma que a dos filamentos que cresceram combinados com nitrogênio. Li e colaboradores (2002) mostraram que a quantidade de MnSOD não mudou durante a diferenciação do heterocisto. Dessa forma, as duas diferentes SODs encontradas em cianobactérias da espécie *Anabaena* possuem funções diferentes.

Ahmed e colaboradores em 2003, realizaram a purificação e a caracterização bioquímica da SOD e desenvolveram um microensaio de atividade enzimática em um parasita de ostra *Perkinsus marinus*. Os autores identificaram o tipo de SOD, através de ensaios de atividade que mediu a habilidade da SOD de inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar. Eles mostraram que toda atividade da SOD detectada no extrato celular foi do tipo Fe (ferro) e encontraram a FeSOD com massa molecular de 24 kDa neste parasita.

Recentemente, Tewari e colaboradores (2004) realizaram um estudo em plantas de milho, induzindo o estresse oxidativo na deficiência de nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio ou enxofre. Eles investigaram se ocorre alguma alteração no nível de peroxidação de lipídeos, peróxido de hidrogênio e de alguma importante resposta antioxidante enzimática. Os autores observaram que a atividade da SOD e da ascorbato peroxidase foi estimulada na deficiência de cada macronutriente. Enquanto a atividade da SOD aumenta nas plantas com deficiência de macronutrientes, ocorre a indução de novas isoformas da SOD particularmente efetivas na peroxidação de lipídeos. Aproximadamente 10 isoformas da SOD têm sido demonstradas em milho (Van Breusegem *et al.*, 1999), e 9 isoformas da SOD em plantas deficientes em fósforo e magnésio (Tewari *et al.*, 2004).

Temperton e colaboradores (1998) investigando o papel da SOD-B no *T. cruzi*, realizaram a transfecção de epimastigotas com um vetor de expressão contendo o gene FeSOD-B e obtiveram a superexpressão da atividade enzimática. Através de ensaios de Northern blot, eles identificaram um único transcrito de 1,2 Kb e um alto nível de mRNA nos parasitas transformados. A atividade enzimática foi aumentada de 5-8x nos parasitas transformados em comparação com os selvagens. A análise do fenótipo dos parasitas transformados mostrou que eles são mais sensíveis que as células controle ao benzonidazol e a violeta genciana. Esse resultado pode refletir em um desequilíbrio na defesa antioxidante do parasita desencadeado pela superexpressão da FeSOD (Temperton *et al.*, 1998).

Estudos com a transfecção do gene SOD têm sido realizados em diferentes organismos, conferindo resistência a drogas. Paramchuk e colaboradores (1997), testando o efeito da superexpressão das isoformas FeSOD-A e FeSOD-B em *L. chagasi*, tratados com quantidades diferentes de paraquat e de nitroprusside, observaram que os parasitas transfectados foram mais resistentes ao paraquat quando comparado com os parasitas selvagens. Isto sugere que a superexpressão da LcFeSOD-A ou LcFeSOD-B promove uma proteção de aproximadamente 80% em *L. chagasi*, quando os parasitas são expostos a espécies reativas de oxigênio (ROIs) produzidas pelo paraquat e pelo nitroprusside (geradores de intermediários reativos de oxigênio). Quando os parasitas transformados foram tratados com peróxido de hidrogênio, os autores não observaram proteção, sendo que os parasitas foram sensíveis a este agente. Os parasitas transformados com os genes LcFeSOD-A e LcFeSOD-B apresentaram níveis de mRNA maiores do que as células selvagens.

Em 2003, Ghosh e colaboradores investigaram o papel da SOD na sobrevivência de *Leishmania* spp. no interior de macrófagos. Parasitas na forma promastigotas de *L. tropica* foram transformados com uma construção no qual o gene SOD estava inserido no sentido antisenso no vetor de expressão. Os autores observaram a presença de duas ou três cópias do gene FeSOD por genoma haplóide dos parasitas transformados, enquanto que nos parasitas selvagens observaram cinco cópias do gene. Eles mostraram um transcrito de 1,2 Kb com nível de mRNA 3,5x menor nos parasitas transfectados, em comparação aos selvagens. Com relação à proteína, os autores não detectaram níveis significativos de expressão da proteína FeSOD em *L. tropica* transformada e a atividade enzimática foi reduzida (1/4). Os parasitas transformados foram mais sensíveis a agentes geradores de radicais livres e na deficiência da ação da FeSOD, os amastigotas tiveram uma redução no crescimento e na sobrevivência no interior do macrófago. Dessa forma, a enzima SOD é o maior determinante para a sobrevivência intracelular de *Leishmania* spp. (Ghosh *et al.*, 2003).

Foi observado em *E. coli* que a superexpressão da Cu/ZnSOD de *Drosophila* confere resistência ao paraquat (Goulielmos *et al.*, 2003). Esta resistência foi visualizada até uma determinada concentração da droga, se esta aumentar (>1.2mM) as células interrompem o seu crescimento indicando uma taxa mínima de sobrevivência, onde a Cu/ZnSOD não prepara as células para um mecanismo eficiente de detoxificação. Da mesma forma que foi observada por outros organismos, o aumento da ação da Cu/ZnSOD não está acompanhado pelo aumento paralelo das outras enzimas envolvidas no metabolismo do H₂O₂. Isso sugere que a enzima

Cu/ZnSOD possui importância para a resistência das células, mas na presença de quantidades limitadas de radicais livres (Goulielmos *et al.*, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

Nosso grupo vem trabalhando há alguns anos em projetos de pesquisa relacionados com a quimioterapia experimental da doença de Chagas. 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 NFX. Tem sido sugerido que a resistência natural do parasita a drogas pode ser um fator importante para explicar as baixas percentagens de cura detectadas em pacientes chagásicos. As alterações bioquímicas e o mecanismo molecular pelo qual os parasitas tornam-se resistentes ou susceptíveis a drogas, estão sendo estudados.

Em um estudo prévio realizado em nosso laboratório, Murta *et al* (2001a) investigaram o papel da fosfoglicoproteína de membrana (PGP) na resistência do *T. cruzi* a drogas. 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 parasita. Utilizando a técnica da representação da expressão diferencial (RDE), os autores obtiveram 55 fragmentos de genes candidatos a estarem associados com o fenótipo de susceptibilidade ou resistência ao BZ (Murta *et al.*, 2001b). Dentre os 55 genes selecionados, no presente trabalho caracterizamos o gene TcFeSOD-A que codifica a enzima Superóxido Dismutase-A, que foi mais expressa nos parasitas resistentes ao BZ.

A enzima superóxido dismutase (SOD) participa do mecanismo de defesa antioxidante do *T. cruzi* (Temperton *et al.*, 1998) e apresenta a função de remover o excesso de ânion superóxido (O_2^-) via dismutação, para oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A atividade da SOD

foi inicialmente detectada em *T. cruzi* por Boveris & Stoppani (1977). Posteriormente, esse gene foi clonado e caracterizado em *T. cruzi* (Temperton *et al.*, 1998) e foi encontrada a presença de duas isoformas dessa enzima, TcFeSOD-A e TcFeSOD-B no parasita (Ismail *et al.*, 1997). A presença da FeSOD foi detectada em todos os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (Ismail *et al.*, 1997). Entretanto o envolvimento dessa enzima no fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas ainda não foi descrito.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o gene da superóxido dismutase-A (TcFeSOD-A), em populações e clones de *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

3.1- Objetivos específicos

- Determinar o nível de mRNA do gene TcFeSOD-A em populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Determinar a organização genômica e o número de cópias desse gene.
- Verificar a localização desse gene nos cromossomas do *T. cruzi*
- Clonar, expressar e caracterizar a proteína recombinante TcFeSOD-A.
- Avaliar o nível de expressão dessa proteína em populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Determinar a atividade enzimática da SOD nas populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.
- Comparar as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene TcFeSOD-A das populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

4. METODOLOGIA

4.1- Cepas de *Trypanosoma cruzi*

As populações e clones do *T. cruzi* utilizadas neste estudo estão listadas na tabela 1, p. 59. Nós utilizamos uma população de *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol (BZR), seu par sensível (BZS), um par de clones dessas populações (clone 4S e clone 16R) (Murta & Romanha, 1998), e uma população 17LER com resistência induzida *in vitro* ao BZ, e seu par sensível 17WTS (Nirdé *et al.*, 1995), gentilmente cedidas pelo Dr. Philippe Nirdé (Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs- Montpellier/ France). Além disso, utilizamos 19 cepas do *T. cruzi*, sendo 5 naturalmente resistentes: Yuyu; Colombiana; SC-28; VL-10 e Noel (Filardi & Brener, 1987) e 14 sensíveis: Romano; JA; Cl Brener; RS-21; CA-I; Quaraizinho; Gilmar; Ernane; SMJ; MR; Luna; Buriti; Barra Seca e São Felipe.

4.2 Extração de RNA total

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

4.3- Extração de DNA

O sedimento de epimastigotas das populações sensíveis e resistentes foi ressuspensionado em tampão de extração contendo 50 mM de Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM de NaCl e 0,5% de SDS, pH 8,0 e incubado com 100 µg/ml de proteinase K por 12h a 37°C. Posteriormente, o DNA foi extraído com fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 1:1:24 e clorofórmio/álcool

isoamílico 1:24 e precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 100% e acetato de sódio 0,3 M a -20°C por 12h. O DNA foi então lavado 2X com etanol 70% e ressuspendido em 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM, pH 8,0). A concentração do DNA obtido foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, comparado com um padrão de DNA de concentração conhecida.

4.4- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para amplificação do fragmento do gene TcFeSOD-A utilizado para vários ensaios. Para o preparo das sondas e PCR de colônia utilizamos os seguintes iniciadores TcFeSOD-A F forward 5' GTTGAGACGTGCGGTGAATA 3' e TcFeSOD-A R reverse 5' CATCGTATGTTGTCCCTG 3'. Esses iniciadores foram desenhados a partir da sequência nucleotídica depositada no banco de dados (GenBank, accession number U90722). Cada reação continha tampão de reação (50mM KCl; e 10mM de Tris-HCl pH 8,5); 1,5 mM MgCl₂; dNTPs (200mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos); 10 pmoles de cada iniciador; enzima Taq DNA Polimerase; DNA de *T. cruzi* (1 ng/µl), em volume final de 10µl.

As reações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer ® utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial 95°C por 5 min; 30 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento 65 °C por 1 min e extensão 72°C por 1 min, e ao final dos 30 ciclos foi feita uma extensão final por 5 min a 72°C.

4.5- Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

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

4.6- Purificação do produto de PCR

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

4.7- RT-PCR quantitativo em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real foi utilizado para quantificar o nível de mRNA do gene TcFeSOD-A. Inicialmente foi realizado um RT-PCR utilizando a enzima transcriptase reversa e o oligonucleotídeo dT para converter os mRNAs em cDNA. Para a síntese da primeira fita de cDNA foi preparado um mix nas seguintes condições: 2 µg de RNA total, 0.5 µg de oligo d(T), 1X tampão RT, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 40 U RNase e 200 U de transcriptase reversa Superscript II, em um volume final de 20 µl. Todos os reagentes usados foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA). A reação do cDNA foi incubada a 42°C por 60 min. Após a síntese da primeira fita, a reação foi inativada a 70°C por 20 min, e o cDNA foi diluído 15X em água deionizada.

O cDNA foi submetido ao PCR em tempo real para amplificação e quantificação das seqüências do gene TcFeSOD-A. A amplificação foi realizada pelo Sistema de Detecção da Seqüência Gene-Amp 5700 (PE Applied Biosystems). Os iniciadores foram desenhados a partir da seqüência completa de nucleotídeos do gene TcFeSOD-A depositada no banco de dados (GenBank, accession number U90722): RT TcFeSOD-A1 forward 5' GTTGAGACGTGCGGTGAATA 3' e RT TcFeSOD-A2 reverse 5' GGC GGT TTT CAA AGT CCT TG 3'. O gene constitutivo hipoxantina guanina fosforibosil transferase do *T. cruzi* (TcHGPRT) foi usado para normalizar a quantidade de amostra analisada. O iniciador TcHGPRT1 forward: 5' CTACAAGGGAAAGGGTCTGC 3', e o iniciador TcHGPRT2 reverse: 5'ACCGTAGCCAATCACAAAGG 3', foram desenhados a partir da seqüência completa de nucleotídeos do gene (GenBank, accession number L07486).

As reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador, tampão 1X SYBR GREEN (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 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 20 µl. O corante SYBR GREEN intercala na fita dupla de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. Os componentes da reação foram homogeneizados e os 20 µl foram adicionados em cada poço da placa. Após aplicar as amostras, a placa foi vedada com um selante e embrulhada em papel alumínio até ser colocada no equipamento.

O programa de amplificação foi realizado nas seguintes etapas: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, e o anelamento/extensão a 60°C por 1 min. Curvas padrão foram utilizadas para cada experimento utilizando quantidades conhecidas dos plasmídeos TOPO PCR 2.1 (Invitrogen) contendo os genes clonados TcFeSOD-A (10^5 a 10^9 moléculas) e TcHGPR1 (10^4 a 10^8 moléculas).

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

4.8- Análise de Northern blot

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

4.9- Southern Blot

A análise da organização e estimativa do número de cópias do gene da TcFeSOD-A no genoma de *T. cruzi* foi feita através da análise do perfil de restrição gerado por diferentes endonucleases. Aproximadamente 10 µg de DNA total das diferentes cepas de *T. cruzi* foi digerido com as enzimas de restrição *Ava*I e *Xba*I (INVITROGEN). A digestão foi realizada a 37°C durante 16h. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e

posteriormente corados com brometo de etídio (0.5 µg/ml). O gel foi fotografado no aparelho EAGLE EYE (STRATAGENE) e transferido para membrana de náilon (Hybond- Amersham Biosciences) em tampão SSC 10X concentrado. A membrana foi hibridizada com a sonda marcada com ^{32}P correspondente ao gene TcFeSOD-A.

4.10- Sondas e Ensaios de Hibridização

As sondas utilizadas nos ensaios de Southern e Northern blot foram preparadas a partir da amplificação por PCR do DNA da cepa 17LER de *T. cruzi* com os iniciadores específicos para o gene TcFeSOD-A. Depois da amplificação, os produtos da PCR foram precipitados, purificados e marcados com [^{32}P] dCTP conforme protocolo descrito por Feingberg & Vogelstein (1983). A pré-hibridização das membranas foram feitas em 15 ml da solução G (1% BSA, 500 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA e 7% SDS) (Church & Gilbert, 1984) durante 2h a 50°C. Posteriormente, a sonda desnaturada (95°C durante 5 min e logo após 5 min no gelo) foi adicionada à solução G e incubada durante 14h à 60°C para Northern blot e 65°C para Southern blot. Após a hibridização, as membranas foram lavadas 4 vezes com SSC 2 X (SSC 1X 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sódio) e 0,1% SDS a temperatura ambiente. Após a lavagem, as membranas foram expostas ao filme de raio X e incubadas a -70°C. Após três dias, os filmes de raio X (Kodak) foram revelados e fixados.

4.11- Eletroforese de pulso alternado – PFGE

Esta metodologia foi utilizada para localizar o gene TcFeSOD-A nos cromossomos do *T. cruzi*. Os parasitas ($\sim 2 \times 10^8$) foram lavados em solução salina 0,9% e ressuspensos em solução de PSG (130 mM NaCl, 142 mM Na_2HPO_4 , 8 mM NaH_2PO_4 e glicose 2%), para a preparação dos blocos (Dos Santos & Buck, 1999). Posteriormente, foi adicionado 1% de agarose de baixo ponto de fusão e a solução foi transferida para um molde de acrílico. Após a solidificação, os blocos foram incubados com a solução de lise (sarcosil 3%, 1 mg/ml Proteinase K e 500 mM EDTA pH8,0) por 48h a 50°C. Em seguida os blocos foram estocados em solução de EDTA 500 mM a 4°C até o uso. A eletroforese de pulso alternado foi realizada utilizando o aparelho “gene navigator™ system” (Amersham Biosciences). Os blocos contendo as amostras foram colocados nos poços do gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X. 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 (1 µg/ml), fotografado pelo programa EAGLE EYE (STRATAGENE) e tratado com tampões de desnaturação ácida, básica e neutralização. Posteriormente, os cromossomos foram transferidos do gel para a membrana de náilon e submetido aos ensaios de hibridização.

4.12- Preparação de bactérias eletrocompetentes

As bactérias da linhagem TOP 10F' foram preparadas para a transformação por eletroporação. Uma colônia de bactéria foi colocada em 50 ml de meio SOB por 12h a 37°C sob agitação. Desta cultura saturada, 300 µl de células foi incubado em 100 ml de meio SOB (sem magnésio), a 37°C sob agitação por 2 ou 3 horas. O crescimento das bactérias foi monitorado através de medidas espectrofotométricas, até ser atingido 0,7 (OD₆₀₀). Atingindo este crescimento as bactérias foram incubadas no gelo por 10 min e posteriormente centrifugadas a 4170 xg a 4°C por 10 min. O sedimento foi ressuscitado em 40 ml de glicerol 10% gelado e centrifugado a 4170 xg por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado e lavado novamente com glicerol 10% gelado, seguido de centrifugação por 15 min. O sedimento foi novamente ressuscitado em glicerol 10% no volume final de 160 µl. As células foram aliqüotadas (20 µl/tubo) e armazenadas a -70°C.

4.13- Clonagem e expressão da proteína recombinante

Para a clonagem do gene TcFeSOD-A em bactérias, inicialmente realizamos uma busca da sequência completa desse gene em banco de dados (GenBank, accession number U90722). Em seguida, desenhamos iniciadores específicos para a região codificante do gene: TcFeSOD-A1 forward 5' CGCGGATCCGATGTTGAGACGTGCGGTGAATATA 3' e TcFeSOD-A2 reverse 5' CGCAAGCTTTCAAGTAATCCGGCCGGCGGTTTT 3'. Na sequência dos iniciadores foram adicionadas sequências correspondentes ao sítio de reconhecimento das endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III (sublinhadas na sequência de nucleotídeos dos iniciadores). Neste estudo utilizamos o vetor de expressão pQE 31 (QIAGEN) que apresenta sítios de restrição para estas mesmas enzimas.

Inicialmente amplificamos por PCR a região codificante do gene TcFeSOD-A. Os produtos de PCR purificados (item 4.9) e o plasmídeo pQE31 (200 ng/µl) foram digeridos

com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III a 37 °C durante 12h. Após a digestão, as extremidades do vetor pQE foram desfosforiladas com a enzima fosfatase alcalina (CIAP-PROMEGA) a 37 °C por 1h. No final do processo a reação foi aquecida a 80°C por 15 min para inativação da enzima.

Para a purificação, os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. As bandas correspondentes ao produto de PCR e plasmídeo, na relação de quantidade 3:1, foram excisados do gel e purificadas em uma mesma coluna, de acordo com o protocolo do fabricante (Kit Qiaquick- QIAGEN). Após cortar a banda do gel, foi adicionado o tampão QG (1:5 v/v) e o tubo foi aquecido a 50°C para dissolver completamente a agarose. Em seguida, foi adicionado isopropanol para purificação do DNA, e todo volume foi colocado em uma coluna. Após centrifugação o DNA permaneceu ligado, e foi adicionado novamente o tampão QG para remover todo o resto da agarose. Para a lavagem, foi adicionado o tampão PE com etanol e a amostra foi centrifugada a 17.900 xg por 1 min. A eluição do DNA foi feita com 50 µl de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min, seguido da centrifugação da coluna.

O vetor pQE e o inserto foram submetidos à reação de ligação utilizando 3 unidades/µl da enzima T4 DNA ligase (PROMEGA), a 15°C durante 12h. O vetor contendo o inserto foi inserido em bactérias da linhagem TOP 10F' através da metodologia de eletroporação, que foi realizada da seguinte maneira: 3 µl da reação de ligação foi adicionada a 20 µl de bactérias eletro-competentes. A transformação foi realizada no aparelho eletroporador com voltagem de 4kΩ e 330 µF de capacitância (GIBCO BRL). Posteriormente, foi adicionado 1 ml de meio Luria-Bertani (LB) sem antibiótico e o tubo foi incubado a 37°C por 1h com agitação. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar com 100 µg/ml de ampicilina e incubadas a 37°C durante 12h. As colônias de bactérias foram submetidas a PCR com os iniciadores específicos para o gene da TcFeSOD-A, para a confirmação da clonagem. Após a confirmação, as bactérias foram crescidas sob agitação (Shaker – Forma Scientific) durante 14h em 5 ml de meio LB com 100 µg/ml de ampicilina. Posteriormente, uma alíquota de 400 µl foi criopreservada em glicerol 50% e o restante da cultura foi utilizada para purificação do plasmídeo utilizando o Kit mini-prep, de acordo com o protocolo do fabricante (QIAGEN). O sedimento de bactérias foi ressuspensionado em 250 µl de tampão de ressuspensão. Posteriormente, foi adicionado ao tubo 250 µl de tampão de lise e 350 µl de tampão de neutralização. A suspensão foi aplicada na coluna, centrifugada por 10 min e o eluato

descartado. A coluna foi lavada e o plasmídeo com o inserto foi eluído em 50 µl de água deionizada aquecida a 95°C por 2 min e por centrifugação da coluna.

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

Uma colônia de bactéria positiva para o gene TcFeSOD-A foi incubada em meio LB com 100 µg/ml de ampicilina (AMP) e 10 µg/ml de kanamicina (KANA), durante 14h a 37°C. Posteriormente, utilizamos 200 µl desse pré-inóculo para 100 ml de meio LB com os antibióticos. As bactérias foram incubadas a 37°C por 3h sob agitação. Quando as bactérias atingiram OD_{600nm} de 0,5 a 0,7, foi retirado 1 ml da amostra não induzida para análise em SDS-PAGE. Foi adicionado ao meio 5 mM IPTG para induzir a expressão da proteína. A amostra permaneceu incubada a 37°C por 4 horas sob agitação. Após a indução da expressão, foi coletado 1 ml da amostra induzida para análise em SDS-PAGE. O restante da amostra foi centrifugado a 4000 xg por 20 min, o sobrenadante descartado e o sedimento armazenado a -20°C para purificação da proteína recombinante.

