

200206435

Camila Whonrath Morisco Chiavegatto

**Envolvimento da triparedoxina peroxidase na resposta do
Trypanosoma cruzi ao estresse oxidativo**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Camila Whonrath
Morisco Chiavegatto
e aprovada pela Comissão Julgadora.

x Fernanda Ramos
Gadelha

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2001

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C431e
V.	
TÍTULO	47546
S.	837/02
	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	06-02-02
N.º CPD	

CM00163097-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Chiavegatto, Camila Whonrath Morisco
C431e Envolvimento da triparedoxina peridoxidase na resposta do
Trypanosoma cruzi ao estresse oxidativo/Camila Whonrath
Morisco Chiavegatto. --
Campinas, SP:[s.n.], 2001

Orientadora: Fernanda Ramos Gadelha
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

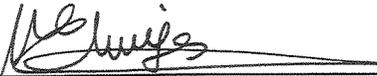
1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Estresse oxidativo. I. Gadelha, Fernanda
Ramos. I. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Campinas, 7 de novembro de 2001.

BANCA EXAMINADORA

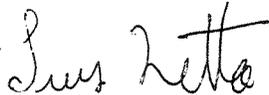


Profª. Dra. Fernanda Ramos Gadelha
UNICAMP – Depto. Bioquímica - IB



Profª. Dra. Maria Edwiges Hoffmann
UNICAMP – Depto. Bioquímica - IB

Profª. Dra. Selma Georgio
UNICAMP – Depto. Parasitologia - IB



Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto
USP – Depto. Genética

“At every level, the greatest obstacle to transforming the world is that we lack the clarity and imagination to conceive that it could be different”

Roberto Unger

Por acreditar que vocês me ajudaram a tornar possível esse trabalho,

dedico-o aos:

Meus pais, Antônio Carlos e Maria Eugênia;

Meu irmão, Rodrigo;

Meu marido, Vanderlei e

a Minha amiga, Fernanda

Agradecimentos

A minha família pelo apoio, amizade e compreensão nos momentos em que me dediquei a esse trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha pela confiança, apoio, incentivo e amizade durante a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann e ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto pela importante contribuição para o trabalho.

Aos membros da pré-banca: Profa. Dra. Carmem Veríssimo Ferreira, Profa. Dra. Selma Giorgio e Prof. Dr. Sérgio Marangoni pelas sugestões feitas na análise prévia deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves, ao Prof. Dr. Walter Colli e ao Prof. Dr. Jorge A. López pela colaboração no nosso trabalho.

À Karen Christine Finzi Corat pela ajuda na realização dos experimentos de adaptação ao estresse oxidativo.

Aos amigos do laboratório, Kiko, Jane e Karen pelos momentos divertidos durante a ajuda nos experimentos, principalmente os da “groselha”.

Ao Giorgio Freesz Valadares pela ajuda nas análises dos experimentos de Western blotting

As secretárias Andréa e Marina pela ajuda burocrática e paciência.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Índice

Resumo	viii
Summary	x
1. Introdução	
1.1 Doença de Chagas	1
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3 Sistemas de defesa antioxidante do <i>T. cruzi</i>	6
1.4 Tripanotiona	8
1.5 Triparedoxina	11
1.6 Triparedoxina peroxidase	12
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	
3.1 Culturas de células	15
3.2 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio	15
3.3 Metabolismo de peróxido de hidrogênio	15
3.4 Tratamento das células de <i>T. cruzi</i> com H ₂ O ₂ e determinação da viabilidade celular	16
3.5 Preparo do extrato protéico total de <i>T. cruzi</i> para Western blotting	17
3.6 Detecção da TXNPx através da análise por Western blotting	17
3.7 Obtenção do anticorpo primário	18

4. Resultados

4.1 Comparação de parâmetros bioquímicos das cepas Y e Tulahuen de <i>T. cruzi</i>	20
4.2 Comparação da concentração da Tryparedoxina peroxidase (TXNPx) nas duas cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
4.3 Comparação da concentração da Tryparedoxina peroxidase (TXNPx) nas diferentes fases do crescimento	23
4.4 Metabolismo de peróxido de hidrogênio	26
4.5 Citotoxicidade ao peróxido de hidrogênio	27
4.6 Efeito do peróxido de hidrogênio na proliferação dos parasitas	30
4.7 Adaptação ao estresse oxidativo	30
5. Discussão	38
6. Referências Bibliográficas	43
7. Anexo	47

Resumo

Em resposta a invasão pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) a célula libera uma série de espécies reativas de oxigênio e ao mesmo tempo ocorre um aumento de concentração de cálcio no citosol indispensável para a penetração do parasita. O *T. cruzi* apresenta uma capacidade limitada em lidar com o estresse oxidativo, levando esta área a ser de grande interesse para a terapêutica. A triparedoxina peroxidase (TXNPx) é uma enzima antioxidante que participa de uma cascata enzimática para a detoxificação de hidroperóxidos descrita em *T. cruzi* que oferece novas opções para o desenvolvimento de agentes tripanossomicidas mais específicos.

Duas cepas com diferentes resistências ao estresse oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio foram utilizadas nesse trabalho. A cepa Tulahuen 2 apresenta menor tempo de geração e uma maior resistência ao estresse oxidativo, além de um maior índice de crescimento e concentração de TXNPx em relação a cepa Y. Correlacionando o número de células com o conteúdo protéico total, a cepa Tulahuen 2 apresenta uma relação maior do que a outra cepa estudada.

Durante a fase lag, em ambas as cepas, ocorre um aumento da expressão da TXNPx.

Nas condições testadas, as duas cepas metabolizaram o H₂O₂ na mesma velocidade.

Baixas concentrações de H₂O₂, levaram a um estímulo da proliferação celular (cepa Y) dando suporte a idéia que este agente pode agir como segundo mensageiro.

Essas células são capazes de se adaptar ao estresse oxidativo quando tratadas inicialmente com uma concentração citotóxica e depois desafiadas com uma dose citostática. Esta adaptação é temporária, induzindo a resistência até 1h 30min após o pré-tratamento.

A triparedoxina peroxidase está envolvida na adaptação ao estresse oxidativo de células epimastigotas de *T. cruzi* uma vez que tratando-se as células com baixas e altas concentrações de H₂O₂ observa-se um aumento da expressão desta proteína.

Summary

In response to invasion by *T. cruzi*, cells generate reactive oxygen species (ROS), occurring at the same time an increase in cytosolic calcium concentration that is essential for invasion. *T. cruzi* has a limited capacity to deal with oxidative stress, being this area of great interest for therapeutics. Tryparedoxin peroxidase (TXNPx) is an antioxidant protein that participates in an enzymatic cascade for hydroperoxide detoxification in *T. cruzi* offering new options for the development of more specific drugs.

Two *T. cruzi* strains with different resistance to the oxidative stress generated by H₂O₂, were used in this study. Tulahuen 2 strain has a smaller doubling time and a higher growth index, tryparedoxin peroxidase expression and resistance to oxidative stress. The correlation between cell number and total protein content was also higher in this strain.

During the lag phase, for both strains, there is a higher expression of TXNPx.

In the conditions used, both strains metabolized H₂O₂ at the same rate.

Low concentrations of H₂O₂ were able to stimulate cell growth in *T. cruzi* (Y strain) giving support to the idea that it can act as a second messenger.

These cells were also able to adapt to oxidative stress when treated with atoxic H₂O₂ concentrations and then challenged with cytostatic concentrations. This adaptation is transient inducing resistance to challenging for a maximum of 1 h 30 min.

Tryparedoxin peroxidase is involved in the adaptation of *T. cruzi* (Y strain) to oxidative stress since treatment with lower and higher H₂O₂ doses induced an increase in its expression.

1. Introdução:

1.1 Doença de Chagas:

A Doença de Chagas ou tripanossomíase americana causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é amplamente distribuída no continente Americano, propagando-se desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, com uma prevalência que varia de 5 à 60% (Rojas de Arias *et al*, 1999).

De um total de 360 milhões de pessoas morando em áreas endêmicas desta doença, é estimado que no mínimo 100 milhões de pessoas corram o risco de adquirir a doença e que cerca de 16 à 18 milhões de pessoas estejam infectadas (Guhl & Vallejo, 1999). No Brasil as estatísticas demonstram que 5 – 6 milhões de indivíduos estão infectados, ocorrendo 6000 óbitos por ano relacionados com a doença (Willians – Blangero *et al*, 1999).

Na doença de Chagas, o homem é o principal reservatório, sendo a forma de transmissão vetorial a mais destacada (80 à 90 %), seguindo-se a transfusional (8 à 18 %) e com alguma importância a congênita (0,5 à 2%) (Dias & Coura, 1997). Outras vias de transmissão do parasita também são consideradas importantes, como: transplante de órgãos (Chocair *et al*, 1985), leite materno e acidentes laboratoriais (Amato Neto, 1984).

Em princípio, a doença de Chagas é basicamente uma endemia rural, cujos indivíduos infectados vivem em casas com paredes de barro (pau - à - pique) e casebres de palha (Rey, 1991) e onde se domiciliaram com relativa facilidade algumas espécies do inseto vetor. Com a “urbanização da doença”, houve a disseminação da doença através da transfusão de sangue e, portanto, começaram a aparecer casos da doença em regiões não endêmicas do EUA (Dias & Coura, 1997).

Muitos medicamentos foram testados contra o *T. cruzi* no início de sua descoberta, como por exemplo: arsenicais, antimoniais, derivados do quinino, amins, sulfas e

antibióticos, que se mostravam ativos em outras infecções e doenças tropicais como, por exemplo, na sífilis, malária, doença do sono, leishmaniose, tuberculose e amebíase mostrando-se, entretanto inócuos contra o *T. cruzi* (Dias, 1999).

Até o momento não foi encontrada a cura para esta doença. Até pouco tempo, o tratamento envolvia a administração de benznidazole e nifurtimox, mas atualmente é utilizado apenas o benznidazole. Ambas as drogas produzem efeitos colaterais severos, podem ser mutagênicas e são efetivas apenas na fase aguda da doença (Dias, 1999). Em 1987, Aguilar e colaboradores (Aguilar *et al*, 1987) propuseram que a redução do grupo nitro do nifurtimox formava um radical ânion nitro e com o ciclo redox produzia ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Com relação ao benznidazole, relacionaram seus efeitos tóxicos com a produção de metabólitos de redução do grupo nitro que se ligam à macromoléculas celulares. Atualmente, sabe-se que os efeitos tóxicos do nifurtimox e benznidazole são uma consequência da diminuição significativa dos níveis de glutathione e tripanotona causados pela conjugação com metabólitos de ambas as drogas. A concentração de tripanotona e glutathione seria reduzida a um ponto que os níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos pelo ciclo redox, ou os radicais livres produzidos no metabolismo normal do parasita, aumentariam causando dano as macromoléculas celulares (Maya *et al*, 1997).

Em 1953, um grupo de pesquisadores testando a ação dos corantes trifenilmetânicos, evidenciaram a eficiente ação tripanossomicida do cristal violeta a 1:4000, após 24 à 48 horas de estocagem na geladeira, e preconizou o emprego deste composto na quimioprofilaxias da doença de Chagas transfusional (Dias & Coura, 1997). O cristal violeta possui ação fotodinâmica, ou seja, a luz visível causa a fotorredução deste composto a um radical centrado no carbono. Em condições aeróbicas este radical livre se autoxida

gerando ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. A fotossensibilidade do cristal violeta, com luz visível e um cofator redutor, acelera o tempo de esterilização do sangue chagásico (Docampo *et al*, 1983).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de se encontrar uma droga eficaz para esta doença minimizando os efeitos colaterais severos provocados pelas drogas já existentes. Uma delas é a combinação de um antifúngico (cetoconazole) com o benznidazole promovendo um efeito sinérgico no tratamento (Araujo *et al*, 2000). Outro estudo, também está sendo realizado utilizando-se o ácido acetil salicílico que diminua o número de parasitas no sangue de camundongos (Freire de Lima *et al*, 2000).

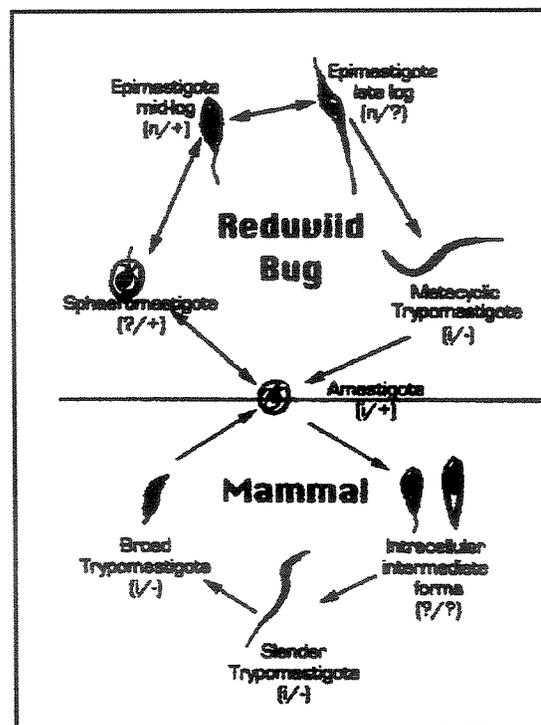
1.2 *Trypanosoma cruzi*:

Pertence a Ordem Kinetoplastida (família Trypanosomatidae) que incluem outros agentes etiológicos como *Leishmania donovani* e *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). Os protozoários desta família são organismos unicelulares, distinguidos pela presença de um único flagelo e pelo grande agregado de DNA mitocondrial, o cinetoplasto (Siqueira – Batista *et al*, 1996).

