

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



EDUARDO DE FIGUEIREDO PELOSO

Sistema antioxidante de *Trypanosoma cruzi*: expressão protéica nas diferentes formas, ao longo da curva de proliferação e o seu envolvimento na bioenergética mitocondrial.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eduardo de Figueiredo Peloso
Fernanda Ramos Gadelha
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL'EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

P367s Peloso, Eduardo de Figueiredo, 1976-
Sistema antioxidante de *Trypanosoma cruzi*:
expressão protéica nas diferentes formas, ao longo da
curva de proliferação e o seu envolvimento na
bioenergética mitocondrial / Eduardo de Figueiredo Peloso.
– Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Fernanda Ramos Gadelha.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Espécies reativas de
oxigênio. 3. Sistema antioxidante. 4. Mitocôndrias. I.
Gadelha, Fernanda Ramos, 1964-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: *Trypanosoma cruzi* antioxidant system: protein expression in the
different forms, along the growth curve and their involvement in mitochondrial
bioenergetics

Palavras-chave em Inglês:

Trypanosoma cruzi

Reactive oxygen species

Antioxidant system

Mitochondria

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Fernanda Ramos Gadelha [Orientador]

Carmen Veríssima Ferreira

Claudio Chrysostomo Wernick

Marcos José Marques

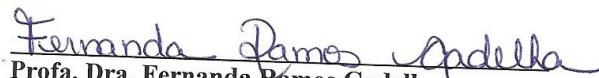
José Franco da Silveira Filho

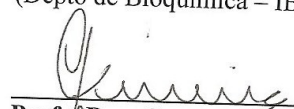
Data da defesa: 26-01-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 26 de janeiro de 2012

Banca Examinadora:


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


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


Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck
(Depto de Bioquímica - IB - UNICAMP)


Prof. Dr. Jose Franco da Silveira Filho
(Depto de Microbiologia-Imunologia-Parasitologia - UNIFESP)


Prof. Dr. Marcos José Marques
(Depto de Patologia e Parasitologia - UNIFAL)

Profa. Dra. Marcia Cristina Paes
(Depto de Bioquímica - UERJ)

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino
(Depto de Patologia Clínica - FCM - UNICAMP)

Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme
(Laboratório de Espectrometria de Massas - Laboratório Luz Síncroton)

“À minha família pelo amor, carinho, colo e apoio nessa trajetória.”

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser minha luz, minha base, meu conforto e meu amor incondicional. Por ter também me proporcionado encontrar com tantas pessoas especiais que logo abaixo cito!

Fazendo das palavras de uma amiga as minhas; “Mirei numa orientadora quando vim para Unicamp e acertei numa GRANDE e ESPECIAL AMIGA”, obrigado Fernanda por tudo o que fez e que faz por mim e por todos que tem a sorte de encontrar com você.

Kiko se tem pessoas especiais nessa vida, você é uma delas! Obrigado por todo o seu apoio e amizade. Muito obrigado por ter me proporcionado conviver e aprender com você durante todo esse tempo.

Thiago, que figuraça!!!! Que irmão eu ganhei hein.....Desde 2005, você tem me proporcionado os momentos mais engraçados e inusitados que uma pessoa pode experimentar. Valeu pela sua amizade...e sempre pode contar comigo!!! Combinado?? Rsr

Conrado, você é daquelas pessoas que quando se conhece é impossível esquecer, e não gostar. Muito obrigado amigo por ter me acompanhado por quase 1,5 anos e ter me ajudado tanto.

Simone, eita menina danada! Obrigado por ter sido uma grande colaboradora e amiga, e acima de tudo crítica, rs!

A todos (Débora, Thysa, Laurinha) que passaram pelo Labdat e todos de laboratórios vizinhos que me permitiram carregar o que aprendi com vocês. Se hoje estou melhor é porque a possibilidade de conviver com vocês me proporcionou isso.

As grandes amigas Marina, Juliana e Bianca pela amizade, ombro amigo, almoços inesquecíveis, papos que é melhor nem falar, rs!

Aos amigos de Fortaleza, Glauco, Isabelle, Annelise e Larisse que me proporcionaram e proporcionam grandes momentos de amizade, carinho, risadas; é eh simmmmm!!!

À minha família em geral que sempre me apoiou, e investiu em mim com palavras, carinho e amor! Muito obrigado.

Ao meu avô Antônio, que sempre foi minha inspiração de vida, obrigado pelo exemplo! Saudades!

As minhas irmãs, cunhados, sobrinhos e sobrinhas pelo apoio. Oh povo engraçado, rs! Agradeço à Deus pela família que ele escolheu pra mim.

Ao meu pai e a minha mãe que são as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim; obrigado pelo amor, pela paciência nos dias de desabafo e por serem os melhores pais que alguém pode ter. Agradeço muito à Deus pelo presente que me deu quando nasci que foi ter pais tão especiais. AMO MUITO VOCÊS!

À Nossa Senhora, por ter sido minha luz nos momentos mais difíceis e por sempre ter me levado junto a Deus.

