

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Jane Kelly Finzi

**Estudo da superexpressão da triparedoxina peroxidase
em *Trypanosoma cruzi* epimastigotas**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JANE KELLY FINZI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Fernanda Ramos Gadelha

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

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

2002

UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
 Nº CHAMADA TIUNICAMP
F499e
 V _____ EX _____
 TOMBO BCI 49904
 PROC 16.837/02
 C _____ DX _____
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA _____
 Nº CPD _____

CM00170445-1

BIB ID 248398

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

F499e **Finzi, Jane Kelly**
 Estudo da superexpressão triparedoxina peroxidase em
Trypanosoma cruzi epimastigotas/Jane Kelly Finzi.—
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Fernanda Ramos Gadelha

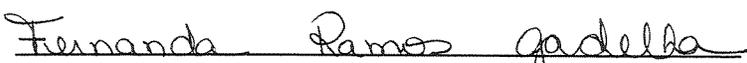
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia

1. Stresse. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Triparedoxina peroxidase.
 I. Gadelha, Fernanda Ramos. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 24 de maio de 2002.

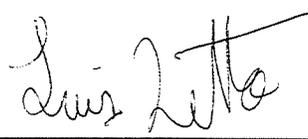
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Fernanda Ramos Gadelha
(UNICAMP - Depto. de Bioquímica - IB)



Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho
(UNIFESP - Depto. de Parasitologia)



Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto
(USP - Depto. de Biologia - IB)

Prof. Dra. Carmen Veríssima Ferreira
(UNICAMP-Depto. de Bioquímica - IB)

00231655

**“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembre-se
que as maiores proezas da história foram conquistas do
que se parecia impossível.”
(Charlie Chaplin)**

**Dedico este trabalho a quem sempre confiou em minha
força de vontade: meus pais, Edgard e Sueli, meus irmãos,
e todos os meus amigos, em especial a Jaque e a minha
orientadora.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo o carinho, pelos conselhos e pela ajuda nos momentos difíceis. E a toda a minha família.

A minha orientadora e grande amiga Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha, por toda confiança em mim depositada, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

À Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves, Prof. Dr. Walter Colli e Prof. Jorge A. Lopez pela colaboração neste trabalho e as valiosas discussões sobre o assunto.

Ao Marcos que apareceu no meio desta jornada e deu um novo rumo à minha vida.

Ao meu amigão Kiko, pela grande ajuda em minha caminhada e por toda a sua amizade. Obrigada por ligar a autoclave sempre que eu pedia!

À grande amiga Odalys por estar sempre presente em minha vida e pela ajuda nos experimentos de biologia molecular.

À Tininha, minha “irmãzinha”, agradeço todo o carinho e ajuda no início do meu trabalho.

À minha prima Karen por toda a torcida e carinho.

Ao meu primo Marcus, que me apresentou a Profa. Fernanda, e que sempre me deu força.

As minhas amigas e companheiras de trabalho Albanin e Maria Fernanda, obrigada pela ajuda, adoro vocês.

A amiga Camila por sua torcida, amizade e companhia durante minha jornada.

Ao Prof. Gonçalo A. Guimarães Pereira pela colaboração em meu trabalho e aos seus alunos Anderson e Marcos que também auxiliaram nos experimentos iniciais de biologia molecular.

Aos meninos do laboratório do Prof. Domingos da Silva Leite, pela ajuda com a fotodocumentação, em especial ao Georgio pela paciência e grande atenção que dispensou a mim.

Ao Mário Paulo Amante Penatti pelas palavras certas nas horas certas.

À Andréia e a Marina, secretárias do Depto. de Bioquímica, pela ajuda e pelo carinho com que sempre me trataram.

Ao Prof. Wanderlei Dias da Silveira e à Alessandra que permitiram o uso do aparelho para realização das eletroporações.

A Cláudia, do laboratório da Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann, pela ajuda.

Ao Gilberto e a Márcia do CIPOI pela ajuda na etapa final, pela amizade e incentivo.

A FAPESP pelo suporte técnico e financeiro.

Índice:

Abreviações	viii
Resumo	ix
Summary	xi
Introdução	
1. <i>Typanosoma cruzi</i>	2
2. Defesas antioxidantes do <i>T. cruzi</i>	4
3. Triparedoxina peroxidase (TXNP _x)	8
4. Biologia molecular dos tripanossomatídeos	10
5. Superexpressão de enzimas que agem na detoxificação de espécies reativas de oxigênio em <i>T. cruzi</i>	14
Objetivos	17
Materiais e Métodos	
1. Cultura de células epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	20
2. Cultura de bactérias <i>E. coli</i> linhagem DH5 α	20
3. Preparo de bactérias competentes	20
4. Obtenção do gene da TXNP _x	21
5. Construção dos vetores de expressão	21
6. Transformação das bactérias competentes e purificação dos plasmídeos vetores	22
7. Eletroporação das células de <i>T. cruzi</i>	23
8. Análise do DNA de <i>T. cruzi</i> por Southern blotting	24
9. Análise do RNA de <i>T. cruzi</i> por Northern blotting	24

10. Obtenção do gene <i>neo</i> para confirmar a transformação	24
11. Incubação das células de <i>T.cruzi</i> com H ₂ O ₂	25
12. Preparo de lisado de <i>T.cruzi</i> para Western blotting	25
13. Western blotting	26
14. Obtenção do anticorpo primário policlonal para Western blotting.....	27
15. Determinação da produção de NADPH através da medida da atividade das enzimas da Via das Pentoses Fosfato (VPF)	27
16. Análises estatísticas	28
Resultados	
1. Obtenção dos vetores de expressão	30
2. Confirmação da obtenção de células de <i>T.cruzi</i> transformadas	31
3. Comparação da expressão de TXNPx nas células de <i>T. cruzi</i> selvagens e transfectadas com os vetores pTEX e pTEX-TXNPx	33
4. Curva de Crescimento e determinação da IC50	40
5. Determinação da produção de NADPH	43
Discussão	45
Referências Bibliográficas	52
Anexo	59

Abreviações:

6PGD: 6-fosfogluconato desidrogenase

C. fasciculata: *Crithidia fasciculata*

E.coli: *Escherichia Coli*

EROs: espécies reativas de oxigênio

G418: antibiótico geneticin

G6PD: glicose 6-fosfato desidrogenase

GSH: glutathiona

GST: glutathiona S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IC50: inibição do crescimento celular em 50%

InC: índice de crescimento

L. donovani: *Leishmania donovani*

mRNA: RNA mensageiro

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

O₂⁻: superóxido

SOD: superóxido dismutase

T(SH)₂: tripanotiona reduzida

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

T. brucei: *Trypanosoma brucei*

TcCPX: triparedoxina peroxidase citosólica

TcGPXI: glutathiona peroxidase de *T. cruzi*

TcMPx: triparedoxina peroxidase mitocondrial

TD: tempo de duplicação

TSA: “thiol specific antioxidant”

TXN: triparedoxina

TXNPx: triparedoxina peroxidase

Resumo:

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) está exposto a espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo sistema imunológico do hospedeiro, assim como pelo metabolismo de drogas e pelo seu próprio metabolismo. Este parasita apresenta uma capacidade limitada em lidar com esse estresse oxidativo, sendo esta área de grande interesse para fins terapêuticos. Uma cascata enzimática para detoxificação de hidroperóxidos foi descrita para *T. cruzi*, sendo diferente de qualquer sistema análogo no organismo hospedeiro. O estudo deste sistema e das enzimas envolvidas, incluindo a triparedoxina peroxidase (TXNPx), poderão levar ao desenvolvimento de agentes tripanossomicidas mais específicos e portanto menos tóxicos para o hospedeiro.

Este trabalho explorou o comportamento de células de *T. cruzi* mutantes que possuem o gene da TXNPx citosólica superexpresso. Observou-se um grande aumento de mRNA (158%) para as células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx, sem o acompanhamento do aumento de produção da proteína TXNPx, evidenciado por Western blotting. Possivelmente a regulação da expressão deste gene deve ocorrer a nível pós-transcricional, como na maioria dos genes em tripanossomatídeos. Quando as células que superexpressam a TXNPx foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante 30 min, observou-se um grande aumento dos níveis de mRNA, mas a quantidade de proteína traduzida não aumentou na mesma proporção. Altos níveis de mRNA correlacionados aos níveis de proteína, foram observados em períodos de incubação maiores (1h – 2hs), demonstrando que a proteína é traduzida de acordo com a necessidade do parasita.

As células que superexpressam a TXNPx apresentaram um maior índice de crescimento, menor tempo de duplicação e uma maior resistência ao estresse oxidativo

gerado pelo H_2O_2 (50% de inibição do crescimento foi alcançada com $104\mu M$ para as células selvagens e $125\mu M$ para as células mutantes).

A superexpressão de uma única proteína da cascata de detoxificação de hidroperóxidos dos tripanossomatídeos, neste caso a TXNPx, leva a um aumento na produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (aproximadamente 23%). A enzima responsável por este efeito, foi a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), primeira enzima da Via das Pentoses Fosfato, que produz NADPH. Assim, como para as células de mamíferos existe uma correlação entre a atividade aumentada da G6PD e a proliferação, o mesmo pode ocorrer para o *T. cruzi*, uma vez que as células que superexpressam a TXNPx citosólica apresentaram um índice de crescimento maior, provavelmente devido a uma maior atividade da G6PD.

Summary:

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is exposed to reactive oxygen species (ROS) produced by the host immunological system, drugs metabolism and from its own metabolism. This parasite has a limited capacity to cope with oxidative stress, which is of great interest to therapeutic. A hydroperoxide detoxification cascade, different from any similar system in the host organism, was described for *T. cruzi*. The study of this system and the involved enzymes, including tryparedoxin peroxidase (TXNPx), can lead to the development of more specific trypanosomicid agents less toxic to the host.

This work explored the behavior of *T. cruzi* mutant cells, that have the cytosolic TXNPx gene overexpressed. It was observed a great increase on mRNA (158%) levels in pTEX-TXNPx transformed cells, without going along with the same increase on TXNPx protein production, as detected by Western blotting. This result could be explained by the regulation at the post-transcriptional level of this gene, as the majority of trypanosomatids genes. When TXNPx overexpressed cells were treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) for 30 min, a great increase on mRNA levels was observed, but protein translation did not increase at the same proportion. Higher mRNA levels correlated to protein levels were observed when the incubation period was longer (1h – 2hs), inferring that protein translation occurs according to the parasite needs.

Cells that overexpress TXNPx had a greater growing index, a smaller duplication time and a higher resistance to oxidative stress generated by H₂O₂ (50 % of growth inhibition was achieved at 104µM for wild type and 125µM for mutant cells).

The overexpression of only one protein from the trypanosomatid hydroperoxide detoxification cascade, in this case TXNPx, led to an increase in reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) production (23% approximately). The enzyme

responsible for this effect, was glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), the first enzyme of the Pentose Phosphate Pathway, that produces NADPH. Once in mammalian cells there is a correlation between increased G6PD activity and proliferation, the same could occur in *T.cruzi* since the cells that overexpress TXNPx had a greater growth index.

INTRODUÇÃO

1. *Trypanosoma cruzi* :

O *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas. Pertence à Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae, sendo um organismo unicelular caracterizado pela presença de um único flagelo e pelo grande agregado de DNA mitocondrial, o cinetoplasto (<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>; Rey, 1991).

No seu ciclo de vida, o *T.cruzi* apresenta diferentes estágios de desenvolvimento, alternando entre um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. Na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero estão presentes as formas tripomastigotas. O hospedeiro invertebrado que se alimenta do sangue contaminado adquire os tripomastigotas que posteriormente se diferenciam a amastigotas (forma replicativa), no intestino médio do inseto. Os amastigotas começam a estender seus flagelos e dão origem a uma forma intermediária denominada esferomastigotas, que se alonga dando origem à forma epimastigota. Esta última adere hidrofobicamente à parede do intestino posterior do inseto, se diferenciando à forma tripomastigota metacíclica, que infecta o hospedeiro vertebrado e não se replica. A forma tripomastigota metacíclica se transforma em amastigota dentro das células do hospedeiro vertebrado, multiplicando-se e transformando-se em tripomastigota. A célula acaba se rompendo, liberando tripomastigotas e amastigotas. Atingindo a corrente sanguínea, os tripomastigotas podem infectar células de outros órgãos e tecidos (Tyler & Engman, 2001).

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, propagou-se no continente americano entre pequenos mamíferos selvagens. Fatores bio-ecológicos e sócio-econômicos deixaram a população rural em contato com o ciclo silvestre da doença, criando-se um ciclo doméstico (<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>).

A doença de Chagas atinge aproximadamente 20 milhões de pessoas na América do Sul

(WHO, 1990) e com a migração rural-urbana este número pode crescer ainda mais. Regiões não endêmicas como os Estados Unidos (Schummis, 1991) foram atingidas, provavelmente através de transfusões de sangue por imigrantes infectados. A transfusão sanguínea é considerada o segundo mecanismo mais importante de transmissão da doença, sendo que o tipo de transmissão com maior prevalência se dá pelo contato das mucosas com as fezes de insetos triatomíneos infectados (<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>). Além destas vias de transmissão, foi relatada também a transmissão congênita (Brener, 1982), pelo transplante de órgãos (Chocain *et al*, 1985), por acidentes em laboratórios e pelo leite materno (Amato Neto, 1984).

A cura para a doença de Chagas ainda não foi encontrada. Ensaio clínicos revelaram dois medicamentos propícios no tratamento da doença: benzonidazol (do grupo dos nitroimidazóis) e nifurtimox (do grupo dos nitrofuranos). A administração dessas drogas diminui a parasitemia, porém o efeito supressivo ocorre somente na fase aguda da doença. Dentre os efeitos colaterais do nifurtimox, estão: náuseas, vômitos, emagrecimento, irritabilidade e insônia, além de serem observadas propriedades mutagênicas e ação cancerígena em ratos (Rey, 1991). O benzonidazol apresenta efeitos colaterais significativos, sendo o comprometimento renal o mais importante (Filardi & Brener, 1987). O cristal violeta foi utilizado na profilaxia da doença de Chagas transfusional (WHO, 1984), mas também os efeitos colaterais e a possibilidade de mutagenicidade limitaram o emprego desse composto.