O cinetoplasto corresponde à cerca de 20 – 25% do DNA total da célula mostrando-se como uma rede fribosa constituída por mini-círculos e maxi-círculos. Existem evidências de que os minicírculos codificam proteínas pequenas, de importância e funções até o momento desconhecidas. Os maxicírculos codificam enzimas do metabolismo do parasita como a citocromo oxidase, ATPases e NADH desidrogenase (Silveria, 2000). O tamanho e a forma do kDNA varia nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita (Brener, 1992).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, alternando entre um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado com mudanças na sua morfologia e metabolismo. Na Figura 1 está representado o ciclo de vida do parasita que pode ser resumido da seguinte forma: durante a picada no hospedeiro mamífero infectado, os insetos vetores adquirem uma população pleomórfica de tripomastigotas sanguíneas (e aproximadamente 10% de amastigotas). No trato intestinal, as tripomastigotas se diferenciam em amastigotas que posteriormente se transformam em epimastigotas. Os epimastigotas se anexam a parede do intestino do vetor e se transformam nas formas tripomastigotas metacíclicas. Uma vez transformadas, elas se destacam da parede do intestino e são excretadas. A contaminação da ferida da picada do inseto ou da mucosa do hospedeiro mamífero com esta excreta, leva à infecção. As formas tripomastigotas metacíclicas parasitam um grande número de células mamíferas nucleadas, diferenciando-se em amastigotas que dão origem aos tripomastigotas sanguíneas. Uma vez formado, os tripomastigotas escapam para o sangue, podendo invadir novas células e transformar-se em amastigota novamente. Os amastigotas também são capazes de infectar células, mas por um mecanismo diferente dos tripomastigotas. Finalmente, a mistura de tripomastigota e amastigota presente no sangue do mamífero infectado completa o ciclo quando esses são resgatados durante a picada do vetor (Tyler & Engman, 2001).

Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Onde: (i) formas infectivas, (n) formas não infectivas, (+) representa formas proliferativas e (-) representa formas não proliferativas (Tyler & Engman, 2001).



A população de *T. cruzi* não é homogênea sendo constituída por diferentes cepas que circulam, na natureza, entre o homem, vetores, animais domésticos e reservatórios silvestres (Dias & Coura, 1997). Mais de 60 linhagens ou cepas já foram descritas por diferentes autores, segundo diferentes critérios (Rey, 1991). Essas populações possuem comportamento diverso no que se refere a interação com as células hospedeira, curvas de parasitemia,, origem geográfica e resistência ou sensibilidade à drogas e medicamentos (Rey, 1991).

Estudos baseados na amplificação do RNA ribossomal 24S alfa, levou a identificação de duas linhagens principais: linhagem 1, associada preferencialmente ao ciclo doméstico, sendo capaz de induzir manifestações patológicas em humanos, e a linhagem 2 associada preferencialmente ao ciclo silvestre induzindo baixa parasitemia em humanos (Zingales *et*

al, 1998). Além dos grupos 1 e 2 existe o grupo 1/2 que originou-se de um evento de transferência genética do grupo 2 para o grupo 1 (Souto *et al*, 1996).

Análise da região variável D7 da subunidade maior do RNA ribossomal demonstrou que dentro de cada linhagem há uma similaridade de 98-100% entre as diferentes cepas e uma semelhança de aproximadamente 80% entre as linhagens (Briones *et al*, 1999).

1.3 Sistemas de defesa antioxidantes do *Trypanosoma cruzi*

As células mamíferas geram espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como, ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^\cdot), através do processo metabólico intracelular normal. As células contêm várias enzimas que são capazes de eliminar estas EROs, tais como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (SOD). O estresse oxidativo pode ser resultado do aumento de exposição a oxidantes reativos ou da diminuição na proteção contra estes oxidantes. As EROs causam toxicidade através de uma série de reações, como por exemplo as reações de Haber-Weiss e Fenton, que consistem na redução de ferro pelo anion superóxido (equação 1) e subsequente geração de radical hidroxil (equação 2) (Kim *et al*, 2001).



Os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo geralmente ocorrem após a exposição a concentrações relativamente altas de EROs (Kim *et al*, 2001). Por outro lado, foi sugerido que em baixas concentrações as EROs podem exercer um papel importante na proliferação e sinalização celular (Burdon, 1995).

Não existem relatos da presença de vitamina E, β -caroteno e xantina oxidase (Docampo, 1990) nesses parasitas. Com relação ao ácido ascórbico são encontrados níveis baixos sendo este mantido em sua forma reduzida graças a uma interação não enzimática do dehidroascorbato com a tripanotiona (Krauth-Siegel & Coombs, 1996)

A concentração da glutatona (GSH) presente é baixa, cerca de 1/10 da concentração descrita para células hepáticas de rato (Boveris *et al*, 1980), existindo uma diferença entre a concentração total de tióis presente nas diferentes formas do parasita: 29% em epimastigotas, 34 e 45% em tripomastigotas e amastigotas, respectivamente (Maya *et al*, 1997). Esta diferença pode provavelmente ser explicada pelas formas amastigotas e tripomastigotas estarem mais expostas a resposta oxidativa do hospedeiro.

Um outro tiol não usual foi identificado em *C. fasciculata* e *L. donovani* denominado ovothiol que parece estar também envolvido no metabolismo de H_2O_2 (Ariyanayagam &, Fairlamb, 2001).

1.4 Tripanotiona:

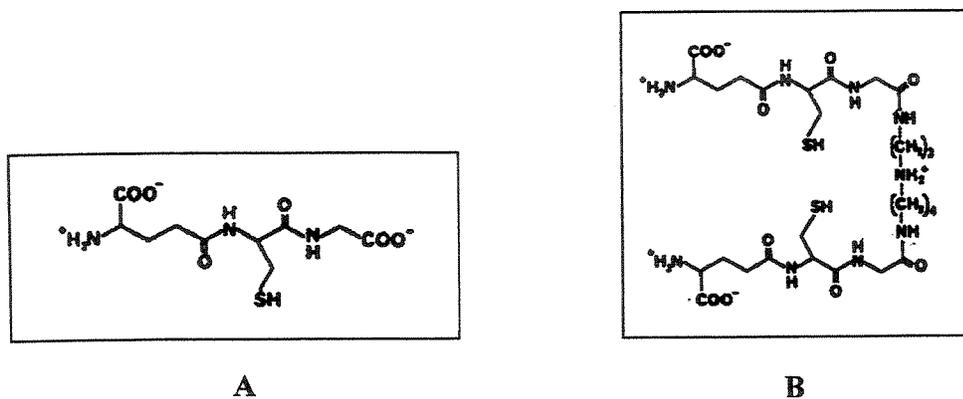


Figura 2- Estrutura química: A) Glutaciona (GSH) e B) Tripanotiona (T(SH)₂)

Cerca de 80% da glutatona nesses organismos está presente na forma de N1-glutationileespermidina e N1, N8 - bis (glutationil)espermidina (tripanotiona, T(SH)₂). Como a glutatona em outros sistemas, a tripanotiona é essencial para a manutenção de uma razão ideal tiol/disulfeto (Fairlamb *et al*, 1986). A síntese da tripanotiona é catalisada por uma enzima restrita aos tripanossomatídeos, a tripanotiona sintetase (Henderson *et al*, 1987). Esta síntese envolve uma conjugação seqüencial da glutatona, dependente de ATP, a ambos os resíduos amino terminais da espermidina (Fairlamb *et al*, 1986), principalmente através do intermediário N8-glutationileespermidina (Henderson *et al*, 1987). A biossíntese dos precursores, de espermidina e glutatona é idêntica à descrita para células de mamíferos (Callahan *et al*, 1991).

Até recentemente, para os tripanossomatídeos, um mecanismo não enzimático de detoxificação de peróxidos envolvendo a tripanotiona era proposto. Entretanto em 1997, Nogoceke e colaboradores, identificaram em *Crithidia fasciculata* (*C. fasciculata*), um sistema de detoxificação de hidroperóxidos contendo além da tripanotiona e da tripanotiona redutase, duas novas proteínas: Cf16 e Cf21 (Nogoceke *et al*, 1997)).

Este sistema foi posteriormente identificado em *T. cruzi* (Lopez *et al*, 2000) recebendo as proteínas outras denominações: a Cf16, homóloga as tioredoxinas, foi denominada: triparedoxina (TXN) e a Cf21 do grupo das peroxiredoxinas, homóloga à “thiol-specific antioxidant” (TSA), triparedoxina peroxidase (TXNPx).

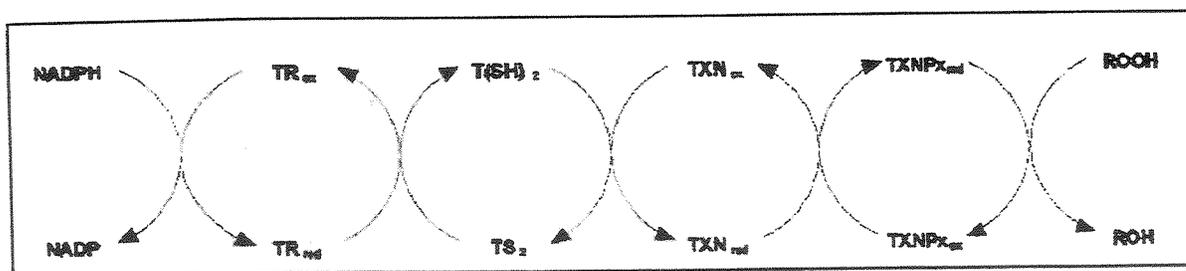


Figura 3: Fluxo de equivalentes reduzidos do NADPH para o hidroperóxido em *T. cruzi*. O dissulfeto de tripanotiona (TS_2) é reduzido a dihidrotripanotiona ($T(SH)_2$) pela tripanotiona redutase (TR), que é dependente de NADPH. Triparedoxina (TXN), reduzem hidroperóxidos (ROOH) ao álcool correspondente (ROH) com gasto de dihidrotripanotiona, mas somente na presença de triparedoxina peroxidase (TXNPx) (Lopez *et al*, 2000).

Este sistema, em parte é homólogo, mas mais complexo do que o metabolismo de peróxido mediado pela tioredoxina em leveduras e mamíferos, os sistemas de álcool hidroperóxido redutase identificado em várias bactérias e as vias dependentes da glutathione em animais superiores (Steinert *et al*, 1999). Como os tripanossomatídeos são altamente sensíveis ao estresse oxidativo, parece não haver uma eficiência grande do sistema (Montemartini *et al*, 1998).

Wilkinson e colaboradores (Wilkinson *et al*, 2000), identificaram uma peroxidase dependente de glutathione em *T. cruzi*. Esta enzima metaboliza eficientemente hidroperóxidos de ácidos graxos e fosfolipídeos, mas não é capaz de metabolizar o peróxido de hidrogênio. Esta nova via correlaciona-se na cascata descrita anteriormente ao nível de tripanotiona, conforme mostrado na Figura 3.

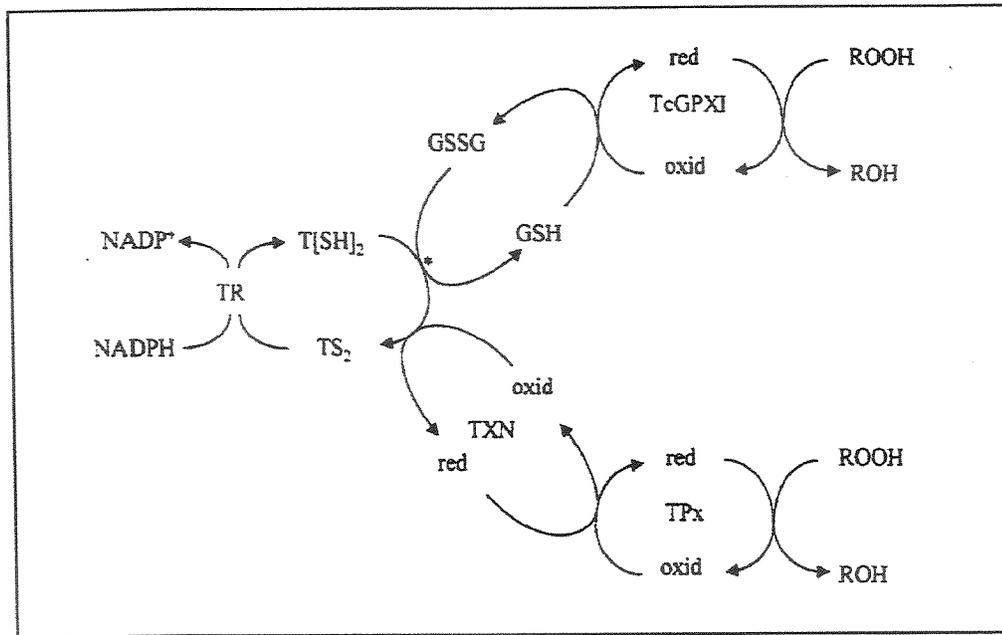


Figura 4 - Esquema proposto para o metabolismo de peróxidos dependente de tripanotona em tripanossomatídeos. A dihidrotripanotona (vide Figura 2), pode também interagir (*) com a glutaciona oxidada (GSSG) via mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para gerar glutaciona reduzida (GSH). TcGPXI (glutaciona peroxidase) reduz hidroperóxidos com gasto de GSH (Reproduzido de, Wilkinson *et al*, 2000).