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

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

separação, porém utilizando-se o tampão Tris-HCl pH 6,8 na concentração final de 0,5 M (Laemmli, 1970).

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

4.15- Teste de solubilidade da proteína recombinante TcFeSOD-A

Para determinar a solubilidade da proteína rTcFeSOD-A, as bactérias da cepa M15 contendo o gene TcFeSOD-A foram crescidas em meio LB com antibióticos (AMP e KANA) e IPTG e centrifugadas à 4000 xg por 20 min. O sedimento resultante foi ressuspendido em tampão de lise pH 8.0 contendo 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl e 8 M uréia. Em seguida a amostra foi congelada a -70°C durante 10 min. Após o descongelamento foi adicionada na amostra 1 mg/ml de lisozima e a mistura foi incubada no gelo por 30 min. Posteriormente, a amostra foi sonicada 3 x por 15 seg, com pausas de 15 seg no gelo e centrifugada a 10.000 xg a 4°C por 30 min. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado e o sedimento foi ressuspendido em tampão de lise, sonicado 3 x por 15 seg e centrifugado a 10.000 xg por 30 min. Este segundo sobrenadante foi transferido para outro tubo e ao sedimento restante foi adicionado 50 μ l de tampão de amostra 1X. Em cada uma dessas etapas foi retirado 50 μ l de amostra para análise em gel SDS-PAGE.

4.16- Purificação da proteína recombinante TcFeSOD-A

A purificação da proteína rTcFeSOD-A sob condições desnaturantes foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (Qiagen). A purificação foi realizada por

cromatografia de afinidade em coluna contendo uma resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni^{2+} - NTA) (Qiagen), que se associa à cauda de 6 histidinas presente na proteína recombinante rTcFeSOD-A. As bactérias induzidas com IPTG foram centrifugadas à 4000 xg por 20 min. O sedimento foi ressuspensionado em tampão de lise pH 8.0 (tampão B) contendo 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl e 8 M uréia. A partir do tampão B, foram preparados os tampões C, D e E, com diferentes pH: 6.3, 5.9 e 4.5, respectivamente. A lise das bactérias foi realizada a temperatura ambiente por 1 hora com agitação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000 xg por 20 min. O sobrenadante foi coletado e uma pequena fração (50 μl) retirada para análise em gel SDS-PAGE. Para cada 4 ml do sobrenadante foi adicionado 1 ml da resina 50% Ni-NTA (Qiagen). A mistura foi submetida à agitação a temperatura ambiente por 1h. Após ligação da proteína na resina, a mistura foi adicionada à coluna (BIORAD) para o empacotamento da resina. O eluato foi coletado para análise em gel SDS-PAGE. A resina foi lavada por 2 vezes com 4 ml de tampão C (pH 6.3), e suas frações foram coletadas. Em seguida, 500 μl do tampão D (pH 5.9) foi adicionado à resina por 4 vezes e suas frações foram coletadas. Posteriormente, a proteína foi eluída da resina com 200 μl de tampão E (pH 4.5) por 5 vezes e todas as frações foram coletadas. Uma alíquota de 20 μl de cada fração foi submetida à eletroforese SDS-PAGE.

4.17- Dosagem de proteínas

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

4.18- Obtenção de anticorpo policlonal anti-proteína rTcFeSOD-A

Para produção de soro policlonal específico, a proteína recombinante TcFeSOD-A foi inoculada em coelhos provenientes da fazenda da UFMG em Igarapé. Foram utilizados 6 coelhos com 3 meses de idade e pesando cerca de 2,5-3 Kg. Os coelhos receberam 3 inoculações subcutâneas nos dias 0, 7 e 21 da seguinte forma: coelho 1 e 2: 300 µg da proteína sem adjuvante; coelho 3 e 4: 300 µg da proteína com adjuvante de Freund (SIGMA); coelho 5: controle com adjuvante de Freund (SIGMA); coelho 6: controle com tampão E (usado na purificação da proteína rTcFeSOD-A). Antes das imunizações 1ml de sangue dos coelhos foi coletado para servir como controle pré-imune.

No primeiro dia de inoculação foi utilizado o adjuvante completo de Freund e nos dias subsequentes o adjuvante incompleto de Freund (SIGMA). O sangue foi coletado 15 e 30 dias após a última inoculação. Após coagulação, o sangue foi centrifugado a 4170 xg à 4°C por 5 min e o soro aliquotado e armazenado a -20°C.

4.19- Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA foi utilizado para analisar a reatividade e a titulação do anticorpo policlonal anti-rTcFeSOD do *T. cruzi* produzido em coelhos. Inicialmente foi feita a sensibilização da placa de 96 poços, adicionando como antígeno a proteína rTcFeSOD-A (1µg/poço). Para a adsorção dos antígenos, as proteínas foram diluídas em tampão carbonato pH 9.6 (35 mM NaHCO₃ e 15 mM Na₂CO₃) e incubados por 16h a 4°C. Em seguida os poços foram lavados com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) por 3 vezes e bloqueados com uma solução de leite desnatado 2,5% (p/v) em PBS-T por 1h a 37°C. Após o bloqueio, os poços foram lavados e incubados em duplicata com os soros dos coelhos anti-rTcFeSOD-A e anti-rTcOYE (controle positivo) diluídos 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600 em PBS-T por 1h a 37°C. Após a incubação com os soros, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T. Em seguida ela foi incubada com o conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (SIGMA), diluído 1:1500 em PBS-T por 1h a 37°C. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T. O revelador foi preparado no momento do uso, misturando o mesmo volume da solução A (0,1 M Glicina pH 6.4, 0,5 mg/ml ABTS (SIGMA)) com a solução B (tampão citrato pH 3.07, H₂O₂ 0,02%) e em seguida foi adicionado 100 µl/poço da solução reveladora na placa. A placa teve a reação quantificada em leitor de ELISA (BIO-RAD) a 405 nm e uma leitura diferencial de 450 nm.

4.20- Extração de proteínas totais do *T. cruzi*

As formas epimastigotas das cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foram cultivadas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e obtidas na fase exponencial de crescimento. Os parasitas foram lavados em PBS por 3 vezes e o sedimento congelado a -70°C. Posteriormente as massas de parasitas foram submetidas à extração de proteínas de acordo com protocolo descrito por Steindel *et al.* (1993). O sedimento de parasitas foi ressuspensionado no tampão de lise pH 8.0 contendo 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, detergente NONIDET P-40 (SIGMA) 1% e coquetel de inibidores de proteases (1000 µg/ml Leupeptina, 2 µg/ml aprotinina e 5 mM EDTA). Após incubação por 10 min no gelo, os parasitas foram lisados através de choque térmico (3 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio (N₂) líquido (-196°C) e banho à 37°C). Em seguida foram centrifugados a 350 xg por 10 min a 4°C e o sobrenadante com as proteínas totais foi dosado, aliquoteado e armazenado à -70°C.

4.21- Western blot

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

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

4.22- Análise Densitométrica

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

4.23- Ensaio de atividade enzimática da TcFeSOD do *T. cruzi*

A atividade enzimática da TcFeSOD nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ foi determinada indiretamente pela capacidade da enzima inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar (Ahmed *et al.*, 2003). O ensaio foi realizado em uma placa de 96 poços. O tampão de ensaio 0.05 M Tris-ácido cacodílico, pH 8.2 contendo 0.001 M de ácido dietilenotriamina pentaacético (DTPA) foi aerado por agitação durante 1h. A solução estoque de pirogalol 20 mM foi preparada em água. O oxigênio dissolvido nesta solução foi removido com o borbulhamento do nitrogênio puro, para evitar a oxidação do pirogalol. A solução do pirogalol foi mantida fechada com uma rolha de borracha a 4°C e uma alíquota retirada com uma seringa no momento do uso, tomando cuidado para não formar bolhas e permitir a entrada do oxigênio. Foi preparada uma solução estoque (20 µg/ml) da SOD bovina (SIGMA), utilizada como padrão. Esta solução foi submetida a diluições seriadas ao dobro em água até a concentração de 1,25 µg/ml. O volume de 50 µl (correspondente a 40 µg de proteína) de cada amostra foi aplicado em duplicata na placa de 96 poços. Os poços contendo 50 µl de água foram usados como controle. As populações e clones de *T. cruzi* usados para este ensaio foram: 17WTS, 17LER, BZS, BZR, Clone 4S, Clone 16R, VL-10, Colombiana, Noel, Buriti e Barra Seca. Foram utilizadas 50 µl de cada amostra do *T. cruzi* concentrada e diluídas 2x e 4x em PBS, aplicadas em duplicata na placa.

Imediatamente antes do ensaio, uma alíquota da solução estoque (20 mM) do pirogalol foi diluída 100X com o tampão de ensaio aerado e 150 µl por poço dessa solução (0.20 mM) foi adicionada com a pipeta multicanal. As placas foram mantidas à temperatura ambiente e submetidas à leitura no leitor de ELISA a 405 nm no tempo zero e após 90 min de reação. Os resultados foram calculados da seguinte forma: foi realizada uma média dos valores da absorbância de cada amostra, incluindo o padrão e o controle, no tempo zero e após 90 min de

reação. O valor da média da absorbância do branco no tempo de 90 min foi subtraído do valor da média da absorbância do branco no tempo zero, e o valor final obtido foi considerado como 100% de oxidação do pirogalol. Da mesma forma, foram subtraídos os valores de absorbância do padrão e das amostras no tempo de 90 min dos valores obtidos no tempo zero. Baseado no controle, o valor oxidado das amostras foi calculado e subtraído de 100 para encontrar a percentagem de inibição. Os valores apresentados na Tabela 3 mostram a média da absorbância, do desvio padrão e da percentagem de inibição da oxidação do pirogalol obtidos de dois experimentos independentes. Os mesmos cálculos foram realizados para as diluições 25 µl e 12,5 µl das amostras, que apresentaram resultados correspondentes com os valores de 50 µl de extrato protéico.

4.24- Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento do gene TcFeSOD-A das seguintes cepas do *T. cruzi*: 17WTS; 17LER; Clone 4S; Clone 16R; Yuyu; Barra Seca; Cl Brener; JA; VL-10 e São Felipe. O produto de PCR do gene TcFeSOD-A foi clonado em bactérias *E. coli* da cepa TOP 10F⁺ utilizando o plasmídeo TOPO. O DNA plasmidial de 5 ml de cultura de bactérias crescidas por 12h foi extraído através do Kit comercial de mini-prep (Qiagen). Foram seqüenciados 3 clones de cada amostra, sendo o sequenciamento repetido 3 vezes com cada primer (forward e reverse). Uma alíquota de 1 µl (50ng) de DNA foi usada na reação de sequenciamento com o Kit terminador ET DYEnamic (Amersham Bioscience), utilizando os iniciadores M13 forward 5' GTAAAACGACGGCCAG 3' e M13 reverse 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'. A reação foi realizada em uma placa de 96 poços da seguinte forma: 1 µl de DNA (100ng); 4 µl do Kit terminator ET DYEnamic; 1 µl de iniciador M13 forward ou reverse (3,3 pmoles) e 4 µl de água deionizada para completar um volume final de 10 µl. Esta reação de sequenciamento foi submetida à PCR, com temperatura inicial de desnaturação de 96°C, 25 ciclos de 15 seg a 92°C, 15 seg a 50°C e 1 min a 60°C. Após o PCR, foi realizada a precipitação das amostras para purificar o produto de PCR e obter melhor resolução no sequenciador.

As amostras foram analisadas no seqüenciador capilar MEGA BACE 400 (Amersham). Para evitar variabilidade da seqüência, 3 colônias de cada cepa de *T. cruzi* foram seqüenciadas 2 vezes com cada iniciador M13F e M13R. Os dados foram analisados usando os programas "Phred, Phrap e Consed". Apenas as seqüências com "Phred" > 20 foram utilizadas no

alinhamento. A sequência de nucleotídeos foi traduzida em sequência de aminoácidos usando o programa “Gene Tool”. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram alinhadas usando o software “Clustal X”.

5. RESULTADOS

5.1- Nível de mRNA do gene TcFeSOD-A em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

Com a finalidade de confirmar os níveis de expressão diferencial do gene TcFeSOD-A nas cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, analisamos o nível de mRNA desse gene através de ensaios de Northern blot. Para isto, os RNAs totais das populações 17WTS, 17LER, BZS e BZR do *T. cruzi* foram separados em gel de agarose, transferidos para membrana de náilon e hibridizados com a sonda específica do gene TcFeSOD-A marcada com ^{32}P .

O perfil de hibridização do gene TcFeSOD-A nas amostras de RNA total das cepas do *T. cruzi* revelou a presença de dois transcritos com tamanhos de 1,2 e 1,6 Kb (Figura 3A). Podemos observar uma diferença na intensidade de ambos os transcritos 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 3B), mostrando que a mesma quantidade de RNA total foi aplicado no gel. A Figura 3C representa um gráfico com os valores da análise densitométrica da intensidade das bandas, normalizado com os valores das bandas do gene RNA ribossomal, mostrando um aumento de 3 vezes no nível de mRNA dos dois transcritos da população resistente 17LER, em relação à população sensível 17WTS. Não foram detectadas diferenças significativas no nível dos dois transcritos das populações BZS/BZR.

A fim de complementar os dados obtidos pelo northern blot e analisar de forma quantitativa os níveis de mRNA do gene TcFeSOD-A entre as cepas e clones de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ, realizamos um PCR quantitativo em tempo real. A quantidade de RNA total nas diferentes amostras foi normalizada utilizando o gene TcHGPRT do parasita, que é constitutivo e apresenta apenas uma cópia por genoma do parasita. Inicialmente foi obtido uma curva padrão utilizando diluições do plasmídeo ao décimo (10^9 a 10^5 ; 10^8 a 10^4 cópias) contendo ambos genes clonados TcFeSOD-A e TcHGPRT, respectivamente (Figura 4 A1 e B1). Para ambos os genes, a intensidade de fluorescência de cada amostra, que é proporcional a quantidade de DNA, foi expresso pelo valor do ciclo do PCR tomado como base de análise o C_T (cycle threshold). Observamos que ambas as curvas apresentaram uma linearidade muito boa ($r^2 = 0.999$ para TcFeSOD-A e $r^2 = 0.9995$ para TcHGPRT) para uma ampla faixa de concentração de plasmídeos.

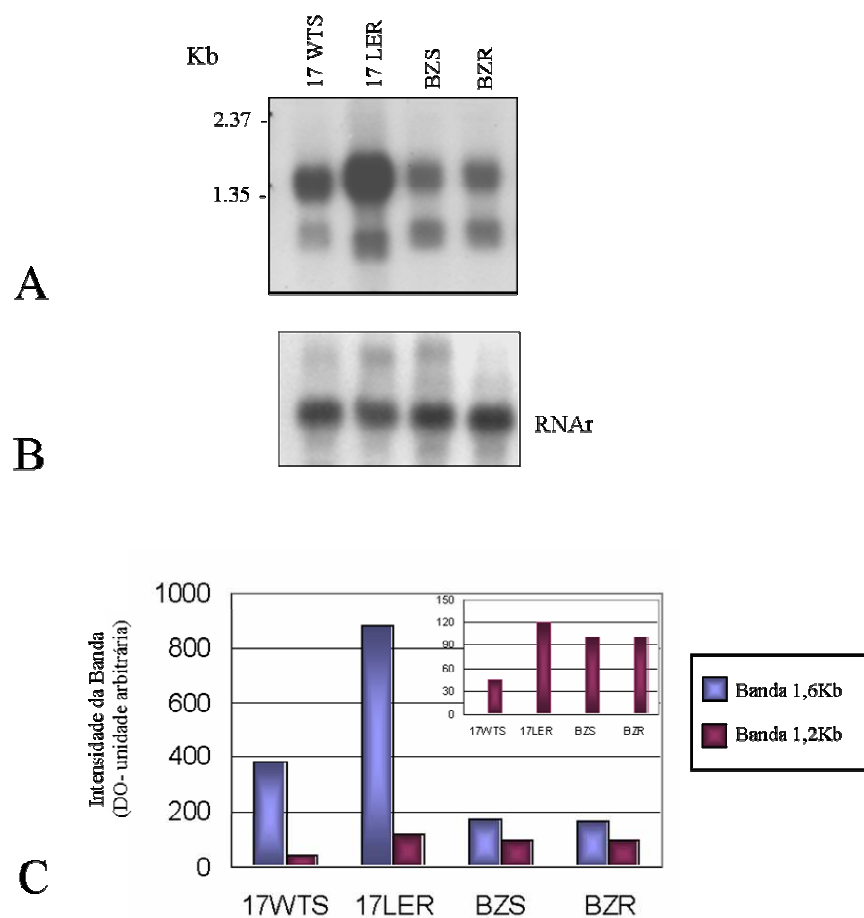


Figura 3: Nível de mRNA do gene TcFeSOD-A em populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. (A) Perfil do northern blot das cepas de *T. cruzi* hibridizadas com uma sonda específica do gene TcFeSOD-A marcada com ^{32}P . (B) Como controle quantitativo a mesma membrana foi marcada com uma sonda do gene do RNA ribossomal do *T. cruzi*. (C) Gráfico de densitometria das bandas correspondentes aos dois transcritos encontrados no northern blot. O gráfico menor representa a densitometria da banda de 1,2 Kb em uma escala menor, permitindo melhor visualização da diferença entre a intensidade da banda nas diferentes amostras. Os valores da intensidade das bandas foram normalizados com o gene do RNAr- RNA ribossomal. Para maiores detalher veja a Tabela 1.

O SYBR green I, utilizado para detecção das moléculas de DNA amplificadas na PCR, é um composto fluorescente que intercala em DNA dupla fita detectando não apenas alvos específicos, mas também produtos de PCR não específicos ou dímeros de iniciadores. O gráfico de dissociação para os produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes TcFeSOD-A e TcHGPRT, mostrou apenas um pico, demonstrando que somente um produto específico foi amplificado (Figura 4 A2 e B2).

A quantidade de moléculas de cDNA do TcFeSOD-A para as diferentes cepas de *T. cruzi* foi determinada por interpolação na curva padrão. Foram usados os valores de C_T obtidos pela curva padrão gerada com as quantidades conhecidas dos plasmídeos do TcFeSOD-A, normalizado com os valores de TcHGPRT. O gráfico (Fig.4C) mostra um aumento de 4 vezes no nível de mRNA do gene TcFeSOD-A na população 17LER, comparada com a 17WTS. Não foi observada diferença significativa no nível de mRNA do gene TcFeSOD-A nas populações BZS/BZR, nos clones 4S/16R e na população sensível Ernane comparada com a população naturalmente resistente Yuyu (Fig. 4C).

5.2- Organização genômica e número de cópias do gene TcFeSOD-A

A análise de Southern blot foi realizada para estimar o número de cópias do gene TcFeSOD-A, investigando se esse gene está amplificado no genoma da população de *T. cruzi* resistente ao BZ (17LER). O DNA genômico de 13 populações e clones do *T. cruzi* foi digerido com as endonucleases de restrição *AvaI* e *XbaI*.

O Southern blot utilizando *AvaI*, que apresenta somente um sítio de restrição na sequência do gene TcFeSOD-A, hibridizado com a sonda desse gene, revelou fragmentos de 1,2 e 5,4 Kb nas populações 17WTS e 17LER (Figura 5). Já nas populações BZS, BZR e clones 4S e 16R foram observados fragmentos de 0,98 e 1,26 Kb. Analisando as outras amostras do *T. cruzi*, observamos que o perfil de bandas 1,2 e 5,4 Kb foi específico para as cepas do zimodema 1 (*T. cruzi* I) e o perfil 0,98 e 1,26 Kb específico para cepas dos zimodemas Z2 e ZB (*T. cruzi* II) (Figura 5 e Tabela 1).