Tanto o benzonidazol, como o nifurtimox e o cristal violeta atuam através da produção de radicais livres, que podem também prejudicar o hospedeiro vertebrado, explicando provavelmente os efeitos colaterais tóxicos encontrados (WHO, 1984; Masana *et al*, 1984).

2. Defesas antioxidantes do *T. cruzi*:

Sendo parasitas, os tripanossomatídeos são expostos inevitavelmente a várias espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical superóxido e o composto peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formados durante a reação de defesa do hospedeiro (Nogoceke *et al*, 1997). A habilidade em lidar com o estresse oxidativo é deficiente, quando comparada à dos mamíferos (Fairlamb & Cerami, 1992). Apesar de possuírem duas superóxido dismutases dependentes de ferro, uma constitutivamente expressa (Fe-SODA), e outra diferencialmente expressa (Fe-SODB) (Ismail *et al*, 1997), não existem relatos da presença de vitamina E, β -caroteno e xantina oxidase (Docampo, 1990).

Foi relatada a existência de traços de catalase (Guerrero *et al*, 1999), cuja carência dessa enzima pode ser compensada parcialmente pela grande quantidade de glutathione S-transferase (GST) presente nos tripanossomatídeos (Yawtez & Agosim, 1981). As GSTs têm uma grande especificidade por substratos, incluindo atividade de peroxidase para hidroperóxidos de lipídios e detoxificação de um grande número de xenobióticos (Fahey & Sundquist, 1991). A conjugação de xenobióticos eletrofílicos com a glutathione é um sistema de detoxificação importante nas células epimastigotas de *T. cruzi* (Yawtez & Agosim, 1981). O envolvimento das GSTs na resistência adquirida às drogas tem sido relatado (Black & Wolf, 1991), apresentando essas enzimas um papel específico na atenuação dos efeitos tóxicos de drogas ativas através da formação de radicais livres (Callahan & Beverly, 1991).

A glutathione (GSH), principal composto antioxidante sulfidril das células de mamíferos, está presente no parasita em baixas concentrações, estando a maior parte na forma de tripanotiona ($T(SH)_2;N1,N8$ -bis(glutathionil) espermidina), que desempenha um

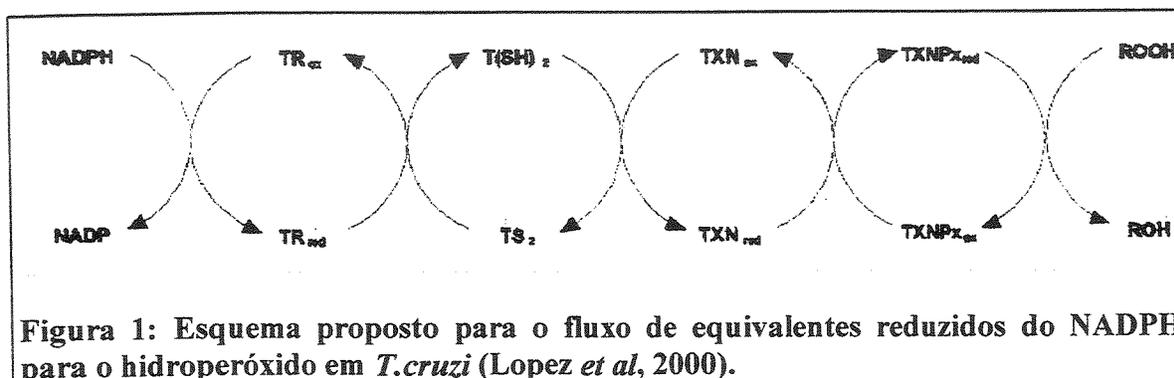
papel importante no sistema de defesa antioxidante dos tripanossomatídeos (Fairlamb & Cerami, 1992; Fairlamb *et al.*, 1985). A síntese da tripanotiona é catalisada pela tripanotiona sintetase, uma enzima restrita aos tripanossomatídeos (Henderson *et al.*, 1990), que catalisa a conjugação sequencial da glutationa, dependente de ATP, a ambos resíduos amino terminais da espermidina (Fairlamb *et al.*, 1986).

Recentemente outro tiol, denominado ovotiol (N¹-metil-4-mercaptohistidina), foi identificado em todos os estágios do ciclo de vida de tripanossomatídeos (*Leishmania spp.*, *Crithidia fasciculata* (*C.fasciculata*), *T.cruzi* e *Trypanosoma brucei* (*T.brucei*)), agindo como seqüestrante não-enzimático de H₂O₂. Neste caso a regeneração da espécie reduzida é dependente do sistema tripanotiona/ tripanotiona redutase. O ovotiol está presente em torno de 1mM em cinco espécies de *Leishmania* promastigotas, ultrapassando o conteúdo de tripanotiona nessas espécies. Porém, no *T.cruzi*, a concentração deste composto é em torno de 0,25mM, não desempenhando grande papel no metabolismo de H₂O₂, fazendo-se necessária uma investigação a respeito do principal papel fisiológico deste composto nestes organismos (Ariyanayagam & Fairlamb, 2001).

Uma atividade seqüestrante de H₂O₂ foi sugerida para o *T.cruzi* baseado no nível de ascorbato reduzido encontrado neste organismo (Clark *et al.*, 1994). No entanto, esta atividade tem sido atribuída a uma interação não enzimática do dehidroascorbato com a tripanotiona (Krauth-Siegel & Ludemann, 1996).

Um sistema utilizado para a eliminação de hidroperóxidos em *C. fasciculata* (Nogoceke *et al.*, 1997), está presente também em *T.cruzi* (Lopez *et al.*, 2000). Este sistema é um dos mais complexos já relatados, incluindo: tripanotiona redutase (TR), tripanotiona (T(SH)₂), Cfl6, que possui similaridade com as tioredoxinas (Nogoceke *et al.*, 1997) e corresponde à TXN (triparedoxina) em *T.cruzi* (Lopez *et al.*, 2000), e a Cf21, membro da

família das peroxiredoxinas (Nogoceke *et al*, 1997), como a “thiol specific antioxidant” (TSA), que corresponde à TXNPx (triparedoxina peroxidase) em *T.cruzi* (Lopez *et al*, 2000) (Figura 1).



Na maioria dos eucariontes, a atividade peroxidase dependente de glutathione desempenha um importante papel no metabolismo de peróxidos. Estudos demonstraram que os tripanossomatídeos não possuíam esta atividade (Fairlamb & Cerami, 1992). Porém, foi isolado um gene cópia única de *T.cruzi*, que codifica uma enzima de 18kDa, cuja seqüência tem alta similaridade com a glutathione peroxidase de plantas (Wilkinson *et al*, 2000). Essa enzima apresenta atividade de peroxidase na presença de glutathione/glutathione redutase, mas não na presença de tripanotiona/tripanotiona redutase. A glutathione peroxidase de *T.cruzi* (TcGPXI) metaboliza uma grande variedade de hidroperóxidos, como hidroperóxidos derivados de ácidos graxos, mas não possui atividade frente ao peróxido de hidrogênio. Assim, foi proposto um novo esquema para o metabolismo de peróxido dependente de tripanotiona nestes parasitas (Figura 2) (Wilkinson *et al*, 2000).

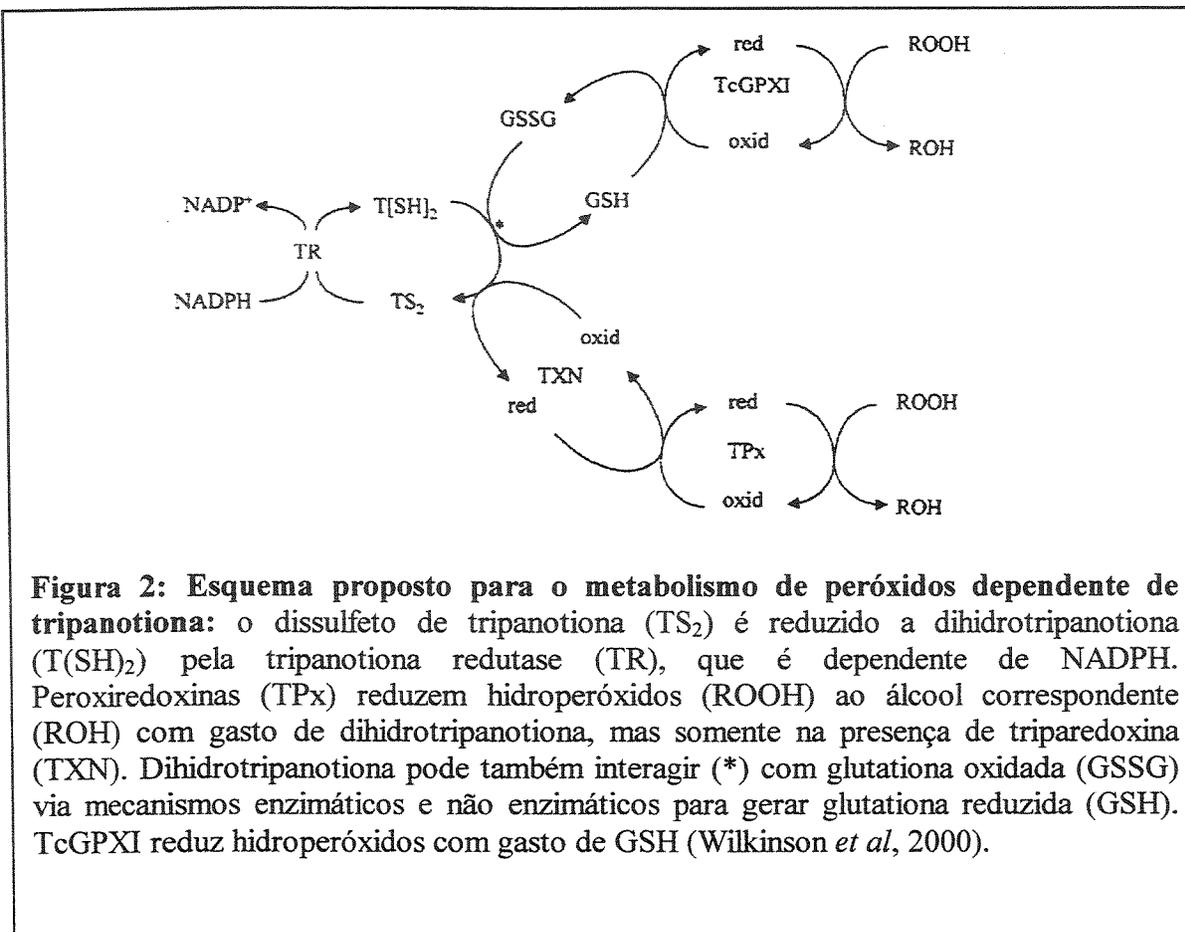


Figura 2: Esquema proposto para o metabolismo de peróxidos dependente de tripanotona: o dissulfeto de tripanotona (TS₂) é reduzido a dihidrotripanotona (T[SH]₂) pela tripanotona redutase (TR), que é dependente de NADPH. Peroxiredoxinas (TPx) reduzem hidróperóxidos (ROOH) ao álcool correspondente (ROH) com gasto de dihidrotripanotona, mas somente na presença de triparedoxina (TXN). Dihidrotripanotona pode também interagir (*) com glutatona oxidada (GSSG) via mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para gerar glutatona reduzida (GSH). TcGPXI reduz hidróperóxidos com gasto de GSH (Wilkinson *et al*, 2000).

Além do sistema doador de elétrons proposto por Wilkinson e colaboradores (2000), um gene codificante de tioredoxina foi recentemente clonado de *T.brucei* (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000). Esta proteína foi a primeira tioredoxina clássica descrita na ordem Kinetoplastida, caracterizada por uma seqüência de 107 aminoácidos e expressa em todos os estágios de desenvolvimento do parasita (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000).

Com a descoberta da tioredoxina em *T.brucei*, pode-se sugerir que os tripanossomas provavelmente desenvolveram dois sistemas (tioredoxina e triparedoxina) para prover elétrons para a síntese de precursores de DNA, catalizando a redução da ribonucleotídeo sintetase, assim como no caso de outros organismos (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000).

Uma proteína chamada Tc52, que foi identificada em *T.cruzi*, compartilha propriedades funcionais e estruturais com a família das tioredoxinas e glutaredoxinas. Esta proteína desempenha um papel importante na imunossupressão associada ao *T.cruzi* observada durante a doença de Chagas. Investigações complementares mostraram que um novo gene (TcRGGm) a montante ao gene Tc52, tem motivos característicos sugerindo que o transcrito pode agir como uma proteína que se liga ao RNA. Encontrou-se também um gene a jusante ao Tc52, que continha motivos conservados característicos de domínio deaminase presente em adenosina deaminases que agem no tRNA. Além dessas seqüências foi observado que as regiões flanqueadoras 5' continham as seqüências TATA e CAAT, características de região promotora de RNA polimerase II, porém a função dessas seqüências ainda não foi esclarecida (Ouaisi *et al*, 2000).

3. Triparedoxina peroxidase (TXNPx):

Recentemente, foram descobertas duas triparedoxina peroxidases em *T.cruzi*, uma mitocondrial (TcMPX) e outra citosólica (TcCPX) (Wilkinson *et al*, 2000). Estas enzimas contêm os dois domínios característicos do subgrupo 2-Cys da família peroxiredoxinas de enzimas antioxidantes. Ambas apresentam 25kDa e em amostras não reduzidas há o aparecimento de banda de 50kDa, indicando a formação de dímero. Diferem das enzimas de mamíferos da família das peroxiredoxinas, por serem dependentes de tripanotona (Wilkinson *et al*, 2000).

Devido à localização dessas enzimas, sugeriu-se que a TcCPX poderia desempenhar um papel importante como seqüestrante de peróxidos, e a TcMPX, presente em uma maior concentração na parte vicinal do cinetoplasto, deve proteger o DNA mitocondrial de danos diretos ou indiretos mediados por peróxidos (Wilkinson *et al*, 2000).