1.5 Triparedoxina:

Funcionalmente, as triparedoxinas podem ser classificadas como uma tripanotona:peroxidoredoxina oxidoreductase por mediar a transferência de equivalentes reduzidos da tripanotona para a triparedoxina peroxidase.

Em *C. fasciculata* esta proteína (TXN1) corresponde à aproximadamente 5% da proteína solúvel total sendo observada como um monômero de 16 kDa, um motivo WCPPCR similar ao motivo do sítio ativo CGPC da tioredoxina (Nogoceke *et al*, 1997). O sequenciamento parcial da TXN1 em *C. fasciculata*, levou a identificação de uma outra triparedoxina (TXN2) na mesma espécie (Guerrero *et al*, 1999).

Recentemente uma tioredoxina foi identificada em *T.brucei*, sendo considerada uma tioredoxina típica, com algumas propriedades não usuais (substratos, PI, etc). Essa tioredoxina apresenta 56% de semelhança com a encontrada em *Leishmania*, sendo a primeira tioredoxina clássica encontrada em tripanossomatídeos (Reckenfelderbaumer *et al*, 2000).

1.6 Triparedoxina peroxidase

Em *C. fasciculata* a triparedoxina peroxidase se encontra na forma de uma proteína ativa enzimaticamente sendo homo-oligomérico com uma massa molecular de 286 kDa e em altas concentrações (aproximadamente 6% da proteína solúvel total), sendo considerada vital para a sobrevivência do parasita (Nogoceke *et al*, 1997).

O alinhamento da sequência das peroxiredoxinas revelou a descoberta de dois grupos diferentes baseados na presença de um ou dois resíduos de cisteína muito conservados. A triparedoxina peroxidase de *C. fasciculata* pertence à família das peroxiredoxinas com dois motivos VCP conservados nas posições 52 e 173 na sequência de aminoácidos (Tetaud & Fairlamb, 1998).

O *T. cruzi* possui uma TXNPx típica (TcTXNPx) que compartilha uma homologia com a enzima de *C. fasciculata* e com muitas peroxidases tipo peroxiredoxina com dois resíduos de cisteínas conservados, encaixados dentro do motivo VCP (Flohé *et al*, 1999). Além disso, resíduos W87, R128 e W178 que participam da catálise da TXNPx de *C. fasciculata* estão conservadas em posições homólogas (Lopez *et al*, 2000).

Genes homólogos também foram encontrados em *Leishmania major* e *T. brucei rhodesiense*, sugerindo que a TXNPx está presente em toda família de tripanossomatídeos (Lopez *et al*, 2000).

Os componentes do sistema peroxidase dos tripanossomatídeos estão presentes no mesmo compartimento celular, isto é, no citosol (Steinert *et al*, 1999). Entretanto, Wilkinson e colaboradores (Wilkinson *et al*, 2000a) detectaram uma triparedoxina peroxidase localizada na mitocôndria, sugerindo que ou a mitocôndria possui toda a maquinaria redox para manter essa enzima em seu estado reduzido ou a via redox está dividida entre o citosol e a mitocôndria, envolvendo a presença de transportadores de tióis e/ou sistema de redução.

2. Objetivos

Duas cepas de *Trypanosoma cruzi* pertencentes à diferentes linhagens com diferentes resistências ao estresse oxidativo foram selecionadas para esse estudo: cepa Y (linhagem 1) e a cepa Tulahuen 2 (linhagem 2).

Os objetivos desse trabalho foram:

1. Comparar as duas cepas quanto:
 - a. Aos parâmetros bioquímicos, como por exemplo: curva de crescimento, tempo de duplicação, índice de crescimento e correlação entre o número de células e a concentração de proteína total;
 - b. Expressão da triparedoxina peroxidase, incluindo análise dessa expressão durante as diferentes fases do crescimento e
 - c. O metabolismo do H_2O_2 determinando-se a IC50 para cada uma delas
2. Verificar se as células de *T. cruzi* são capazes de se adaptar ao estresse oxidativo.
 - a. pré-tratar com baixas concentrações de H_2O_2 e posteriormente desafiar as células com uma concentração maior de peróxido de hidrogênio;
 - b. verificar se essa adaptação é transitória, fazendo o desafio em diferentes tempos após a exposição a uma baixa concentração de H_2O_2 ;
 - c. verificar se há um aumento da expressão da TXNPx após exposição a diferentes concentrações de H_2O_2 .

3. Materiais e métodos:

3.1 Cultura de células:

T. cruzi epimastigotas (cepa Y e cepa Tulahuen 2) foram crescidos à 28°C em meio LIT (76mM NaCl, 5,9mM KCl, 12,3mM glicose, 78,5mM Na₂HPO₄, 0,56% triptose, 0,56% infusão de fígado, 20µg/ml hemina, pH 7,4) e 10% soro fetal bovino inativado (Camargo, 1964). Após cinco dias de incubação (início da fase estacionária), as células foram coletadas por centrifugação (2500 rpm, 5 min à 4°C) e lavadas uma vez com PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄ e 1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,4) e uma vez com Meio IB (5mM KCl, 80 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 16,2 mM Na₂HPO₄, 3,8 mM NaH₂PO₄, 50 mM glicose, pH 7,4 e 0,15% albumina bovina) (Carnieri *et al*, 1993), sendo posteriormente ressuspensas nesse último meio. A concentração de proteína foi determinada pelo método do Biureto (Gornall *et al*, 1949) na presença de 0,2% deoxicolato. A contagem de células foi feita em Câmara de Neubauer.

3.2 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio:

A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada à 230 nm (coeficiente de extinção de 81 M⁻¹ cm⁻¹) (Carnieri *et al*, 1993) antes de cada experimento.

3.3 Metabolismo de H₂O₂ :

Foram inoculadas 5,2 x 10⁶ céls/ml e após 5 dias de crescimento as células foram coletadas por centrifugação, lavadas uma vez com PBS, outra com meio IB e ressuspensas neste último. As células foram incubadas em meio IB com vermelho de fenol (5mg para cada 100ml IB) à 30°C, e no tempo 0 foi adicionado 20µM H₂O₂. Nos tempos especificados

na legenda da Figura alíquotas foram retiradas e adicionadas à 4 µl da enzima “horseradish peroxidase” (HRP), centrifugada à 10.000 rpm por 2 min e ao sobrenadante adicionou-se 20 µl de NaOH 2M. A absorbância foi medida à 610 nm para determinar a concentração de H₂O₂ não metabolizado, como descrito por Carnieri *et al* (1993). Este método baseia-se na reação do vermelho de fenol com o peróxido de hidrogênio catalisada pela HRP. Para este experimento foram realizados 5 repetições em dias diferentes com duplicatas a cada dia.

3.4 Tratamento das células de *Trypanosoma cruzi* com H₂O₂ e determinação da viabilidade celular:

Epimastigotas ($5,2 \times 10^6$ céls/ml) foram ressuspensos em meio IB e incubadas na presença de diferentes concentrações de H₂O₂ à 30°C por 30 min. Após este tempo, as células foram centrifugadas à 2500 rpm por 5 min à 4°C, ressuspensas em meio de cultura LIT e incubadas à 28°C em shaker (50 rpm). Nos dias subsequentes alíquotas foram retiradas para se realizar a contagem das células em câmara de Neubauer (Carnieri *et al*, 1993).

Nos experimentos de desafio, após a exposição à 20µM de H₂O₂, as células foram submetidas à concentrações maiores de H₂O₂, conforme especificado nas legendas das figuras e procedeu-se ao mesmo protocolo descrito anteriormente. Para este experimento foram realizados 5 repetições em dias diferentes com duplicatas a cada dia.

3.5 Preparo do Extrato Protéico Total de *Trypanosoma cruzi* para Western

blotting:

Após o tratamento com H₂O₂ como descrito acima para se determinar a viabilidade celular, as células foram centrifugadas, ressuspensas em PBS e adicionou-se tampão de amostra que continha 20% azul de bromofenol 0,1% e 4% β-mercaptoetanol diluídos em uma solução-mãe, composta de 32 % tampão C (0,5M Tris-base pH 6,8 e 0,4% SDS 20%), 38,5% glicerol, 25,6% SDS 20% e 1,3% EDTA 0,2M. Amostras foram separadas sem o tampão de amostra para se determinar a concentração de proteína pelo método do Biureto (Gornal *et al*, 1949) na presença de 0,2% de deoxicolato.

Antes de sua aplicação no gel, o extrato foi incubado por 5 min à 100°C.

Para este experimento foram realizados 3 repetições em dias diferentes com amostras de dias diferentes

3.6 Detecção da triparedoxina peroxidase através da análise por Western

blotting:

A eletroforese foi feita em gel de poliacrilamida NuPage Gel 10% BT 10 no sistema XCell II™ Mini Cell (Novex™), tendo como tampão de corrida uma solução de 2,3 mM MES, 2,5 mM Tris, pH 7,3, 0,15 mM SDS e 0,04 mM EDTA filtrada na hora do uso. Condições de corrida: 200V, 120mA por 35 min.

A transferência para uma membrana de nitrocelulose foi feita por 35 min, mantendo-se a voltagem constante a 25 V. O tampão de transferência era composto de 12mM Tris Base, pH 8,3, 96mM glicina e 0,2M metanol.

Para a imunodeteção, a membrana foi bloqueada com 4% de leite em pó desnatado em PBS por 30 min e logo em seguida incubada por 16hs com o anticorpo primário (contra triparedoxina peroxidase de *C. fasciculata*) numa diluição 1:100, em PBS/ 0,1% Tween 20.

Após esta incubação, a membrana foi lavada com PBS/0,1% Tween 20 e incubada por 1 h com anticorpo secundário numa diluição 1:2500 em tampão Tris/Na⁺/Mg²⁺ (100mM Tris-Cl, pH 9,5, 100mM NaCl e 5mM MgCl₂) e lavada com PBS ao término da incubação.

Antes da revelação, a membrana foi incubada por 10 min no tampão Tris/Na⁺/Mg²⁺ acima descrito. A revelação para a fosfatase alcalina foi feita usando-se 33µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate - Promega) e 66µl de NBT (nitro blue tetrazolium - Promega) em 10 ml de tampão Tris/Na⁺/Mg²⁺.

A densitometria das bandas do Western blotting foi feita utilizando-se o programa ImageMaster[®] Total Lab, versão 1.0 da Amershan Pharmacia Biotech.

3.7 Obtenção do anticorpo primário

O anticorpo foi obtido por imunizações com 3 e 30 µg de proteína, administrada em intervalos de 7 e 15 dias em camundongos. O antígeno foi administrado em adjuvante de Freund completo no primeiro inóculo e um adjuvante de Freund incompleto para os inóculos subseqüentes. As rotas de imunização foram intraperitoneal nos camundongos. Os antígenos usados foram triparedoxina peroxidase recombinante de *C. fasciculata* (Cf21). Após 6 imunizações, o camundongo foi sangrado por punção do plexo radial. O sangue coletado foi coagulado à 37°C por 1 h, permanecendo depois à 4° C durante à noite. O soro foi coletado por centrifugação à 2500 min e armazenado à 20°C. Este anticorpo foi obtido

pelo Prof. Dr. Jorge Alberto López Rodriguez no laboratório da Prof. Dra. Maria Júlia Manso Alves da Universidade de São Paulo (USP)

4. Resultados

4.1 Comparação de parâmetros bioquímicos das cepas Y e Tulahuen 2 de *Trypanosoma cruzi*:

4.1.1 Curva de crescimento:

Em seguida, determinou-se a curva de crescimento das duas cepas, representadas na Figura 5, onde foram feitas as contagens das células a partir do segundo dia (início de fase log) até o oitavo dia (fase estacionária).