Quando a sonda TcFeSOD-A foi hibridizada com o DNA genômico digerido com *XbaI*, que não possui sítio de restrição na sequência do gene, observamos uma única banda de 9,4 Kb nas populações 17WTS e 17LER e nas cepas do zimodema 1 (Colombiana, Quaraizinho e SC-28) (Figura 6). Nas cepas do *T. cruzi* do zimodema 2 (BZS/BZR,

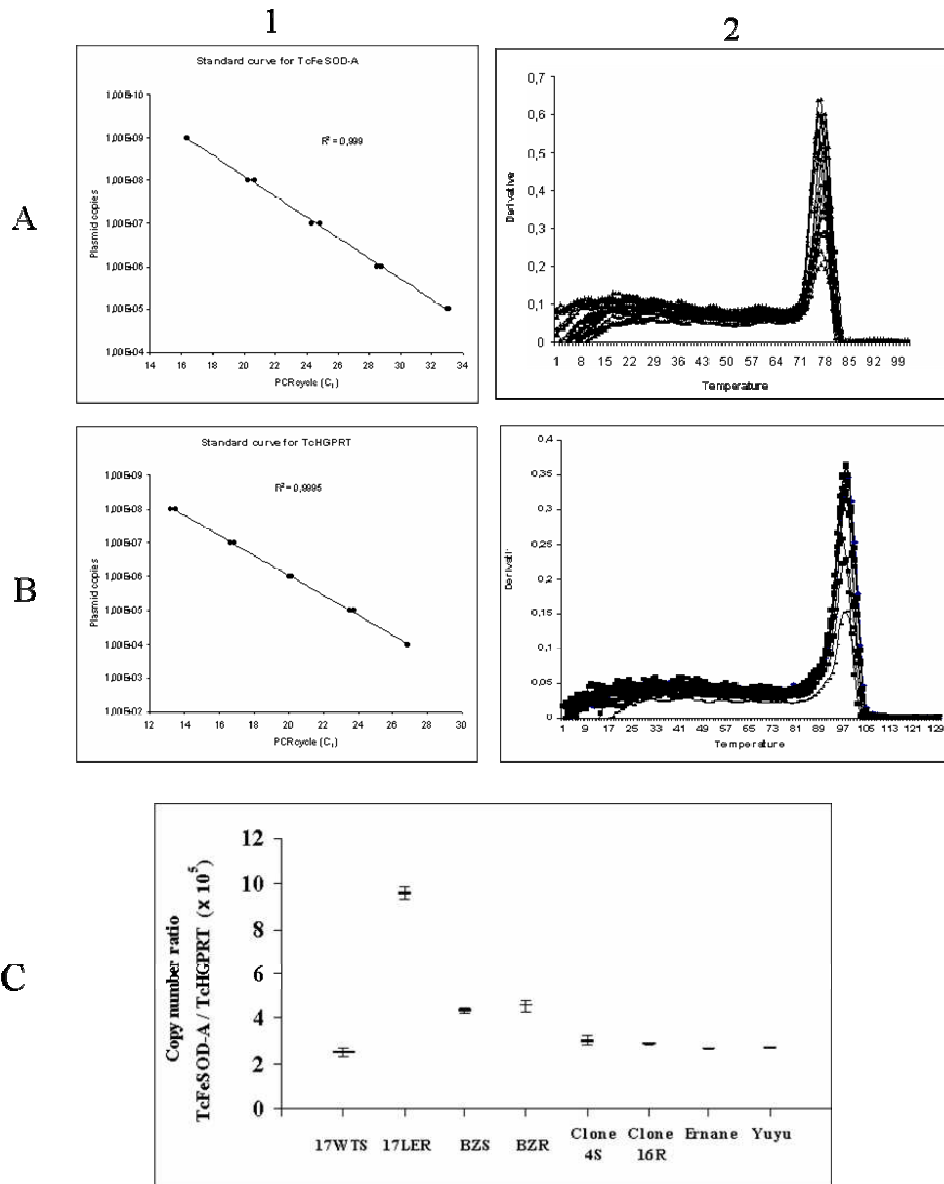


Figura 4: Amplificação dos genes TcFeSOD-A e TcHGPRT de *T. cruzi* por RT-PCR quantitativo em tempo real. Diluições seriadas dez vezes dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de cDNA do TcFeSOD-A (A1) e do TcHGPRT (B1) foram analisados por PCR em tempo real. Os gráficos mostram os valores de C_t obtidos para cada uma das diluições ($\pm DP$). Gráficos de dissociação mostram a especificidade da amplificação dos genes TcFeSOD-A (A2) e TcHGPRT (B2). (C) O gráfico mostra o número de cópias do gene TcFeSOD-A em populações do *T. cruzi* normalizadas com o TcHGPRT. Os dados do RT-PCR quantitativo em tempo real foram obtidos em duplicata de três experimentos independentes. A barra de erro é o desvio padrão da média ($\pm dpm$).

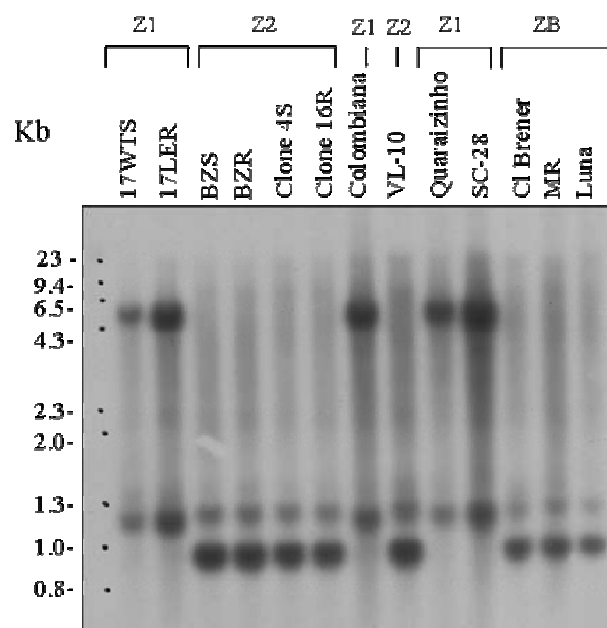


Figura 5: Southern blot do gene TcFeSOD-A de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. O DNA total de cada cepa foi digerido com *Ava*I e hibridizado com a sonda do gene TcFeSOD-A marcada com ^{32}P .

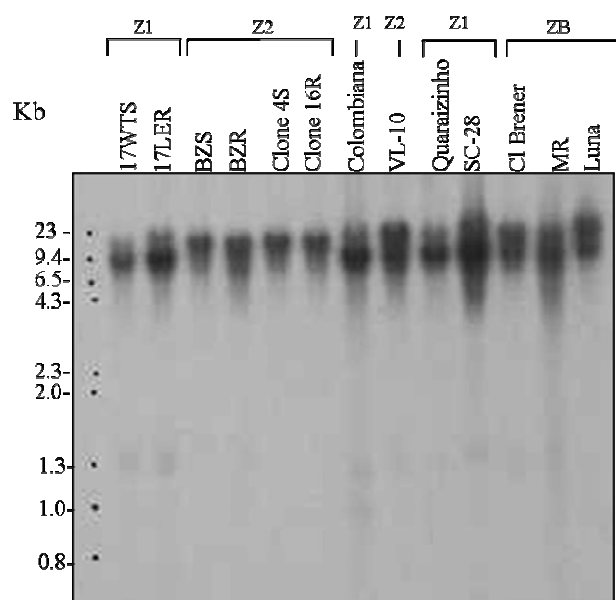


Figura 6: Southern blot do gene TcFeSOD-A de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. O DNA total de cada cepa foi digerido com *Xba*I e hibridizado com uma sonda da TcFeSOD-A marcada com ^{32}P .

clone4S/clone16R e VL-10) visualizamos uma banda de 14 Kb e nas cepas do zimodema B (Cl Brener, MR e Luna) observamos a presença de ambas bandas de 9,4 e 14 Kb. Observamos um polimorfismo na vizinhança do gene TcFeSOD-A que foi associado ao zimodema da cepa de *T. cruzi* e não com o fenótipo de resistência a drogas.

Nos perfis de Southern blot para ambas as enzimas *Ava*I e *Xba*I, pode ser visualizada uma diferença na intensidade das bandas entre as populações 17WTS e 17LER. A análise comparativa por densitometria mostrou que o gene TcFeSOD-A está duas vezes mais amplificado na população resistente 17LER do que na 17WTS, sugerindo um aumento no número de cópias desse gene no genoma da população 17LER. A mesma quantidade de DNA genômico foi utilizada para cada cepa. As outras cepas apresentaram a mesma intensidade de bandas independente do fenótipo de resistência a drogas.

5.3- Localização do gene TcFeSOD-A nos cromossomas do *T. cruzi*.

A fim de avaliar a distribuição cromossômica do gene TcFeSOD-A no genoma do parasita, os cromossomas das diferentes cepas foram separados por eletroforese de pulso alternado (PFGE). Os cromossomas foram transferidos do gel de agarose para a membrana de náilon, conforme descrito em Materiais e Métodos. A hibridização dos cromossomas com a sonda TcFeSOD-A, mostrou que este gene pode estar localizado em um ou dois cromossomas, dependendo da cepa do *T. cruzi*. Foi observada uma heterogeneidade em relação ao tamanho e ao número dos cromossomas do gene TcFeSOD-A entre as diferentes cepas do *T. cruzi*.

A Figura 7A mostra o perfil cromossômico das amostras de *T. cruzi* coradas com brometo de etídio. Observamos um perfil heterogêneo de bandas cromossômicas entre as diferentes cepas do parasita, variando de 0,6 a 1,9 Mb. A mesma quantidade de parasitas por bloco foi aplicada em cada canaleta do gel. A sonda do gene TcFeSOD-A reconheceu duas bandas cromossômicas de tamanhos 775 e 880 Kb nas populações 17WTS e 17LER (Figura 7B). Ambas as bandas são mais intensas na 17LER comparado com a 17WTS. A análise densitométrica das bandas hibridizadas com a sonda TcFeSOD-A, mostrou que essa diferença é duas vezes maior na população 17LER.

O gene TcFeSOD-A está presente no cromossoma de 810 Kb nas cepas do zimodema B (Romano, Cl Brener e JA) e em duas bandas cromossômicas de 970 e 1110 Kb nas cepas do zimodema 2 (BZS/BZR e clones 4S/16R). Enquanto que a cepa SMJ, pertencente ao Z2,

apresentou bandas com diferentes tamanhos (1107 e 1343 Kb). Com relação ao zimodema 1, foi possível observar bandas cromossômicas de diversos tamanhos (760Kb na cepa Yuyu; 919 e 1445Kb na cepa SC-28) mostrando um polimorfismo dependente da cepa (Figura 7B). De acordo com análises densitométricas, nenhuma diferença significativa na intensidade da banda foi observada entre as outras cepas sensíveis e resistentes.

De acordo com os nossos resultados, as 4 cepas do zimodema 1 apresentaram diferença na localização cromossômica do gene TcFeSOD-A. Diante disso, analisamos outras 5 cepas de *T. cruzi* do zimodema 1 (RS-21, CA-I, Quaraizinho, Gilmar e Colombiana) (Figura 8A). Também observamos uma grande variação no tamanho dos cromossomas do gene da TcFeSOD-A (Figura 8B e Tabela 1) que foi cepa específica. A Tabela 1 resume os resultados da localização cromossômica e o tamanho dos fragmentos de DNA genômico gerados pela digestão por *AvaI* do gene TcFeSOD-A. Análises densitométricas confirmaram o aumento de duas vezes na intensidade das bandas hibridizadas com a sonda TcFeSOD-A na população 17LER comparado com seu par sensível 17WTS. As outras cepas sensíveis e resistentes do *T. cruzi* pertencentes ao zimodema 1, apresentaram bandas com mesma intensidade. Observamos que as diferenças na localização cromossômica desse gene não estão associadas com o fenótipo de resistência ou susceptibilidade do *T. cruzi* a drogas.

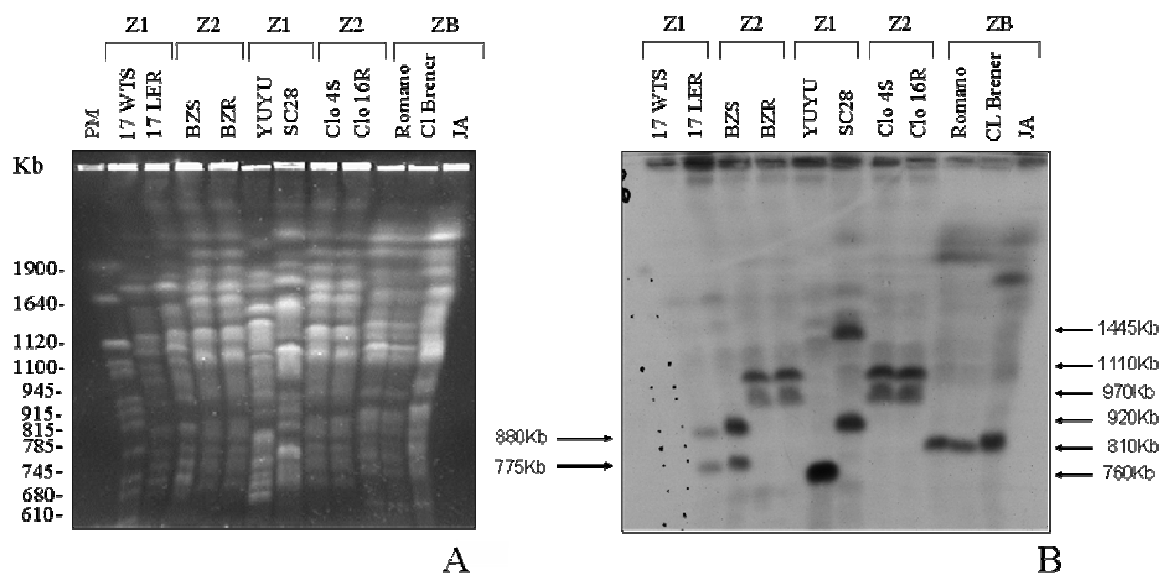


Figura 7: Localização cromossômica do gene *TcFeSOD-A* em populações do *T. cruzi* com diferentes zimodemas e resistência a droga. (A) Bandas cromossômicas do *T. cruzi* separadas por PFGE e coradas com brometo de etídio. (B) Southern blot dos pares de cromossomas do *T. cruzi* hibridizados com a sonda específica do gene *TcFeSOD-A* marcada com ³²P. Marcador de massa molecular corresponde aos cromossomas de *Saccharomyces cerevisiae*.

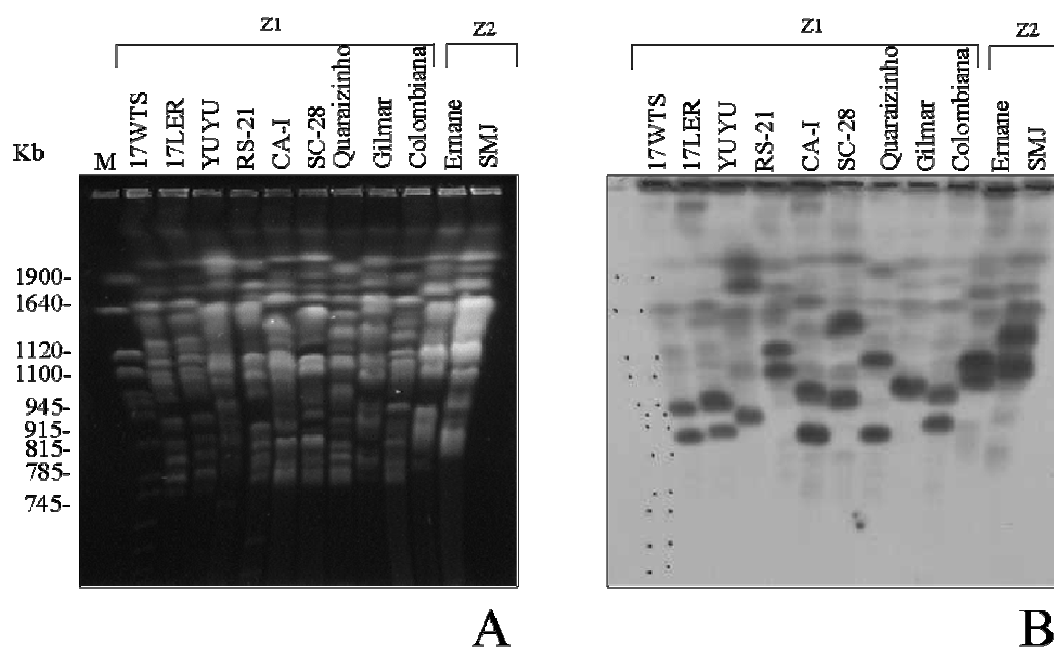


Figura 8: Localização cromossômica do gene TcFeSOD-A no genoma do *T. cruzi*, utilizando diferentes cepas do zimodema 1. (A) Bandas cromossômicas do *T. cruzi* separadas por PFGE e coradas com brometo de etídio. (B) Southern blot dos cromossomos do *T. cruzi* hibridizados com a sonda específica do gene TcFeSOD-A marcada com ³²P. O marcador de massa molecular são cromossomos de *Sacchromyces cerevisiae*.

Tabela 1

Populações e clones do *Trypanosoma cruzi* utilizadas neste trabalho, a localização cromossômica e o tamanho dos fragmentos de DNA genômico do gene TcFeSOD-A gerados por *AvaI*.

<i>T. cruzi</i>	Origem ¹	Hospedeiro	Sus. ²	Z. ³	TcFeSOD-A	
					Localização cromossômica (Kb)	Fragmentos de DNA genômico gerados por <i>AvaI</i> (Kb)
17 WT	Mex	Triatomíneo	S	1	775; 880	1,2; 5,4
17 LE	Mex	Triatomíneo	R	1	775; 880	1,2; 5,4
YUYU	Ba	<i>T. infestans</i>	R	1	760	ND
Colombiana	Col	Humano F.C.	R	1	840; 997	1,2; 5,4
SC-28	SC	<i>D. marsupialis</i>	R	1	919; 1445	ND
RS-21	RGS	<i>P. megistus</i>	S	1	1100; 1194	ND
CA-I	Arg	Humano F.C.	S	1	808; 1014	ND
Quaraizinho	RGS	<i>T. infestans</i>	S	1	965; 1117	1,2; 5,4
Gilmar	MG	Humano F.A.	S	1	1032	ND
Barra Seca	RGS	<i>T. infestans</i>	S	1	ND	ND
BZS	SP	Humano F.A.	S	2	970; 1110	0,98; 1,26
BZR	SP	Humano F.A.	R	2	970; 1110	0,98; 1,26
Clone 4S	SP	Humano F.A.	S	2	970; 1110	0,98; 1,26
Clone 16R	SP	Humano F.A.	R	2	970; 1110	0,98; 1,26
SMJ	Go	Humano F.C.	S	2	1107; 1343	ND
Ernane	Go	Humano F.C.	S	2	970; 1110	ND
VL-10	MG	Humano F.C.	R	2	ND	0,98; 1,26
Noel	MG	Humano F.A.	R	2	ND	ND
São Felipe	Ba	Humano F.C.	S	2	ND	ND
Cl Brener	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	810	1,0; 1,3
Romano	Arg	Humano F.A.	S	B	810	ND
MR	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	ND	1,0; 1,3
Luna	Arg	Humano F.A.	S	B	ND	1,0; 1,3
Buriti	RGS	<i>T. infestans</i>	S	B	ND	ND
JA	Go	Humano F.C.	S	B	810	ND

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

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

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

ND- não determinado

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

5.4- Clonagem e expressão da proteína recombinante TcFeSOD-A

Com o objetivo de estudar os níveis de expressão da proteína FeSOD-A nas cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas, clonamos e expressamos a proteína recombinante rTcFeSOD-A. O plasmídeo pQE foi digerido com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e submetido a uma reação de ligação ao produto de PCR do gene TcFeSOD-A. Após a ligação, o plasmídeo recombinante foi transferido para as células de *E. coli*, e a clonagem foi confirmada através do PCR de colônia conforme descrito em Materiais e Métodos. O PCR de colônia mostrou uma ótima eficiência da clonagem pela presença do fragmento de 635 pb, correspondente à sequência codificante do gene TcFeSOD-A, em todas as colônias de bactérias analisadas.

A expressão da proteína recombinante foi realizada em bactérias *E. coli* da cepa M15 por indução com IPTG. O IPTG é um análogo da lactose, que se liga à proteína repressora Lac. Essa proteína repressora Lac na ausência de lactose permanece ligada ao sítio do início da síntese de RNA, impedindo a transcrição do gene. Na presença do IPTG, esta proteína repressora se desliga e induz a transcrição e expressão da proteína recombinante. Após a indução das culturas transformadas, os extratos bacterianos foram preparados e submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (Figura 9). O perfil eletroforético dos extratos protéicos obtidos das bactérias induzidas com IPTG, apresentou uma banda com massa molecular de aproximadamente 24 kDa (canaletas 2, 4 e 6). Esta banda corresponde à proteína recombinante rTcFeSOD-A ligada a um peptídeo de 6 histidinas na sua porção amino-terminal, conferindo essa massa molecular. Por outro lado, a proteína recombinante não foi expressa nas bactérias na ausência de IPTG (canaletas 1, 3 e 5).

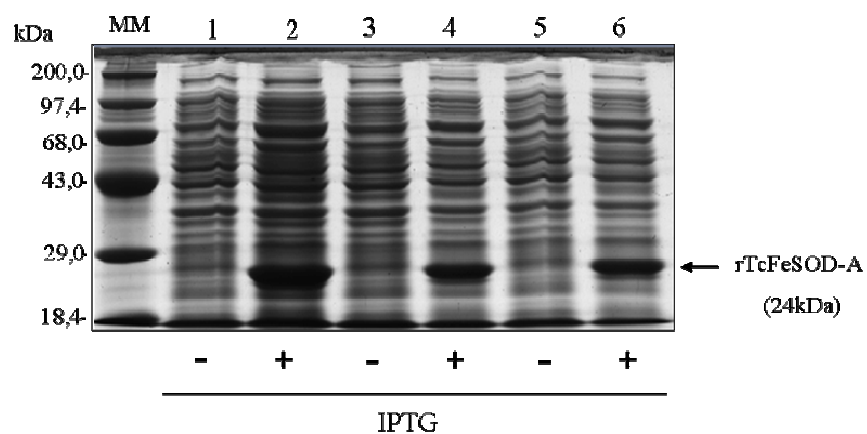


Figura 9: Indução com IPTG da expressão da proteína recombinante rTcFeSOD-A do *T. cruzi*, pelas bactérias *E. coli* M15 transformadas. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue. MM- Marcador de massa molecular.

5.4.1- Caracterização da proteína recombinante TcFeSOD-A.

5.4.1.1 – Teste de solubilidade da proteína rTcFeSOD-A.

Após obter a eficiente expressão da proteína recombinante, realizamos um ensaio para investigar a solubilidade da rTcFeSOD-A. Os procedimentos para a extração da proteína recombinante foram realizados como descrito em Materiais e Métodos. A parte solúvel (sobrenadante) e a insolúvel (sedimento) obtidas da amostra foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE (Figura 10). Observamos a presença da proteína recombinante rTcFeSOD-A (24 kDa) no sedimento (canaletas 1, 2 e 3, Fig. 10), mostrando que ela está insolúvel nas condições utilizadas na expressão, provavelmente sob a forma de corpos de inclusão. Na fração solúvel, visualizamos apenas as proteínas específicas das bactérias.

5.4.1.2- Purificação da proteína recombinante rTcFeSOD-A

A proteína recombinante rTcFeSOD-A está ligada a uma cauda com 6 histidinas. Dessa forma, a purificação da proteína foi realizada utilizando uma resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni^{2+} -NTA). Nos procedimentos de purificação a proteína foi eluída com os tampões contendo uréia, Tris e fosfato, com pHs decrescentes (8,0; 6,3; 5,9 e 4,5). As frações coletadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE (Figura 11). Foi observado na canaleta 1 a presença da proteína rTcFeSOD-A e das proteínas das bactérias antes da purificação. As canaletas 2 e 3, que correspondem às lavagens da resina, mostram apenas as proteínas bacterianas que não permaneceram associadas à resina por não apresentarem a cauda de histidina. Nas outras canaletas, foi possível visualizar a proteína recombinante, sendo que nas canaletas 6 a 9 observa-se uma banda forte da rTcFeSOD-A. Dessa forma, observamos que a proteína rTcFeSOD-A foi eluída da resina com eficiência no tampão com pH 4,5. A proteína recombinante TcFeSOD-A purificada foi quantificada pelo método de Bradford e apresentou uma concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A partir de 1,6 L de cultura de bactérias, conseguimos obter 15 mg (30 mL) de proteína recombinante purificada.