Aos professores da banca de qualificação, pelas valiosas sugestões e contribuições.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

À UNICAMP pela estrutura e pela oportunidade.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Antimicina A
ADP – Adenosina Difosfato
APX – Ascorbato Peroxidase
ATP – Adenosina Trifosfato
CPX – Células que superexpressam a TcCPx
DC – Doença de Chagas
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
GI – Índice de Proliferação
GPX – Glutathione Peroxidase
GSH – Glutathione Reduzida
GSSG – Glutathione Oxidada
G6PD – Glicose 6 Fosfato Desidrogenase
IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50% da Proliferação
MPx – Células que superexpressam a TcMPx
MRC – Cadeia Respiratória Mitocondrial
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
pTEX – Vetor
PX – Peroxiredoxina
RCR – Taxa de Controle Respiratório
SOD – Superóxido Dismutase
TcCPx – Triparedoxina Peroxidase Citosólica
TcMPx – Triparedoxina Peroxidase Mitocondrial
TPN – Triparedoxina
TR – Tripanotona Redutase
T(SH)₂ – Tripanotona Reduzida
TTFA – Tenoiltrifluoroacetona
UMSBP – *Universal Minicircle Binding Protein*
 $\Delta\Psi$ – Potencial de Membrana Mitocondrial

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 A doença de Chagas e seu agente etiológico, o <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.2 O sistema antioxidante dos tripanosomatídeos.....	19
1.3 Sistema antioxidante dependente da triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial.....	22
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
3. CAPÍTULO I - O papel das peroxiredoxinas de <i>Trypanosoma cruzi</i> na bioenergética mitocondrial.....	30
4. CAPÍTULO II - A expressão da triparedoxina peroxidase e superóxido dismutase, bem como a liberação de EROs estão relacionadas às fases de proliferação do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
5. CAPÍTULO III - Avaliação da expressão das triparedoxinas peroxidases em tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> derivados de meio de cultura tratados com H ₂ O ₂	52
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	80
8. PERSPECTIVAS.....	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
10. DECLARAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA.....	89

Resumo

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas para a qual não há vacina e os tratamentos disponíveis têm eficácia limitada, sendo agravada pela heterogeneidade das cepas do parasita. Na busca por novos alvos terapêuticos, destaca-se o sistema antioxidante do parasita. As proteínas desse sistema como as triparedoxinas peroxidases citosólica e mitocondrial e as superóxido dismutases A e B (TcCPx, TcMPx, SODA e SODB, respectivamente) são fundamentais para a sobrevivência do parasita. Neste sentido, analisou-se o envolvimento da TcCPx e TcMPx na bioenergética mitocondrial de *T. cruzi* que superexpressavam estas enzimas (CPx e MPx, respectivamente) e também em células controle (pTEX), bem como a expressão dessas enzimas e das SODA e SODB, a liberação de H_2O_2 e a produção de $O_2^{\cdot -}$ ao longo da curva de proliferação nas cepas Tulahuen 2 e Y. Paralelamente, foi verificado o nível de expressão da TcCPx e TcMPx na forma tripomastigota de cultura sob incubação com H_2O_2 , tanto intracelularmente quanto no meio de incubação e a expressão dessas enzimas comparada com a da forma epimastigota. Em relação à CPx e MPx, foi possível observar que na CPx há um aumento na expressão da TcMPx, e a mesma correlação para a MPx foi observada. Diferenças na liberação de H_2O_2 entre CPx e MPx foram detectadas apenas quando a cadeia respiratória mitocondrial foi inibida. A MPx teve maiores taxas de consumo de oxigênio do que a pTEX e CPx, entretanto em todas as células, o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de ATP foram similares. Em relação às cepas Tulahuen 2 e Y, diferenças foram observadas em relação à liberação de H_2O_2 e produção de $O_2^{\cdot -}$ não somente entre as cepas, mas também ao longo da curva de proliferação. Todas as enzimas estudadas nessas cepas variaram sua expressão em função do tempo em cultura. Contudo, na cepa Y, o nível de expressão de todas as enzimas foi menor do que da Tulahuen 2, exceto para a SODA. Em relação à forma tripomastigota, tanto a TcCPx quanto a TcMPx tiveram padrões de expressão similares, com um aumento em baixas concentrações ($10\mu M$) seguido por uma redução até concentrações maiores de H_2O_2 . No sobrenadante do meio de incubação a TcMPx não foi detectada, contudo a TcCPx foi e em níveis que aumentaram concomitantemente com a redução da sua expressão no compartimento intracelular. Adicionalmente, o nível de expressão de ambas peroxiredoxinas foi maior na forma tripomastigota em relação à