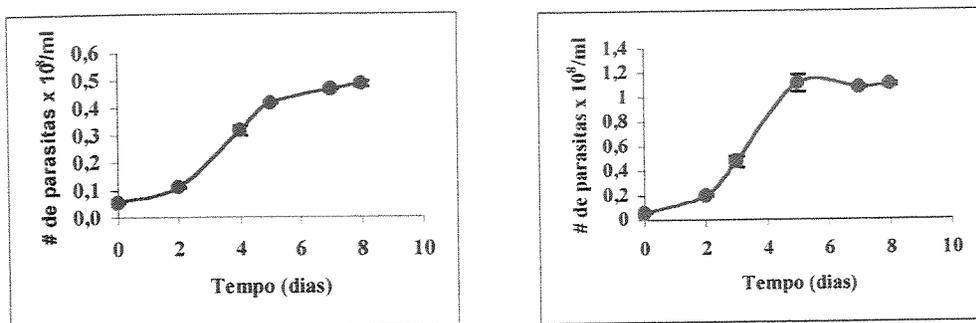


Figura 5 – Curva de crescimento de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. $5,2 \times 10^6$ céls/ml foram incubadas à 30°C em meio LIT, conforme descrito em Materiais e Métodos. Nos dias especificados, alíquotas foram retiradas e o número de células foi determinado pela contagem em Câmara de Neubauer (•) Y e (•) Tulahuen 2.

Iniciando a curva de crescimento com uma concentração de $5,2 \times 10^6$ céls/ml, no oitavo dia de crescimento verificou-se que a cepa Tulahuen 2 atingiu um maior número de células (cerca de duas vezes) em relação a cepa Y ($1,10 \times 10^8$ e $4,93 \times 10^7$ céls/ml, respectivamente).

4.1.2 Tempo de duplicação e índice de crescimento:

Através da curva de crescimento da Figura 5, foram determinados o índice de crescimento e o tempo de duplicação das duas cepas.

O tempo de duplicação (TD) foi determinado de acordo com a fórmula (Toma *et al*, 2000):

$$TD = \frac{\ln 2 (T2 - T1)}{2,3 \log (N1/N0)}$$

Onde: T2 - tempo (hs) relativo ao final da fase log, T1 tempo (hs) relativo ao início da fase log, N1 número de parasitas em T2 e N0 número de parasitas em T1.

O índice de crescimento (InC) foi calculado a partir da fórmula (Martinez-Diaz *et al* 2001):

$$InC = \frac{\text{Número final de parasitas}}{\text{Número inicial de parasitas}}$$

Para a cepa Y o tempo de duplicação foi de 37,52 e o índice de crescimento foi de $7,97 \pm 0,92$, enquanto que, para a cepa Tulahuen 2 o TD foi de 28,73 e o InC foi de $12,97 \pm 1,06$. Estes resultados mostram que a cepa Tulahuen 2 é capaz de se dividir em uma taxa maior do que a cepa Y e portanto apresenta um índice de crescimento maior (cerca de 1,6 x).

4.1.3 Correlação entre o número de células e a concentração total de proteína:

Na Figura 6, encontra-se representado o número de células correspondente à 1mg/ml de proteína total para ambas as cepas.

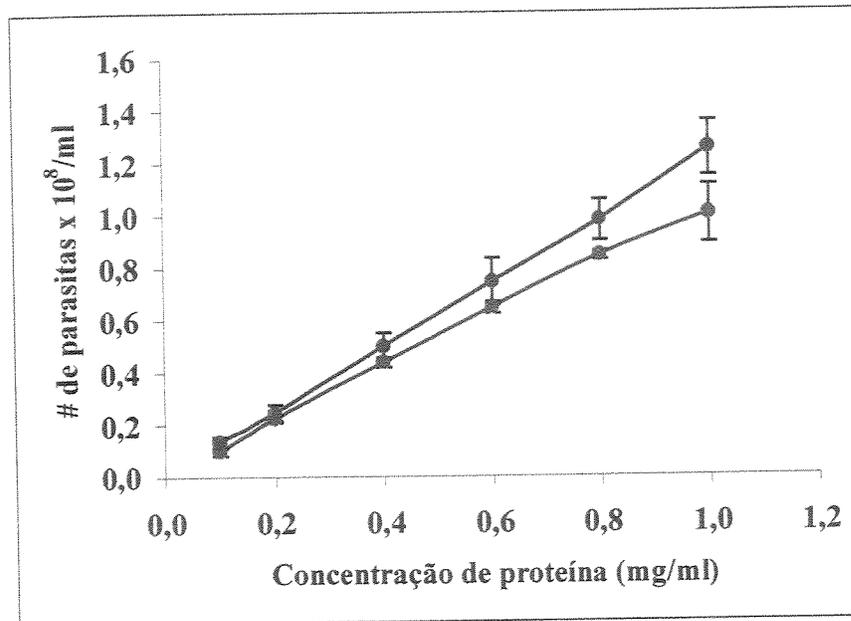


Figura 6 – Relação mg/ml de proteína total com o número de células de *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotas em início de fase estacionária foram ressuspensos em PBS, alíquotas foram retiradas para a contagem das células e determinação da concentração de proteína como descrito em Materiais e Métodos.

Nestes resultados obteve-se uma correlação de $1,25 \pm 0,1 \times 10^8$ céls/ml para a cepa Y e $1,00 \pm 0,18 \times 10^8$ céls/ml para a cepa Tulahuen 2. Apesar da diferença entre as cepas não ser significativa observa-se que essa relação é linear nas concentrações estudadas.

Para padronizar os experimentos, todos foram realizados considerando-se o número de células, ao invés da concentração de proteína total como utilizada na maior parte dos trabalhos.

4.2 Comparação da concentração da Triparedoxina peroxidase (TXNPx) nas duas cepas de *Trypanosoma cruzi*

Com o objetivo de se estabelecer a concentração de TXNPx nas duas cepas estudadas, preparou-se amostra para o Western blotting de acordo com o descrito em Materiais e

Métodos. Verifica-se na Figura 7, que a cepa Tulahuen 2 possui uma maior concentração (aproximadamente 63% maior) em relação a cepa Y.

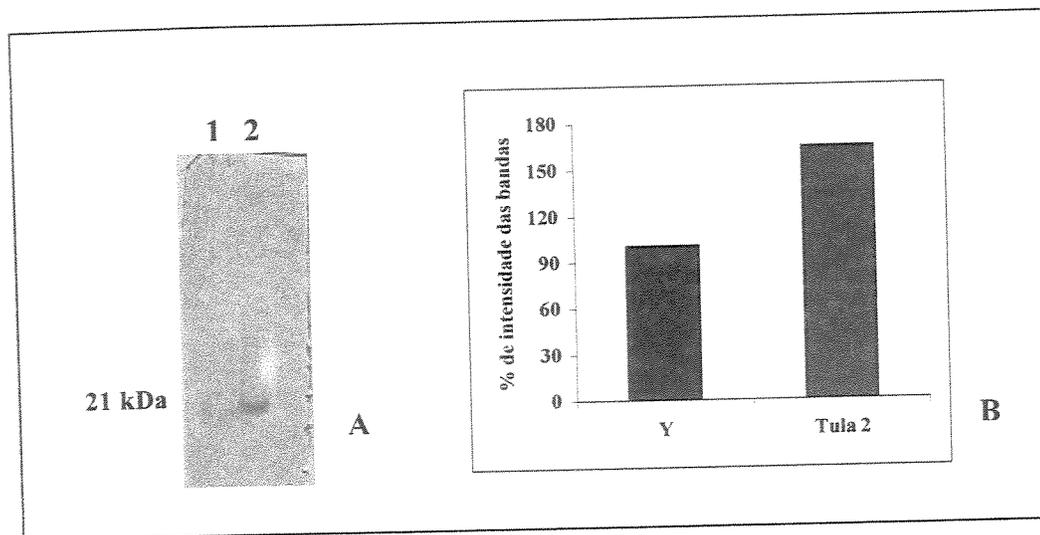


Figura 7 – Determinação da concentração da triparedoxina peroxidase por Western blotting, em diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotas ($5,2 \times 10^6$ céls/ml) foram incubados por cinco dias à 30°C . Após esse período, foram coletados por centrifugação e as amostras para Western blotting preparadas de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. **A** Western blotting: anticorpo primário anti-TXNPx de *C. fasciculata* dil 1:100 e $90\mu\text{g}$ proteína total aplicado e **B** % de intensidade das bandas referentes à TXNP. Dados calculados através do programa ImageMaster Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech.

Nos experimentos de Western blotting utilizou-se como anticorpo primário um anticorpo contra TXNPx de *C. fasciculata* que apresenta uma homologia de 71% com a TXNPx de *T. cruzi* (analisado pelo BLAST).

4.3 Comparação da concentração da Triparedoxina peroxidase (TXNPx) nas diferentes fases do crescimento do parasita

Com o objetivo de se verificar se há um aumento da expressão da TXNPx na fase estacionária e se a mesma apresenta alguma correlação com o crescimento celular,

epimastigotas foram isolados em diferentes fases de crescimento (2, 4 6 e 8 dias), e comparou-se a expressão da TXNPx por Western blotting, utilizando o mesmo anticorpo descrito anteriormente.

O mesmo padrão foi observado para ambas as cepas, conforme mostrado nas Figuras 8 (cepa Tualhuen 2) e 9 (cepa Y). De um modo geral, durante a fase lag, fase em que as células estão se adaptando ao meio rico em nutrientes, há um aumento da expressão dessa proteína que diminui cerca de 30% com a passagem para a fase log. No início da fase estacionária há um aumento da expressão equivalente ao observado na fase lag que com o avanço da fase estacionária decai.

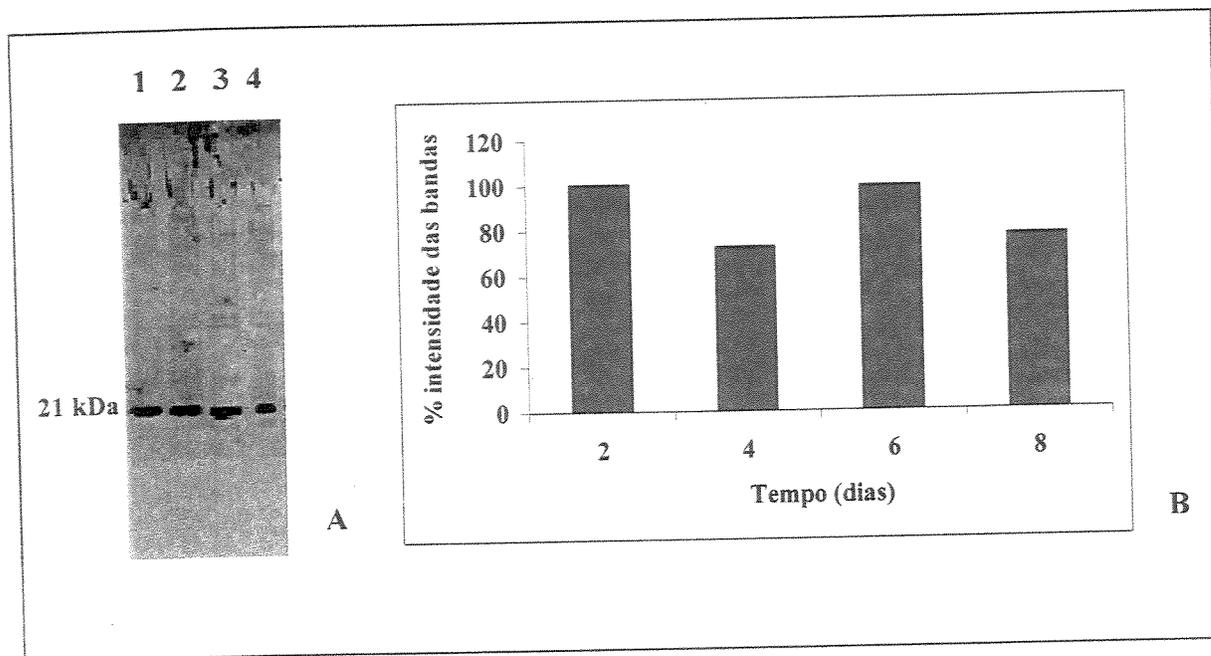


Figura 8 - Análise por Western blotting de extratos lisados de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* isolados em diferentes dias de crescimento. Epimastigotas (cepa Tulahuen 2) foram isolados em diferentes dias de crescimento e o extrato total dessas amostras foi preparado, conforme descrito em Materiais e Métodos. **A.** Western blotting: Anticorpo primário anti-TXNP *C. fasciculata* dil. 1:100 (amostras 90 µg proteína). **Linha 1** - 2º dia, **Linha 2** - 4º dia, **Linha 3** - 6º dia, **Linha 4** - 8º dia. **B.** % de intensidade das bandas referentes à TXNPx em relação ao controle. Dados calculados utilizando-se o programa ImageMaster Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech.