Uma vez que a TcMPX encontra-se na mitocôndria, essa organela pode conter toda a maquinaria necessária para manter a TcMPX na forma reduzida, ou o ciclo redox deve ser repartido entre citosol e mitocôndria. Há evidências de que em *T.brucei* a enzima tripanotiona redutase seja restrita ao citosol (Smith *et al*, 1991), e se este é o caso do *T.cruzi*, pode haver a presença de um transportador de tiol e/ou um sistema de redução ainda não identificado (Wilkinson, *et al* 2000).

Em *T.brucei* também foi identificado um gene multicópia de triparedoxina peroxidase, que apresenta similaridade com o da triparedoxina peroxidase citosólica de *C. Fasciculata*, e um gene de simples cópia que codifica uma proteína similar a triparedoxina peroxidase citosólica, porém localizada na mitocôndria (Tetaud *et al*, 2001), assim como observado em *T.cruzi* (Wilkinson, *et al* 2000).

Um gene denominado “metacyclogenin” foi caracterizado recentemente, sendo diferencialmente expresso durante a metaciclógênese de *T.cruzi* (Ávila *et al*, 2001). Este gene é encontrado em ao menos três cópias no genoma de *T.cruzi*, linhagem Dm28c, sendo organizado em repetições em tandem de 2,8kb que incluem o gene da triparedoxina peroxidase e um gene associado (AG). Análise por Northern blotting e Western blotting demonstraram que o mRNA do “metacyclogenin” embora detectado no RNA total dos epimastigotas replicativos e diferenciados, era mobilizado para os polissomos e traduzido somente nos epimastigotas diferenciados. O gene da TXNPx é expresso em epimastigotas replicativos e diferenciados, porém a expressão nos últimos é bem maior, podendo indicar que a TXNPx também pode estar envolvida no processo de metaciclógênese (Ávila *et al*, 2001).

Com respeito à estrutura dessa proteína, determinou-se através de métodos de dispersão de ondas um modelo decâmico para a triparedoxina peroxidase recombinante de

C. fasciculata (Alphey *et al*, 2000). A estrutura quaternária de dímero (forma oxidada) passa a decâmero (forma reduzida) (Figura 3), sendo que este último arranjo 2-Cys pode prevenir uma oligomerização indiscriminada, possui dez sítios ativos e contribui para a especificidade da redução pela triparedoxina, assim como para a atração de peróxidos para o sítio ativo (Alphey *et al*, 2000).

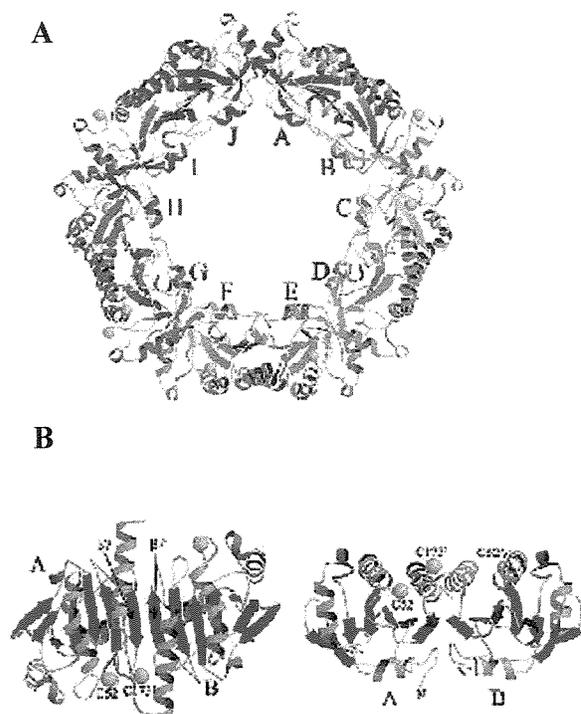


Figura 3: Estrutura secundária da triparedoxinase de *C. fasciculata*. **A:** decâmero, mostrando as subunidades nomeadas de A a J, e os sítios ativos como esferas amarelas. **B:** vistas ortogonais do dímero A-B da proteína, sendo que os sítios ativos estão como esferas amarelas (Cys52 e Cys173), N identifica o resíduo amino-terminal da cadeia polipeptídica. (Alphey *et al*, 2000).

4. Biologia molecular dos tripanossomas:

O *T. cruzi* possui um conteúdo de DNA por célula que varia entre as diferentes cepas, isolados e entre os clones derivados da mesma cepa. Em estudos de renaturação, a complexidade do genoma foi estimada em $1,8 - 2,5 \times 10^8$ pares de base (pb). A quantidade do DNA total (nuclear + cinetoplasto) varia de 0,12 a 0,33 pg por célula, entre diferentes

cepas e entre clones isolados da mesma cepa (<http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html>).

O cinetoplasto é uma rede fibrosa de DNA (kDNA) que constitui de 20 a 25% do DNA total do parasita e está localizado na mitocôndria. O kDNA corresponde a aproximadamente 32% do DNA total (Kooy *et al*, 1989). As moléculas de kDNA estão organizadas em minicírculos e maxicírculos associados. O tamanho e forma do kDNA variam nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita, sendo que o seu papel ainda não foi bem esclarecido. Existem evidências de que os minicírculos correspondem a 95% do kDNA, possuindo em média 465bp (Clayton, 1988) e codificam proteínas pequenas cuja importância e existência ainda não se sabem. Os maxicírculos, devido ao seu tamanho e peso molecular, 39Kb (Clayton, 1988), parecem codificar enzimas que participam do metabolismo do parasita (<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>).

O genoma do *T. cruzi* é composto por três classes principais de sequências de DNA: a) DNA codificante de proteína (genes de cópia única; famílias de genes duplicados); b) DNA de múltiplas cópias em uma mesma sequência (genes que codificam proteínas e RNAs, por exemplo: rRNA, medRNA, histona, tubulina, etc.); c) DNA repetitivo (micro e minisatélites, elementos interespersados curtos e longos, transposons, retrotransposons, etc.). Além dessas sequências, sequências de DNA espaçadoras ou conectoras podem ser encontradas entre os genes, codificando proteínas ou RNAs (<http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html>).

Muitos genes de tripanossoma, como os que codificam proteínas endógenas, antígenos, enzimas e proteínas estruturais, são arranjados como repetições múltiplas alelas, existindo uma correlação entre o número de cópias de um gene e a quantidade de seu

produto na célula. Proteínas altamente abundantes e RNAs são codificados por genes de múltiplas cópias (<http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html>).

Estudos moleculares indicam que a reprodução sexuada não ocorre, ou ocorre muito raramente, em *T.cruzi*, indicando que as variações biológicas e genéticas encontradas podem ser explicadas pela evolução independente de múltiplas linhagens clonais (Souto *et al*, 1996).

Unidades de transcrição eucarióticas, com genes simples ladeados por promotores controlados individualmente, são exceção nos tripanossomas. Os genes parecem estar contidos dentro de longas unidades de transcrição policistrônicas e os promotores estão distantes. Somente poucos promotores para codificação de proteínas são conhecidos: os de genes ribossomal, VSG e prociclina, encontrados em *T.brucei*, e aqueles para genes de RNAs pequenos (Vanhamme & Pays, 1995).

Apesar da transcrição primária da maioria dos genes ser constitutiva e não regulada, a maior parte dos genes já estudados possuem modelos divergentes de expressão individual durante o ciclo de vida do parasita (Vanhamme & Pays, 1995; Gibson *et al*, 1988). O controle da expressão gênica em tripanossomas parece operar a níveis pós-transcricionais (Vanhamme & Pays, 1995).

Os mecanismos pelos quais a expressão diferencial dos genes de tripanossomas ocorre, parecem estar intimamente associados àqueles envolvidos na geração de RNAs mensageiros maduros (mRNA). A maquinaria de processamento se liga a polipirimidina localizada nas regiões intergênicas do transcrito primário e cliva estas regiões assim que elas são sintetizadas. Os produtos liberados são modificados pela adição de cap e poliadenilação (Vanhamme & Pays, 1995). A adição de cap na extremidade 5' ocorre através de *trans-splicing*, onde uma fita líder modificada, impropriamente chamada de

mini-exon, originada do processamento de um RNA doador (medRNA, 141 nucleotídeos em *T.brucei*), é adicionada à extremidade 5' (Bruzik & Steitz, 1990). A poliadenilação ocorre a uma distância conservada do sítio *splice* (Vanhamme & Pays, 1995). Como o processamento lida com seqüências intergênicas (regiões não traduzidas que ladeiam os genes), estas são elementos chave na modulação da abundância de mRNAs (Vanhamme & Pays, 1995).

Com o objetivo de se estudar melhor a expressão de genes nestes parasitas, muitos experimentos de transfecção foram realizados, sendo que para isso, algumas regras foram estabelecidas: sítio de adição SL (*splice leader*, ou fita líder) deve estar a montante do gene (para o *trans-splicing*) e o sítio acceptor *splice* deve estar a jusante do gene (para a poliadenilação). Já a necessidade de um promotor para a transcrição depende do tripanossomatídeo envolvido. Para *T.brucei* a presença de um promotor criou níveis de expressão altíssimos, mas em *T.cruzi* e algumas espécies de *Leishmania* foram obtidos bons resultados na expressão de certos genes sem a presença de um promotor (Teixeira, 1998).

A biologia molecular destes parasitas tem progredido rapidamente e com isso ferramentas, como vetores de expressão têm sido criadas especialmente para estes parasitas. Kelly e colaboradores (1992) desenvolveram um vetor chamado pTEX, o qual foi construído utilizando-se seqüências flanqueadoras derivadas de dois genes *gapdh*, e para ajudar na clonagem e permitir a seleção de transformantes, um sítio de clonagem múltiplo e um marcador de resistência a droga (gene *neo*) foram incluídos. Observou-se que o plasmídeo se replica episossomalmente e se mantém estável durante a presença de seleção exercida pela droga. É importante ressaltar que o pTEX pode ser utilizado para transfectar *T.cruzi* e várias espécies de *Leishmania*, mas não *T.brucei* ou *C. fasciculata* (Kelly *et al*, 1992).

As transformações genéticas têm trazido uma grande quantidade de informações a respeito da biologia destes parasitas, criando muitas possibilidades de manipulação de seus genomas, auxiliando na busca da cura destas doenças.

5. Superexpressão de enzimas que agem na detoxificação de espécies reativas de oxigênio em *T.cruzi*:

A identificação e análise das enzimas do *T.cruzi*, que o protegem contra o estresse oxidativo é de grande importância sendo esta uma área alvo para o desenvolvimento terapêutico.

Investigações sobre o papel da enzima superóxido dismutase (SOD), que remove o excesso de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) via dismutação para oxigênio e peróxido de hidrogênio, do *T.cruzi* foram realizadas (Temperton *et al*, 1998). Uma atividade 5 a 8 vezes maior para a SOD foi obtida em células de *T.cruzi* que superexpressavam esta enzima (Temperton *et al*, 1998), utilizando o vetor pTEX-SOD (Kelly *et al*, 1992). As células mutantes apresentaram uma sensibilidade duas vezes maior que as células controle aos efeitos inibitórios do crescimento celular pela violeta genciana e benzonidazol (Temperton *et al*, 1998). Uma explicação provável, por analogia com outros organismos como bactérias (Scott *et al*, 1987; Scott *et al*, 1989) e células de mamíferos (Amstad *et al*, 1991; Amstad *et al*, 1994), seria que a geração de $O_2^{\cdot-}$ nas células que superexpressaram SOD causaria um desequilíbrio no sistema oxidativo do parasita, resultando em um aumento da velocidade de produção de H_2O_2 . Como a habilidade para metabolizar H_2O_2 é limitada, o efeito tripanossomicida, diretamente ou pela geração de radicais hidroxila seria aumentado.

Além disso, a SOD tem se mostrado capaz de catalisar a produção de radicais hidroxila a partir de H_2O_2 (Yim *et al*, 1990). Esta também seria a explicação principal para

a sensibilidade a O_2^- aumentada de *E.coli* que superexpressaram Fe-SOD (Scott *et al*, 1987).

Outra enzima que foi superexpressa em tripanossomatídeos foi a tripanotiona redutase (Kelly *et al*, 1993). A região codificante da tripanotiona redutase foi amplificada do DNA genômico de *Leishmania donovani* (*L.donovani*) e clonada no vetor pTEX, realizando-se a transfecção tanto em *L. donovani* quanto em *T. cruzi*. O crescimento das células transformadas e selvagens foi igualmente sensível a inibição por nifurtimox, nitrofurazona, violeta genciana e H_2O_2 . Estes experimentos sugerem que a habilidade de regenerar dihidrotripanotiona a partir de tripanotiona dissulfeto não é um passo limitante no metabolismo de H_2O_2 (Kelly *et al*, 1993).

Os genes correspondentes à TcCPX e TcMPX, foram clonados no vetor pTEX e observou-se que as linhagens de *T.cruzi* (cepa CL Brener) que superexpressaram TcCPX ou TcMPX, crescidas na presença de H_2O_2 e t-butil hidroperóxido, tinham uma susceptibilidade muito menor que as células controle. Neste caso, as concentrações de peróxidos necessárias para inibir o crescimento celular em 50% (IC50), eram duas vezes maior quando comparadas ao controle (Wilkinson *et al*, 2000). Essas enzimas são capazes de proteger os parasitas de peróxidos de origem endógena e exógena. A susceptibilidade às drogas benzonidazol e nifurtimox, permaneceu inalterada com relação às células selvagens. A partir disso supôs-se que o mecanismo de ação dessas drogas não seja através de dano mediado por peróxidos (Wilkinson *et al*, 2000), e sim pela diminuição dos níveis de GSH, como proposto por Maya e colaboradores (1997).

Após a descoberta da enzima TcGPXI em *T.cruzi* (Wilkinson *et al*, 2000) que também participa da cascata de detoxificação de hidroperóxidos, (Figura 2), o grupo de Wilkinson e colaboradores (2002) superexpressou esta enzima e determinou sua

localização na célula. Os parasitas que superexpressaram a enzima tiveram um pequeno, mais significativo, aumento da IC50 com relação ao H₂O₂ e ao t-butil hidroperóxido, porém com relação às drogas benzonidazol e nifurtimox não houve diferença significativa. A TcGPXI está localizada no citosol e também no glicosomo, sendo que ela contém um tripeptídeo no terminal carboxílico que pode ser um sinal para o transporte desta proteína para o glicosomo. Além disso, a atividade da TcGPXI também pode ser ligada a redução da tripanotona através de um caminho alternativo, envolvendo a proteína triparedoxina (Wilkinson *et al*, 2002).