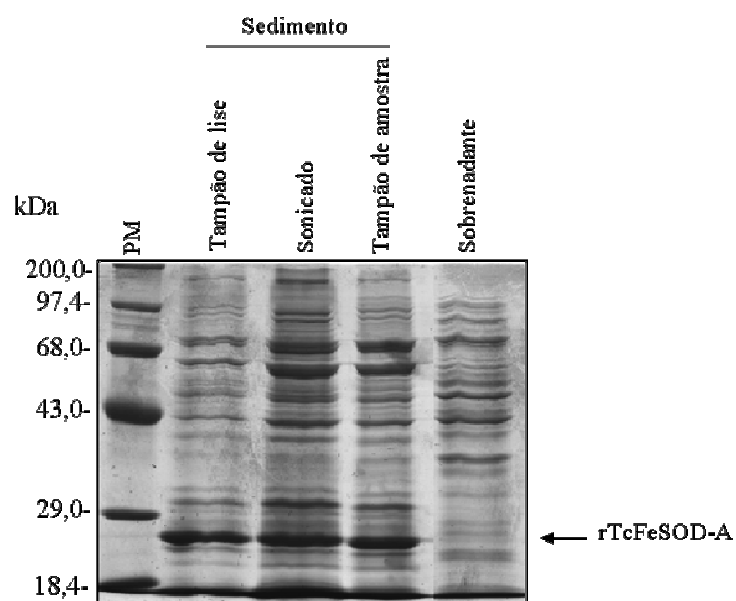


Figura 10: Teste de solubilidade da proteína recombinante rTcFeSOD-A do *T. cruzi*. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie blue. O sedimento de bactérias da cepa M15 foi ressuscitado com tampão de lise e sonicado para extração das proteínas (canaleta 1). Após centrifugação, o sobrenadante obtido deste sedimento foi coletado e as proteínas solúveis aplicadas no gel (canaleta 5). O sedimento foi ressuscitado em tampão de lise e sonicado novamente, para melhor extração das proteínas insolúveis (canaleta 2). Após centrifugação, o segundo sedimento foi ressuscitado com tampão de amostra (canaleta 3). MM- Marcadores de massa molecular.

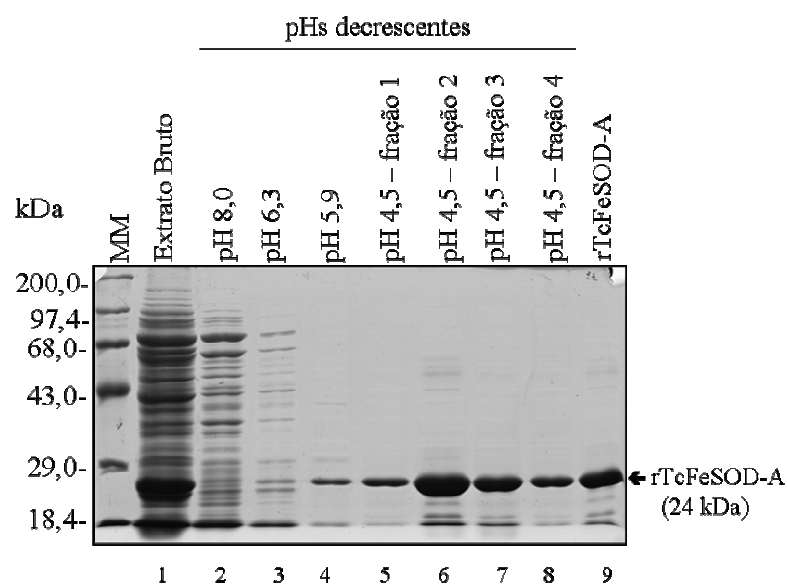


Figura 11: Purificação da proteína recombinante rTcFeSOD-A com uma cauda de 6 histidinas, expressa por bactérias da cepa *E. coli* M15. SDS-PAGE 12% corado por Coomassie blue. Foi usada uma resina de ácido nitrilotriacético com níquel (Ni^{2+} -NTA) e a proteína eluída com tampões de pHs decrescentes. A última canaleta do gel (rTcFeSOD-A) corresponde à mistura do eluído das frações 2, 3 e 4. MM- Marcador de massa molecular.

5.5- Nível de expressão da proteína rTcFeSOD-A em populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

5.5.1- Imunização de coelhos para a produção de anticorpo policlonal anti-rTcFeSOD-A e teste de ELISA

A proteína recombinante foi utilizada para as inoculações nos coelhos e conseqüente produção do anticorpo policlonal anti-rTcFeSOD-A, como descrito em Materiais e Métodos.

O anticorpo policlonal anti-rTcFeSOD-A produzido em coelhos foi submetido a ensaios de ELISA para testar sua reatividade. Foram utilizados os soros dos coelhos coletados aos 15 e 30 dias após a última inoculação. A Tabela 2 mostra os valores da absorbância obtidos por ELISA para a determinação dos níveis de anticorpos contra a proteína rTcFeSOD-A produzidos em coelhos. Esses valores são referentes à diluição do soro 1:200. Os coelhos imunizados com a proteína recombinante que tiveram os soros obtidos 15 dias após a última inoculação, não apresentaram diferenças na reatividade em relação à presença ou ausência do adjuvante. Os coelhos inoculados apenas com a proteína TcFeSOD-A apresentaram diferenças na absorbância, uma vez que durante a primeira inoculação parte da proteína foi perdida quando inoculada no coelho 2. Ao contrário, nos soros coletados dos coelhos 30 dias após a última inoculação, observamos uma maior reatividade nos coelhos desafiados com a proteína e o adjuvante (coelhos 3 e 4), quando comparados com os coelhos inoculados apenas com a proteína, sem o adjuvante (coelhos 1 e 2). Como esperado para os controles, os coelhos inoculados apenas com adjuvante (coelho 5) e somente com tampão (coelho 6) apresentaram baixos valores de absorbância. Para os ensaios de Western blot foi utilizado o soro do coelho inoculado com a proteína TcFeSOD-A e com adjuvante (coelho 4), obtido 15 dias após a última inoculação.

5.5.2- Western blot

A expressão da proteína rTcFeSOD-A nas diferentes cepas de *T. cruzi* foi analisada através de ensaios de Western blot. Extratos das proteínas totais das formas epimastigotas de diferentes populações do parasita foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE. A Figura 12A mostra o perfil das proteínas totais com massa molecular entre 10 e 100 kDa. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e esta incubada com anticorpo policlonal

Tabela 2

Determinação dos níveis de anticorpos contra a proteína rTcFeSOD-A produzidos em coelhos, pela técnica de ELISA. Os soros foram coletados aos 15 e 30 dias após a última inoculação e diluídos a 1:200.

Coelhos	Absorbância a 405nm		Desvio Padrão	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
A) Inoculados com proteína rTcFeSOD-A				
1	0.824	0.658	0,009	0,009
2	0.571	0.471	0,022	0,017
3 (+ adjuvante)	0.804	0.816	0,012	0,013
4 (+ adjuvante)	0.802	0.839	0,001	0,001
B) Inoculados sem proteína rTcFeSOD-A				
5	0.093	0.039	0,005	0,001
(somente com adjuvante)				
6	0.067	0.041	0,007	0,005
(somente com tampão)				

* Este experimento é representativo de dois outros experimentos independentes, que deram resultados semelhantes.

de coelho anti-rTcFeSOD-A. Observamos que o anticorpo reconheceu um polipeptídeo com o tamanho esperado (~23kDa) para todas as amostras do *T. cruzi* analisadas (Figuras 12B e 13A). A proteína recombinante rTcFeSOD-A purificada foi utilizada como controle positivo. Ela apresentou uma massa molecular de ~24kDa, cerca de 1kDa maior do que a nativa devido à presença da cauda de histidina.

O gel SDS-PAGE com as proteínas totais do *T. cruzi*, após a transferência para membrana foi corado por Coomassie blue e a membrana antes de ser tratada com os anticorpos foi corada com ponceau. Assim, foi possível visualizar a mesma intensidade das bandas protéicas, mostrando que a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel e transferida para a membrana.

A análise densitométrica mostra que a população 17LER expressa duas vezes mais proteína do que a 17WTS (Figura 12C e 13B). As outras populações de *T. cruzi* apresentaram o mesmo nível de expressão da proteína TcFeSOD-A, independente do fenótipo de resistência a drogas (Figuras 12C e 13B).

Com o objetivo de comprovar essa diferença de expressão da proteína TcFeSOD-A na população 17LER, realizamos diluições seriadas ao dobro (2, 4 e 8) de extratos protéicos de ambas populações 17WTS e 17LER (Figura 14). Após a incubação com o anticorpo anti-rTcFeSOD-A, observamos uma diferença de duas vezes na intensidade da banda entre as populações 17WTS e 17LER (Figuras 14B e 14C), confirmando o aumento da expressão da proteína TcFeSOD-A na população resistente (17LER).

5.6- Atividade enzimática da SOD nas populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

A fim de avaliar a atividade enzimática da SOD realizamos um ensaio indireto, que consiste em medir a habilidade desta enzima em inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar. Utilizamos populações do *T. cruzi* sensíveis, com resistência induzida *in vitro*, selecionada *in vivo* e cepas naturalmente resistentes ao BZ. A Tabela 3 mostra a atividade SOD de extratos proteicos brutos de populações e clones do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Observamos que o controle positivo, a enzima SOD bovina (3 unidades por poço) inibiu 100% da oxidação do pirogalol. No controle negativo, sem adição de enzima ou extrato, o pirogalol foi totalmente oxidado (0% de inibição). A atividade SOD das amostras de *T. cruzi* variou de 16 a 81% utilizando 50 µl (40 µg) de extrato proteico. A amostra 17LER apresentou uma atividade SOD de 81% e a 17WTS de 37%. As demais populações e clones sensíveis e

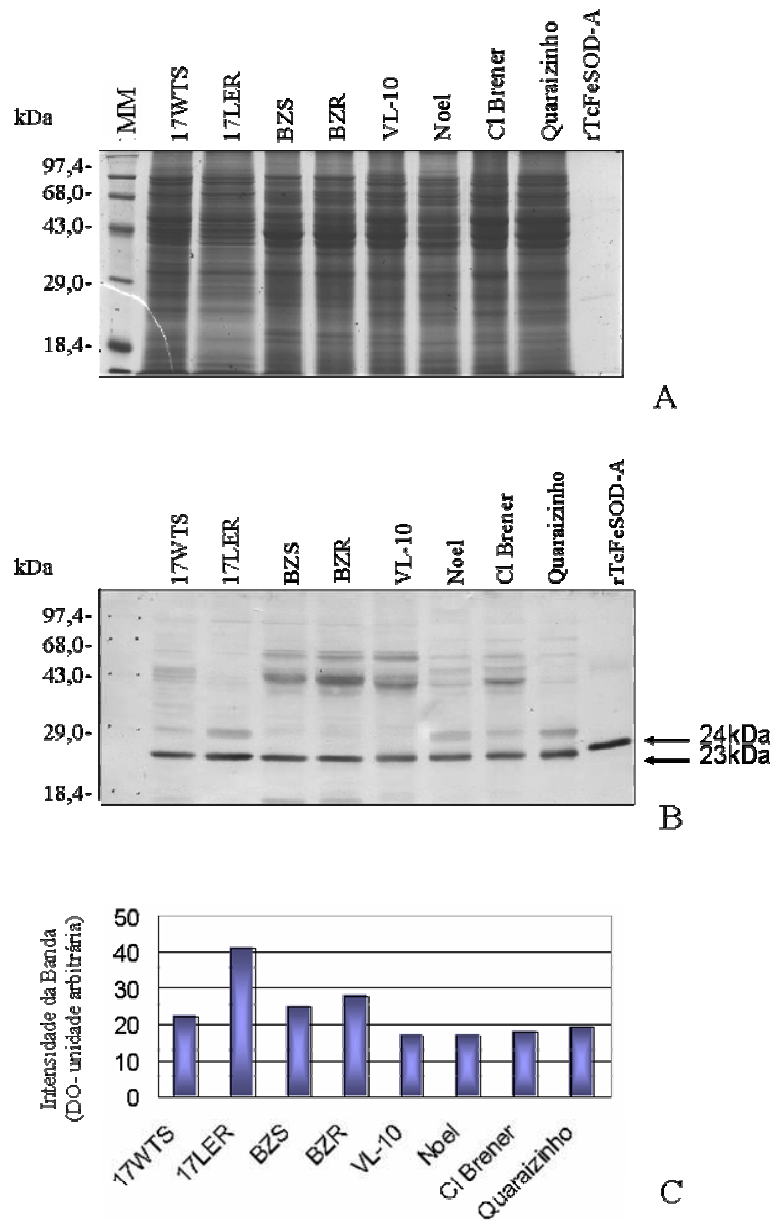


Figura 12: (A) Perfil eletroforético das proteínas totais de epimastigotas de populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. SDS-PAGE 12% corado por Coomassie blue; MM- Marcador de massa molecular; (B) Western blot usando o anticorpo policlonal de coelho contra a proteína recombinante rTcFeSOD-A; (C) Análise densitométrica da intensidade da banda da proteína TcFeSOD-A no ensaio de Western blot.

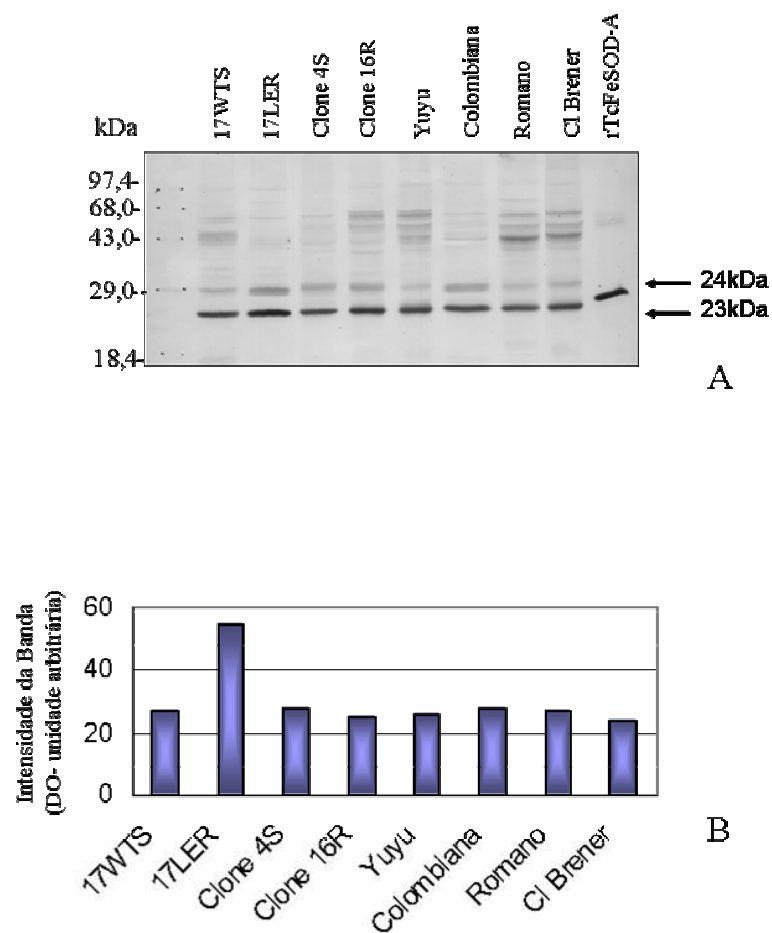


Figura 13: (A) Western blot usando o anticorpo policlonal contra a proteína recombinante rTcFeSOD-A; (B) Análise densitométrica da intensidade da banda da proteína TcFeSOD-A no ensaio de Western blot.

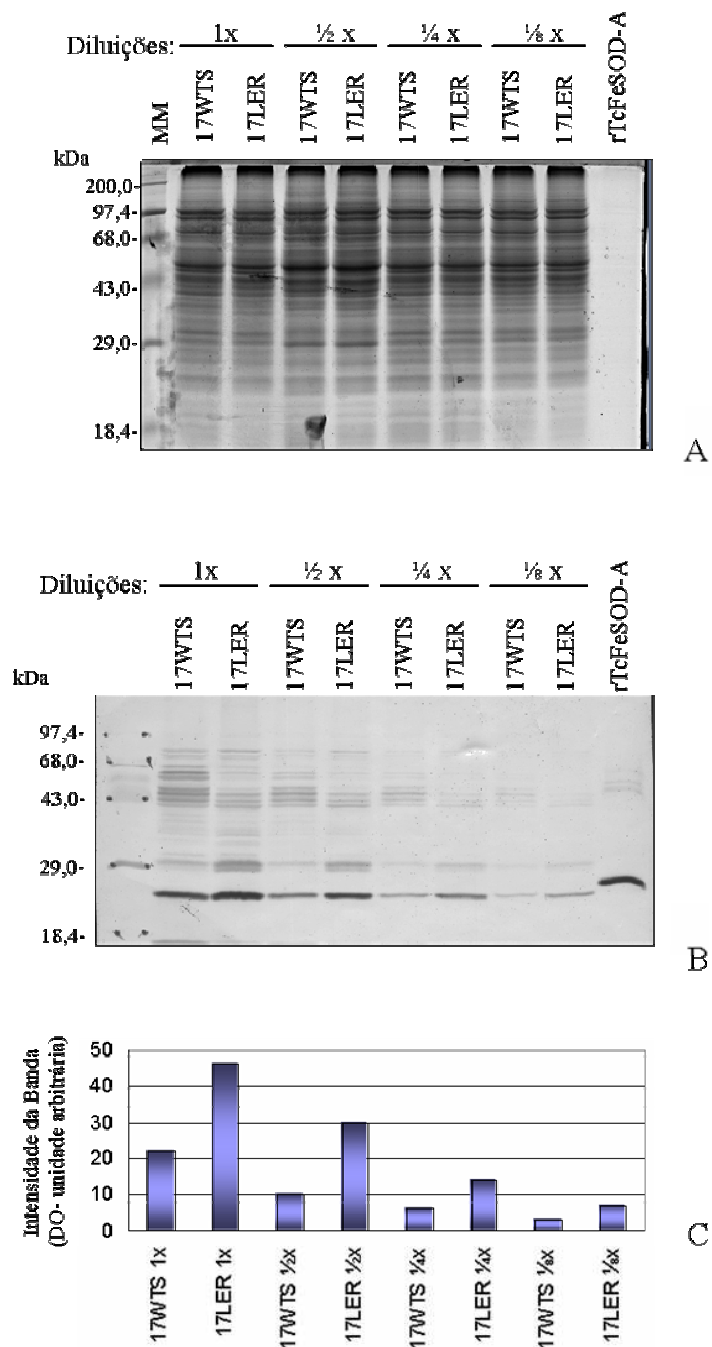


Figura 14: (A) Perfil eletroforético das proteínas totais do *T. cruzi*; (B) Western blot e (C) Densitometria da proteína rTcFeSOD-A das populações 17WTS e 17LER diluídas sucessivamente ao dobro.

Tabela 3

Atividade superóxido dismutase (SOD) de extratos proteicos brutos de populações e clones do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol.

<i>T. cruzi</i>	Resistência ao BZ	Tempo de incubação da reação a temperatura ambiente		Atividade SOD**
		0 min	90 min	
		Abs 405nm *	Abs 405nm *	
WTS	S	0,270 ± 0,004	0,385 ± 0,001	37
LER	R	0,167 ± 0,001	0,202 ± 0,001	81
BZS	S	0,137 ± 0,005	0,181 ± 0,001	50
BZR	R	0,179 ± 0,007	0,233 ± 0,001	47
Clone 4S	S	0,245 ± 0,016	0,379 ± 0,011	21
Clone 16R	R	0,226 ± 0,001	0,377 ± 0,004	25
VL-10	R	0,133 ± 0,001	0,218 ± 0,005	58
Colombiana	R	0,239 ± 0,004	0,407 ± 0,005	16
Noel	R	0,122 ± 0,003	0,249 ± 0,003	37
Buriti	S	0,105 ± 0,001	0,195 ± 0,001	55
Barra Seca	S	0,105 ± 0,001	0,202 ± 0,001	52
Controles ***				
Positivo	-	0,054 ± 0,001	0,068 ± 0,002	100
Negativo	-	0,064 ± 0,001	0,265 ± 0,001	0

* Os resultados das absorbâncias apresentados correspondem à média e desvio padrão de um experimento. Foi feito um segundo experimento que mostrou resultados semelhantes.

** A atividade SOD foi determinada pela percentagem de inibição da oxidação do pirogalol. Foi utilizado 50 µl de extrato bruto contendo 40 µg de proteína das amostras/ 200 µl de reação.