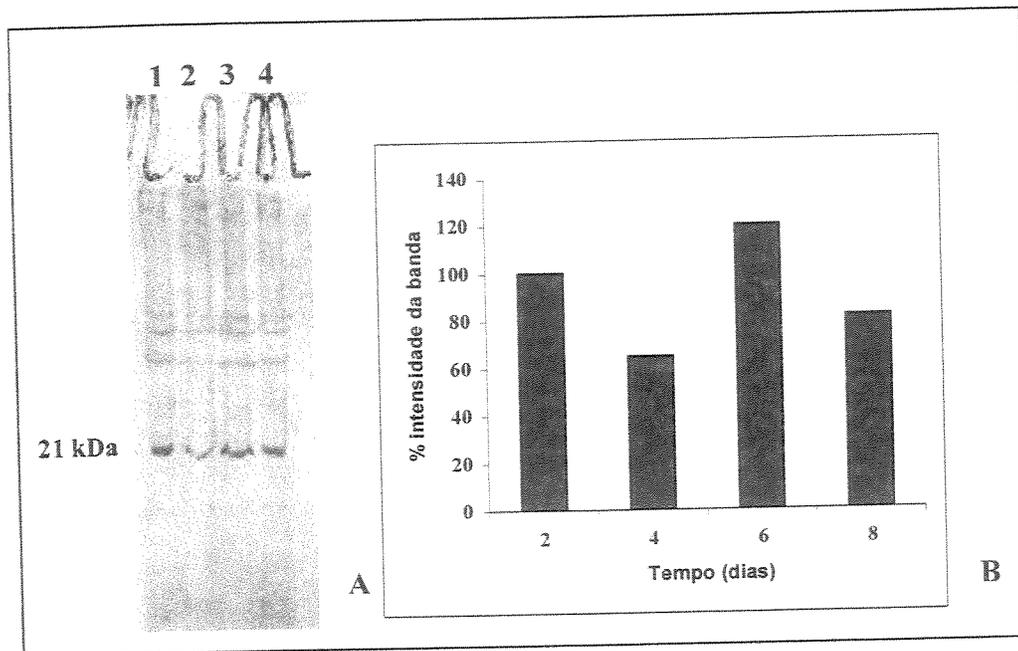


Figura 9 - Análise por Western blotting de extratos lisados de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* isolados em diferentes dias de crescimento. Epimastigotas (cepa Y) foram isolados em diferentes dias de crescimento e o extrato total dessas amostras foi preparado, conforme descrito em Materiais e Métodos. **A.** Western blotting: Anticorpo primário anti-TXNPx *C. fasciculata* dil. 1:100 (amostras 90 µg proteína) **Linha 1 - 2º dia, Linha 2 - 4º dia, Linha 3 - 6º dia, Linha 4 - 8º dia.** **B.** % de intensidade das bandas referentes à TXNPx em relação ao controle. Dados calculados utilizando-se o programa ImageMaster Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech.

4.4 Metabolismo do peróxido de hidrogênio

Os resultados mostrados na Figura 10, indicam que o *T. cruzi* é capaz de metabolizar H_2O_2 na presença de glicose. No tempo zero, foi adicionado 20µM H_2O_2 e nos tempos especificados, alíquotas foram retiradas para se determinar a concentração de H_2O_2 restante.

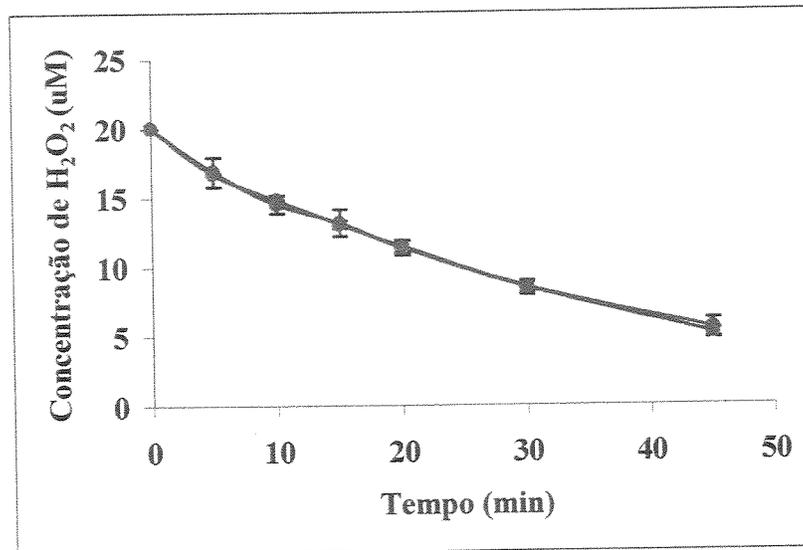


Figura 10– Metabolismo de peróxido de hidrogênio em *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. Epimastigotas ($5,2 \times 10^6$ cél/ml) foram incubadas à 30°C em meio IB contendo 50 mg l^{-1} de vermelho de fenol. H_2O_2 ($20 \mu\text{M}$) foi adicionado ($t=0$) e alíquotas foram retiradas nos tempos indicados. A dosagem de H_2O_2 restante foi feita conforme descrito em Materiais e Métodos. (•) Y e (•) Tulahuen 2.

Na concentração $5,2 \times 10^6$ céls/ml, não foi possível verificar nenhuma diferença na velocidade de metabolização entre as duas cepas. Aumentando a concentração de células para 5×10^7 céls/ml também não foi possível estabelecer uma diferença significativa entre as duas cepas apesar de com 15 min o peróxido de hidrogênio adicionado ter sido praticamente metabolizado.

Estes experimentos também foram repetidos na ausência de glicose adicionada obtendo-se um padrão semelhante (dados não mostrados).

4.5 Citotoxicidade ao peróxido de hidrogênio

A Figura 11 representa a % de inibição da proliferação da cepa Y após a exposição à diferentes concentrações de H_2O_2 ($80\text{-}120 \mu\text{M}$). As células foram incubadas em meio IB na

presença de diferentes concentrações de H_2O_2 por 30 min à $30^\circ C$. Após esse período as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e a contagem das células foi feita no quinto dia de crescimento (início de fase estacionária). Observou-se que ocorreu uma inibição de aproximadamente 20, 29, 55, 68 e 80 % quando as células foram tratadas com 80, 90, 100, 110 e 120 μM , respectivamente. Em relação às outras concentrações testadas (140 e 150 μM), a inibição do crescimento foi de 100%.

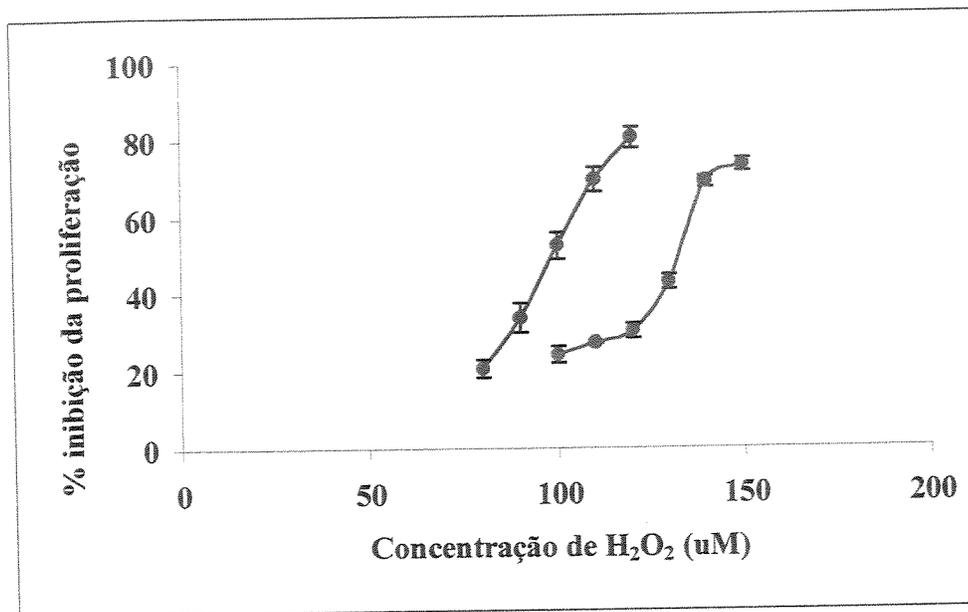
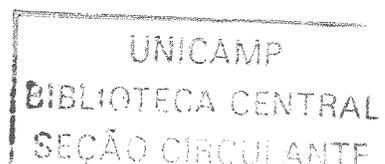


Figura 11 – Inibição da proliferação pelo H_2O_2 de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. 5.2×10^6 céls/ml foram expostas à diferentes concentrações de H_2O_2 e incubadas por 30 min à $30^\circ C$. Após este período foram centrifugadas e ressuspensas em meio LIT e as alíquotas foram retiradas no quinto dia de cultura para se determinar o número de células. (•) Y e (◻) Tulahuen 2.

Com relação a cepa Tulahuen, o mesmo procedimento foi feito obtendo-se uma inibição de aproximadamente 24, 27, 30, 43, 69 e 73% quando as células foram tratadas com 100, 110, 120, 130, 140 e 150 μM respectivamente.



A partir dos dados da Figura 11 a IC 50 do peróxido de hidrogênio para cada cepa foi determinada, conforme descrito por Kelly e colaboradores (Kelly *et al*, 1993) (Tabela 1).

Cepa	IC50
Y	98,54 ± 1,66
Tulahuen 2	133,09 ± 2,02

Tabela 1 - Concentração de H₂O₂ capaz de inibir 50% da proliferação dos parasitas (IC 50). Epimastigotas ($5,2 \times 10^6$ céls/ml) foram tratados com diferentes concentrações de H₂O₂ e incubados por 30 min à 30°C. Após este período foram centrifugadas e ressuspensas em meio LIT. Alíquotas foram retiradas no quinto dia de cultura para se determinar o número de células.

Utilizando-se a IC50 para o H₂O₂ determinada em meio IB, o mesmo protocolo foi repetido em meio de cultura onde observou-se uma inibição da proliferação abaixo do observado em meio IB. Para a cepa Y utilizou-se uma concentração de 100µM H₂O₂ obtendo-se uma % de inibição de $27,31 \pm 3,62$ e para a cepa Tulahuen 2 a concentração de 133µM levou a uma inibição de $12,93 \pm 2,82$. Esses resultados reforçam os obtidos anteriormente que relatam a reação dos radicais livres com os constituintes do meio de reação (Gadelha *et al*, 1997) indicando que as EROs não podem existir em meio de cultura por longos tempos (Kim *et al*, 2001).

Através dos resultados obtidos, a cepa Y por ser mais sensível ao estresse oxidativo provocado pelo H₂O₂, foi selecionada para dar continuidade aos experimentos de adaptação ao estresse oxidativo uma vez que uma pequena alteração na expressão da enzima seria mais evidente do que com a outra cepa que já apresenta um nível basal bem alto.

4.6 Efeito do peróxido de hidrogênio na proliferação dos parasitas

A Figura 12 representa o estímulo da proliferação quando epimastigotas da cepa Y foram tratadas com baixas concentrações de H_2O_2 (2.5 – 20 μM). Observa-se que a concentração capaz de estimular um maior crescimento foi a de 15 μM ($19.1 \pm 3.4\%$).

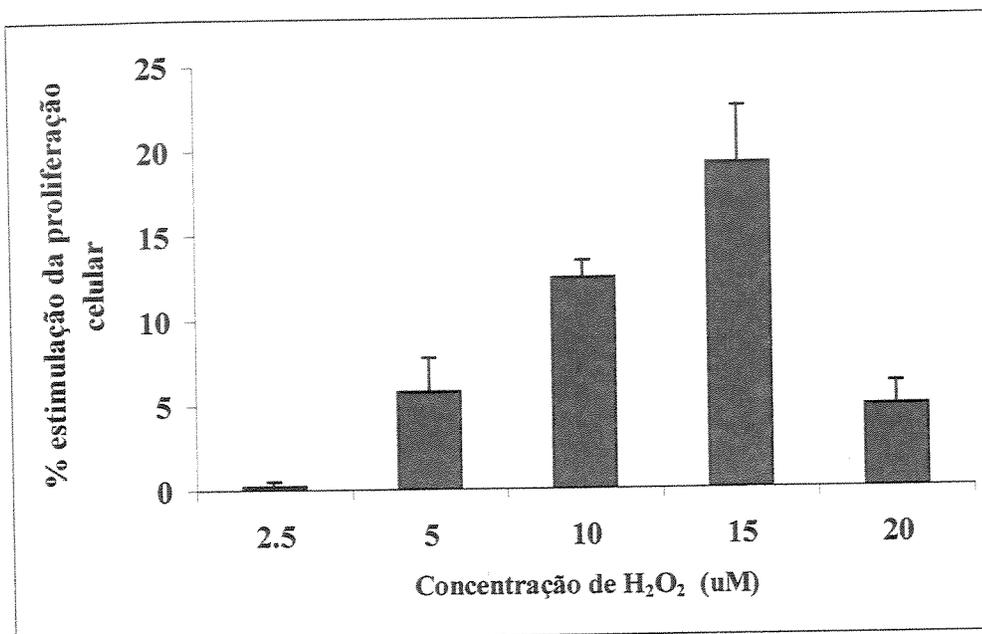


Figura 12 – Estímulo da proliferação de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) tratadas com baixas concentrações de H_2O_2 . 5.2×10^6 céls/ml foram expostas à diferentes concentrações de H_2O_2 e incubadas por 30 min à $30^\circ C$. Após este período foram centrifugadas e ressuspensas em meio LIT, conforme descrito em Materiais e Métodos. No quinto dia de cultura determinou-se o número de células pela contagem em câmara de Neubauer.