OBJETIVOS

O gene que codifica a proteína TXNPx citosólica, foi escolhido para ser superexpresso, pois esta proteína participa de uma cascata de detoxificação de hidroperóxidos muito importante para o *T.cruzi*, que difere do metabolismo análogo no hospedeiro, representando um bom alvo para a terapêutica.

Os objetivos do trabalho foram:

1. Obter os mutantes das células epimastigotas de *T.cruzi* transfectados com o vetor pTEX e pTEX-TXNPx;
2. Estudar os efeitos da superexpressão quando as células são submetidas ao pré-tratamento com H_2O_2 , com relação aos níveis de mRNA e proteína. Estabelecer se o tempo de tratamento influi na expressão da proteína TXNPx para as células transformadas. Determinar a IC50 com relação ao H_2O_2 ;
3. Estabelecer se a eletroporação somente com o vetor pTEX pode causar mudanças nas células, com relação às selvagens, estudando os mesmos parâmetros que foram determinados para as células eletroporadas com o vetor pTEX-TXNPx;
4. Estudar possíveis relações da TXNPx com a via das pentoses fosfato, já que a cascata de detoxificação de hidroperóxidos se inicia com a doação de equivalentes reduzidos do NADPH.

1. Cultura de células epimastigotas de *T.cruzi*:

As células epimastigotas da cepa Y, foram crescidas à 28°C em meio LIT (68,4mM de cloreto de sódio; 5,4mM de cloreto de potássio; 11,1mM de glicose; 56,4mM de fosfato de sódio dibásico anidro; 0,5% de triptose; 0,5% de infusão de fígado; 20µg/mL de hemina; pH 7,4) e 10% de soro fetal bovino inativado (Camargo, 1964). Após 5 dias da inoculação de $5,2 \times 10^6$ células/mL em meio LIT, estas foram coletadas, por centrifugação (1000 g durante 5 min à 4°C) e lavadas uma vez com PBS (137mM de cloreto de sódio; 2,7mM de cloreto de potássio; 8,1mM de Na₂HPO₄ e 1,5mM de KH₂PO₄, pH 7,4) e uma vez com IB (2mM de MgCl₂, 5mM de KCl, 80mM de NaCl, 16,2 mM de Na₂HPO₄ pH 7,4, 3,8mM de NaH₂PO₄, 50mM de glicose e 0,15% de BSA 1%).

A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer.

2. Cultura de bactérias *E. coli* da linhagem DH5α:

As bactérias foram cultivadas em meio LB (10g/L de triptona; 5g/L de extrato de levedura; 10g/L de cloreto de sódio, pH 7,0 e 15g/L de agarose (para meio sólido). As bactérias que tinham plasmídeo com gene de resistência a ampicilina, foram crescidas em meio LB acrescido de 20µg/mL de ampicilina (Sambrook & Russell, 2001).

3. Preparo de bactérias competentes:

As bactérias competentes da linhagem DH5α foram feitas como previamente descrito (Sambrook & Russell, 2001).

4. Obtenção do gene da TXNPx:

O gene da TXNPx citosólica foi obtido no laboratório da Prof. Dra. Maria Júlia Manso Alves, na Universidade de São Paulo, no Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, pelo Prof. Jorge A. Lopez. Este gene foi amplificado através do DNA genômico de células epimastigotas de *T.cruzi* da cepa Y de acordo com descrito anteriormente (Lopez *et al*, 2000), e clonado no sítio *Sma* I do vetor pUC18 (AmershamPharmacia).

5. Construção dos vetores de expressão:

O gene da TXNPx continha na sua extremidade 3' sítio de restrição para *Xho* I e o vetor pUC18 onde o gene estava clonado possuía sítio para *Eco* RI. A reação de corte, para retirada deste gene do vetor pUC18, foi realizada utilizando 10U de *Eco* RI e 10U de *Xho* I (ambas GibcoBRL[®]), 2 μ L de tampão 2 (GibcoBRL[®]), em um volume de 20 μ L, à 37°C por 2 hs. Para purificação do gene, fez-se uma eletroforese (Sambrook & Russell, 2001), em gel de agarose de baixo ponto de fusão (GibcoBRL[®]), separou-se a banda respectiva ao gene da TXNPx e utilizou-se o Concert[™] Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL[®]), para retirada do fragmento do gel. Em seguida, a reação de ligação no vetor pTEX foi feita utilizando-se 6 vezes mais a quantidade em picomoles de vetor, para o gene e 1U de T4 DNA ligase (GibcoBRL[®]) (Sambrook & Russell, 2001).

Obtidos os vetores, uma reação de seqüenciamento foi feita para verificar a integração do gene. Para a reação foi utilizado protocolo de acordo com o fabricante do aparelho de sequenciamento (Perkin Elmer, 377) onde foi utilizado 3 μ L de tampão de seqüenciamento, 1 μ L de Big Dye[™](Perkin Elmer), 5 picomoles de primer (5'-

CGCCTCGAGATGTCCTGCGGAGAC- 3') e 300 a 400ng de DNA em um volume final de 10 μ L. Os parâmetros para a programação do termociclador (9700 Perkin Elmer) foram: 1 ciclo de 3 min a 95°C, 40 ciclos de 40 seg a 95°C, 30 seg a 50°C e 4 min a 60°C.

Esta parte do projeto foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Gonçalo A. Guimarães Pereira.

6. Transformação das bactérias competentes e purificação dos plasmídeos vetores:

A transformação das bactérias da linhagem DH5 α foi feita por choque térmico (Sambrook & Russell, 2001). A extração dos plasmídeos das bactérias transformadas foi realizada de modo a obter uma maior quantidade de DNA plasmidial, sendo que os vetores utilizados nas eletroporações foram purificados em média escala (Sambrook & Russell, 2001).

Inoculou-se 50mL de cultura de bactéria em meio LB (10g/L de triptona; 5g/L de extrato de levedura; 10g/L de cloreto de sódio, pH 7,0) na presença de 50 μ g/mL de ampicilina, durante 12 hs a 37°C. As células foram centrifugadas para a retirada do meio LB, posteriormente ressuspensas em 4mL de solução I (10mM de EDTA, 25mM de Tris-HCl, pH 8,0), adicionando-se 4mL de solução II (0,2N de NaOH e SDS 1%), misturando-se delicadamente e incubando-se a 0°C durante 10min. Adicionou-se 4mL de solução III (3M de acetato de potássio e 11,5% de ácido acético glacial), misturou-se o conteúdo e centrifugou-se a 12000 g e 4°C por 30min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, o DNA plasmidial foi precipitado com 2 vezes o volume de etanol absoluto e centrifugou-se a 12000 g e 4°C por 30min, para a retirada do sobrenadante. Lavou-se o precipitado com

etanol 70%, centrifugando-se depois a 12000 g e 4°C por 10min, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado, depois de seco a temperatura ambiente foi ressuspensão em 500µL de água ou TE (10mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 1mM de EDTA) estéreis. Os plasmídeos foram tratados com 2µL de RNase (concentração da solução estoque: 10mg/mL) durante 40min a 37°C e posteriormente purificados com fenol/ clorofórmio (Sambrook & Russell, 2001).

7. Eletroporação das células de *T.cruzi*:

Este método e o tampão de eletroporação foram adaptados por Wilkinson e colaboradores (de acordo com comunicação pessoal), do método já descrito anteriormente (Van den Hoff *et al*, 1992). Células epimastigotas da cepa Y de *T.cruzi*, em fase logarítmica de crescimento, foram lavadas duas vezes com PBS e posteriormente lavadas e ressuspensas em tampão “cytomix” (2mM de EGTA; 120mM de KCl; 0,15mM de CaCl₂; 10mM de solução K₂HPO₄/ KH₂PO₄ ; 25mM de HEPES; 5mM de MgCl₂.6H₂O; 0,5% de glicose; 100µg/mL de BSA e 1mM de hipoxantina; pH 7,6) numa concentração final de 5 x 10⁸ células/mL. As células foram colocadas em cubeta de 0,4cm ou 0,2cm, adicionando-se 50 a 100µg de plasmídeo, submetidas a 2-3 pulsos de 2,0kV e 10µF no aparelho Biorad Gene Pulser II, e deixadas por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram colocadas em 10mL de meio LIT e após 2 dias foi feito repique na proporção 1:10 (geralmente 1mL de cultura mais 9 mL de meio LIT) na presença de antibiótico G418 (Geneticin, GibcoBRL®). Para os vetores episomais, no caso pTEX e pTEXTXNPx, utilizou-se uma concentração de 200µg/mL de G418. As células foram mantidas neste meio até observar-se a presença de células resistentes, em torno de 4-6 semanas.

8. Análise do DNA de *T.cruzi* por Southern blotting:

A extração do DNA de células de *T.cruzi* foi realizada através do método da proteinase K (Blaxter, M. L. *et al*, 1988). O Southern blotting foi realizado através do método de sonda fria, de acordo com protocolo do produto, Random Primer Fluorescein Labeling Kit com Antifluorescein –AP (NEN® Life Science Products).

9. Análise do RNA de *T. cruzi* por Northern blotting:

A extração do RNA de células de *T.cruzi* foi feita utilizando TRIZOL REAGENT da Life Technologies. O Northern blotting foi realizado através do método de sonda fria, de acordo com protocolo do produto, Random Primer Fluorescein Labeling Kit com Antifluorescein –AP (NEN® Life Science Products).

A densitometria das bandas foi determinada utilizando-se o programa ImageMater® Total Lab, versão 1.0 da Amershan Pharmacia Biotech.

10. Obtenção do gene *neo* para confirmar a transformação:

Para obtenção da sonda do gene *neo*, foram construídos primers (ATGGGATCG GCCATTGAACAAGATGG e TCAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGGCG) e foram feitas reações de PCR, utilizando como molde 0,5 e 1µg do vetor pTEX; 37,5 picomoles de cada primer; 5mM de dNTPs; 2,5U de *Taq* Polimerase e tampão para *Taq* 1x (GibcoBRL®); 50mM de Mg²⁺; em um volume final de 20µL. Os parâmetros para a programação do termociclador (Robocycler gradient 96, Stratagene) foram: 25 ciclos de 1min a 95°C, 1min a 65°C e 1min a 72°C e após estes 25 ciclos o aparelho era programado para ficar a 6°C, para o término da reação. Aplicou-se o volume de reação em um gel de agarose de baixo

ponto de fusão e extraiu-se o fragmento de 803pb através do Concert™ Rapid Gel Extraction System (GibcoBRL®).

11. Incubação das células de *T.cruzi* com H₂O₂:

Células com 5 dias de crescimento foram lavadas uma vez com PBS e uma vez com IB, sendo ressuspensas em neste último na concentração de $5,2 \times 10^6$ células/mL, na presença de 0 a 200µM de H₂O₂ a 28°C, pelos tempos descritos nas legendas das figuras.

12. Preparo de lisado de *T.cruzi* para Western Blotting:

Os lisados foram preparados a partir de $5,2 \times 10^6$ células/mL que eram incubadas de acordo com o descrito no item 11 de Materiais e Métodos, em um volume final de 40mL de IB.

Depois de lavadas com PBS, as células foram ressuspensas em 60µL de PBS, e a um volume de 15µL de amostra adicionava-se o mesmo volume de tampão de amostra, que continha 0,02% de azul de bromofenol e 4% de β-mercaptoetanol, diluídos em uma solução-mãe composta de 32,9% de tampão C (0,5M de Tris-Cl pH 6,8 e 0,45 de SDS), 39,5% de glicerol, 26,3% de SDS 20% e 1,3% de EDTA 0,2M. Para dosagem de proteína (método de Biureto na presença de 0,2% de deoxicolato) foi utilizada amostra que não foi ressuspensa no tampão descrito (Gornal *et al*, 1949).

Antes da aplicação no gel o lisado foi incubado por 10min à 100°C.

13. 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 solução de 2,3mM de MES, 2,5mM de Tris, pH 7,3, 0,15mM de SDS e 0,04mM de EDTA filtrada na hora do uso. Condições de corrida: 200V, 120mA durante 35 min.

A transferência foi realizada para uma membrana de nitrocelulose, nas condições descritas acima, exceto para o tempo que foi de 70min. O tampão de transferência era composto de 12mM de Tris Base, pH 8,3, 96mM de glicina e 0,2M de metanol.

Após a transferência, a membrana foi neutralizada com 4% de leite em pó desnatado diluído em PBS, durante 30 min e depois incubada durante 16 hs com anticorpo primário (contra triparedoxina peroxidase de *T.cruzi* numa diluição de 1:630 em PBS/ 0,1%Tween 20).

Depois de incubada com o anticorpo primário a membrana foi lavada com PBS/ 0,1%Tween 20, incubada por 1 h com anticorpo secundário (anti-camundongo IgG - Sigma A3562) numa diluição 1:2500 em PBS/ 0,1% Tween 20 e posteriormente lavada com PBS.

Antes da revelação para fosfatase alcalina, a membrana era mergulhada durante 10min no tampão Tris/ Na⁺/ Mg²⁺(100mM Tris-Cl, pH 9,5, 100mM NaCl e 5mM MgCl₂). Em seguida, descartou-se este tampão e adicionou-se a solução reveladora feita a partir de 10mL do tampão Tris/ Na⁺/ Mg²⁺ mais 33μL de BCIP (5-bromo-4 cloro-3-indolil-fosfato, 50mg/mL) (Biorad-CA, EUA) e 66μL de NBT, (“nitroblue tetrazolium”, 50mg/mL) (Biorad-CA, EUA).

A densitometria das bandas foi determinada utilizando-se o programa ImageMater® Total Lab, versão 1.0 da Amershan Pharmacia Biotech.