***Controles: Positivo - foram adicionadas 3 unidades da enzima SOD bovina (SIGMA)/ 200 µl de reação; Negativo - sem adição de enzima SOD ou extrato.

resistentes não apresentaram diferenças significativas na atividade enzimática. Os valores apresentados na Tabela 3 mostram a média e o desvio padrão de um experimento. Foi feito um segundo experimento que mostrou resultados semelhantes. Os mesmos cálculos foram realizados para as diluições 25 µl e 12,5 µl das amostras, que apresentaram resultados correspondentes com os valores de 50 µl de extrato proteico (dado não mostrado). Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.7- Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene TcFeSOD-A das populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

Analisamos a presença de polimorfismos nas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, do gene TcFeSOD-A em 10 populações e clones do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Para a clonagem e o sequenciamento utilizamos um fragmento amplificado por PCR de 635pb, que corresponde à região codificante (ORF) do TcFeSOD-A. As amostras de *T. cruzi* analisadas foram 6 sensíveis: 17WTS, Clone 4S, Barra Seca, São Felipe, Cl Brener e JA e 4 resistentes: 17LER, Clone 16R, Yuyu e VL-10. O agrupamento destas amostras de acordo com o zimodema e a susceptibilidade a drogas pode ser visualizada na Tabela 1. As seqüências das amostras analisadas foram depositadas no banco de dados GenBank, com números de acesso de AY864902 a AY864911 e serão disponibilizadas após a publicação do trabalho. A Figura 15 mostra o multi-alinhamento de nucleotídeos do gene TcFeSOD-A das diferentes cepas de *T. cruzi* e a seqüência da FeSOD-A da cepa Tulauen C2 depositada no banco de dados (GenBank, número de acesso U90722). Comparando as seqüências de nucleotídeos, podemos observar a presença de 11 mutações, sendo que 8 estão associadas com os zimodemas das cepas de *T. cruzi*. Observamos que as cepas do Z1 (grupo *T. cruzi* I) apresentaram nucleotídeos diferentes das cepas do zimodemas Z2 e ZB (grupo *T. cruzi* II). As outras 3 mutações foram específicas para algumas cepas de *T. cruzi*. Comparando as seqüências de aminoácidos das amostras de *T. cruzi* utilizadas (Figura 16), observamos que as 11 mutações nucleotídicas deram origem a duas substituições de aminoácidos. As amostras do zimodema 1 apresentaram o aminoácido lisina (básico) na posição 78 e as demais amostras do Z2 e ZB o aminoácido treonina (hidrofílico). Nos clones 4S e 16R observamos uma substituição do aminoácido alanina (neutro) na posição 16 pelo aminoácido treonina (hidrofílico) presente nas outras amostras. Não houve relação entre as mutações e a

resistência do *T. cruzi* a drogas. Observamos também que nenhuma das mutações está presente nos resíduos de ligação ao íon Ferro.

As Figuras 17 e 18 mostram o alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região codificante e de aminoácidos das isoformas TcFeSOD-A (número de acesso U90722) e TcFeSOD-B (número de acesso U90723). Os iniciadores utilizados para a clonagem, preparo da sonda e RT-PCR quantitativo do gene TcFeSOD-A estão representados na Figura 17. A isoforma TcFeSOD-A possui uma região codificante de 635pb, enquanto que a TcFeSOD-B apresenta 587pb (Figura 17). Comparando as seqüências de aminoácidos, observamos que a identidade entre ambas isoformas é baixa, cerca de 41% (Figura 18). A TcFeSOD-A apresenta 31 aminoácidos na região amino-terminal, que estão ausentes na isoforma TcFeSOD-B. Por outro lado, a TcFeSOD-B apresenta 17 aminoácidos na região carboxi-terminal ausentes na TcFeSOD-A (Figura 18).

Em nossas análises observamos um erro na seqüência TcFeSOD-A da cepa Cl Brener depositada no banco de dados (GenBank, número de acesso U90722). Observamos a deleção de um único nucleotídeo na seqüência da FeSOD-A do *T. cruzi* (nucleotídeo G na posição 557), comparada com as seqüências de nucleotídeos das nossas amostras, incluindo a cepa Cl Brener. Isso resultou na substituição dos 26 aminoácidos localizados na porção carboxi-terminal da seqüência da proteína TcFeSOD-A (Figuras 15 e 16).

+

Figura 15: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região codificante das populações e clones do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Essas seqüências foram depositadas no GenBank com os respectivos números de acesso: JA (AY864907); Cl Brener (AY864906); Clone 4S (AY864905); VL-10 (AY864911); São Felipe (AY864909); Clone 16R (AY864908); 17LE (AY864902); 17WT (AY864903); Barra Seca (AY864904) e Yuyu (AY864910). A seqüência do gene TcFeSOD-A (SOD) da cepa Tulauen C2 (número de acesso U90722, GenBank) também foi utilizada no alinhamento para comparação. As mutações encontradas estão marcadas com uma seta (↓). O sinal (+) mostra o erro encontrado na seqüência TcFeSOD-A depositada no banco de dados.

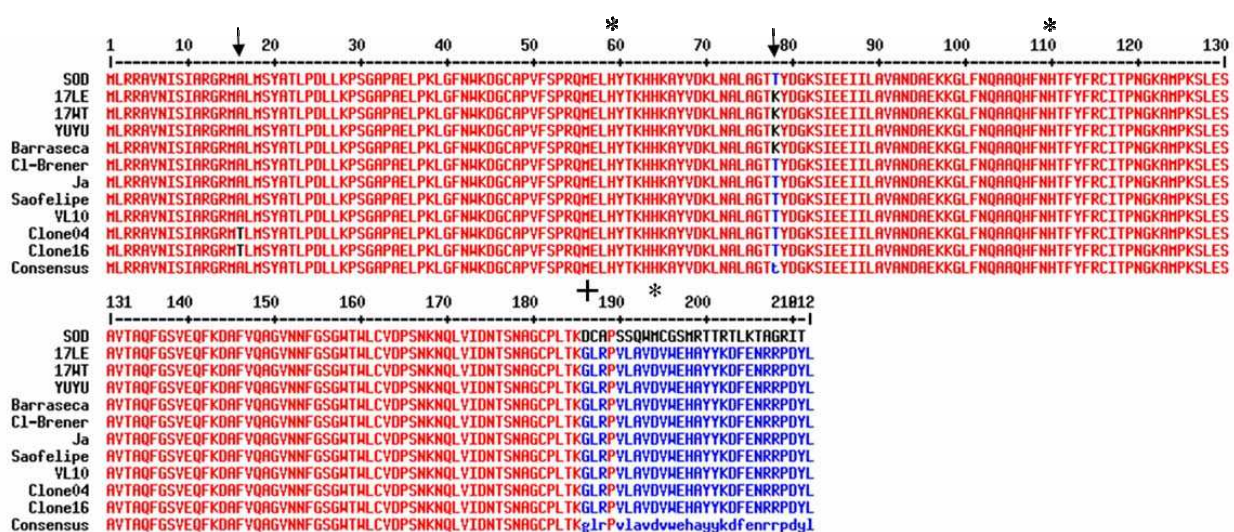


Figura 16: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das populações e clones do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ (números de acesso AY864902 a AY864911) e da TcFeSOD-A (SOD) do *T. cruzi* depositada no banco de dados (número de acesso U90722). As setas (↓) mostram os pontos onde ocorreram as substituições dos aminoácidos (16 Ala – Tre; 78 Lis – Tre) e o sinal (+) mostra o erro encontrado na seqüência TcFeSOD-A depositada no banco de dados. O asterisco (*) mostra os sítios de ligação do íon ferro.

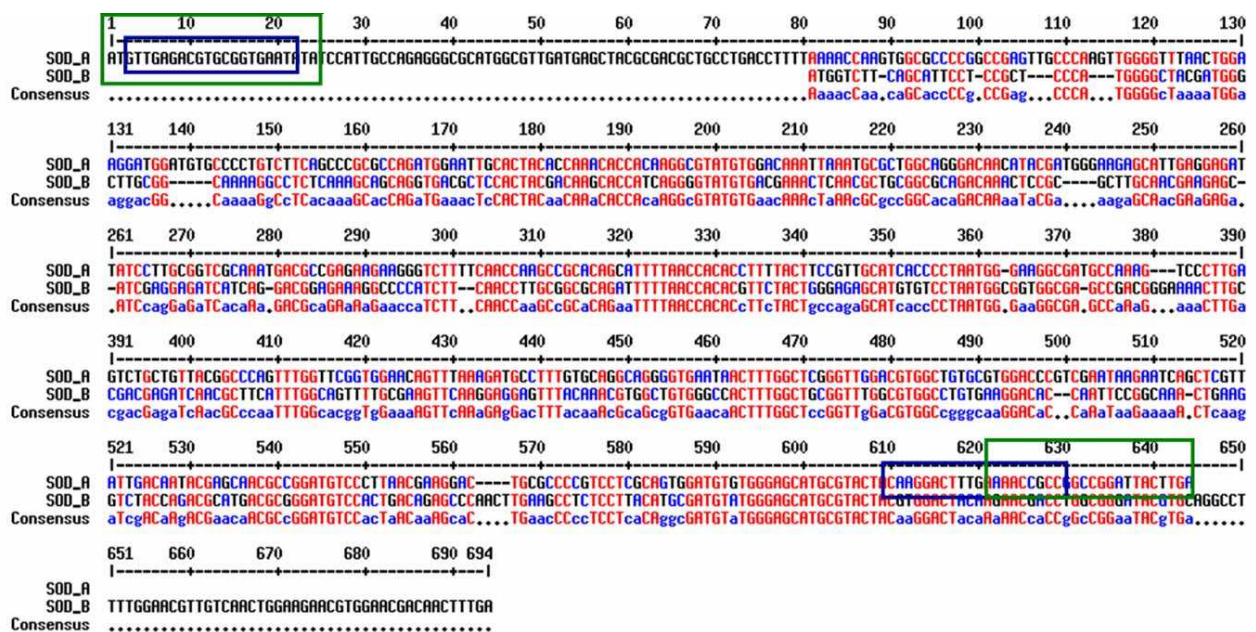


Figura 17: (A) Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região codificante da TcFeSOD-A (número de acesso: U90722) com a TcFeSOD-B do *T. cruzi* (número de acesso: U90723). Os retângulos verdes representam a localização dos iniciadores utilizados para a clonagem e preparo da sonda do gene TcFeSOD-A. Os retângulos em azul mostram a localização dos iniciadores utilizados para o RT-PCR quantitativo em tempo real.

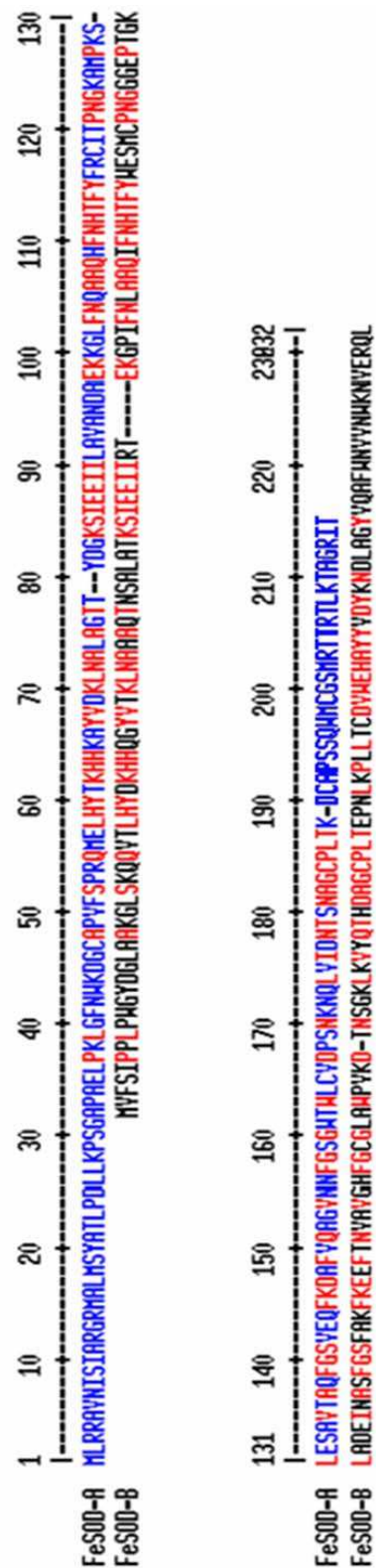


Figura 18: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da TcFeSOD-A (número de acesso U90722) com a TcFeSOD-B (número de acesso U90723) do *T. cruzi*.

6- DISCUSSÃO

O tratamento da doença de Chagas é problemático, devido à baixa eficácia de cura com BZ e o NFX, principalmente na fase crônica da doença; considerável toxicidade destes compostos; existência de cepas do *T. cruzi* resistentes a drogas e a resistência cruzada entre o BZ e o NFX. Acredita-se que os parasitas resistentes a drogas possam superexpressar ou deletar alguns dos genes envolvidos no metabolismo da droga, a fim de sobreviverem e se adaptarem no organismo.

A metodologia da Representação da Expressão Diferencial (RDE) (Krieger & Goldenberg, 1998) é uma importante ferramenta para estudar a expressão diferencial de genes em células e organismos sob diferentes condições. A RDE tem sido utilizada na identificação de genes diferencialmente expressos durante a metaciclologênese do *T. cruzi* (Krieger *et al.*, 1999). Os autores observaram que alguns genes são transientemente expressos durante a metaciclologênese, enquanto outros estão presentes apenas na forma epimastigota e outros no tripomastigota metacíclico (Krieger *et al.*, 1999). Dessa forma, Ávila e colaboradores (2001) isolaram o gene da metaciclologênina, que é diferencialmente expresso durante a transformação do parasita da forma epimastigota para a tripomastigota metacíclica. Recentemente, Yamada-Ogatta e colaboradores (2004) clonaram e caracterizaram dois genes obtidos por RDE, que foram superexpressos em tripomastigotas metacíclicos (metaciclologênina I e II). Murta e colaboradores (2001b), utilizando esta metodologia, selecionaram 55 fragmentos de genes diferencialmente expressos em populações do *T. cruzi* resistentes ao BZ. Um dos genes obtidos foi o TcFeSOD-A que codifica a enzima Ferro Superóxido Dismutase-A (FeSOD-A). Os autores observaram uma maior expressão desse gene na população 17LER do *T. cruzi* resistente ao BZ, em relação ao seu par sensível (17WTS). No presente trabalho nós caracterizamos esse gene em relação ao nível de mRNA, a amplificação do gene, localização cromossomal no DNA genômico, expressão da proteína, atividade enzimática e polimorfismo de nucleotídeos e aminoácidos do gene TcFeSOD-A em cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ.

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que participa da defesa antioxidante do *T. cruzi*, removendo o excesso de ânion superóxido (O_2^-) via dismutação, para oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fridovich, 1974; Boveris & Stoppani, 1977, Fridovich, 1997; Temperton *et al.*, 1998, Turrens, 2004).

Drogas anti-tripanosomicidas utilizadas para o tratamento da doença de Chagas promovem a geração do ânion superóxido (O_2^-). Por exemplo, o nifurtimox é enzimaticamente reduzido produzindo radicais nitro-ânion e em condições aeróbicas a redução resulta na formação de O_2^- e a produção de H_2O_2 (Docampo & Moreno, 1984). O ânion superóxido (O_2^-) não atravessa facilmente a membrana celular e a dismutação para H_2O_2 ocorre no compartimento em que o radical é formado. Por esta razão, muitos eucariotos incluindo o *T. cruzi*, apresentam diferentes superóxido dismutases em distintos compartimentos celulares, como no citosol e na mitocôndria (Temperton *et al.*, 1998).

O mecanismo de ação do NFX e do BZ tem sido estudado em *T. cruzi*. O NFX é reduzido pela enzima tripanotiona redutase (Docampo *et al.*, 1981; Henderson *et al.*, 1988). O radical gerado pode reagir com o oxigênio molecular para gerar o ânion superóxido (O_2^-) e este produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da enzima superóxido dismutase. Pode ocorrer a interação do H_2O_2 com o O_2^- produzindo o radical hidroxila ($OH^\cdot$), que é um dos radicais mais tóxicos, de baixo peso molecular, também produzido por radiações ionizantes. Todos esses passos podem causar danos ao DNA (Olive, 1978) e lipídeos e formar peróxido orgânico (Tappel, 1973; Docampo *et al.*, 1981).

O mecanismo de ação do BZ ainda não está claro. Sabe-se que o BZ inibe o crescimento do *T. cruzi* em concentrações que não estimulam a produção de O_2^- e H_2O_2 . Assim, o efeito tripanosomicida do BZ não depende de radicais de oxigênio como o NFX (Moreno *et al.*, 1982; Maya *et al.*, 2003). Provavelmente metabólitos reduzidos do BZ estão envolvidos no mecanismo de ação, através de ligações covalentes com componentes do parasita ou ligando ao DNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* (Diaz de Toranzo *et al.*, 1988; Aldunate & Morello, 1993; Maya *et al.*, 1997 e 2003).

Parasitas como *Leishmania spp.*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *Plasmodium falciparum* e *Giardia lamblia*, têm desenvolvido a capacidade de adquirir resistência às drogas utilizadas para o seu tratamento, selecionando mecanismos apropriados para sobreviver aos compostos antiparasitários (Buckner *et al.*, 1998). A resistência natural de cepas do *T. cruzi* ao BZ e NFX tem sido descrita na literatura (Hauschka, 1949, Bock *et al.*, 1969, Haberkorn & Gonnert, 1972, Brener *et al.*, 1976; Andrade *et al.*, 1985 e Neal & Van Bueren, 1988). Alguns autores têm sugerido a ocorrência de seleção dos parasitas resistentes, para explicar a persistência do parasita no hospedeiro vertebrado após um tratamento prolongado (Andrade *et al.*, 1977, Veloso *et al.*, 2001). Filardi e Brener (1987) isolaram cepas do *T. cruzi* de vetores silvestres no estado de Santa Catarina, onde não existe a doença de Chagas humana autóctone. Tem sido sugerido que as

baixas percentagens de cura de pacientes chagásicos sejam explicadas pela resistência do *T. cruzi* a droga. As cepas de *T. cruzi* VL-10 e Colombiana naturalmente resistentes ao BZ e NFX também apresentaram resistência ao azol antifúngico D0870 (Molina *et al.*, 2000). Para obter um modelo de resistência a droga *in vivo* em *T. cruzi*, Murta e Romanha (1998) selecionaram uma população e clones deste parasita com resistência *in vivo* ao BZ. Os autores utilizaram a cepa Y do *T. cruzi*, que foi selecionada a partir de sucessivas passagens em camundongos tratados com uma única dose alta da droga.

Os mecanismos de resistência a drogas em protozoários parasitas já descritos (Ullman, 1995; Engel *et al.*, 2000), incluem: a diminuição da entrada da droga na célula, o aumento da sua eliminação, a diminuição da sua ativação e alterações na enzima alvo para diminuir a interação enzima-droga. Estes mecanismos ainda não estão bem esclarecidos. No entanto, a resistência de *Leishmania* ao metotrexato pode ser explicada por vários mecanismos, incluindo a redução da entrada da droga na célula mediada pela modulação da expressão de uma série de transportadores de folato (Guimond *et al.*, 2003). Os autores observaram que o gene do transportador de ácido fólico FT5 foi deletado na linhagem de parasitas resistentes ao metotrexato.

Estudos mostram que a superexpressão da fosfoglicoproteína de membrana (PGP) está relacionada com os mecanismos de resistência a drogas em alguns protozoários parasitas (Ullman, 1995). A PGP funciona como uma bomba de efluxo de droga dependente de ATP que reduz o acúmulo de compostos citotóxicos dentro da célula. A associação da superexpressão dessa proteína na resistência a drogas foi descrita em *Leishmania* resistente ao arsenato e antimoniais (Legare *et al.*, 2001) e em *P. falciparum* resistente a cloroquina (Cowman *et al.*, 1991). Entretanto, recentemente 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.

Buckner e colaboradores (1998) mostraram que cepas do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao fluconazol apresentaram resistência cruzada a outros azoles antifúngicos, como cetoconazol, miconazol e itraconazol. Isto sugere um mecanismo de resistência que não é único para a estrutura molecular do fluconazol, mas que é um mecanismo seletivo de resistência aos azoles. Por outro lado, a população do *T. cruzi* resistente ao fluconazol não apresentou resistência ao BZ e a anfotericina B.

Engel e colaboradores (2000) utilizando epimastigotas de *T. cruzi* geraram resistência a um inibidor da enzima cisteína protease (Cruzipaína, 57 kDa) e observaram um aumento da regulação da via secretora nestes parasitas resistentes. Ocorreu um aumento das vesículas entre o

complexo de Golgi e a bolsa flagelar e um aumento das cisternas do Golgi. Os parasitas resistentes ao inibidor de cisteína protease foram sensíveis ao NFX e ao BZ, sugerindo que estas drogas são mediadas por mecanismos diferentes. Em nosso trabalho, observamos a superexpressão do gene TcFeSOD-A em populações de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ, em resposta ao estresse gerado por esta droga.

No presente estudo, as análises de Northern blot das populações sensíveis e resistentes do *T. cruzi* ao BZ hibridizadas com a sonda do gene TcFeSOD-A, mostraram dois transcritos um de 1,2 Kb e outro de 1,6 Kb. Ismail e colaboradores (1997) analisando o alinhamento das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene SOD do *T. cruzi* com as seqüências das SODs de outros organismos, identificaram duas isoformas da enzima FeSOD: FeSOD-A e FeSOD-B (GenBank, números de acesso: U90722 e U90723, respectivamente). Esses autores analisando o nível de transcrição do mRNA desses genes FeSOD-A e FeSOD-B no *T. cruzi* encontraram um único transcrito de 1,2 Kb para ambas as isoformas. Por outro lado, Temperton e colaboradores (1996) também encontraram dois transcritos, um de 1,2 Kb e outro de 1,9 Kb, mas os autores não sabem se os transcritos são derivados de um mesmo gene ou de genes diferentes. Dessa forma, nossos resultados discordam dos apresentados por Ismail e colaboradores (1997), uma vez que mostramos que o gene TcFeSOD pode apresentar dois transcritos em epimastigotas do *T. cruzi*. É importante ressaltar que em nossos experimentos utilizamos como sonda a seqüência inteira codificante do TcFeSOD-A e Ismail e colaboradores (1997) utilizaram duas sondas específicas para cada seqüência de cDNA das isoformas FeSOD-A e FeSOD-B. Já, Temperton e colaboradores (1996) usaram como sonda o gene TcFeSOD-B. Uma hipótese para explicar o reconhecimento dos dois transcritos em nosso trabalho é que ambos correspondem a isoforma TcFeSOD-A, no qual ocorrem diferentes níveis de maturação do mRNA, sendo o transcrito maior um pré-mRNA imaturo e o transcrito de 1.2 Kb o mRNA maduro após seu processamento. Com o objetivo de esclarecer futuramente estes resultados pretendemos utilizar sondas específicas para cada isoforma e verificar a expressão e o tamanho dos transcritos.