4.7 Adaptação ao estresse oxidativo

Com o objetivo de se estudar a adaptação ao estresse oxidativo os epimastigotas foram pré-tratados com uma dose atóxica de peróxido de hidrogênio (20 μM) e após 1h30 min de incubação à $30^\circ C$, foram desafiadas com uma concentração citostática para o

parasita (100 μ M) e incubadas por mais 30 min à 30 °C. Em seguida foram centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e no quinto dia de crescimento, foram feitas as contagens das células.

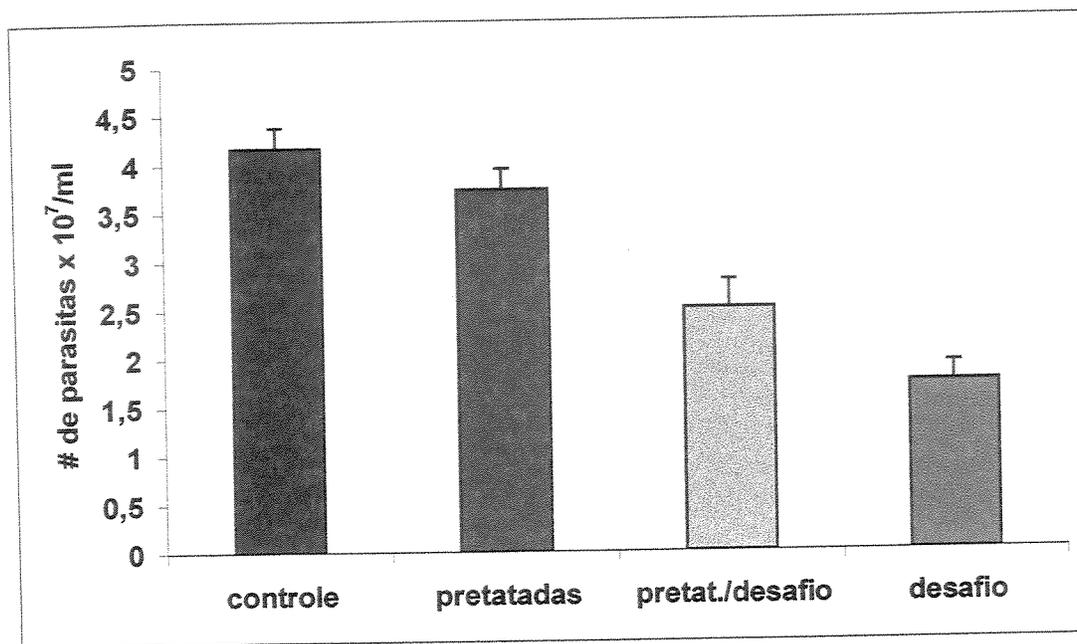


Figura 13 – Adaptação ao peróxido de hidrogênio por epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após o pretratamento com peróxido de hidrogênio (cepa Y). $5,2 \times 10^6$ céls/ml foram expostas à 20 μ M de H₂O₂ e incubadas por 1h30 min, à 30°C e em seguida, foram desafiadas com 100 μ M de H₂O₂ e incubadas nas mesmas condições. Após 1h30 min, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio LIT, conforme descrito em Materiais e Métodos. Após 5 dias, alíquotas foram retiradas, determinando-se o número de células em câmara de Neubauer.

Observa-se que as células que foram pré-tratadas com uma baixa concentração (39,8% de inibição em relação ao controle) foram capazes de resistir melhor ao desafio com uma concentração maior do que as que não foram pré-tratadas (58,40% de inibição em relação ao controle).

Controles foram feitos incubando-se $5,2 \times 10^6$ céls/ml por 30min à 30°C, com 20 μ M e 100 μ M para se determinar a % de morte celular durante o período de incubação de 30min. Na concentração mais baixa o H₂O₂ mostrou uma inibição não significativa ($8,35 \pm 1,83$) enquanto que, na concentração mais alta levou à $33,64 \pm 3,96$ % de morte. Assim, durante a incubação com o H₂O₂ ocorre 34% de morte da população sendo que o restante das células é capaz de se adaptar ao estresse oxidativo.

Com o objetivo de se verificar se essa adaptação era transiente, as células foram pré-tratadas 20 μ M e posteriormente desafiadas em diferentes tempos com 100 μ M H₂O₂. Os resultados apresentados na Figura 14, demonstram que no quinto dia de crescimento até 1 h 30 min de incubação após o estímulo com 20 μ M ainda é possível se observar uma adaptação ao estresse oxidativo quando essas células são posteriormente desafiadas com 100 μ M. Com 2 h os resultados são muito semelhantes as células que foram apenas desafiadas e portanto, sem significância. Nos tempos de 30 min e 1h na concentração de 20 μ M obteve-se um estímulo de 9,4 e 2,3 % respectivamente.

O pré-tratamento com 20 μ M H₂O₂ não levou a uma perda da viabilidade celular significativa. Nos experimentos de desafio as células são primeiramente expostas à 20 μ M H₂O₂ por 1h30 min e depois são desafiadas com 100 μ M H₂O₂ por mais 30 min (Figura 13). Os controles só com 20 μ M ficam expostos por 1 h30 min e assim observamos uma diferença entre os experimentos de estímulo onde as células eram expostas à 20 μ M H₂O₂ por apenas 30 min ($5,31 \pm 1,4$ % de estímulo) e esses resultados mostraram uma inibição de 10,4% em relação ao controle.

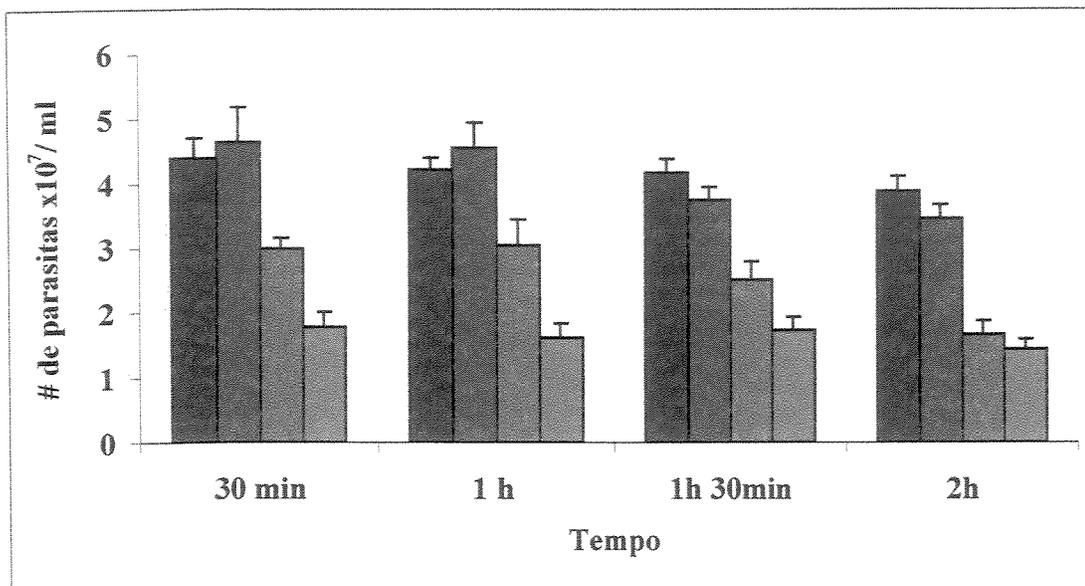


Figura 14 – Adaptação ao H₂O₂ por epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) após o pré-tratamento com 20 μM H₂O₂. 5.2 x 10⁶ céls/ml foram expostas à diferentes concentrações de H₂O₂ e incubadas por diferentes tempos à 30°C. Após o período de incubação, foram centrifugadas e ressuspensas em meio LIT, conforme descrito em Materiais e Métodos. . (■) controle (▒) células tratadas com 20 μM de H₂O₂: (⊠) 20 μM de H₂O₂ e 100 μM, (◼) 100 μM de H₂O₂

Observa-se que esta adaptação é temporária, ou seja, o *T. cruzi* apresenta uma adaptação máxima até 1h 30 min. Após esse período, o pré tratamento não resulta mais em uma maior proteção das células, quando essas são submetidas a concentrações sub-letais do oxidante.

Verificou-se um aumento da expressão da TXNPx após incubação das células com diferentes concentrações de H₂O₂ (2,5 – 500 μM). Os resultados apresentados na Figura 15 representam as células incubadas com baixas concentrações (2,5; 5; 10; 15 e 20 μM) e na Figura 16 com altas concentrações (40; 60; 80; 100; 150; 250 e 500 μM) durante 30 min à 30°C.

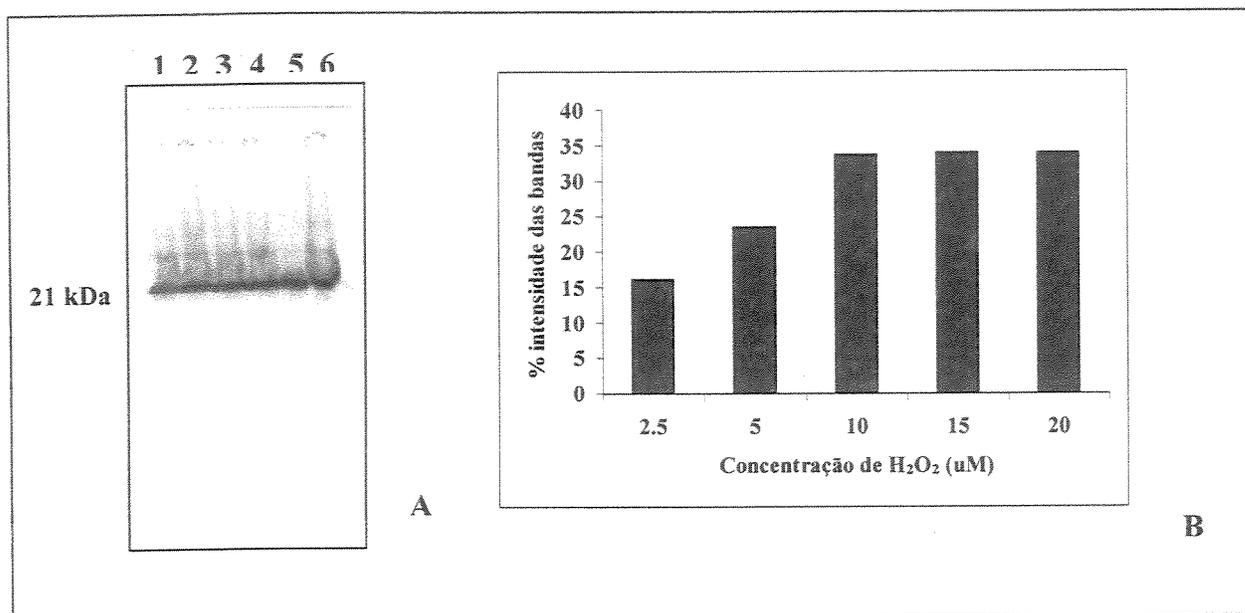


Figura 15 – Detecção da TXNPx através de extratos lisados de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratados com baixas concentrações de peróxido de hidrogênio. $5,2 \times 10^6$ céls/ml foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ e após 30 min o extrato total dessas amostras foi preparado, conforme descrito em Materiais e Métodos. **A.** 80μg proteína total foram aplicados. **Linha 1-** controle e células tratadas com H₂O₂ (μM): **Linha 2 – 2,5; Linha 3 – 5; Linha 4 – 10; Linha 5 - 15 e Linha 6 – 20.** Anticorpo primário anti TXNPx de *T.cruzi* dil. 1:200. **B.** % de intensidade das bandas referentes à TXNPx em relação ao controle. Dados calculados utilizando-se o programa ImageMaster Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech.