14. Obtenção do anticorpo primário policlonal para Western Blotting:

Realizaram-se imunizações com 3 a 30 μ g da proteína TXNPx recombinante de *T. cruzi*, administrada em adjuvante de Freund completo no primeiro inóculo e adjuvante incompleto nos inóculos subseqüentes. As imunizações foram feitas em intervalos de 7 e 15 dias em camundongos, sendo a rota intraperitoneal. Após 6 imunizações o camundongo foi sangrado por punção do plexo radial. O sangue coletado foi coagulado a 37°C por 1h, permanecendo depois a 4°C durante à noite. O soro foi coletado por centrifugação a 2500 rpm e armazenado a 20°C. Este anticorpo foi obtido pelo Prof. Dr. Jorge A. Lopez no laboratório da Profª. Dra. Maria Júlia Manso Alves, no Depto. de Bioquímica do IQ-USP.

15. Determinação da produção de NADPH através da medida da atividade das enzimas da Via das Pentoses Fosfato:

As enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD), que fazem parte da Via das Pentoses Fosfato e que são responsáveis pela produção de NADPH, tiveram suas atividades determinadas através da quantidade de NADPH produzida por minuto. Este método foi padronizado para as células de *T. cruzi* (Pereira, 2000), baseando-se no método descrito por Cronín e colaboradores (1989).

As células foram lavadas uma vez com PBS e uma vez com IB, contendo 1mM de DTT e ressuspensas neste IB contendo inibidor de proteases (Cocktail Set III, Calbiochem®). A quantidade de inibidor era calculada a partir da leupeptina presente, onde eram adicionados 80 μ M de leupeptina para em torno de 400 x 10⁶ células (Cronín *et al*, 1989).

Ao meio de reação (50mM de Tris-HCl, pH 7,6, 50mM de KCl, 0,1% de Triton X-100) foram adicionados NADP⁺ (250 μ M), MgCl₂ (2mM), glicose 6-fosfato (1mM), 6-

fosfogluconato (1mM), e 2×10^6 células/mL. A produção de NADPH total era observada através de espectrofotometria a 340nm. A atividade da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase foi obtida através da quantidade de NADPH produzida por min, na ausência de glicose 6-fosfato. A atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase foi obtida através da subtração da quantidade de NADPH obtida somente através da 6-fosfogluconato desidrogenase da quantidade total produzida por min (Cronín *et al*, 1989).

16. Análises estatísticas:

As análises foram realizadas utilizando-se o programa Graphpad Instat. Os valores de probabilidade, $p < 0,05$ foram considerados significativos. Quanto às análises comparativas, foi aplicado o teste “One way-Anova”

RESULTADOS

1. Obtenção dos vetores de expressão:

Construiu-se o vetor pTEX-TXNPx (Figura 4) extraindo-se o gene TXNPx do plasmídeo pUC18TXNPx através da digestão com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xho* I, e posterior ligação ao vetor pTEX, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos.

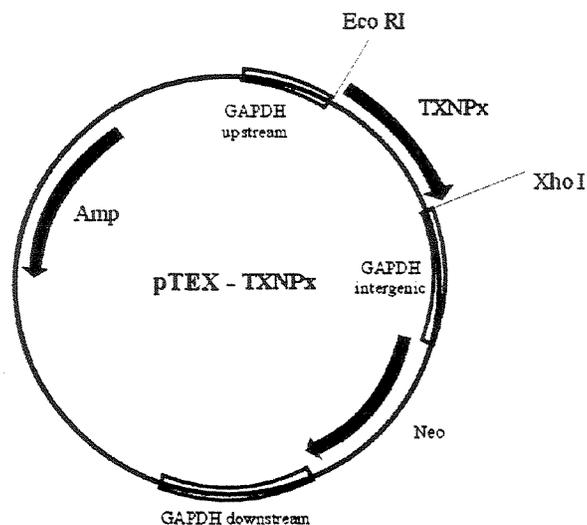


Figura 4: Vetor de expressão pTEX-TXNPx. O gene TXNPx foi clonado nos sítios de restrição *Eco* RI e *Xho* I conforme descrito em Materiais e Métodos.

A ligação foi confirmada pela reação de seqüenciamento (377, Perkin Elmer) do vetor obtido, onde se obteve identidade com o gene TcCPX (triparedoxina peroxidase citosólica de *T. cruzi*, número de acesso no GenBankTM: AJ012101) maior que 80%. Através de reação com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xho* I que produziu fragmento do tamanho exato do inserto clonado (dado confirmado posteriormente também através de Southern blotting a partir de DNA total de células de *T.cruzi* transformadas, Figura 6) também pôde se observar que houve a ligação do inserto ao vetor (dado não mostrado).

2. Confirmação da obtenção de células de *T.cruzi* transformadas:

Células na concentração de 5×10^8 células/mL em tampão “cytomix” foram eletroporadas, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos, na presença de 100 μ g do vetor pTEX, e também na presença de 100 μ g do vetor pTEX-TXNPx.

Células resistentes ao antibiótico G418 foram obtidas após 5 semanas da eletroporação. O DNA das células foi extraído, digerido “overnight” com a enzima *Sst* I (enzima que corta uma vez no vetor pTEX) confirmando-se a transformação através de Southern blotting, utilizando como sonda o gene *neo*, presente somente nas células transformadas (Figura 5). Outra parte do DNA foi digerido “overnight” com *Eco* RI e *Xho* I, enzimas que cortam exatamente nas extremidades 5' e 3' respectivamente do gene TXNPx, que foi inserido no vetor pTEX, sendo este inserto ausente nas células que não possuem o vetor pTEX-TXNPx. Confirmou-se a presença desse inserto nas células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx, através de Southern blotting utilizando como sonda o gene da TXNPx (Figura 6).

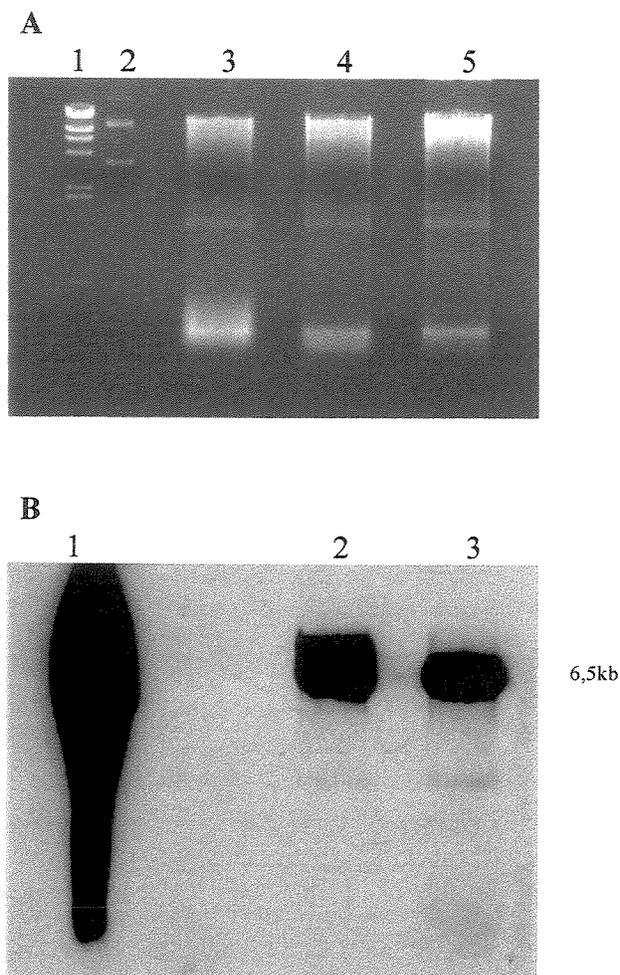


Figura 5: Southern blotting, utilizando como sonda o gene *neo*, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. A: Gel de DNA. Coluna 1: DNA λ *Hind*III, Coluna 2: vetor pTEX, 10 μ g de DNA digerido com enzima *Sst* I, de células de *T.cruzi* epimastigotas cepa Y, coluna 3: tipo selvagem, coluna 4: transformadas com o vetor pTEX e coluna 5: transformadas com o vetor pTEX-TXNPx. B: Southern blotting,. Coluna 1: vetor pTEX, coluna 2: DNA de células de *T.cruzi* transformadas com o vetor pTEX e coluna 3: DNA células de *T.cruzi* transformadas com o vetor pTEX-TXNPx.

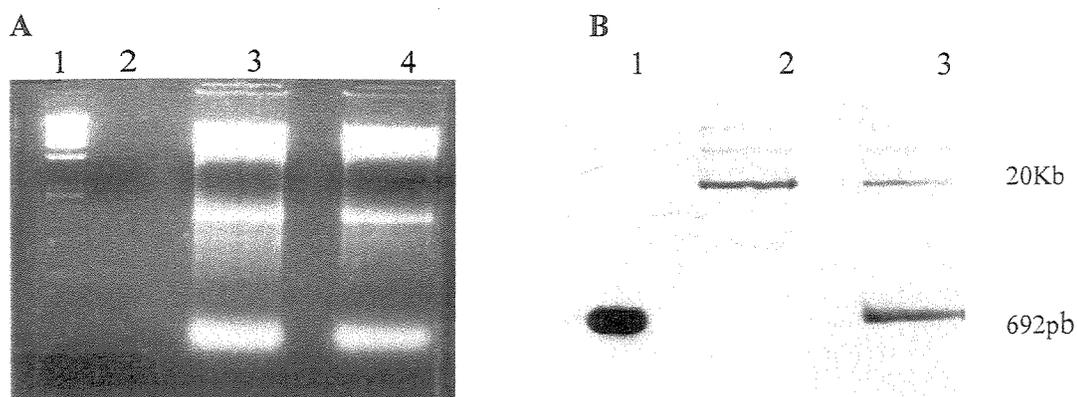


Figura 6: Southern blotting utilizando como sonda o gene TXNPx, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. A: Gel de DNA. Coluna 1: DNA λ HindIII, Coluna 2: inserto TXNPx, 10 μ g de DNA digerido com as enzimas Eco RI e Xho I de células de *T.cruzi* epimastigotas cepa Y, coluna 3: transformadas com o vetor pTEX, coluna 4: transformadas com o vetor pTEX-TXNPx. B: Southern blotting, Coluna 1: inserto TXNPx, coluna 2: DNA das células transformadas com o vetor pTEX e coluna 3: DNA das células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx, onde se evidencia banda em torno de 692pb, de mesmo tamanho do inserto.

3. Comparação da expressão de TXNPx nas células de *T.cruzi* selvagens e transfectadas com os vetores pTEX e pTEX-TXNPx:

Com a finalidade de se estabelecer esta comparação entre as células mutantes e selvagens, conforme a concentração de H₂O₂, as células foram pré-incubadas durante 30min, na ausência de H₂O₂, ou na presença de 100 ou 200 μ M deste composto, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Posteriormente, extraiu-se o RNA total das células e preparou-se lisados para análise por Western blot.

Para o gel de RNA foi aplicado aproximadamente 7 μ g de RNA total (concentração das amostras determinada através de espectrofotometria), procedendo-se a transferência para uma membrana de nylon (Hybond N⁺), de acordo com o descrito em Materiais e Métodos (Sambrook & Russell, 2001). As intensidades das bandas observadas no gel de

RNA (Figuras 7 A e 8A) e as intensidades das bandas obtidas no Northern blotting (Figuras 7 B e 8B), onde a hibridação foi feita com o gene TXNPx marcado com reagente quimioluminescente, conforme descrito em Materiais e Métodos, foram calculadas com o auxílio do programa ImageMater[®] Total Lab, versão 1.0 da Amershan Pharmacia Biotech. A partir dos valores obtidos para as intensidades observadas no gel de RNA fez-se uma correção dos valores obtidos no Northern blotting, considerando-se as diferenças na quantidade aplicada de RNA.

Para o Western blotting, a transferência foi feita para uma membrana de nitrocelulose e para detectar-se a proteína TXNPx, utilizou-se anticorpo anti-TXNPx citosólica de *T. cruzi* (Figuras 7 D, 7 E , 8 D e 8 E).