Com relação ao nível de mRNA do gene TcFeSOD nas diferentes cepas do *T. cruzi* analisadas, observamos uma diferença quantitativa dos transcritos. Ambos os transcritos (1,2 e 1,6 Kb) apresentaram um aumento de 3 vezes no nível de mRNA na população resistente 17LER comparada com seu par sensível (17WTS). Por outro lado, as outras amostras do *T. cruzi* analisadas apresentaram o mesmo nível de mRNA independente do fenótipo de resistência. Ismail e colaboradores (1997), observaram que a TcFeSOD-A foi constitutivamente expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasita, e que a TcFeSOD-B mostrou uma maior

expressão nas formas epimastigota, comparado com as tripomastigota e amastigota. Além disso, o nível de mRNA do gene TcFeSOD-B parece ser muito maior no estágio de epimastigota quando comparado com o TcFeSOD-A.

Os nossos resultados do RT-PCR quantitativo em tempo real confirmaram os resultados de Northern blot, mostrando que o nível de transcrição do gene TcFeSOD-A é 4 vezes maior na população 17LER do que na 17WTS. Neste estudo, nós utilizamos um iniciador específico para o TcFeSOD-A, que não se alinha com a sequência de nucleotídeos da TcFeSOD-B, confirmando a expressão diferencial da isoforma TcFeSOD-A na população 17LER do *T. cruzi*.

Paramchuk e colaboradores (1997), caracterizaram em *L. chagasi* as duas isoformas LcFeSOD-A e LcFeSOD-B. Os autores observaram um aumento no nível de mRNA do gene LcFeSOD-A de 1,5 vezes e do LcFeSOD-B de 3,0 vezes em promastigotas e amastigotas na fase logarítmica em relação à fase estacionária. Uma hipótese levantada por esses autores para explicar a presença de duas isoformas da FeSOD com a mesma função na *L. chagasi*, foi que as isoformas podem estar localizadas em compartimentos celulares diferentes. A LcFeSOD-A apresenta uma extensão de 31 aminoácidos hidrofóbicos e uma homologia com um peptídeo transitório mitocondrial (Bowler *et al.*, 1989; Paramchuk *et al.*, 1997), ausente na LcFeSOD-B. Isto sugere que a LcFeSOD-A pode ser mitocondrial, enquanto que a LcFeSOD-B seja citoplasmática. Em *T. cruzi*, a isoforma TcFeSOD-A também possui uma extensão de 31 aminoácidos na porção amino terminal, muito similar à encontrada na isoforma LcFeSOD-A. Enquanto que ambas enzimas TcFeSOD-B e LcFeSOD-B são desprovidas desta extensão. Uma outra evidência que concorda com a idéia de compartimentalização das isoformas da SOD, é a geração de toxicidade na mitocôndria pela ação da droga tripanosomicida violeta de genciana. Essa toxicidade na presença de O₂ possibilita a geração de O₂⁻ e a produção de H₂O₂ (Kelly *et al.*, 1993). Assim, pode ser necessária a presença da enzima SOD na mitocôndria. A hipótese da compartimentalização das isoformas da FeSOD de *L. chagasi* também pode ser aplicada em *T. cruzi*, uma vez que foi observado uma similaridade entre esses genes dos parasitas.

A comparação da sequência de aminoácidos das duas isoformas da FeSOD do *T. cruzi* com as de *L. chagasi* foi realizada por Paramchuk *et al* (1997). Além disso, as sequências de nucleotídeos das isoformas TcFeSOD-A do *T. cruzi* e de *L. chagasi* apresentou 55% de identidade, enquanto que entre a TcFeSOD-B e a LcFeSOD-B apresentou 62% de identidade. Esta similaridade sugere que estes genes podem ser únicos nos tripanosomatídeos e que de alguma forma ambos são necessários para a sobrevivência do parasita (Paramchuk *et al.*, 1997).

Outra explicação para a presença das duas isoenzimas no mesmo organismo é que uma enzima pode ser constitutivamente produzida e a outra pode ser induzida por um estresse externo, como radicais livres de oxigênio. Esta sugestão foi baseada no fato de que a FeSOD é produzida constitutivamente em *E. coli*, em condições anaeróbicas, entretanto, MnSOD é produzida em resposta à presença de oxigênio. Assim, a LcFeSOD-A pode ser produzida em resposta ao estresse oxidativo, enquanto, que a LcFeSOD-B pode ser constitutivamente expressa, funcionando como um mecanismo de defesa constante (Paramchuk *et al.*, 1997). Em *T. cruzi*, nossos resultados sugerem que a enzima TcFeSOD-A pode ser mais expressa sob condições do estresse gerado a partir do processamento das drogas tripanosomicidas.

A isoforma LcFeSOD-B de *L. chagasi* foi localizada em um cromossoma com alta massa molecular e organizado no genoma do parasita como um gene multi-cópias. Muitos genes metabolicamente essenciais de *L. chagasi* são localizados em cromossomas com alta massa molecular (Lighthall & Giannini, 1992; Paramchuk *et al.*, 1997) e organizados em arranjos em “tandem” (England *et al.*, 1982; Paramchuk *et al.*, 1997). Isto suporta a idéia de que o gene LcFeSOD-B é constitutivamente expresso, funcionando como um mecanismo de defesa inicial. Ao contrário, a isoforma LcFeSOD-A pode ser expressa sobre condições de estresse, uma vez que ela se localiza em um cromossoma com baixa massa molecular e apresenta uma cópia simples.

Nossas análises de Southern blot do DNA genômico digerido com as enzimas de restrição *AvaI* e *XbaI* e hibridizado com a sonda TcFeSOD-A, mostraram uma diferença na intensidade da banda do gene TcFeSOD-A, sugerindo que ele esteja amplificado na população 17LER. Observamos também uma diferença no tamanho dos fragmentos do gene na amostras digeridas com ambas enzimas, o que mostra uma variação na vizinhança do gene. Por análises comparativas de densitometria, nós detectamos um aumento de 2 vezes na intensidade da banda na amostra 17LER comparada com a 17WTS. Não foram encontradas diferenças significativas na intensidade das bandas entre as outras cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes analisadas. A diferença na intensidade das bandas hibridizadas pode refletir uma variação na abundância de unidades repetidas do gene ou no grau de identidade com a sequência de DNA usada como sonda. Assim, quanto mais intensa a banda maior será o seu número de cópias no genoma ou a complementariedade da sonda com o DNA molde. Interessantemente, a sequência de nucleotídeos da isoforma TcFeSOD-B não apresenta sítios para enzima de restrição *AvaI*, utilizada em nossos experimentos de Southern blot. Isso reforça nossos dados mostrando que a

sonda utilizada foi específica para o gene TcFeSOD-A. Além disso, aumentamos a temperatura de hibridização para obtermos maior especificidade da sonda TcFeSOD-A.

O controle da expressão gênica na etapa de transcrição é uma importante resposta ao estresse oxidativo na maioria dos organismos (Steenkamp, 2002; Finzi *et al.*, 2004). No entanto, em tripanosomatídeos a regulação da expressão gênica ocorre principalmente ao nível pós-transcricional (Vanhamme & Pays, 1995; Finzi *et al.*, 2004). Recentemente, vários estudos têm mostrado a importância das regiões 3' UTR e intergênicas na regulação da expressão dos genes em tripanosomatídeos (Jefferies *et al.*, 1991; Ramamoorthy *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 1995; Charest *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1997). Desde que essas regiões apresentem sinais para poliadenilação e trans-splicing, o nível de mRNA pode ser regulado por um ou ambos os mecanismos. Alternativamente, a região 3' UTR possui sítios de ligação para proteínas que podem influenciar na estabilidade do mRNA (Ismail *et al.*, 1997). No entanto, nós observamos que o aumento no nível de mRNA do gene TcFeSOD-A no *T. cruzi* é mediado pela amplificação do DNA, sugerindo que a regulação desse gene não ocorre a nível pós-transcricional.

Em *T. brucei*, Kabiri e Steverding (2001) identificaram a FeSOD envolvida na regulação do desenvolvimento do parasita. Foi observado que nas formas sangüíneas, a regulação da SOD é provavelmente determinada por um mecanismo pós-transcricional, já que nenhuma mudança no nível de mRNA da SOD foi observada entre as formas finas e largas. Entretanto, na forma procíclica presente no inseto, o nível de mRNA da FeSOD foi menor comparado com as formas sangüíneas.

Uma variação no número de cópias do gene TcFeSOD no *T. cruzi* e em *Leishmania* tem sido descrita na literatura. Temperton e colaboradores (1996), utilizando uma sonda do gene TcFeSOD-B para análise de Southern blot, demonstraram que em epimastigotas este gene pode estar presente no genoma do *T. cruzi* com um baixo número de cópias. Ao contrário desses dados, Ismail e colaboradores (1997), sugerem que os genes TcFeSOD-A e TcFeSOD-B estão presentes no genoma do *T. cruzi* como unidades repetidas em múltiplas cópias. Em tripanosomatídeos, a maioria dos genes apresentam uma organização repetida em “tandem”, embora existam alguns exemplos de genes que estão presentes em uma única cópia (Tannich *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 1995; Ismail *et al.*, 1997). Paramchuk *et al.* (1997), observaram que em *L. chagasi* o gene LcFeSOD-A pode estar presente em uma simples cópia no genoma, enquanto que o LcFeSOD-B pode estar organizado em múltiplas cópias no genoma do parasita. Em *L. tropica*, Ghosh e colaboradores (2003) sugerem a presença de uma simples cópia ou um baixo número de cópias do gene FeSOD. Análises quantitativas indicaram 2 ou 3 cópias do gene por genoma haplóide do

parasita. Dessa forma, ainda existem controvérsias a respeito do número de cópias do gene FeSOD no genoma desses tripanosomatídeos.

Em populações de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ utilizadas neste trabalho, nós detectamos um aumento de 3 vezes no nível de mRNA e uma amplificação do gene TcFeSOD-A. A superexpressão dos genes γ -glutamylcisteína sintetase, P-glicoproteína A, pterina redutase 1 e dihidrofolato-redutase-timidilato-sintase mediada pela sua amplificação e por outros mecanismos foi observada em mutantes de *Leishmania* resistentes ao metotrexato (Guimond *et al.*, 2003). Os autores detectaram também a presença de três novos genes (glutathione sintase, S-adenosilhomocisteína hidrolase e S-adenosilmetionina sintase) que são superexpressos nos parasitas resistentes a droga, entretanto esses genes não estão amplificados no genoma do parasita.

Interessantemente, as análises de Southern blot e sequenciamento do gene TcFeSOD-A mostraram um polimorfismo na sequência de nucleotídeos desse gene associado com o zimodema da cepa do *T. cruzi*. Cepas classificadas como Z2 e ZB (grupo *T. cruzi* II) apresentaram o mesmo perfil, que foi diferente das cepas Z1 (grupo *T. cruzi* I). Entretanto, os perfis observados não estão associados com o fenótipo de resistência a drogas em *T. cruzi*. O polimorfismo provavelmente, está associado a alguma alteração nucleotídica da vizinhança do gene TcFeSOD-A.

Variações no cariótipo do *T. cruzi* têm sido descritas (Wagner & So, 1990; Alves *et al.*, 1996; Henriksson *et al.*, 1996). Uma interessante característica deste parasita é que o tamanho do seu genoma varia entre cepas (Dvorak *et al.*, 1982) e clones de uma mesma cepa (McDaniel & Dvorak, 1993). Esta variabilidade no conteúdo do DNA do *T. cruzi* pode gerar implicações na organização genômica do parasita, como por exemplo, o número de repetições de determinados genes (Henriksson *et al.*, 1996). Análises do cariótipo sugerem que o *T. cruzi* é diplóide e que o genoma está distribuído em pares homólogos de cromossomas, que geralmente diferem em tamanho. A hibridização de bandas cromossômicas com sondas específicas de DNA revelou uma grande diversidade no cariótipo entre as cepas do *T. cruzi* (Henriksson *et al.*, 1996). No entanto, uma certa correlação foi encontrada entre o perfil de hibridização e a divisão das cepas nos dois grandes grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Henriksson *et al.*, 1996).

Vargas e colaboradores (2004) observaram que em *T. cruzi* o número e o tamanho das bandas cromossômicas variam consideravelmente entre as cepas: 19-22 bandas cromossômicas foram observadas exclusivamente no grupo *T. cruzi* II e 17-18 bandas no grupo *T. cruzi* I. O grupo *T. cruzi* II mostrou bandas com tamanhos maiores (acima de 3,3 Mb) quando comparado

com o grupo *T. cruzi* I. Os autores observaram que o clone CL Brener apresenta 52 cromossomas e o tamanho do genoma é de aproximadamente 70 Mb. De acordo com os nossos resultados, o gene TcFeSOD-A no clone Cl Brener do *T. cruzi* está localizado em um cromossoma de 810 Kb. Temperton e colaboradores (1996) observaram que o gene FeSOD-B está localizado em dois cromossomas no clone Cl Brener, um de 460 Kb e outro de 1200 Kb. Isso reforça nossos dados mostrando que a sonda utilizada no Southern blot foi específica, reconhecendo apenas o gene TcFeSOD-A.

Em nosso estudo observamos um perfil heterogêneo de bandas cromossômicas entre as diferentes cepas do *T. cruzi*, também descrito por outros autores (Engman *et al.*, 1987; Wagner & So, 1990; Henriksson *et al.*, 1990; 1993; 1995). Nossos resultados mostraram que o gene TcFeSOD-A pode estar localizado em um ou dois cromossomas próximos ou homólogos, dependendo da cepa do *T. cruzi* analisada. Observamos um polimorfismo no tamanho dos cromossomas dependente da cepa, principalmente para as amostras do zimodema 1. A variabilidade cromossômica pode ocorrer devido à presença de cromossomas homólogos com diferentes tamanhos, à variação do tamanho do telômero ou a ocorrência de pequenas deleções ou inserções (Henriksson *et al.*, 1996). A localização do gene TcFeSOD-A não está correlacionada com a resistência a drogas, mas sim com o zimodema da cepa. Observamos que a população 17LER apresentou intensidade das bandas cromossômicas 2 vezes maior comparado com seu par 17WTS. Provavelmente, o aumento da intensidade das bandas na população resistente a droga esteja refletindo a amplificação do gene TcFeSOD-A nessa população, também observado na análise de Southern blot.

Dados da literatura mostram que a resistência induzida ao NFX numa cepa de *T. cruzi* provocou algumas mudanças no DNA incluindo o rearranjo cromossômico e a aneuploidia (Nozaki *et al.*, 1996). Os autores mostram a ocorrência de deleções ou translocações nas bandas cromossômicas entre as cepas sensíveis e resistentes a droga. Na cepa resistente CA/NR1 os autores observaram que o conteúdo de DNA e de G-C era maior nos parasitas resistentes do que nos sensíveis, na ausência ou presença da droga, sugerindo que esta cepa pode ter uma aneuploidia estável. De acordo com nossos resultados a população resistente 17LER apresenta amplificação do gene TcFeSOD-A.

A expressão da proteína recombinante TcFeSOD-A foi produzida em bactérias *E. coli* cepa M15 induzidas por IPTG. A purificação dessa proteína foi realizada sob condições desnaturantes, com base no resultado do teste de solubilidade que mostrou que a proteína expressa era insolúvel. Altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em uma variedade

de sistemas de expressão podem levar a formação de agregados insolúveis, que em *E. coli* são conhecidos como corpos de inclusão. Em *T. brucei*, a expressão da proteína recombinante rTbFeSOD em bactéria também foi insolúvel (Kabiri & Steverding, 2001).

Nós analisamos o nível de expressão da rTcFeSOD-A por Western blot, utilizando o anticorpo policlonal anti-rTcFeSOD-A obtido em coelho. A proteína TcFeSOD-A, com tamanho esperado de 23 kDa, está presente em todas as cepas do *T. cruzi*. Observamos por análises densitométricas, um aumento de 2 vezes na expressão da proteína TcFeSOD-A na população 17LER comparado com a 17WTS. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as outras cepas sensíveis e resistentes. Interessantemente, na população 17LER ocorre amplificação do gene TcFeSOD-A, que leva ao aumento do nível de mRNA e superexpressão dessa proteína.

Kabiri & Steverding (2001), expressando a proteína recombinante FeSOD em *T. brucei* observaram duas bandas da FeSOD de 22 e de 24 kDa. Essas duas bandas podem representar duas isoenzimas diferentes ou elas podem ser formas parcialmente degradadas de uma enzima. Durante a diferenciação das formas largas em procíclica uma proteína de 24 kDa foi detectada quando o nível da proteína de 22 kDa começa a aumentar. Essas proteínas FeSOD podem ser as isoformas da FeSOD (FeSOD-A e FeSOD-B) encontradas em *T. cruzi* e em *L. chagasi*, na qual uma isoforma pode ser produzida constitutivamente e a outra induzida por estresse oxidativo. Outra explicação para a presença das duas isoenzimas pode ser a compartimentalização, como discutido anteriormente. No *T. brucei*, enquanto as formas sangüíneas têm uma mitocôndria menos desenvolvida com a ausência dos citocromos, as formas procíclicas têm uma mitocôndria ativa promovendo a fosforilação oxidativa. Desde que a mitocôndria ativa produz ânion superóxido (Loschen *et al.*, 1974, Kabiri & Steverding, 2001), uma segunda isoenzima FeSOD na forma procíclica do parasita pode ter uma função similar a MnSOD de eucariotos superiores (Van Loon *et al.*, 1986; Zhu & Scandalios, 1995; Kabiri & Steverding, 2001). Essa idéia corrobora com a hipótese discutida por Paramchuk e colaboradores (1997), de que as isoformas da FeSOD podem ser expressas em diferentes compartimentos da *Leishmania* e do *T. cruzi*. Os autores observaram que durante o desenvolvimento do ciclo de vida do *T. brucei*, o nível de expressão da proteína foi 4 e 6 vezes menor na forma fina que nas formas procíclica e larga, respectivamente (Kabiri & Steverding, 2001).

Em nosso trabalho avaliamos a atividade enzimática da TcFeSOD através de um método indireto que mede a capacidade da enzima inibir a oxidação do pirogalol pelo oxigênio do ar. A oxidação do pirogalol é dependente do pH, por isso preparamos um tampão com pH 8.2 e retiramos todo o oxigênio dissolvido na solução. Neste ensaio observamos que o extrato total da

população 17LER inibiu 81% da oxidação do pirogalol e o extrato da população 17WTS apenas 37%. Por outro lado, não observamos nenhuma diferença significativa nos valores da inibição para as populações e clones do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* BZS/BZR e nem nas cepas do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao BZ. A população 17LER foi a que apresentou maior atividade SOD. A atividade enzimática na população 17LER foi o dobro da 17WTS. Esse resultado está de acordo com o aumento da produção da proteína TcFeSOD-A na população 17LER.

Esse ensaio enzimático da FeSOD utilizado em nosso trabalho também foi utilizado para outros organismos. Ahmed e colaboradores (2003) identificaram e caracterizaram a FeSOD do parasita protista *Perkinsus marinus*, um parasita de ostra (Marklund & Marklund, 1974). Kabiri & Steverding (2001) também utilizaram este ensaio para determinar o tipo da SOD encontrada em *T. brucei*. Eles observaram que na presença do peróxido de hidrogênio a oxidação do pirogalol não foi inibida pela SOD do *T. brucei*, confirmando que o *T. brucei* apresenta o tipo FeSOD, encontrada em *T. cruzi* e em outros tripanosomatídeos (Le Trant *et al.*, 1983). Outros estudos também demonstraram a presença da FeSOD na bactéria *Desulfovibrio gigas* (Dos Santos *et al.*, 2000) e na cianobactéria *Anabaena* sp. (Li *et al.*, 2002).

A análise da seqüência nucleotídica e de aminoácidos do gene TcFeSOD-A de dez populações e clones do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ mostrou a presença de 11 mutações de nucleotídeos. Três mutações foram cepa específica. As outras 8 mutações foram associadas com os zimodemas do *T. cruzi*. As cepas do zimodema 1 (grupo *T. cruzi* I) apresentaram 8 nucleotídeos distintos das cepas dos zimodemas Z2 e ZB (grupo *T. cruzi* II). Observamos que as 11 mutações deram origem a duas substituições de aminoácidos. Uma substituição foi específica para os clones 4S e 16R e outra específica para os grupos I e II de *T. cruzi*. Não observamos nenhuma alteração no sítio ativo da enzima TcFeSOD-A e nos resíduos de ligação do íon ferro. Machado & Ayala (2001) fazendo a relação filogenética entre as seqüências de nucleotídeos dos genes nucleares Tripanotiona redutase e DHFR-TS e dos genes mitocondriais citocromo oxidase e NADH desidrogenase, de cepas do *T. cruzi* pertencentes aos diferentes zimodemas, separaram os grupos de *T. cruzi* I e II de acordo com o zimodema da cepa. As cepas do grupo *T. cruzi* I (Z1) apresentaram alelos em um mesmo clade (A), enquanto que o grupo *T. cruzi* II (Z2 e ZB) mostraram alelos em diferentes clades (B, C e D). Em nosso trabalho, utilizando o gene TcFeSOD-A, também foi possível observar a divisão das cepas do *T. cruzi* nos dois grupos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Dessa forma, observamos que o polimorfismo no gene TcFeSOD-A está relacionado aos grupos de *T. cruzi* e não ao fenótipo de resistência a droga.

O multi-alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos da região codificante e de aminoácidos das isoformas TcFeSOD-A e TcFeSOD-B, depositadas no GenBank, mostrou uma grande diferença entre elas. A identidade entre as seqüências de aminoácidos das isoformas FeSOD-A e FeSOD-B do *T. cruzi* é de apenas 41%, conforme já descrito por Ismail e colaboradores (1997). Adicionalmente, nós detectamos um erro na seqüência depositada no GenBank, que apresentou a deleção de 1 nucleotídeo (na posição 557) comparado com as nossas seqüências. Este fato resultou na substituição dos 26 aminoácidos localizados na porção carboxi-terminal da proteína TcFeSOD-A.