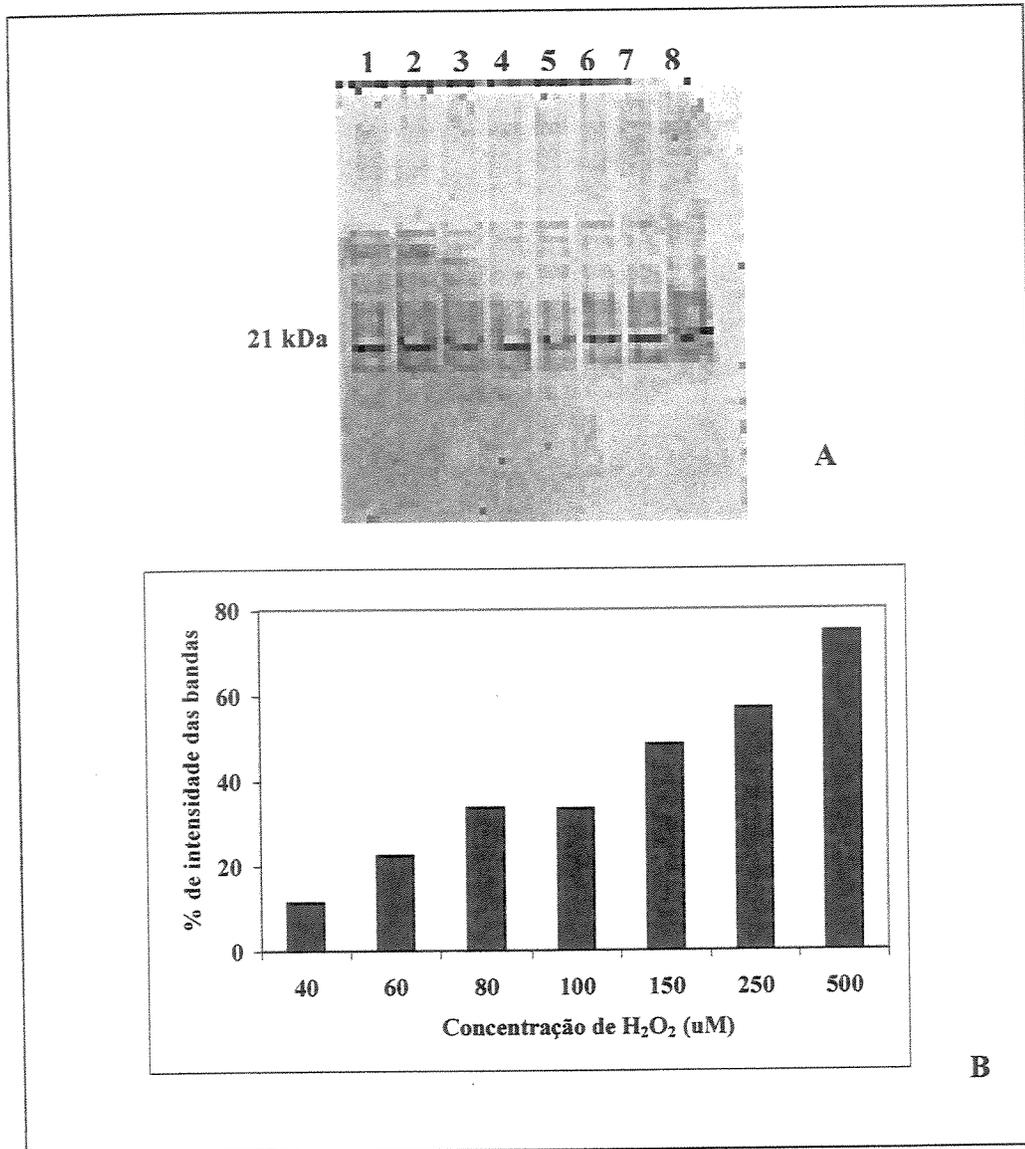


Figura 16 – Detecção da TXNP através de extratos lisados de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratados com altas concentrações de peróxido de hidrogênio. $5,2 \times 10^6$ céls/ml foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ e após 30 min o extrato total dessas amostras foi preparado, conforme descrito em Materiais e Métodos. **A.** 50 μg proteína total foram aplicados. **Linha 1**-controle e células tratadas com H₂O₂ (μM): **Linha 2** – 40, **Linha 3** – 60, **Linha 4** – 80, **Linha 5** – 100, **Linha 6** – 150, **Linha 7** – 250 e **Linha 8** - 500. Anticorpo primário anti TXNPx de *C. fasciculata* dil. 1:100. **B.** % de intensidade das bandas referentes à TXNPx em relação ao controle. Dados calculados utilizando-se o programa ImageMaster Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia biotech.

Após exposição à 40, 60, 80, 100, 150, 250 e 500 μ M H₂O₂ houve um aumento na expressão da TXNPx de aproximadamente 11; 22; 33; 33; 48; 56 e 74% respectivamente.

O aumento de 74 % observado na concentração de 500 μ M poderia ser o resultado de uma indução rápida na célula na tentativa de se proteger dessa concentração considerada letal. Para verificar o que estava acontecendo durante os 30 min de incubação com esta concentração, as células foram incubadas nos tempos indicados na legenda. O resultado mostra que após 2,5 min de exposição à esta concentração já começa a ocorrer um aumento na expressão desta enzima, confirmando a hipótese levantada anteriormente.

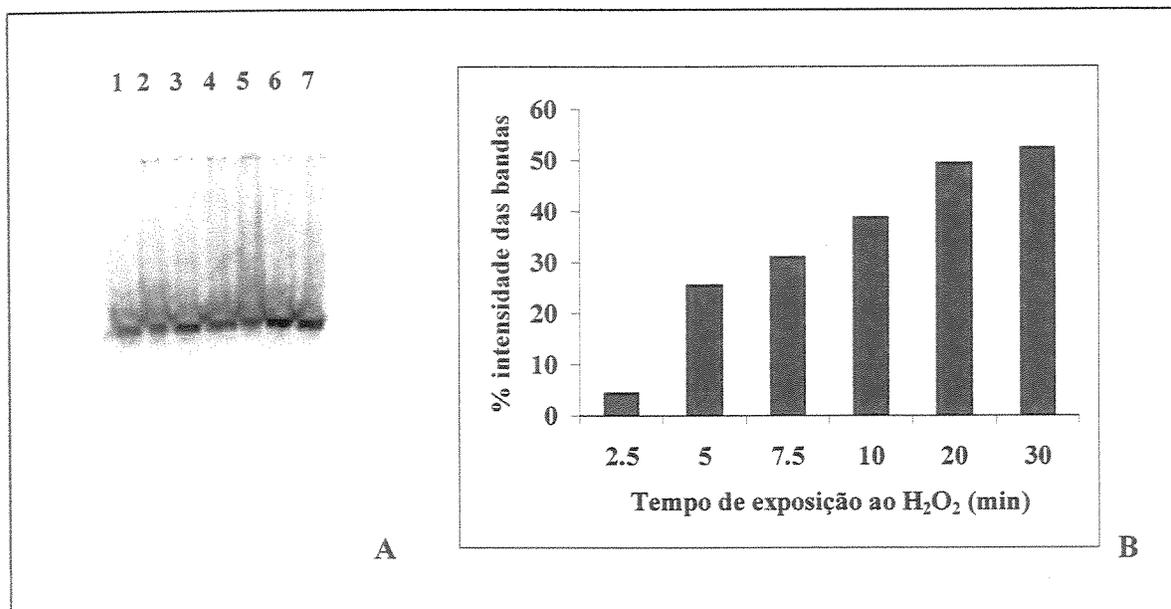


Figura 17 – Detecção da TXNPx através de extratos lisados de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratados com alta concentração de peróxido de hidrogênio. Epimastigotas ($5,2 \times 10^6$ cél/ml) foram tratados com $500 \mu\text{M}$ H₂O₂ e nos tempos determinados o extrato total dessas amostras foi preparado, conforme descrito em Materiais e Métodos. **A.** $80 \mu\text{g}$ proteína total foram aplicados. **Linha 1**-controle e células tratadas com $500 \mu\text{M}$ de H₂O₂ nos tempos (min): **Linha 2** – 2,5, **Linha 3** – 5, **Linha 4** – 7,5, **Linha 5** – 10 **Linha 6** – 20 e **Linha 7**- 30 Anticorpo primário anti TXNPx *T.cruzi* dil. 1:200. **B.** % de intensidade das bandas referentes à TXNPx em relação ao controle. Dados calculados utilizando-se o programa ImageMaster Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech.

5. Discussão

A doença de Chagas possui uma ampla variedade de manifestações clínicas que podem ser resultados ou de uma heterogeneidade entre os isolados de *T. cruzi* e/ou das diferenças genéticas na resposta imune do hospedeiro. Uma característica marcante do *T. cruzi* é sua heterogeneidade em relação as propriedades biológicas. Diferenças na taxa de crescimento, infectividade, tropismo por tecidos, composição antigênica, virulência e morbidade em modelos animais e suscetibilidade ao soro imune e drogas quimioterapêuticas foram descritos (Martinez-Díaz *et al*, 2001).

Alguns parâmetros bioquímicos foram determinados para as cepas estudadas, como curva e índice de crescimento, e tempo de geração onde a cepa Tulahuen 2 apresentou uma taxa de crescimento maior do que a Y atingindo a fase logarítmica mais rápido do que a outra (Figura 5, linha vermelha). A correlação entre o número de células e mg/ml de proteína total das cepas também foi determinada, para se estabelecer o melhor parâmetro a ser utilizado nos experimentos (Figura 6). Observou-se que não existe uma diferença significativa nesta relação entre as duas cepas, mas verificou-se que esta relação é linear em todas as concentrações estudadas. Apesar da diferença não ser significativa, todos os experimentos foram padronizados utilizando o número de células.

Como a tripanotona peroxidase faz parte da cascata de detoxificação de peróxidos (Figura 3), a concentração da triparedoxina peroxidase, foi estabelecida para ambas as cepas. Verificou-se que a cepa Tulahuen 2 possui uma maior concentração desta enzima (Figura 7 A linha 2 e B, barra vermelha) podendo se especular que essa cepa teria uma resistência maior ao estresse oxidativo. Poderia também se especular que a Tulahuen 2 apresentando uma maior concentração de triparedoxina peroxidase em função da cascata de

detoxificação, teria uma menor concentração de GSH e tripanotona livre que levaria a um aumento da sensibilidade ao beznidazole como relatado na literatura (Aguilar *et al*, 1987).

Para verificar se a triparedoxina peroxidase estaria tendo um aumento de sua expressão nas diferentes fases do crescimento de *T. cruzi*, amostras para Western blotting foram preparadas nos dias referentes à fase lag (dia 2), em que as células estão se adaptando ao meio rico em nutrientes, fase logarítmica (dia 4), onde há uma proliferação intensa e fase estacionária (início dia 6 e dia 8) (Figuras 8 e 9). Nas duas cepas há um aumento durante a fase lag que decai nos dias subseqüentes tendo novamente um aumento no início da fase estacionária, como observado em leveduras (Longo *et al*, 1999). Esses resultados indicam que a triparedoxina peroxidase não está diretamente envolvida na proliferação celular, como já descrito para as tioredoxinas. Em mamíferos, quando os níveis de tioredoxinas são aumentados há um aumento do crescimento celular e resistência aos mecanismos normais de morte celular programada (Powis *et al*, 2000).

Com relação ao metabolismo de H_2O_2 nenhuma diferença significativa foi observada entre as duas cepas (Figura 10). O mesmo experimento foi realizado na ausência de glicose adicionada ao meio (dados não mostrados) e também nenhuma diferença significativa foi observada, provavelmente por causa da grande quantidade de substratos endógenos existente neste parasita, como demonstrado por Carnieri e colaboradores (Carnieri *et al* 1993).

Para se determinar a IC 50 para o H_2O_2 para cada cepa, as mesmas foram expostas a diferentes concentrações de H_2O_2 e os resultados confirmaram uma maior resistência aos níveis de estresse oxidativo para a cepa Tulahuen 2 em relação a cepa Y (Tabela 1), o que já era esperado uma vez que a primeira apresenta uma maior concentração de TXNPx (Figura 7). Wilkinson e colaboradores mostraram que quando esta enzima foi superexpressa

no parasita e exposta ao H_2O_2 estes parasitas apresentaram um aumento de 2x na resistência em relação ao controle (Wilkinson *et al*, 2000a).

O estresse oxidativo pode ser resultado do aumento a exposição de oxidantes reativos ou na diminuição da proteção contra estes oxidantes (Kim *et al* 2001). O H_2O_2 é gerado fisiologicamente, em baixas concentrações como resultado do metabolismo celular. Acredita-se que este radical livre possa agir como um segundo mensageiro, uma vez que, existe mais de um mecanismo enzimático responsável pela sua decomposição. Assim, seria possível se especular que o H_2O_2 em baixas concentrações poderia ser um agente fisiológico de crescimento e proliferativo (Rhee, 1999). Neste sentido, como já havia sido descrito um estímulo ao crescimento em células de mamíferos (Wiese *et al*, 1995) e leveduras (Davies *et al*, 1995), investigou-se se o mesmo processo poderia ocorrer em *T. cruzi*. As células foram incubadas na presença de baixas concentrações de H_2O_2 , (2,5 – 20 μ M) ressuspensas e colocadas em meio de cultura. Todas as concentrações testadas levaram à um estímulo do crescimento (Figura 12), sendo o maior estímulo alcançado com a concentração de 10 μ M para a cepa Tulahuen (19,3%, dados não mostrados) e 15 μ M para a cepa Y (19,1%, Figura 12), reforçando a hipótese descrita anteriormente.

O estresse oxidativo envolve respostas a oxidantes ou agentes que levam a oxidação via reações redox intracelulares. Um estresse oxidativo severo pode comprometer a viabilidade celular ou até mesmo levar à morte celular (Wiese *et al*, 1995). Em bactérias é possível evidenciar uma adaptação ao estresse oxidativo quando essas células são primeiramente submetidas a baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e posteriormente expostas a concentrações maiores, que normalmente seriam letais para essas células. Essa resistência parece estar relacionada à expressão de pelo menos 30 produtos

gênicos incluindo muitas enzimas antioxidantes (Wiese *et al*, 1995). Perfil semelhante foi observado também em leveduras (Davies *et al*, 1995).

Baseado nesses dados da literatura foi feito um pré-tratamento das células de *T. cruzi* da cepa Y com o objetivo de se verificar se era possível ocorrer uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo como descrito para outras células. A cepa Y foi selecionada para esses experimentos por ser mais sensível ao estresse oxidativo.