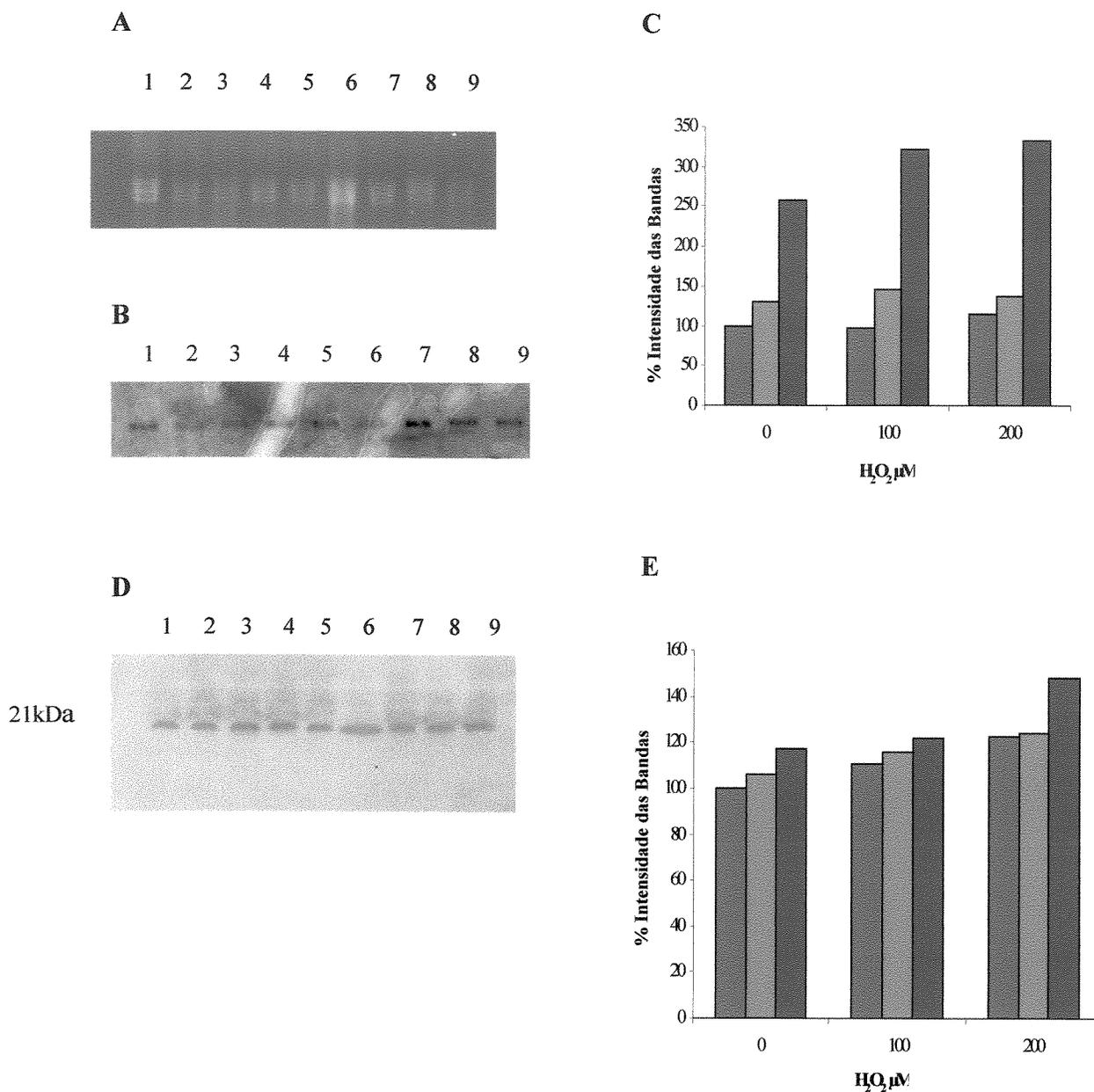


Figura 7: Análise da expressão da TXNPx conforme a concentração de H₂O₂, através de Northern blotting e Western Blotting, das células de *T. cruzi* selvagens (■) e transformadas com os vetores pTEX (■) e pTEX-TXNPx (■). 5,2x 10⁶ células/mL foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ e incubadas por 30min a 28°C, posteriormente extraiu-se o RNA total e obteve-se o lisado proteico. **Colunas 1, 2 e 3: células Y selvagens, **colunas 4, 5, 6:** transformadas com pTEX e **colunas 7, 8 e 9:** transformadas com pTEX-TXNPx. Pré-incubação sem H₂O₂: **colunas 1, 4 e 7**, pré-incubação com 100μM de H₂O₂: **colunas 2, 5 e 8**, e com 200μM de H₂O₂: **colunas 3, 6 e 9**. **A. Gel de RNA**, 7μg RNA total por coluna. **B. Northern blotting**. **C. Análise da expressão**, com o auxílio do programa Image Master Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech. **D. Western blotting**, 60μg de proteína total por coluna. **E. Análise da quantidade de TXNPx**, através do programa Image Master Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech. A intensidade das bandas foi normalizada a partir da intensidade da banda da coluna 1, considerada 100%.**

Através da análise das bandas obtidas no Northern blotting (Figura 7 C), pôde-se observar que as células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx, apresentaram altos níveis de mRNA referentes a proteína TXNPx. Ocorreu um aumento de mRNA em torno de 158% a mais que a selvagem. Quando as células transformadas com pTEX-TXNPx foram tratadas com H₂O₂ esta diferença aumentou para 221% e 232% referente ao tratamento com 100 e 200μM, respectivamente. As células transformadas com o vetor pTEX também apresentaram uma maior nível do mRNA da TXNPx, 29% com relação a selvagem, e quando tratadas com H₂O₂ esta diferença ficou em torno de 40%. Comparando-se as células selvagens que não sofreram tratamento com H₂O₂ com as selvagens que sofreram, não se observou uma diferença significativa na quantidade de mRNA da TXNPx (em torno de 10%).

No Western blotting a quantidade de TXNPx que foi traduzida não correspondeu à quantidade de mRNA. As células que superexpressaram a TXNPx, quando comparadas às selvagens não tratadas, atingiram um aumento de 17%, 22% e 48% na quantidade de TXNPx, sem terem sofrido tratamento, sendo tratadas com 100μM e 200μM de H₂O₂, respectivamente. As transformadas com pTEX apresentaram um aumento de 6%, 15% e 24% de TXNPx, comparadas às selvagens, sem terem sido tratadas, tratadas com 100μM e 200μM de H₂O₂, respectivamente. Já para as células selvagens observou-se um aumento da quantidade de TXNPx, com relação as mesmas não tratadas, de 10% e 22%, para o tratamento com 100μM e 200μM de H₂O₂.

Através da comparação dentro de um mesmo grupo de células, pôde-se dizer que dentre as células selvagens e as transformadas com o vetor pTEX, não observou-se uma diferença muito grande nos níveis de mRNA da TXNPx, quando houve o tratamento com H₂O₂ durante 30min. Para as células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx esta

diferença foi significativa, 63%, comparando-se as células tratadas com 100 μ M de H₂O₂ e não tratadas, aumentando para 74% quando as células foram tratadas com 200 μ M de H₂O₂. Quanto a TXNPx que foi traduzida, para as células selvagens observou-se um aumento de 10% após tratamento com 100 μ M de H₂O₂ e de 22% após tratamento com 200 μ M de H₂O₂. As células transformadas com pTEX comportaram-se de modo semelhante às selvagens, pois quando tratadas com 100 μ M de H₂O₂ aumentaram em 10% a quantidade de TXNPx, e quando foram tratadas com 200 μ M de H₂O₂ o aumento foi de 19%. Já as células transformadas com pTEX-TXNPx, após o tratamento com 100 μ M de H₂O₂, praticamente não aumentaram a produção de TXNPx (4,5%), porém quando tratadas com 200 μ M de H₂O₂, houve um aumento de 30%.

Com o intuito de se observar a influência do tempo de tratamento com peróxido na expressão desta proteína, as células foram incubadas com a maior concentração de peróxido utilizada no experimento anterior (200 μ M) durante 1h e 2 hs (Figura 8).

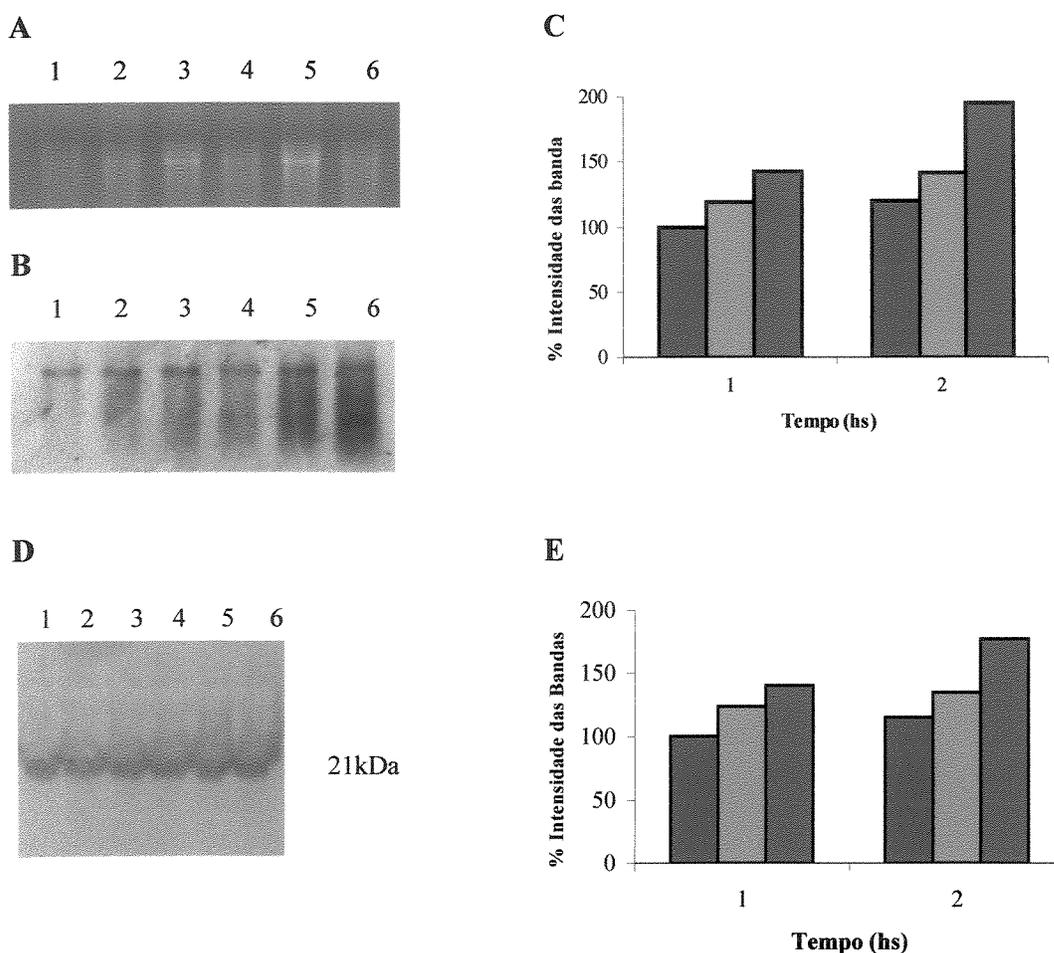


Figura 8: Análise da expressão da TXNPx, conforme o tempo de tratamento, através de Northern blotting e Western Blotting, das células de *T. cruzi* selvagens (■), transformadas com os vetores pTEX (■) e pTEX-TXNPx (■). $5,2 \times 10^6$ células/mL foram tratadas com $200 \mu\text{M}$ de H_2O_2 e incubadas durante 1 e 2 hs a 28°C , posteriormente extraiu-se o RNA total e obteve-se o lisado proteico. Colunas 1 e 2: células Y selvagens, colunas 3 e 4: transformadas com pTEX e colunas 5 e 6: transformadas com pTEX-TXNPx. Tempo de incubação de 1 h: colunas 1, 3 e 5, e tempo de incubação de 2 hs: colunas 2, 4 e 6. A. Gel de RNA, $7 \mu\text{g}$ RNA total por coluna. B. Northern blotting. C. Análise da expressão, com o auxílio do programa Image Master Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech. D. Western blotting, $60 \mu\text{g}$ de proteína total por coluna. E. Análise da quantidade de TXNPx, através do programa Image Master Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech., A intensidade das bandas foi normalizada a partir da intensidade da banda da coluna 1, considerada 100%.

Após 1 h de incubação das células com $200 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , as transformadas com o vetor pTEX-TXNPx tiveram um aumento de mRNA referente a TXNPx, com relação as

células selvagens tratadas por 1h, igual a 42% e após 2 hs esta diferença passou para 95% (Figura 8 C). Um aumento semelhante ao observado para o mRNA foi observado para a quantidade de TXNPx produzida, após 1h de tratamento, que foi de 40%, e após 2h houve um aumento de 77% desta proteína (Figura 8 E). As células transformadas com o vetor pTEX também apresentaram um aumento do mRNA comparadas às selvagens, 19% com o tratamento de 1 h e 40% com o tratamento de 2 hs, e o valor obtido para as mesmas amostras, para a quantidade de TXNPx foram de 24% e 34%, respectivamente. Pôde-se observar também para as células selvagens que a quantidade de mRNA foi semelhante a quantidade traduzida para proteína, pois após 2 hs de tratamento obteve-se um aumento de 20% para o mRNA e 15% para a TXNPx.

Comparando-se células de mesmo grupo entre si, observa-se que as transformadas com o vetor pTEX-TXNPx após 2hs de tratamento com 200 μ M de H₂O₂, aumentam a produção do mRNA, em 53% comparadas com as mesmas tratadas por 1h. As transformadas com pTEX aumentaram os níveis de mRNA em 22% e as selvagens aumentaram em 20%. Quanto a quantidade de TXNPx, as transformadas com o vetor pTEX-TXNPx tratadas por 2 hs com 200 μ M de H₂O₂, possuíam 37% de TXNPx a mais que as mesmas células tratadas por 1h. As transformadas com pTEX tiveram um aumento de 10% e as selvagens 15%.

4. Curva de Crescimento e determinação da IC50:

A curva de crescimento das células contendo os vetores e a controle foi determinada para se estabelecer se havia alguma diferença no crescimento (Figura 9), de acordo com o descrito em Materiais e Métodos.

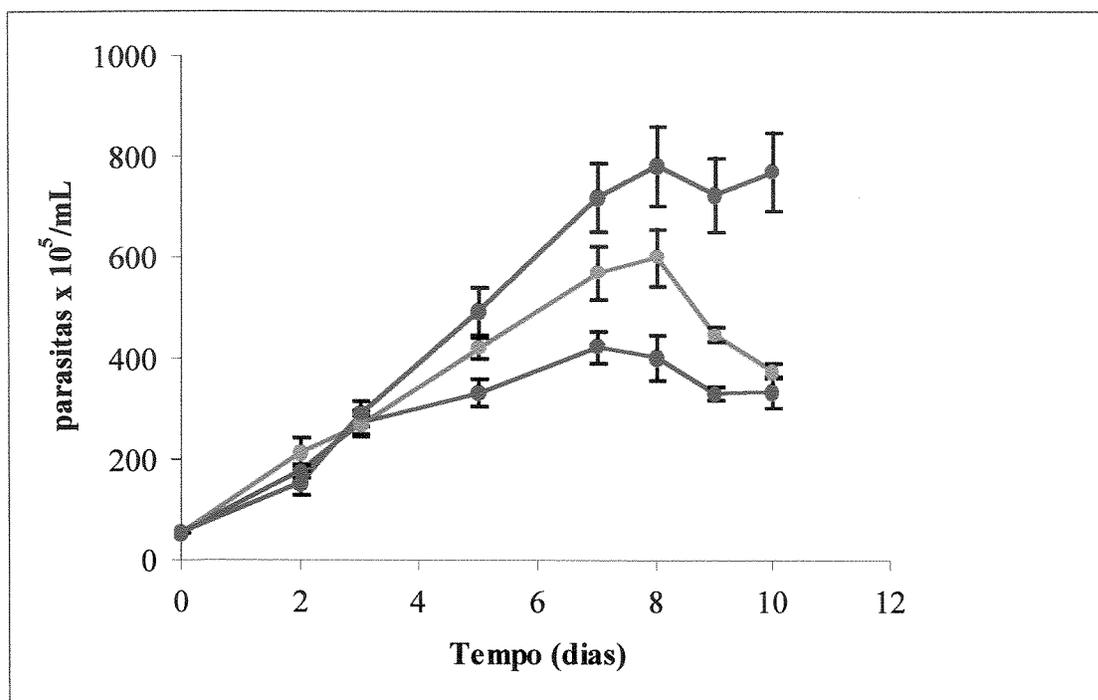


Figura 9: Curva de crescimento. $5,2 \times 10^6$ células/mL foram incubadas à 28°C em meio LIT. Nos dias especificados, alíquotas foram retiradas e o número de células foi determinado pela contagem em Câmara de Neubauer. (●) células Y selvagens, (◻) células transformadas com pTEX e (◻) células transformadas com pTEX-TXNPx. Os resultados são médias de dois experimentos \pm SD (feitos em duplicata).