Temperton e colaboradores (1998) realizaram um estudo de superexpressão (de 5 a 8 vezes) do gene FeSOD-B em *T. cruzi*, através de ensaios de transfecção. Surpreendentemente, os epimastigotas transfectados foram 2 vezes mais sensíveis ao BZ e a violeta de genciana do que os parasitas não-transfectados. Uma possível explicação para esse aumento da sensibilidade a drogas nos parasitas transfectados com a FeSOD-B, pode ser devido a um desequilíbrio causado no sistema de defesa oxidativo do parasita, que resulta no aumento da taxa de produção do H_2O_2 , levando o parasita à morte. O resultado mostrado por Temperton e colaboradores (1998) discorda dos dados obtidos em nosso trabalho, no qual observamos que o *T. cruzi* resistente ao BZ apresenta uma superexpressão da proteína TcFeSOD-A. Além disso é importante ressaltar que, os autores transfectaram o gene TcFeSOD-B em *T. cruzi* e nossos resultados mostram que o gene TcFeSOD-A está amplificado nos parasitas resistentes ao BZ.

A habilidade de metabolizar o H_2O_2 é limitada nos tripanosomatídeos, os efeitos causados pelas drogas podem ser aumentados pelo aumento da concentração de H_2O_2 ou através da geração de radicais hidroxila ($OH^\cdot$) a partir do H_2O_2 (Temperton *et al.*, 1998). Tem sido mostrado por Yim e colaboradores (1990) que a SOD também pode catalisar a produção de radical hidroxila ($OH^\cdot$) a partir do H_2O_2 , o que pode explicar em parte o aumento da sensibilidade ao $O_2^\cdot$ em *E. coli* que superexpressa a FeSOD. Foi observado também em células de *E. coli* superexpressando a Cu/ZnSOD de *Drosophila*, que altos níveis acumulados de H_2O_2 pode inativar a enzima Cu/ZnSOD modificando a histidina do sítio ativo da proteína (Blech & Borders, 1983; Goulielmos *et al.*, 2003).

Uma outra hipótese pode explicar o aumento da sensibilidade do *T. cruzi* transfectado às drogas testadas. As enzimas envolvidas no metabolismo do H_2O_2 , como a tripanotiona redutase, triparedoxina peroxidase e ascorbato peroxidase (Turrens, 2004), não estão sendo superexpressas nos parasitas transfectados com a enzima SOD (Temperton *et al.*, 1998). Dessa forma, o processo de detoxificação nas células transformadas fica deficiente, sendo que o parasita se torna mais

sensível. Em condições normais, a quantidade de H_2O_2 produzido deve ser proporcional à quantidade de O_2^- que é metabolizado pela enzima SOD. Assim, as outras enzimas do sistema de defesa oxidativo do parasita conseguem metabolizar o H_2O_2 e proteger o parasita do estresse oxidativo.

As populações do *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ utilizadas em nosso trabalho, possivelmente desencadeiam um sistema de detoxificação que ocorre em sincronia. Pode-se especular que no parasita resistente ocorre uma superexpressão da TcFeSOD-A, que aumenta a produção de H_2O_2 intracelular, e que provavelmente está ocorrendo também um aumento da expressão das enzimas tripanotiona redutase, triparedoxina peroxidase e ascorbato peroxidase responsáveis pela detoxificação do H_2O_2 . Dessa forma, o parasita se torna resistente ao BZ. Os níveis de expressão desses genes e dessas enzimas serão avaliados futuramente em nosso laboratório.

Finzi e colaboradores (2004) mostraram que epimastigotas de *T. cruzi* quando tratados com uma concentração determinada de H_2O_2 (até $20\mu\text{M}$) têm a capacidade de proliferar (Finzi *et al.*, 2004). Em bactérias (Demple & Halbrook, 1983), leveduras (Davies *et al.*, 1995) e células de mamíferos (Wiese *et al.*, 1995), existe uma adaptação ao estresse oxidativo quando as células são expostas a diferentes concentrações de H_2O_2 . As células podem desenvolver resistência aumentando a expressão de genes que codificam enzimas protetoras e sistemas de reparo (Pearson & Steigbigel, 1981; Finzi *et al.*, 2004).

Estes autores mostraram também que os níveis da enzima triparedoxina peroxidase são aumentados de maneira dose dependente, quando as células do *T. cruzi* são tratadas com baixas concentrações de H_2O_2 . E que sobre condições de estresse (altas concentrações de H_2O_2) os níveis da enzima aumentam com o tempo, tornando os parasitas mais resistentes ao estresse oxidativo. Os parasitas que superexpressam a triparedoxina peroxidase são duas vezes mais resistentes ao estresse oxidativo comparado com os parasitas selvagens (Wilkinson *et al.*, 2000; Finzi *et al.*, 2004). Em nosso trabalho mostramos que a TcFeSOD-A está duas vezes mais expressa nos parasitas resistentes a droga do que nos sensíveis. Para compensar o aumento da expressão da TcFeSOD-A e o conseqüente aumento dos níveis de H_2O_2 intracelular, os parasitas podem estar superexpressando a enzima triparedoxina peroxidase e tornando o parasita resistente à droga. O fenótipo de resistência a drogas em *T. cruzi* parece ser multigênico, onde várias enzimas poderiam estar atuando no processo.

Assim como a SOD, a enzima tripanotiona redutase participa do sistema de defesa oxidativo do *T. cruzi*. Nozaki e colaboradores (1996) caracterizaram a tripanotiona redutase nas

formas tripomastigota e epimastigota de cepas do *T. cruzi* sensíveis e com resistência induzida *in vitro* ao NFX. A resistência ao NFX observada nas formas tripomastigotas das cepas resistentes foi de 3 a 8 vezes maior comparada com as sensíveis, enquanto que na forma epimastigota a resistência ao NFX foi 10 vezes maior. Os autores não observaram diferença no nível de mRNA, na organização genômica e na sequência de nucleotídeos do gene da tripanotona redutase entre as cepas sensíveis e resistentes ao NFX.

Estudos de transfecção do gene SOD têm sido realizados em diferentes organismos, conferindo resistência ao paraquat. O paraquat é um herbicida que age como um gerador intracelular de O_2^- , H_2O_2 e secundariamente $HO^\cdot$ (Goldstein *et al.*, 2002). Paramchuk e colaboradores (1997), testando o efeito da superexpressão das isoformas FeSOD-A e FeSOD-B em *L. chagasi*, tratadas com quantidades diferentes de paraquat, observaram que os parasitas transfectados foram mais resistentes ao paraquat quando comparado com os parasitas selvagens. Em células de *E. coli* transformadas com a enzima Cu/ZnSOD de *Drosophila* também foi observada a resistência ao paraquat (Goulielmos *et al.*, 2003). Da mesma forma, células de *E. coli* transformadas com a enzima TcFeSOD-B de *T. cruzi* apresentaram proteção contra o paraquat (Ismail *et al.*, 1997). Este resultado corrobora com nossos dados da associação da TcFeSOD-A com a resistência ao BZ.

Os promastigotas de *L. chagasi* transfectados também foram testados na presença de H_2O_2 , e não foi observada nenhuma proteção. Isso mostra que mesmo o gene da SOD estando superexpresso nos parasitas, as enzimas envolvidas no metabolismo do H_2O_2 não apresentam um aumento na expressão, tornando deficiente o sistema de defesa oxidativo do parasita. Uma outra explicação para a susceptibilidade dos parasitas transfectados com a SOD ao H_2O_2 , pode ser pelo fato de que o H_2O_2 inativa a FeSOD através da oxidação dos seus resíduos de triptofano, o que resulta na provável modificação do sítio ativo da enzima (Beyer & Fridovich, 1987, Paramchuk *et al.*, 1997). Isso sugere que o H_2O_2 está inativando a ação da superexpressão da SOD em *L. chagasi* e nenhuma resistência foi observada (Paramchuk *et al.*, 1997).

A resistência observada em células de *E. coli* superexpressando a Cu/ZnSOD de *Drosophila* foi dependente da concentração da droga. Quando a concentração do paraquat é alta (>1.2mM), as células interrompem o seu crescimento e apresentam uma taxa mínima de sobrevivência. Em concentrações altas da droga a enzima Cu/ZnSOD não é eficiente no mecanismo de detoxificação. Da mesma forma que foi observada em outros organismos, o aumento da ação da Cu/ZnSOD não está acompanhado pelo aumento paralelo das outras enzimas envolvidas no metabolismo do H_2O_2 (Goulielmos *et al.*, 2003). Isso sugere que a enzima

Cu/ZnSOD possui importância para a resistência das células, mas na presença de quantidades limitadas de radicais livres (Goulielmos *et al.*, 2003).

Ghosh e colaboradores (2003) demonstraram que a transfecção com o gene SOD em *L. tropica* e *L. donovani* inibiu o crescimento dos parasitas na presença de menadiona (gerador de O_2^-) e aumentou a sensibilidade ao H_2O_2 . Isto foi observado uma vez que o gene da SOD foi inserido na orientação antisenso no vetor de expressão, promovendo a redução nos níveis de mRNA da SOD, na expressão da proteína e na atividade funcional da enzima. Foi observado também que a deficiência da SOD nestes parasitas resulta em uma grande redução do crescimento e sobrevivência dos amastigotas em macrófagos. Estudos de transfecção em *T. cruzi* serão realizados em nosso laboratório para comprovar o envolvimento do gene TcFeSOD-A na resistência do *T. cruzi* a drogas.

Nossos dados mostram um aumento do número de cópias e no nível de mRNA do gene TcFeSOD-A, superexpressão da proteína TcFeSOD e aumento da atividade enzimática na população de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER), mas não em populações com resistência selecionada *in vivo* ou naturalmente resistentes ao BZ. Isto sugere que em populações selecionadas *in vivo* ou com resistência natural ao BZ, a regulação do gene pode ser mediada por mecanismos diferentes. De fato, a resistência do *T. cruzi* a drogas pode ser um processo complexo entre os estágios do parasita, envolvendo não apenas mecanismos bioquímicos, mas outros elementos do sistema imune do hospedeiro que podem interferir na susceptibilidade do parasita a droga. Esta interação múltipla, parasita, droga e sistema imune tem sido descrita no tratamento de Tripanosomíase Africana e Leishmaniose (Target, 1985; Berger & Fairlamb, 1992). Murta e colaboradores (1999) observaram a existência de cooperação entre o tratamento com o BZ e a resposta imune do hospedeiro contra a infecção com *T. cruzi*. Estudos comparativos de susceptibilidade do *T. cruzi* a drogas demonstraram que não existe correlação entre a susceptibilidade *in vivo* e *in vitro* (Neal & Van Bueren, 1988; Scoth & Mathews, 1987; Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 1995).

Em nosso trabalho mostramos que a população de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) apresenta amplificação do gene TcFeSOD-A, aumento do nível de mRNA, superexpressão da proteína e aumento da atividade enzimática. Observamos também a presença de polimorfismos na sequência nucleotídica do gene TcFeSOD-A e diferenças na localização desse gene nos cromossomos e no DNA genômico das diferentes cepas do *T. cruzi* analisadas. Houve uma associação entre esses polimorfismos e o zimodema da cepa de *T. cruzi* e não com o fenótipo de resistência ou susceptibilidade a droga. O BZ não induz estresse oxidativo no *T.*

cruzi, no entanto ele provoca um efeito tóxico. Como anteriormente descrito, o mecanismo de ação do BZ ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que metabólitos reduzidos do BZ se ligam a moléculas vitais do parasita. De maneira indireta esses metabólitos reduzidos do BZ podem agir em alguma via metabólica e provocar a indução do estresse oxidativo nesse parasita. Dessa forma, o aumento da expressão da proteína TcFeSOD-A pode ser um mecanismo de defesa desenvolvido pelo *T. cruzi* para a detoxificação oxidativa.

Estudos de transfecção do gene TcFeSOD-A em *T. cruzi* serão realizados para comprovar o envolvimento desse gene no fenótipo de resistência do parasita ao BZ. Serão avaliados também os níveis de expressão das enzimas tripanotiona redutase, triparedoxina peroxidase e ascorbato peroxidase, essenciais para a defesa antioxidante do parasita, nas populações do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ. Ensaio de Northern blot utilizando sondas específicas das isoformas TcFeSOD-A e TcFeSOD-B serão realizados para investigar a natureza dos dois transcritos encontrados em nossos resultados. Dessa forma, será possível esclarecer se os transcritos correspondem as duas isoformas da TcFeSOD.

Concluindo, nossos resultados mostram uma associação da amplificação do gene TcFeSOD-A com a resistência *in vitro* do *T. cruzi* ao BZ.

7- CONCLUSÕES

- Análise de Northern blot com a sonda do gene TcFeSOD-A mostrou a presença de dois transcritos, um de 1,2 Kb e outro de 1,6 Kb para todas as amostras de *T. cruzi* analisadas.
- O nível de mRNA do gene TcFeSOD-A é três vezes maior na população de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) comparado com seu par sensível (17WTS);
- O gene TcFeSOD-A está duas vezes mais amplificado na população de *T. cruzi* 17LER comparado com a 17WTS;
- A proteína TcFeSOD-A está duas vezes mais expressa na população resistente 17LER do que na sensível 17WTS;
- A atividade enzimática da TcFeSOD é duas vezes maior na população 17LER do que na 17WTS;
- O nível de mRNA do gene TcFeSOD-A, 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.
- O perfil de Southern blot gerado com as enzimas de restrição *AvaI* e *XbaI* e hibridizado com a sonda do gene TcFeSOD-A mostrou uma associação com o zimodema das cepas de *T. cruzi* analisadas e não com o fenótipo de resistência a drogas;
- O gene TcFeSOD-A pode estar localizado em um ou dois cromossomos, dependendo da cepa do *T. cruzi* analisada e não está associado com o fenótipo de resistência do *T. cruzi* a drogas;
- O seqüenciamento do gene TcFeSOD-A mostrou 11 mutações nucleotídicas e duas alterações na seqüência de aminoácidos (16 Ala - Tre; 78 Lis -Tre). As mutações estão associadas ao zimodema e não ao fenótipo de resistência a drogas.

Conclusão final

- O gene TcFeSOD-A está amplificado na população do *Trypanosoma 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.
- Ahmed H, Schott ET, Gauthier JD, Vasta GR 2003. Superoxide dismutase from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Anal. Biochem.* 318: 132-141.
- Ajioka J & Swindle J 1993. The calmodulin-Ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57: 127-136.
- Aldunate J & Morello A 1993. Free radicals in the mode of action of antiparasitic drugs. In: Aruoma OI, editor. *Free radicals in tropical disease*. 137-65.
- Alves AM, de Almeida DF, von Kruger WM 1996. Genomic variation in *Trypanosoma cruzi* clonal cultures. *Parasitol Res.* 82:410-5.
- Anacleto C, Abdo MCB, Ferreira AVB, Murta SMF, Romanha AJ, Fernandes AP, Moreira ESA 2003. Structural and functional analysis of an amplification containing a *PGPA* gene in a glucantime-resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell line. *Parasitol. Res.* 90: 110-118.
- Andrade SG, Andrade ZA, Figueira RM 1977. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Rev. Inst. Med. Trop.* 19:124-129.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull. World Health Organiz.* 63(4), 721-726.
- Andrade ALS, Zicker F, Oliveira RM, Silva AS, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, Andrade SS, Andrade JG, Martelli CM 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet.* 348, 1407-1413.
- Andrade SG & Magalhães JB 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi*: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 27-35.
- Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 100, 163-172.
- Araya JE, Cano MI, Yoshida N, Franco da Silveira J 1994. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific gp82 kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 161-169.

- Araújo MSS, Martins-Filho AO, Pereira MES, Brener Z 2000. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 819-824.
- Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, Da Silva Monteiro V, Krieger MA, Nakamura CV, De Souza W, Goldenberg S 2001. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117(2):169-77.
- Bacchi CJ 1993. Resistance to clinical drugs in African trypanosomes. *Parasitol. Today.* 9, 190-193.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crit. Rev. Biochem.* 22, 111-180.
- Becuwe P, Gratepanche S, Fourmaux MN, Van Beeumen J, Samyn B, Mercereau-Puijalon O, Touzel JP, Slomianny C, Camus D, Dive D 1996. Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 125-134.
- Beyer WF & Fridovich I 1987. Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 26, 1251-7.
- Benov LT & Fridovich I 1996. Functional significance of the Cu/ZnSOD in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 249-253.
- Berger BJ & Fairlamb AH 1992. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. *Parasitology* 105, 871-878.
- Beverley SM 1991. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 417-444.
- Blech DM & Borders CL 1983. Hydroperoxide anion, HO^-_2 , is an affinity reagent for the inactivation of yeast Cu,Zn superoxide dismutase, modification of one histidine per subunit. *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 579-586.
- Bock M, Gonnert R & Haberkorn A 1969. Studies with Bay 2502 on animals. *Bol. Chileno Parasitol.* 24, 13-19.
- Bogliolo AR, Lauria-Pires L, Gibson WC 1996. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. *Acta Tropica*, 61, 31-40.
- Borst P, Van Der Ploeg M, Van Hoek JFM, Tas J, James J 1982. On the DNA content and ploidy of tripanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 13-23.
- Borst P & Ouellette M 1995. New mechanism of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 427-460.
- Boveris A & Stoppani AO 1977. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* 33, 1306-1308.

- Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM 1980. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 188, 643–648.
- Bowler C, Alliotte T, De Loose M, Van Montagu M, Inze D. 1989. The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J.* 8: 31-8.
- Braga MS, Lauria-Pires L, Arganaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira AR 2000. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivates. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, 42, 157-161.
- 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.* 7;72:248-54.
- Brener Z & Chiari E 1967. Susceptibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, 9, 197-207.
- Brener R, Costa AG, Chiari E 1976. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, 18, 450-455.
- Brener Z 1984. Recent advances in the chemotherapy of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 79, 149-155.
- Brener Z 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 82, 205-212.
- Brener Z, Camargo ME, Rassi A 1992. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo, *ISTB Brazil-SBHH*, 13-29.
- Breniere SF, Morochi W, Bosseno MF, Ordonez J, Gutierrez T, Vargas F, Yaksic N, Noireau F 1998. *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. *Acta Trop.* 30;71:269-83.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 95-105.
- Buckner F, Wilson A, Whittr T, Van Voorhis W 1998. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemoth.* 42:3245-50.
- Buscaglia CA & Di Noia J 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microb. Infec.* 5, 419-427.
- Callahan HL & Beverley SM 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 266, 18427-30.
- Camandaroba ELP, Reis EAG, Gonçalves MS, Reis MG, Andrade SG 2003. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36(2):201-209.

- Cançado JR 1999. Criteria of Chagas disease cure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94, Suppl. I: 331-335.
- Cano MI, Gruber A, Vasquez M, Cortes A, Levin MJ, Gonzales A, Degraive WM, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, Alonso C, Requema JM, Franco da Silveira J 1995. *Trypanosoma cruzi* genome project: Molecular karyotype of clone Cl Brener. *Mol. Biochem. Parasitol.* 71, 273-278.
- Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, Da Silva AA, Pereira CM, Morel 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.
- Castro C, Craig SP, Castaneda M 1981. Genomic organization and ploidy number in *T. cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4, 273-282.
- Cauchetier E, Loiseau PM, Lehman J, Rivollet D, Fleury J, Astier A, Deniau M, Paul M 2002. Characterisation of atovaquone resistance in *Leishmania infantum* promastigotes. *Int. J. Parasitol.* 32(8):1043-51.
- Chance B, Sies H, Boveris A 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.
- Charest H, Zhang WW, Matlashewski G 1996. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 271:17081-17090.
- Chiquero MJ, Olmo A, Navarro P, Ruiz-Perez LM, Castanys S, Gonzales-Pacanowska D, Gamarro F 1994. Amplification of the H locus in *Leishmania infantum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1227, 188-94.
- Chow LM, Wong AK, Ullman B, Wirth DF 1993. Cloning and functional analysis of an extrachromosomally amplified multidrug resistance-like gene in *Leishmania enriettii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60(2):195-208.
- Church GM & Gilbert W 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci.* 81(7):1991-5.
- Conselho Regional de Farmácia do Tocantins, 2004. Web.
- Coura JR & De Castro SL 2002. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, 97 (1), 3-24.
- Coura J, Junqueira A, Fernandes O, Valente S, Miles M 2002. Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 18, 171-176.
- Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG. 1991. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J. Cell. Biol.* 113:1033-1042.
- Davies JMS, Lowry CV, Davies KJA 1995. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 1-6.

- De Castro SL 1993. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta. Trop.* 53, 83-98.
- Demple B & Halbrook J 1983. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*. 304, 466-8.
- Detke S, Katakura K, Chang KP 1989. DNA amplification in arsenite-resistant *Leishmania*. *Exp Cell Res.* 180:161-70.
- Dey S, Ouellette M, Lightbody J, Papadopoulou B, Rosen Bp 1996. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 2192-2197.
- 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, 1-12.
- Dias De Toranzo EGD, Castro JA, Franke De Cazzuolo BM, Cazulo JJ 1988. Interaction of benzonidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experimentia*. 44, 880-881.
- Docampo R, de Boiso JF, Boveris A, Stoppani AO 1976. Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. *Experientia*. 32:972-5.
- Docampo R & Stoppani 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, Stoppani AOM, Leon W, Cruz FS, Villalta F, Muniz RFA 1981. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* 30, 14, 1947-1951.
- Docampo R & Moreno SNJ 1984. Free radical metabolism in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Infect. Dis.* 6, 223-238.
- Docampo R 2001. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Design* 7, 1157-1164.
- Dodge MA, Waller RF, Chow LM, Zaman MM, Cotton LM, McConville MJ, Wirth DF 2004. Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol.* 51:1563-75.
- 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. Euk. Microbiol.*, 46: 17-23.