As células foram pré-tratadas com 20 μ M H₂O₂ por 1h30 min à 30°C e posteriormente desafiadas com 100 μ M (Figura 13). Nas células pré-tratadas, ocorre um aumento da resistência ao H₂O₂. Durante a incubação de 30 min com 20 μ M e 100 μ M H₂O₂ há uma morte de aproximadamente 8,35 % e 33,64 % da população de células, respectivamente. Como o pré-tratamento foi feito com 20 μ M e a perda de viabilidade não foi significativa, pode-se descartar a seleção de sub-populações resistentes ao H₂O₂.

Tanto em leveduras quanto em células mamíferas a adaptação ao estresse oxidativo é temporária, ou seja, a levedura apresenta uma adaptação máxima de 2hs e as células mamíferas, 18 hs. Após esse período, o pré-tratamento não resulta em uma maior proteção das células, quando essas são submetidas a concentrações letais do oxidante (Wiese *et al*, 1995 e Davies *et al*, 1995).

Esta resposta adaptativa transiente ao peróxido de hidrogênio para células mamíferas é considerada um importante mecanismo pelo qual as células conseguem lidar com os níveis flutuantes de oxidantes gerados pela própria respiração, autooxidação e com o metabolismo de uma variedade de drogas que produzem H₂O₂ e toxinas (Wiese *et al*, 1995). Em condições fisiológicas, a resposta adaptativa possui a função de proteger as células e organismos de altas doses de um determinado agente tóxico. Esta resposta

protetora também indica que a célula, uma vez exposta à toxinas, espera, ou no mínimo está preparada para receber uma subsequente dose letal (Crawford e Davies *et al*, 1994).

A resposta adaptativa ao pré-tratamento com 20 μ M H₂O₂ aumenta com o tempo até o máximo 1 h 30 min (Figura 13). Pré-tratamento maior que 1 h 30 min, resultaram numa perda da resistência ao H₂O₂ (perda da adaptação) indicando que a resposta ao H₂O₂ é transiente.

Em *E. coli* a adaptação ao estresse oxidativo com H₂O₂ envolve a síntese de novo de proteínas (Morgan *et al*, 1986) ocorrendo nessas células um aumento da síntese de 30 proteínas e em leveduras de aproximadamente 21 proteínas durante essa adaptação (Davies *et al*, 1995). Em leveduras adaptadas ao H₂O₂, observou-se um aumento dos níveis de mRNA transcritos de catalase T (CTT1 gene) e aumento da atividade da glutathiona peroxidase (Davies *et al*, 1995). Com relação ao *T. cruzi* a exposição tanto a baixas (Figura 15) como a altas (Figura 16) concentrações de H₂O₂ levou a um aumento da expressão da TXNPx ressaltando o seu papel na adaptação dessas células ao estresse oxidativo.

Observa-se que em concentrações de H₂O₂ consideradas letais também há um aumento da expressão dessa enzima que poderia representar um esforço inicial da célula para tentar se defender de tal concentração. Com a concentração de 500 μ M observou-se um aumento dessa expressão já nos primeiros minutos de incubação dando suporte a hipótese levantada anteriormente.

Este trabalho ressaltou a importância da TXNPx não só na detoxificação do peróxido de hidrogênio mas também na adaptação das células epimastigotas de *T. cruzi*, ao estresse oxidativo, abrindo caminho para um estudo mais aprofundado sobre as demais enzimas da cascata.

Referências Bibliográficas

- AGUILAR, E.G.; KOLDOBSCKY, C.; TORANZO, E.G.D. & CASTRO, J.A. Species and sex differences in the liver microsomal nitroreductive biotransformation of nifurtimox and benznidazole. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 287, p.181-187, 1987.
- AMATO NETO, V. Modalidades alternativas de transmissão: empecilhos às cogitações de erradicação da doença de Chagas. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, v. 39, p. 93-95, 1984.
- ARAUJO, M.S.S.; MARTINS, A.O.; PEREIRA, M.E.S. & BRENER, Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. **J. Antimicrob. Chemoth**, v.45, p.819-924, 2000.
- ARIYANAYAGAM, M.R. & FAIRLAMB, A.H. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 115, p. 189-198, 2001
- BLACK, S.M. & WOLF, C.R. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. **Pharmacol. and Therap.**, v.51, p.139-154, 1991.
- BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E.; DOCAMPO, R.; TURRENS, J. & STOPPANI, A. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v.188, p.643-648, 1980.
- BRIONES, M.R.S.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S. & ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, p. 219-232, 1999.
- BURDON, R.H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. **Free Rad. Biol. & Med.**, v.18, p. 775-794, 1995.
- CALLAHAN, H.L. & BEVERLEY, S.M. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in Leishmania. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p.18427-18430, 1991.
- CAMARGO, E. Growth and differentiation in *T.cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, vol 6, n 3, p. 93-100, 1964.
- CARNIERI, E.G.S.; MORENO, S.N.J. & DOCAMPO, R. Trypanothione - dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.61, p.79-86, 1993.
- CLAYTON, C.E. The molecular biology of Kinetoplastida. In: **Genetic Engineering**. Academic Press, 1988. v.7, p.2-56.

CRAWFORD, D.R. & DAVIES, K.J.A. **Environ. Health Perspect**, v. 102, n.10, p.25-28, 1994.

DAVIES, J.M.S.; LOWRY, C.V. e DAVIES, K.J.A. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 317, p.1-6, 1995.

DIAS, J.C.P. & COURA, J.R. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas – uma abordagem prática para o clínico geral**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1997.

DIAS, J.C.D. **O tratamento específico da doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.vertentes.com.br>>. Acesso em: fevereiro/01.

DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. The metabolism and mode of action gentian violet. **Drug Metabol. Rev.**, v.22, p.161-178, 1993.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem.-Biol. Interac.**, v. 73, p.1-27, 1990.

FAHEY, R.C. & SUNDQUIST, A.R. Evolution of glutathione metabolism. In: **Advances os enzymology and related areas of molecular biology**, New York: John Wiley and Sons, Inc, 1991.p.1-53.

FAIRLAMB, A.H.; HENDERSON, G.B. & CERAMI, A. The biosynthesis of trypanothione and N1-glutathionyl-spermidine in *Crithidia fasciculata*. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 21, p.247-257, 1986.

FLOHÉ, L.; HECHT, H.J.; & STEINERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Rad. Biol. & Med.**, v.27, p. 966-984, 1999.

FREIRE DE LIMA, C.G.; NASCIMENTO, D.O.; SOARES, M.B.P.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; DE MELLO, F.G.; DOS REIS, G.A. & LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v.403, p. 199-203, 2000.

GADELHA, F.R., THOMSON, L., FAGIAN, M.M., COSTA, A.D.T., RADI, R. & VERCESI, A.E. Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 345. n. 2. p. 243-250, 1997.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J. & DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, p.751-766, 1949.

GUERRERO, S.A.; FLOHÉ, L.; KALISZ, H.M.; MONTERMATINI, M.; NOGOCEKE, E.; HECHT, H.J.; STEINERT, P. & SINGH, P. Sequence, heterologous expression and

functional characterization of trypanothione 1 from *Crithidia fasciculata*. **Euro. J. of Biochem.**, v.259, n. 3, p.789-794, 1999.

GUHL, F. & VALLEJO, G.A. Interruption of Chagas disease transmission in the Andean Countries: Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, Suppl I, p.413-415, 1999.

HENDERSON, G.B.; FAIRLAMB, A.H. & CERAMI, A. Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 24, p. 39-45, 1987.

ISMAIL, S.; PARAMCHUK, W.; SKEIKY, Y.; REED, S.; BHATIA, A. & GEDAMU, L. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 86, p.187-197, 1997.

KELLY, J., TAYLOR, M.C., SMITH, K., HUNTER, K.J. & FAIRLAMB, A.H. Phenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which over-express trypanothione reductase. **Eur. J. Biochem.** v. 218. p. 29-37, 1993.

KIM, B.; HAN, M. & CHUNG, A. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. **Free Rad. Biol. & Med.**, v.30, n.6, p.686-698, 2001.

KRAUTH-SIEGEL, R. & COOMBS, G.H. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. **Parasitol. Today.** v.15, n. 10, p.404-409, 1999.

LONGO, V.D.; LIOU, L.; VALENTINE, J.S. & GRALLA, E.B. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. **Arch. Biochem. and Biophys.**, v.365, n.1, p. 131-142, 1999.

LOPEZ, J.A.; CARVALHO, T.U.; SOUZA, W.; FLOHÉ, L.; GUERRERO, S.A.; MONTEMARTIN, M.; KALISZ, H.M.; NOGOCEKE, E.; SINGH, M.; ALVES, J.M. E COLLI, W. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. **Free Rad. Biol. & Med.** v.28, p.767-772, 2000.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R.; ESCARIO, J.A.; NOGAL-RUIZ, J.; & GOMEZ-BARRIO, A. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.96, n.1, p.53-59, 2001.

MAYA, J.D.; REPETTO, Y.; AGOSÍN, M.; OJEDA, J.M.; TELLEZ, R.; GAULE, C. e MORELLO, A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.86, p. 101- 106, 1997.

MONCADA, C.; REPETTO, Y.; ALDUNATE, J. & MORELLO, A. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94C, p.87-91, 1989.

MONTEMARTINI, M.; KALISZ, H.M.; KIESS, M.; NOGOCEKE, E.; SINGH, M.; STEINERT, P. & FLOHE, L. Sequence, heterologous expression and functional characterization of a novel trypanothione from *Crithidia fasciculata*. **Biol. Chem.**, v. 379, p.1137-1142, 1998.

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

NOGOCEKE, E.; GOMMEL, D.; KIEB, M.; KALISZ, H. & FLOHÉ, L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione - mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. **Biol. Chem.**, v. 378, p. 827 –836, 1997.

POWIS, G.; MUSTACICH, D. & COON, A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. **Free Rad. Biol. & Med.**, v.29, n.3/4, p.312-322, 2000.

REY, P. **Parasitologia**. 2^A ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

RECKENFELDERBÄUMER, N.; LUDEMANN, H.; SCHMIDT, H.; STEVERDING, D. & KRAUTH-SIEGEL, L. Identification and functional characterization of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 7547-7552, 2000.

RHEE, S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Exp. Mol. Med.**, v. 31, n. 2, p. 53-59, 1999.

ROJAS de ARIAS, A. FERRO E.A.; FERREIRA M.E.; & SIMANCAS, L.C. Chagas disease vector control through different intervention modalities in endemic localities of Paraguay. **Bulletin of the World Health Organization**, v.77, n. 4, p.331 – 339, 1999.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M. & VAHIA-LOUREIRO, A.M. **O Trypanosoma cruzi**. In: Moléstia de Chagas, ed. Cultura Médica, p. 40-51, 1996.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A. & ZINGALES, B. DNA markers define two major lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.83, p.141-152, 1996.

STEINERT, P.; DITTMAR, K.; KALISZ, H.M.; MONTEMARTINI, M.; NOGOCEKE, E.; ROHDE, M.; SINGH, M.; & FLOHÉ, L. Cytoplasmatic localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*. **Free Rad. Biol. & Med.**, v. 26, p.844-849, 1999.

TETAUD, E. & FAIRLAMB, H.A. (1998). Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 96, p.111-123.

- TOMA, H.K., CERÁVOLO, I.P., GUERRA, H.L., STEÍNDEL, M. & ROMANHA, A.J. *Trypanosoma cruzi*: parasitemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. **Inter. J.of Parasitol.**, v.30, p.593-597, 2000.
- TYLER, K.M. & ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Inter. J.Parasitol.**, v. 31, p.472-481, 2001.
- WIESE, A.G., PACIFICI, R.E. & DAVIES, K.J. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 318, n.1, p. 231-240, 1995.
- WILKINSON, S.R., MEYER, D.J. & KELLY, J.M. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. **Biochem. J.**, v. 352, p.755-761, 2000.
- WILKINSON,S.; TEMPERTON, N.; MONDRAGON, A. & KELLY, J. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v.275, n. 11, p.8220-8225, 2000a.
- WILLIAMS - BLANGERO, S., VANDEBERG, J.L. & TEXEIRA, A.R.L. Attitudes towards Chagas' disease in an endemic Brazilian community. **Caderno de Saúde Pública**, v.15, n.1, p.7-13, 1999.
- YAWETZ, A. & AGOSIN, M. Purification of the glutathione-S-transferase of *T. cruzi*. **Comp. Biochem. Phys.**, v.68B, p.237-243, 1991.
- ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A. & FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences **Inter. J. Parasitol.**, v. 28, p.105-112, 1998.

Anexo I

Comunicações em Congresso

1. Nacional

- a. **Morisco, C.W., Finzi, J.K., Lira, C.B.B., Netto, L.E.S. & Gadelha, F.R.** Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes from different phylogenetic lineages. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000. Caxambu.

2. Internacional

- a. **F.R. Gadelha, C.W.M. Chiavegatto, K.C.F. Corat, Finzi, J.K., Lira, C.B.B., Lopez, J.A., Colli, W. & M.J.M. Alves.** Adaptation to oxidative stress in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. 27th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies. *FEBS Journal* **268** Suppl. 1 PS4-113, pg 126.