Observa-se que as células que receberam o vetor pTEX-TXNPx tiveram um maior crescimento comparado com as que receberam o vetor pTEX e as células selvagens. É importante salientar que as células transformadas tanto com pTEX quanto pTEX-TXNPx,

não apresentaram nenhuma mudança morfológica, comparadas às selvagens. O índice de crescimento (InC) foi calculado a partir da fórmula (Martinez-Diaz *et al*, 2001):

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

* O número final de parasitas considerado foi o número de parasitas atingido no oitavo dia, com exceção das células selvagens, onde se considerou o sétimo dia.

Através da curva de crescimento (Figura 9) também foi determinado o tempo de duplicação (TD) de acordo com a fórmula (Toma *et al*, 2000):

$$\text{TD} = \frac{\ln 2 (T2 - T1)}{2,3 \log (N1/NO)}$$

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 NO- número de parasitas em T1.

Os valores obtidos para o InC e o TD estão na Tabela 1.

Tabela 1: Índice de crescimento (InC) e tempo de duplicação (TD). Resultados obtidos a partir da curva de crescimento (Figura 9).

Células	InC	TD (hs)
Y selvagens	8,14 ± 0,61	96,51 ± 0,82
Y transformadas com pTEX	11,54 ± 1,07 *	89,51 ± 6,24 ns
Y transformadas com pTEX-TXNPx	15,02 ± 1,51*** **	59,10 ± 4,95***

Para o InC: *** p<0,001 comparado às células selvagens, **p<0,01 comparado às células transformadas com pTEX, *p<0,05 comparado às células selvagens. Para o TD, ***p<0,001 comparado às células selvagens e transformadas com pTEX e ns: p>0,05 comparado às células selvagens.

As células que superexpressam a TXNPx apresentaram um maior InC e menor TD, comparadas às selvagens e às transformadas com pTEX. Já as transformadas com o vetor pTEX apresentaram um InC um pouco maior que o InC para as células selvagens, porém com relação ao TD, não houve diferença significativa entre estas células e as células selvagens.

Para a determinação da IC 50 as células foram pré-incubadas com H₂O₂ nas concentrações de 0 a 200µM, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos e os cálculos foram feitos de acordo com o descrito por Kelly e colaboradores (Kelly *et al*, 1993) (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração de H₂O₂ capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitas (IC₅₀). As células (5,2x10⁶ células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ e incubadas por 30min a 28°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. Os resultados são média de dois experimentos ± SD (feitos em duplicata).

Células	IC ₅₀ (μM)
Y selvagens	103,7 ± 3,0
Y transformadas com pTEX	104,4 ± 2,5 ns
Y transformadas com pTEX-TXNPx	125,0 ± 0,1 **

**p<0,01 comparado às células selvagens e transformadas com pTEX, ns: p>0,05 comparado às células selvagens.

As células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx, se mostraram menos susceptíveis ao H₂O₂, apresentando um valor de IC₅₀ aproximadamente 25% maior, quando comparado às células selvagens.

5. Determinação da produção de NADPH:

Com o objetivo de se determinar a influência da superexpressão da TXNPx na produção de NADPH, composto que inicia a doação de equivalentes reduzidos na cascata de detoxificação de hidroperóxidos de *T.cruzi* (Figura 2), avaliou-se a atividade das enzimas da Via das Pentoses Fosfato (Figura 10).

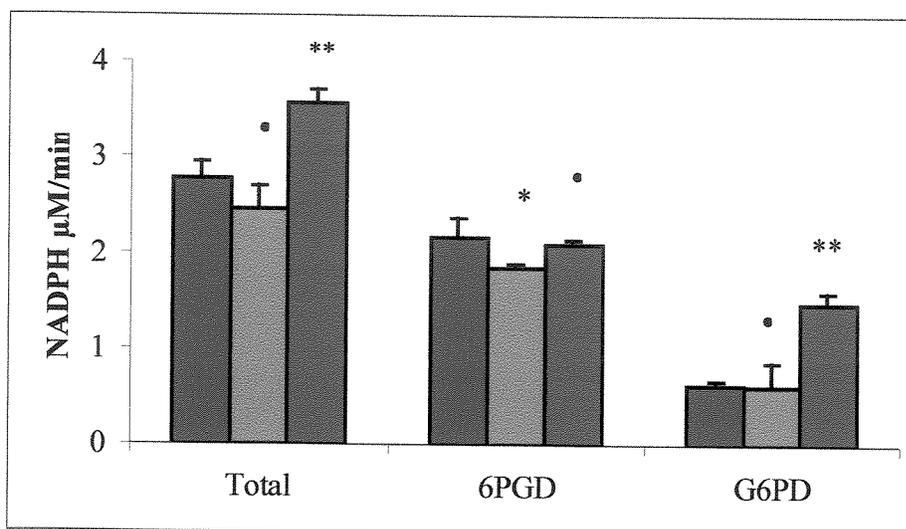


Figura 10: Produção de NADPH através da VPF de 2×10^6 células/ mL de *T.cruzi* selvagens (■), transformadas com os vetores pTEX (■) e pTEX-TXNPx (■). Acompanhou-se a mudança da absorbância a 340nm de acordo com o descrito em Materiais e Métodos e calculou-se a concentração de NADPH utilizando-se o coeficiente de extinção, $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ariyanayagam & Fairlamb, 2001). Os resultados são médias de três experimentos \pm SD (feitos em duplicatas). Para a atividade total: • $p > 0,05$ comparado às células selvagens e ** $p < 0,01$ comparado às células selvagens e transformadas com pTEX; para a 6PGD: • $p > 0,05$ comparado às células selvagens e às transformadas com pTEX e * $p < 0,05$ comparado às células selvagens e para a G6PD: ** $p < 0,01$ comparado às células selvagens e transformadas com pTEX e • $p > 0,05$ comparado às células selvagens.

As células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx produziram uma maior quantidade de NADPH total por minuto, $3,55 \mu\text{M}/\text{min}$, enquanto que as células selvagens produziram $2,77 \mu\text{M}/\text{min}$ e as células transformadas com pTEX produziram $2,45 \mu\text{M}/\text{min}$. A enzima que contribuiu com este aumento foi a glicose 6-fosfato desidrogenase, cuja atividade foi de $1,46 \mu\text{M}$ de NADPH/min para as células que superexpressam a TXNPx e $0,61 \mu\text{M}$ de NADPH/min para as outras células. A atividade da 6-fosfogluconato desidrogenase para as células mutantes permaneceu semelhante às células selvagens.

DISCUSSÃO

Como parasita, o *T.cruzi* está exposto ao estresse oxidativo, causado pelo seu metabolismo, pelo sistema imune do hospedeiro e pelo metabolismo das drogas utilizadas no tratamento da Doença de Chagas (Nogoceke *et al*, 1997). Sendo a habilidade deste parasita em lidar com este estresse deficiente (Fairlamb & Cerami, 1992) e o sistema de detoxificação de hidroperóxidos diferente do hospedeiro (Wilkinson *et al*, 2000), é muito importante o estudo das enzimas e proteínas envolvidas nestes processos, a fim de se desenvolver uma nova terapêutica.

Neste trabalho estudou-se a superexpressão da enzima TXNPx, que participa ativamente da cascata de detoxificação de hidroperóxidos (Figura 2). Comparamos as características das células selvagens e das células que superexpressam esta enzima, verificando o papel que esta desempenha quando a célula se encontra em condições de estresse oxidativo.

A transfecção de tripanossomatídeos é muito peculiar, pois a transcrição nestes parasitas é diferente da existente em outros eucariontes (Vanhamme & Pays, 1995), exigindo vetores de expressão especiais. Estes vetores devem possuir um sítio de adição SL a montante do gene a ser transcrito, para ocorrer o *trans-splicing* e um sítio acceptor *splice* a jusante do gene, para a poliadenilação. Não há a necessidade de um promotor, no caso do *T.cruzi*, pois a regulação da expressão gênica ocorre a níveis pós-transcricionais para a maior parte de seus genes (Teixeira, 1998). Foi escolhido o vetor pTEX para a expressão homóloga do gene da TXNPx (Figura 4), que é um vetor construído especificamente para tripanossomatídeos, pois possui seqüências flanqueadoras derivadas de genes de *T.cruzi* (Kelly *et al*, 1992). Este vetor possui um marcador de resistência a droga (gene *neo*) para seleção dos transformantes, e a existência deste gene, nas células transformadas com o

vetor pTEX somente e com o vetor construído pTEX-TXNPx, foi confirmada através de Southern blotting (Figura 5).

A inserção do gene da TXNPx através da transfecção também foi confirmada através de Southern blotting (Figura 6), utilizando-se as enzimas de restrição, que possuíam sítios nas extremidades do gene inserido, para cortar o DNA total das células de *T. cruzi*, obtendo-se assim um fragmento de mesmo tamanho do inserto.

As células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx, possuíam um nível constitutivo de mRNA da TXNPx aproximadamente três vezes maior que nas células selvagens, o que não significou um aumento igual para a proteína produzida (17%) (Figura 7). Para as células transformadas com o vetor pTEX também observou-se um maior nível de mRNA (29%) da TXNPx e a quantidade de proteína traduzida também foi menor (6%). Como já descrito anteriormente (Goldenberg *et al*, 1985; Ávila *et al*, 2001) o mRNA parece ser estocado no citoplasma para posteriormente ser traduzido. A regulação da expressão dos genes em tripanossomatídeos pode ocorrer a níveis de maturação e tradução destes mRNAs (Vanhamme & Pays, 1995). Os resultados obtidos com as células transformadas sugerem que a regulação do gene que codifica a proteína TXNPx é pós-transcricional.

Quando houve tratamento com 100 e 200 μ M de H₂O₂ durante 30min, observou-se que as células que superexpressaram a TXNPx tiveram seus níveis de mRNA ainda mais aumentados e que a tradução da proteína não aumentou na mesma proporção, quando comparadas às outras células (Figura 7). Pode-se deduzir que as células somente vão traduzir a proteína conforme a sua necessidade, mesmo possuindo a princípio uma maior quantidade de mRNA, ou que o tempo de 30min ainda não é suficiente para observar a tradução de proteína a níveis proporcionais aos níveis de mRNA. É importante ressaltar que

as células ao final dos 30 min de tratamento com a maior concentração de H₂O₂ (200µM) apresentavam morfologia normal e pouca mobilidade.

No intuito de observar se o nível de mRNA continuava aumentado conforme o tempo de incubação das células com H₂O₂, foi feito Northern e Western blotting, submetendo-se as células durante 1 e 2 hs à 200µM de H₂O₂ (Figura 8), concentração na qual obteve-se um maior nível de mRNA e proteína, observado anteriormente com o tratamento por 30min. Para as células selvagens e transformadas com pTEX, em ambos os tratamentos, os níveis de mRNA e proteína aumentavam com o tempo em uma mesma proporção. Com relação às células transformadas com pTEX-TXNPx, o mesmo foi observado para o tratamento de 1h, sendo observada uma diferença significativa entre os níveis de mRNA (95%) e proteína (77%) após 2 hs de tratamento. Ao final de 2 hs de tratamento as células estavam praticamente imóveis, mas possuíam morfologia normal.

Pode-se então deduzir que em um primeiro momento (30 min), em resposta ao estresse oxidativo, é produzido muito mais mRNA do que a célula é capaz de traduzir, porém ao longo do tempo (1 h), os níveis de mRNA e proteína passam a aumentar proporcionalmente. O estímulo dado pelo H₂O₂ persiste até 2 hs após o tratamento, uma vez que a quantidade de mRNA após este tempo é maior que o observado em 1 h.

Chiavegatto e colaboradores observaram que as células de *T.cruzi* são capazes de se adaptar ao estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂, sendo que a TXNPx está envolvida nesse processo tendo seus níveis de expressão aumentados (Chiavegatto *et al*, 2002). Em células de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) também foi demonstrado uma grande indução da cTPx I, homóloga a TXNPx, após a exposição ao H₂O₂ (Demasi *et al*, 2001). Diante disso e dos resultados obtidos, as peroxiredoxinas apresentam uma função antioxidante muito importante nessas células.

As células que superexpressam a TXNPx são mais resistentes ao tratamento com H₂O₂, como foi observado através da determinação da IC 50 (Tabela 2) de 125µM. É interessante ressaltar que a IC 50 obtida para estas células é aproximadamente 21% maior que a obtida para as células selvagens. Este valor está próximo do obtido para a diferença da quantidade de TXNPx basal observada entre estas células no Western blotting, que foi de 17% (Figura 7 E). Uma maior resistência ao H₂O₂, de células epimastigotas de *T. cruzi* (clone CL Brener) que superexpressam a TXNPx, também foi observada pelo grupo de Wilkinson e colaboradores (2000), além de uma maior atividade da TXNPx na presença de H₂O₂.