- Dos Santos WG, Pacheco I, Liu MY, Teixeira M, Xavier AV, Legall J 2000. Purification and Characterization of an Iron Superoxide Dismutase and a Catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 182: 796-804.
- Dost CK, Saraiva J, Monesi N, Zentgraf U, Engels W, Albuquerque S 2004. Six *Trypanosoma cruzi* strains characterized by specific gene expression patterns. *Parasitol. Res.* 94: 134 – 140.
- Doyle PS, Dvorak JA, Engel JC 1984. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of clones derived from various sources. *J. Protozool.* 31, 280-283.
- Drew ME, Morris JC, Wang Z, Wells L, Sanchez M, Landfear SM, Englund PT 2003. The adenosine analog tubercidin inhibits glycolysis in *Trypanosoma brucei* as revealed by an RNA interference library. *J. Biol. Chem.* 278: 46596-46600.
- Droge W 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Dujardin JC, Dujardin JP, Tibayrenc M, Timperman G, De Doncker S, Jacquet D, *et al.* 1995. Karyotype plasticity in Neotropical *Leishmania*: an index for measuring genomic distance among *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) braziliensis* populations. *Parasitology.* 110, 21-30.
- Dvorak JA, Hall TE, Crane MS, Engel JC, McDaniel JP, Uriegas R 1982. *Trypanosoma cruzi* flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mitramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* 24, 430-437.
- Engel J, Garcia C, Hsieh I, Doyle P, Mckerrow J 2000. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci.* 113:1345-54.
- Engman DM, Reddy LV, Donelson JE, Kirchhoff LV 1987. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 115-123.
- Englund PT, Hudjuk SL, Marini S 1982. The molecular biology of trypanosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 1, 695-726.
- Escobar P, Yardley V, Croft SL 2001. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine) ambisome and sodium stibogluconate (pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient *scid* mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45, 1872-1875.
- Fairlamb AH, Henderson GB, Cerami A 1989. Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2607-2611.
- Fairlamb AH & Cerami A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.* 46:695-729.
- Feinberg AP & Vogelstein B 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132(1):6-13.

- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*. 118, 161-166.
- Filardi LS & Brener Z. 1982. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Ann Trop Med Parasitol*. 76:293-7.
- 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.
- Finley RW & Dvorak JA 1987. *Trypanosoma cruzi*: Analysis of the population dynamics of heterogeneous mixtures. *J. Protozool.* 34, 409-415.
- Finzi JK, Chiavegatto CWM, Corat KF, Lopez JA, Cabrera OG, Mielniczki-Pereira AA, Colli W, Alves MJM, Gadelha FR 2004. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol. & Bioch. Parasit.* 133:37-43.
- Fleming JE, Miquel J, Cottrel SF, Yenogoyan AC 1982. Economos, is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology*. 28: 44-53.
- Flohe L, Hecht HJ, Steinert P 2003. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 966-984.
- Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE 1991. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*. 353, 726-730.
- Franco FRS, Paranhos-Bacalla GS, Yamauchi LM, Yoshida N, Franco Da Silveira J 1993. Characterization of a cDNA clone encoding the carboxy-terminal domain of a 90-kilodalton surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect. Immun.* 61, 4196-4201.
- Fridovich I 1974. Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol Biol.* 41, 35-97.
- Fridovich I 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 97-112.
- Fridovich I 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272, 18515-18517.
- Garzoni LR, Waghabi MC, Baptista MM, De Castro SL, Meirelles MN, Britto CC, Docampo R, Oldfield E, Urbina JA 2004. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. 23(3): 286-90.
- Gibson AC & Miles MA 1986. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 5, 1299-1305.
- Giulivi C, Turrens JF, Boveris A 1988. Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 243-52.

- Ghosh S, Goswami S, Adhya S 2003. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *Biochem. J.* 369, 447-452.
- Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, Colli W, Morel CM. 1985. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 180:265-70.
- Goldstein S, Samuni A, Aronovitch Y, Godinger D, Russo A, Mitche JB 2002. Kinetics of paraquat and copper reactions with nitroxides, the effects of nitroxides on the aerobic and anoxic toxicity of paraquat. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 686-691.
- Goscin SA & Fridovich I 1972. The purification and properties of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 289, 276-283.
- Goulielmos GN, Arhontaki K, Eliopoulos E, Tserpistali K, Tsakas S, Loukas M 2003. *Drosophila* Cu,Zn superoxide dismutase gene confers resistance to paraquat in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 433-438.
- Gourley DG, Schuttelkopf AW, Leonard GA, Luba, J, Hardy, LW, Beverley SM, Hunter WN 2001. Pteridine reductase mechanism correlates pterin metabolism with drug resistance in trypanosomatid parasites. *Nat. Struct. Biol.* 8(6):521-5.
- Gros P & Buschman E 1993. The mouse multidrug resistance family: structural and functional analysis. *Int. Rev. Cytology.* 137C, 169-197.
- Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, Fadili AE, Peytavi R, Briand G, Richard D, Messier N, Papadopoulou B, Cordeil J, Bergeron M, Legaré D, Ouellette, M 2003. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, 31:5886-96.
- Haberkorn A & Gonnert R 1972. Animal experimental investigations in the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittel-Forschung* 22, 1570-1580.
- Hanson S, Beverley SM, Wagner W, Ullman B 1992. Unstable amplification of two extrachromosomal elements in alpha-difluoromethylornithine-resistant *Leishmania donovani*. *Mol. Cell Biol.* 12(12):5499-507.
- Haimeur A & Ouellette M 1998. Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1689-1694.
- Harman D 1982. The free radical theory of aging, in: WA Pryor (ed), *Free Radicals in Biology*, vol. 5, Academic Press.
- Hauschka TS 1949. Persistence of strains-specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *J. Parasitol.* 35, 593-599.
- Henriksson J, Aslund L, Marcina RA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U 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, Ruiz A, Sabaj V, Galanti N, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U. 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 J, Aslund L, Pettersson U 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today.* 12, 108-114.
- Henriksson J, Dujardin JC, Barnabé 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.
- Ismail SO, Skeiky YAW, Bhatia A, Omara-Opyene LA, Gedamu L 1994. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of Iron Superoxide Dismutase cDNA from *Leishmania donovani chagasi*. *Infection and Immunity*, 62, 657-664.
- Ismail SO, Paramchuk W, Skeiky YAW, Reed SG, Bhatia A, Gedamu L 1997. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 187-197.
- Jacobson MD 1997. Apoptosis, Bcl-2-related proteins get connected. *Curr. Biol.* 7: 277-281.
- Jefferies D, Tebabi P, Pays E 1991. Transient activity assays of the *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein gene promoter: control of gene expression at the postranscriptional level. *Mol. Cell. Biol.* 11:338-343.
- Johnson PJ 1993. Metronidazole and drug resistance. *Parasitol. Today.* 9, 183-186.
- Kabiri M & Steverding D. 2001. Identification of a developmentally regulated iron superoxide dismutase of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 360:173-7.
- Kanematsu S & Asada K 1979. Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 535-545.
- Kawashita S, Sanson G, Fernandes O, Zingales B, Briones M 2001. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2250-2259.
- Kelly JM, Taylor MC, Smith K, Hunter KJ, Fairlamb AH 1993. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* over-express trypanothione reductase. Sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. *Eur. J. Biochem.* 18:29-37.
- Kirchhoff LV 1993. Chagas disease: american trypanosomiasis. *Infec. Dis. Clin. North America.* 7, 487-501.

- Krieger MA & Goldenberg S 1998. Representation of differential expression: a new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. *Parasitology Today*, 14 (4): 163-166.
- Krieger MA, Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, Plazanet-Menut C, Goldenberg S 1999. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metaciclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94,I: 165-168.
- Kwok LY, Schuler D, Clayton C, Soldati D 2004. The antioxidant system in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Mol. Microbiol.* 51, 47–61.
- Laemmli UK 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685,
- Lanar DE, Levy SC, Manning JE 1981. Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 327-341.
- Le Trant N, Meshnick SR, Kitchener K, Eaton JW, Cerami A 1983. Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. Purification, characterisation, and similarity to the leishmanial and trypanosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* 258, 125-130.
- Leclerc V, Boiron R, Blondeau R 1999. Diversity of superoxide-dismutases among clinical and soil isolates of *Streptomyces* species. *Curr. Microbiol.* 39, 365-368.
- Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, *et al.* 2001. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem.* 276, 26301-26307.
- Li T, Huang X, Zhou R, Liu Y, Li B, Nomura C, Zhao J 2002. Differential expression and localization of Mn and Fe superoxide dismutase in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 184(18):5096-5103.
- Lighthall GK & Giannini SG 1992. The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitol. Today*. 8, 192-9.
- Lira R, Contreras LM, Santa-Rita R, Urbina JA 2001. Mechanism of action of antiproliferative alkyl-lysophospholipids against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 537-546.
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 42, 68-72.
- 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.* 55:147-53.
- Marín C, Hitos AB, Rodríguez-González I, Dollet M, Sánchez-Moreno M 2004. *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol. Letters.* 234, 69-74.

- Machado CA & Ayala FJ 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7396-401.
- Marklund S & Marklund G 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474.
- Maya JD, Repetto Y, Agosín M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A 1997. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote, and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 101-6.
- Maya JD, Bollo S, Nuñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, Périé J, Chauvière G 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurant derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 65, 999-1006.
- Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42(2): 352-357.
- McCord JM & Fridovich I 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McDaniel JP & Dvorak JA 1993. Identification, isolation and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 213-222.
- Meshnick SR & Eaton JW 1981. Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 970-976.
- Meshnick SR, Trang NL, Kitchener K, Cerami A, Eaton J 1983. Iron-containing superoxide dismutases in trypanosomatids. In: Cohen, G., Greenwald, R.A. (Eds.), *Oxy Radicals and Their Scavenger Systems*. In: *Molecular Aspects*, vol. I. Elsevier Biomedical, New York, 348-352.
- Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, Romanha AJ, Gazzinelli RT 1998. Interleukin-12 enhances *in vivo* parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 2549-56.
- 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, Pova 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, Pova 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 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* (Zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet* i, 1338-1340.
- Miller AF 2004. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 1-7.
- Milner JD & Hajduk SL 1999. Expression and localization of serum resistance associated protein in *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104: 271-83.
- Molina J, Brener Z, Romanha AJ, Urbina JA 2000. *In vivo* activity of the bis-triazole D0870 against drug-susceptible and drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:137-40.
- Moreno SNJ, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AOM 1982. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 585-91.
- Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 6810-6814.
- 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.
- Moutiez M, Aumercier M, Schoneck R, Meziane-Cherif D, Lucas V, Aumercier P, Ouaisi A, Sergheraert C, Tartar A 1995. Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 310, 433-437.
- Moutiez M, Quemeneur E, Sergheraert C, Lucas V, Tartar A, Davioud-Charvet E 1997. Glutathione-dependent activities of *Trypanosoma cruzi* p52 makes it a new member of the thiol: disulphide oxidoreductase family. *Biochem. J.* 322, 43-48.
- 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, Gazzineli RT, Brener Z, Romanha AJ 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biol. Parasitol.* 93, 203-214.
- Murta SMF, Dos Santos WG, Anacleto C, Nirdé P, Moreira ESA & Romanha AJ 2001a. 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, Goldenberg S, Romanha AJ 2001b. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *XXVIII Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas e XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia* 5 a 7 de novembro, *Anais da Reunião*, p. 183.

- Nakaar V, Dare AO, Hong D, Ullu E, Tschudi C 1994. Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in Trypanosomes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6736-6742.
- 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.
- Nilsen TW 1992. Trans-splicing in protozoa and helminthes. *Infect. Agents Dis.* 7, 212-218.
- 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.
- Nozaki T & Cross GA 1995. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75, 55-67.
- 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.
- Olanow CW 1997. Attempts to obtain neuroprotection in Parkinson's disease. *Neurology*. 1 (Suppl) S26-S33.
- Olive P 1978. Nitrofurazone-induced DNA damage to tissues of mice. *Chem. Biol. Interact.* 20, 323-31.
- Oliveira R, Broude N, Macedo A, Cantor C, Smith C, Pena S 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3776-3780.
- Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* 9:1027-33.
- Ouellette M, Legare D, Haimeur A, Grondin K, Ray G, Brochu C, Papadopoulou B 1998. *Drug Resistance Updates* 1, 43-48.
- Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M 1992. A novel antifolate gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *EMBO J.* 11, 3601-8.
- Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Oullette M 1994. Contribution of the *Leishmania* P-glycoprotein related gene *ltgpa* to oxyanion resistance. *J. Biol. Chem.* 269, 11980-6.
- Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L 1997. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90, 203-221.
- Parker MW & Blake CCF 1988. Iron – and manganese-containing superoxide dismutase can be distinguished by analysis of their primary structure. *FEBS Lett.* 229: 377-82.

- Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM, Torres HN 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48:69-74.
- Pearson RD & Steigbigel RT 1981. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 127, 1438-43.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B 2003. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 79-90.
- Pelham HRB 1990. In: *Stress Proteins in Biology and Medicine* (Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C) Cold Spring Harbor, NY, 287-299.
- Pérez-Fuentes R, Guégan JF, Barnabé C, López-Colombo A, Salgado-Rosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Díaz M, Ramos-Jiménez J, Sánchez-Guillén MC 2003. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int. J. Parasitol.* 33, 293-299.
- Perry KL & Agabian N 1991. mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia*, 47, 118-128.
- Petray PB, Morilla MJ, Corral RS, Romero EL 2004. *In vitro* activity of etanidazole against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 233-235.
- 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.
- Postan M, Mcdaniel JP & Dvorak JA 1986. *Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term *in vitro* maintenance. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 659-662.
- Quesada JM, Entrala E, Fernández-Ramos C, Marin C, Sánchez-Moreno M 2001. *Phytomonas* spp.: superoxide dismutase in plant trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 123-127.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 96-102.
- Ramamoorthy R, Donelson JE, Paetz KE, Maybodi M, Roberts SC, Wilson ME 1992. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. *J. Biol. Chem.* 267:1888-1895.
- Rassi A 1979. Clínica: Fase Aguda. In: *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Ed. Guanabara Koogan, S. A., Rio de Janeiro, 251-264.

- Rassi A & Luquetti A O 1992. Therapy of Chagas disease. *In: Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine* (ed.) Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M. E. & Rassi, A. ISBT Brazil, São Paulo, 237-247.
- Rassi A, Rassi JA, Rassi GG 2000. Fase aguda. *In: Trypanossoma cruzi e a doença de Chagas*. 2.^a Edição. Brener, Z., Andrade, ZA., Barral-Netto, M. Rio de Janeiro, 231-244.
- Rassi A, Amato Neto V, De Siqueira AF, Ferriolli Filho F, Amato VS, Rassi GG, Rassi Junior A 2002. Treatment of chronic Chagas' disease with an association of nifurtimox and corticoid. *Rev. Soc. Med. Trop.* 35: 547-50.
- Ravindranath SD & Fridovich I 1975. Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. *J. Biol. Chem.* 250: 6107-6112.
- Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF 2000. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 403:903-909.
- Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 52, 35–41.
- Ribeiro-Rodrigues R, Dos Santos W, Oliveira AB, Snieckus V, Zani C & Romanha AJ 1995. Growth inhibitory effect of naftiofuran and naftiofuranquinone derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 5, 1509-1512.
- Robello C, Navarro P, Castanys S, Gamarro F. 1997. A pteridine reductase gene ptr1 contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem. Parasitol.* 90: 525-35.
- Rodriguez JB 2001. Specific molecular targets to control tropical diseases. *Curr. Pharm.Des.* 7, 1105-1116.
- 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*. Tese PhD, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110.
- Rowland EC, Moore-Lai D, Seed JR, Stephens CE, Boykin DW 2003. Inhibition of *in vitro* intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* by dicationic compounds. *J. Parasitol.* 89:1078-80.
- Salin ML & Bridges SM 1980. Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 369-374.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17:914-21.

- Santa-Rita R, Barbosa HS, Meirelles MNL, De Castro SL 2000. Effect of alkyllysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta. Trop.* 75, 219-228.
- Schapira A, Beales PF, Halloran ME 1993. Malária: living with drug resistance. *Parasitol. Today.* 9, 168-174.
- Scoth VR & Mathews TR 1987 The efficacy of an n-substituted imidazole, RS-49676, against a *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37, 308-313.
- Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaiissi A, Lemesre JL 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42, 3097-3102.
- Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D 2001. Novel intracellular Sb^V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 276(6): 3971-3976.
- Silveira JF 2000. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. 2.^a edição. Brener, Z., Andrade, ZA., Barral-Neto, M. Rio de Janeiro, 127-147.
- Singh N, Singh RT, Sundar S 2003. Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. *J. Infect. Dis.* 188:600-7.
- Solari A 1980. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma.* 78, 239-255.
- Sosa-Estani S, Armenti A, Araujo G, Viotti R, Lococo B, Ruiz Vera B, Vigliano C, De Rissio AM, Segura EL 2004. Treatment of Chagas disease with benznidazole and thiocetic acid. *Medicina (B Aires)*. 64: 1-6.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell D, Zingales, B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141-152.
- Steenkamp DJ 2002. Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. *Antioxid. Redox Signal.* 4:105-21.
- Steenkamp DJ 2003. Thiol metabolism of the trypanomatids as potential drug target. *IUBMB Life* 53: 243-248.
- Steindel M 1993. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados de Santa Catarina. Belo Horizonte: UFMG. 162p. Tese de Doutorado.
- Steindel M, Toma Hk, Ishida MM, Murta SM, De Carvalho Pinto CJ, Grisard EC, Schlemper BR Jr, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ 1995. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. *Acta Trop.* 60:167-77.

- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Internat. J. Parasitol.* 33, 269-279.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon SA, Morris LM, Wittner M 1992. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5, 400-419.
- Tannich E, Bruchhaus I, Walter RD, Hostmann RD 1991. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 61-72.
- Tappel AL 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fedn. Proc.* 32, 1870-4.
- Target GAT 1985. Chemotherapy and the immune response in parasitic infections. *Parasitology* 90, 661-673.
- Teixeira SM, Kirchhoff L, Donelson J 1995. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNA from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 270:22586-22594
- Teixeira SMR 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1503-16.
- Temperton NJ, Wilkinson SR, Kelly JM 1996. Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 339-343.
- Temperton NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM 1998. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96, 167-176.
- Tewari RK, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma PN 2004. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses- influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Science.* 166, 687-694.
- Thomas EA, Yon H, Armando J, Robert O, Ulmann B 1995. Cloning and expression of the hypoxanthineguanine phosphoribosyl transferase from *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73, 133-143.
- Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabe C, Tafuri WL, De Lana M 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 223-30.
- 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.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:1335-9.

- Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552:335-44.
- Turrens JF 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects of Medicine.* 25:211-220.
- Ullman B 1995. Multidrug resistance and P-glicoprotein in parasitic Protozoa. *J. Bioenerg. Biomemb.* 27: 77-84.
- Ullu E & Nilsen T 1995. Molecular biology of protozoan and helminth parasites. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites.* New York, Academic Press LTD, 1-17.
- Ullu E, Tschudi C, Gunzi A 1996. Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. Em: Smith, DF., Parson, M. (ed) *Molecular Biology of Parasitic Protozoa.* IRL Press Oxford, 115-129.
- Upcroft JA & Upcroft P 1993. Drug resistance and *Giardia.* *Parasitol. Today.* 9, 187-190.
- Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja G, Liendo A, Lazard K, Piras MM, Piras R, Perez N, Wincker P, Ryley JF 1996. Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. *Science.* 273, 969-971.
- Urbina JA 1999a. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J. Mol. Med.* 77, 332-338.
- Urbina JA 1999b. Parasitological cure of Chagas disease: It is possible? Is it relevant? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94, 349-355.
- Urbina JA 2000. Sterol biosynthesis inhibitors for Chagas' disease. *Curr. Opin. Anti-infect. Invest. Drugs.* 2, 40-46.
- Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartoli J 2000. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.* *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44, 2498-2502.
- Urbina JA 2001. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Curr. Opin. Infect. Disease.* 14, 733-741.
- Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ. 2003. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Inter. J. Antimicrob. Agents.* 21, 39-48.
- Van Breusegem F, Slooten L, Stassart JM, Botterman J, Moens T, Montagu MV, Inzé D 1999. Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplast on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 50, 71-78.
- Van Loon AP, Pesold-Hurt B, Schatz G 1986. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3820-3824.

- Vanhame L & Pays E 1995. Control of gene expression in Trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 59:223-40.
- Vargas N, Pedroso A, Zingales B 2004. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 131-141.
- Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJO, Lana M, Chiari E, Tafuri WL, Bahia MT 2001. Variation in susceptibility to Benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96:1005-1011.
- Vickerman K 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int. J. Parasitol.* 24, 1317-1331.
- Wagner W & So M 1990. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect. Immun.* 58, 3217-3224.
- Walder JA, Eder PS, Engaman DM, Brentano ST, Walder RY, Knutzon DS, Dorfman DM, Donelson JE 1986. The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science.* 233, 569-571.
- Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJ 1995. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 231-40.
- Wilkinson SR, Temperton N, Mondragon A, Kelly J 2000a. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 275, 8220-5.
- Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM 2000b. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem. J.* 352, 755-61.
- Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio EL, Kelly JM 2002. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 13453–13458.
- Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio EL, Kelly JM 2003. RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the African trypanosome. *J. Biol. Chem.* 278, 31640–31646.
- Wilson K, Berens RL, Sifri CD, Ullman B 1994. Amplification of the inosinate dehydrogenase gene in *Trypanosoma brucei gambiense* due to an increase in chromosome copy number. *J. Biol. Chem.* 269: 28979-87.
- WHO. Organização Mundial da Saúde. Disponível em [http: www.who.gov.br](http://www.who.gov.br)
- Yamada-Ogatta SF, Motta MC, Toma HK, Monteiro-Goes V, Ávila AR, Muniz BD, Nakamura C, Fragoso SP, Goldenberg S, Krieger MA 2004. *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. *Acta Tropica.* 90: 171-179.

- Yim MB, Chock PB, Stadtman ER 1990. Copper, zinc superoxide dismutase catalyses hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 5006-10.
- Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO 1996. A novel nickel containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 318, 889-896.
- Zeledón R, Dias JCP, Brilla-Salazar A, Rezendo JM, Vargas LG, Urbina A 1988. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? In: Brener, Z. & Andrade, Z. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 152-174.
- 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.
- Zhu D & Scandalios JG 1995. The maize mitochondrial MnSODs encoded by multiple genes are localized in the mitochondrial matrix of transformed yeast cells. *Free Radicals Biol. Med.* 18, 179-183.