Através da curva de crescimento (Figura 9) concluiu-se que as células transformadas com o vetor pTEX-TXNPx possuem um maior índice de crescimento, comparadas às células selvagens, e também um menor tempo de duplicação (Tabela 1). Existe uma proteína que possui identidade com a estrutura primária da TSA (homóloga a TXNPx), a TbrTSA presente em *T. brucei rhodesiense* (El- Sayed *et al*, 1995). Esta proteína apresenta 61,8% de identidade com o produto do gene *pag* (“proliferation associated gene”), que é expresso intensamente em células epiteliais mamárias humanas que estão proliferando ativamente (El- Sayed *et al*, 1995). Desse modo, poderia deduzir-se que a TXNPx está associada a proliferação, ou então as células que superexpressam a TXNPx, sendo mais resistentes ao estresse oxidativo conseguiriam sobreviver mais e portanto observaria-se um maior número de células. O maior crescimento observado para as células transformadas com o vetor pTEX poderia ser explicado pelo fato de que as células contendo o plasmídeo sofreram uma seleção pela resistência ao G418, obtendo-se assim uma população mais resistente e com maior crescimento, como já foi observado anteriormente para *Leishmania donovani* (Zhang & Matlashewski, 1997). Este fato poderia

explicar também o ligeiro aumento existente para os níveis de mRNA e proteína das células transformadas com pTEX, comparados às células selvagens.

Para que a cascata de detoxificação de hidroperóxidos (Figura 2) funcione adequadamente é necessário também um balanço na quantidade de NADPH. Observou-se uma maior produção de NADPH para as células que superexpressam a TXNPx, por consequência do aumento na atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (Figura 10), que é uma das enzimas que produz NADPH na Via das Pentoses Fosfato. Tem-se mostrado que a expressão da G6PD está intimamente ligada ao estresse oxidativo em células de mamíferos, sendo responsável pela regulação da Via das Pentoses Fosfato (Pandolfi *et al*, 1995). Células de *S. cerevisiae* que possuíam mutação no gene estrutural que codifica esta enzima se mostraram sensíveis ao estresse oxidativo (Juhnke *et al*, 1996). Dessa forma, pode-se supor que a G6PD possa estar ligada ao estresse oxidativo também em *T. cruzi*, já que sua expressão é aumentada quando há um aumento da expressão da TXNPx.

A enzima G6PD também está envolvida com o crescimento celular. Sabe-se que o nível de oxidantes e redutores é muito importante para a regulação do crescimento celular, sendo o principal redutor intracelular o NADPH e a enzima G6PD a principal fonte deste redutor. Células de mamíferos que superexpressaram esta enzima demonstraram uma maior velocidade de crescimento comparadas às selvagens e quando estas células tiveram atividade da G6PD inibida, a velocidade de crescimento diminuía (Tian *et al*, 1998). Assim, o observado para as células que superexpressaram a enzima TXNPx a respeito do maior índice de crescimento e menor tempo de duplicação, pode ser consequência do fato destas células também apresentarem um aumento na atividade da G6PD, e não do fato da TXNPx possuir identidade com o gene *pag* como previsto anteriormente (El- Sayed *et al*, 1995).

A obtenção dos mutantes de *T.cruzi* que superexpressam a TXNPx esclareceu que a expressão desta proteína no parasita parece ocorrer a níveis pós-transcricionais, sendo sua expressão induzida pelo H_2O_2 . Comprovou-se a existência de uma interligação entre a cascata de detoxificação de hidroperóxidos e a Via das Pentoses Fosfato, e que a proteína envolvida no aumento da produção de NADPH observado para as células mutantes foi a G6PD. Uma maior atividade desta enzima pode ter sido a causa do maior índice de crescimento celular observado para as mutantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPHEY, M S.; BOND, C. S.; TETAUD, E.; FAIRLAMB, A. H. & HUNTER, W. N. The structure of reduced tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J. Mol. Biol.* v.300, p.903-915, 2000.

AMATO NETO, V. Modalidades alternativas de transmissão: empecilhos às cogitações de erradicação da doença de Chagas. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, v.39, p.93-95, 1984.

AMSTAD, P.; MORET, R. & CERUTTI, P. Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.1606-1609, 1994.

AMSTAD, P.; PESKIN, A. & SHAH, G. The balance between Cu,Zn superoxide dismutase and catalase affects sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry*, v.30, p.9305-9313, 1991.

ARIYANAYAGAM, M. R. & FAIRLAMB, A. H. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in tripanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.115, p.189-198, 2001.

ÁVILA, A. R.; YAMATA-OGATTA, S. F.; MONTEIRO, V. S.; KRIEGER, M. A.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, W. & GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.117, p.169-177, 2001.

BLACK, S. M. & WOLF, C. R. The role of glutathione dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacology and Therapeutics*, v.51, p.139-154, 1991.

BLAXTER, M. L.; MILES, M. A. & KELLY, J. M. Specific serodiagnosis of visceral leishmaniasis using a *Leishmania donovani* antigen identified by expression cloning. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.30, p.259-270, 1988.

BRENER, Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bulletin of The World Health Organization*, v.60, n.4, p.463-473, 1982.

BRUZIK, J. P. & STEITZ, J. A. Spliced leader RNAs from lower eukaryotes are trans-spliced in mammalian cells. *Nature*, v.360, p.692-695, 1990.

CALLAHAN, H. L. & BEVERLY, S. M. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.18427-18430, 1991.

CHIAVEGATTO, C. W. M.; CORAT, K. C. F.; LOPEZ, J. A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. & GADELHA, F. R. Tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* and the response to oxidative stress. *Eur. J. Biochem.* 2002 (submetido).

CHOCAIN, P. R.; AMATO NETO, V.; SABBAGA, E. & TORRECILAS, P.H. Aspectos clínicos diagnósticos relativos à fase aguda da doença de Chagas em pacientes submetidos à transplante de rim e imunodeprimidos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.18, p. 43-46, 1985.

CLARK, D.; ALBRECHT, M. & AREVALO, J. Ascorbate variations and dihydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.66, p. 143-145, 1994.

CLAYTON, C. E. The molecular biology of Kinetoplastida. **Genetic Engineering Academic Press** v.7, p. 2-56, 1988.

CRONÍN, C. N.; DEREK, P. N. & VOORHEIS, P. H. The enzymes of the classical pentose phosphate pathway display differential activities in procyclic bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **FEBS Lett.** v.244, n.1, p.26-30, 1989.

DEMASI, A. P. D.; PEREIRA, G. A. G. & NETTO, L. E. S. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. **FEBS Lett.** v.509, p.430-434, 2001.

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

EL-SAYED, N.; ALARCON, C.; BECK, J.; SHEFFIELD, V. & DONELSON, J. cDNA expressed tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into biology of the parasite. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.73, p. 75-90, 1995.

FAHEY, R. C. & SUNDQUIST, A. R. **Evolution of glutathione metabolism.** In: Advance of Enzymology and related areas of Molecular Biology, Ed. Alton Meister, p.1-53, 1991.

FAIRLAMB, A. H. & CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.46, p.695-729, 1992.

FAIRLAMB, A. H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B. T. & CERAMI, A. Trypanothione: A novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science.** v.227, p.1485-1487, 1985.

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.

FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs, used clinically in Chagas' disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.81, p.755-759, 1987.

GIBSON, W. C.; SWINKLES, B. S. & BORST, P. Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. **J. Mol. Biol.** v.201, p.315-325, 1988.

GOLDENBERG, S.; SALLES, J. M.; CONTRERAS, V. T.; LIMA FRANCO, M. P. L.; KATZIN, A. M.; COLLI, W. & MOREL, C. M. Characterization of messenger RNA from

epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Lett.** v.180, n.2, p.265-270, 1985.

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.; MONTEMARTINI, M.; NOGOCEKE, E.; HECHT, H. J.; STEINERT, P. & SINGH, M. Sequence, heterologous expression and functional characterization of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. **Eur. J. Biochem.** v.259, p.789-794, 1999.

HENDERSON, G. B.; YAMAGUCHI, M.; NOVOA, L.; FAIRLAMB, A. H. & CERAMI, A. Biosynthesis of the trypanosomatid metabolite trypanothione: purification and characterization of trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. **Biochem.**, v.29, p.3924-3929, 1990.

Historical aspects. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. Epidemiology of Chagas disease. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter.html>.

ISMAIL, S. O.; PARAMCHUCK, W.; SKEIKY, Y. A. W.; REED, S. G.; 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.

JUHNKE, H.; KREMS, B.; KÖTTER, P. & ENTIAN, K. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. **Mol. Gen. Genet.** v.252, p.456-464, 1996.

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

KELLY, J. M.; WARD, H. M.; MILES, M. A. & KENDALL, G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.** v.20, n.15, p.3963-3969, 1992.

KOOY, R. F.; ASHALL, F.; PLOEG, M. V. D. & OVERDULVE, J. P. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.36, n.1, p.73-76, 1989.

KRAUTH-SIEGEL, R. L. & LUDEMAN, H. Reduction of dihydroascorbate by trypanothione. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.80, p.203-208, 1996.

LOPEZ, J.A.; CARVALHO, T. U.; SOUZA, W.; FLOHÉ, L.; GUERRERO, S. A.; MONTEMARTINI, M.; KALISZ, H. M.; NOGOCEKE, E., SINGH, M.; ALVES, M. J. M. & COLLI, W. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. **Free Rad. Biol. and Medicine** v.28, n.5, 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.

MASANA, M.; TORANZO, E. G. D. & CASTRO, J. A. Reductive metabolism and activation of benzimidazole. **Biochem. Pharmac.** v.33, p.1941-1945, 1984.

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

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.

OUAISSI, A.; VERGNES, B.; BORGES, M. & GUILVARD, E. Identification and molecular characterization of two novel *Trypanosoma cruzi* genes encoding polypeptides sharing sequence motifs in proteins involved in RNA editing reactions. **Gene** v.253, p.271-280, 2000.

PANDOLFI, P.P.; SONATI, F.; RIVI, R.; MASON, P. GROSVELD, F. & LUZZATTO, L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. **EMBO J.** v.14, n.21, p.5209-5215, 1995.

PEREIRA, A. A. M. Correlação da atividade das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase com o mecanismo de defesa antioxidante em *Trypanosoma cruzi*. Tese de mestrado em andamento, 2000.

RECKENFELDERBÄUMER, N.; LÜDEMAN, H.; SCHMIDT, H.; STEVERDING, D. & KRAUTH-SIEGEL, R. L. Identification and functional characterization of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. **J. Biol. Chem.** v.275, n.11, p.7547-7552, 2000.

REY, L. **Parasitologia**. 2ª edição. Editora Guanabara Koogan, 1991.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, NY, 2001.

SCHUMMIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the ethiological agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion** v. 31, p.547-557, 1991.

SCOTT, M. D.; MESHNICK, S. R. & EATON, J. W. Superoxide dismutases-rich bacteria. **J. Biol. Chem.** v.262, p.3640-3645, 1987.

SCOTT, M. D.; MESHNICK, S. R. & EATON, J. W. Superoxide dismutase amplifies organism sensitivity to ionising radiation. Paradoxical increase in oxidant toxicity. **J. Biol. Chem.** v.264, p.2498-2501, 1989.

SMITH, K.; OPPERDOES, F. R. & FAIRLAMB, A. H. Subcellular distribution of trypanothione reductase in bloodstream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.48, p.109-112, 1991.

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.

TEIXEIRA, S. M. R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.31, n.12, p.1503-1516, 1998.

TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J. & KELLY, J. M. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents: gentian violet and benznidazole. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.96, n.1-2, p.167-176, 1998.

TETAUD, E. ; GIROUD, C.; PRESCOTT, A. R.; PARKIN, D. W.; BALTZ, T. & FAIRLAMB, A. H. Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanredoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.116, p.171-183, 2001.

The *Trypanosoma cruzi* genome project:nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brener. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html>.

TIAN, W.; BRAUNSTEIN, L. D.; PANG, J.; STUHLMEIER, K. M.; XI, Q.; TIAN, X. & STANTON, R. C. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. **J. Biol. Chem.** v.273, n.17, p.10609-10617, 1998.

TOMA, H. K.; CERÁVOLO, I. P.; GUERRA, H. L.; STEINDEL, M. & ROMANHA, A. J. *Trypanosoma cruzi* parasitemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite cell-interaction. **Inter. J. Parasitol.**, v.30, p.593-597, 2000.

TYLER, K. M. & ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int. J. Parasitol.** v.31, p.472-481, 2001.

VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. & LAMERS, W. H. Electroporation in "intracellular" buffer increases cell survival. **Nuc. Ac. Res.** v.20, n.11, p. 2902, 1992.

VANHAMME, L. & PAYS, E. Control of gene expression in Trypanosomes. **Microbiol. Rev.**v.59, p.223-240, 1995.

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J. & KELLY, J. M. Biochemical characterization of a trypanothione enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. **Biochem. J.** v.352, p.755-761, 2000.

WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; TAYLOR, M. C.; BROMLEY, E. V.; MILES, M. A. & KELLY, J. M. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J. Biol. Chem.** (no prelo).

WILKINSON, S. R.; TEMPERTON, N. J.; MONDRAGON, A. & KELLY, J. M. Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol.Chem.** v.275, n.11, p.8220-8225, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Special programme for research and training in tropical diseases. Meeting on the development of trypanocidal compounds for the sterilization of blood.** Geneva 13-14 de dezembro, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Weekly Epidemiol. Rec.** v.65, p.257-262, 1990.

YAWTEZ, A., & AGOSÍN, M. Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochem. Physiology** v.68B, p.237-243, 1981.

YIM, M. B.; CHOCK, P. B. & STADMAN, E. R. Copper, zinc superoxide dismutase catalyses hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.87, p.5006-5010, 1990.

ZHANG, W. & MATLASHEWSKI, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amostigote-specific protein, A2. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.94, p.8807-8811, 1997.

1. Comunicações em Congresso:

1.1 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.

1.2 Internacional

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

2. Atividades didáticas:

Monitoria na disciplina de Bioquímica Fisiológica (BB215), oferecida no segundo semestre do primeiro ano do Curso de Medicina (Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP), 2000.

3. Manuscrito em preparação:

Correlation between mRNA expression and protein synthesis in *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidase overexpressing cells exposed to hydrogen peroxide. Finzi, J. K., Lopez, J. A., Cabrera, G. O, Pereira, A. A. M., Pereira, G. A. G., Colli, W., Alves, M.J.M. e Gadelha, F. R. FEBS Letters.