epimastigota. Devido a um leve desacoplamento observado nas MPx, a presença ou indução de um transportador na membrana mitocondrial é sugerido quando a TcMPx é expressa em maiores níveis. Além disso, houve uma modulação das enzimas antioxidantes ao longo da curva de proliferação e entre as diferentes cepas, formas do parasita e tratamento com H₂O₂. Dada a importância das espécies reativas de oxigênio na sinalização redox do parasita, a expressão diferencial das enzimas antioxidantes nos diferentes parâmetros analisados sugere que as mesmas desempenham diversos papéis na sobrevivência, proliferação e diferenciação do parasita.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, sistema antioxidante, mitocôndria, espécies reativas de oxigênio.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease, which has no vaccine and the available treatments have limited efficacy that is aggravated by the heterogeneity of parasite strains. In the search for new therapeutic targets, the antioxidant system of the parasite has attracted attention. The proteins of this system such as the cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidases and superoxide dismutases A and B (TcCPx, TcMPx, SODA and SODB, respectively) are essential for parasite survival. In this sense, analysis of the involvement of TcCPx and TcMPx in the mitochondrial bioenergetics in *T. cruzi* overexpressing these enzymes (CPx and MPx, respectively) and also in control cells (pTEX) as well as the expression of these enzymes and SODA and SODB, H₂O₂ release and O₂⁻ production along the growth curve in two strains Tulahuen 2 and Y were performed. In parallel, the expression level of TcCPx and TcMPx was determined in tissue culture-derived trypomastigotes under incubation with H₂O₂, both intracellularly and in the incubation medium and the expression of these enzymes compared to the epimastigote form. Regarding CPx and MPx, it was observed that in CPx the expression of TcMPx was increased, and the same correlation was observed for MPx. Differences in H₂O₂ release between CPx and MPx were detected only when the mitochondrial respiratory chain was inhibited. MPx had higher oxygen consumption rates than pTEX and CPx, however in all cells, the mitochondrial membrane potential and ATP levels were similar. Regarding Tulahuen 2 and Y strains, differences were observed in relation to H₂O₂ release and O₂⁻ production not only between strains but also along the growth curve. All the enzymes studied in these strains varied their expression in function of time in culture. However, in the Y strain, the expression level of all enzymes was lower than Tulahuen 2, except for SODA. Regarding trypomastigotes, not only TcCPx but also TcMPx had similar expression patterns, with an increasing in lower concentrations (10μM) followed by a reduction till higher H₂O₂ concentrations. In the supernatant of the incubation medium TcMPx was not detected, but TcCPx was detected and its levels increased concomitantly with the reduction in its expression in the intracellular compartment. Additionally, the level of expression of both peroxiredoxins was higher in trypomastigote compared to epimastigote. Because of the mild uncoupling observed in MPx, the presence or induction of a carrier in the

mitochondrial membrane is suggested when the TcMPx is expressed at higher levels. In addition, there was a modulation of the antioxidant enzymes along the growth curve and between different strains, forms of the parasite and treatment with H₂O₂. Given the importance of reactive oxygen species in parasite redox signaling, the differential expression of the antioxidant enzymes in the different parameters analyzed suggests that they play different roles in the survival, proliferation and differentiation of the parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, antioxidant system, mitochondria, reactive oxygen species

1 – Introdução

1.1 – A doença de Chagas e seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas foi identificada pela primeira vez pelo pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Chagas, há mais de 100 anos (1909). Carlos Chagas descreveu o agente etiológico da doença, o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), parasito pertencente à ordem Kinetoplastida, a qual compreende as famílias Bodonidae (Hollande, 1952) e Trypanosomatidae (Kent, 1880). O gênero *Trypanosoma* é um dos mais significativos dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes como a doença de Chagas e a do sono (*Trypanosoma brucei*) (FIOCRUZ, 2009).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectantes. Há ao longo do ciclo três tipos de formas: os epimastigotas que estão presentes no tubo digestivo do inseto vetor (conhecido popularmente como barbeiro); os amastigotas que são observados no interior das células de mamíferos e os tripomastigotas metacíclicos, encontrados nas fezes e urina do inseto vetor e os circulantes, no sangue de mamíferos. As duas primeiras formas são replicativas e não-infectantes, ao passo que os tripomastigotas são não-replicativos e infectantes (FIOCRUZ, 2009).

Na Figura 1 está ilustrado o ciclo de vida do *T. cruzi*. No triatomíneo, o tubo digestivo está infectado com as formas epimastigotas, as quais se transformam em tripomastigotas por metaciclogênese. O barbeiro, então, pica um possível hospedeiro a fim de se alimentar de seu sangue e defeca ao mesmo tempo, liberando juntamente com as fezes as formas tripomastigotas metacíclicas. Esses por sua vez podem penetrar no hospedeiro vertebrado através da ferida causada pela picada ou através de alguma membrana mucosa, como a conjuntiva. No interior do hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* invade células específicas, onde se transforma em amastigotas intracelulares, os quais se multiplicam assexuadamente por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas que são liberados na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado (MURRAY *et al.*, 2006). Nessa fase, os tripomastigotas podem invadir novas células em regiões diferentes do corpo, transformar-se em amastigotas que se multiplicam, repetindo o processo; ou o hospedeiro pode ser picado

por um barbeiro não infectado e os tripomastigotas serem, assim, sugados e o inseto passa a estar infectado. Os tripomastigotas ingeridos diferenciam-se em epimastigotas no intestino do vetor, onde se multiplicam e se transformam na forma infectante tripomastigota metacíclico, que pode ser transmitido a um inseto ainda não infectado.

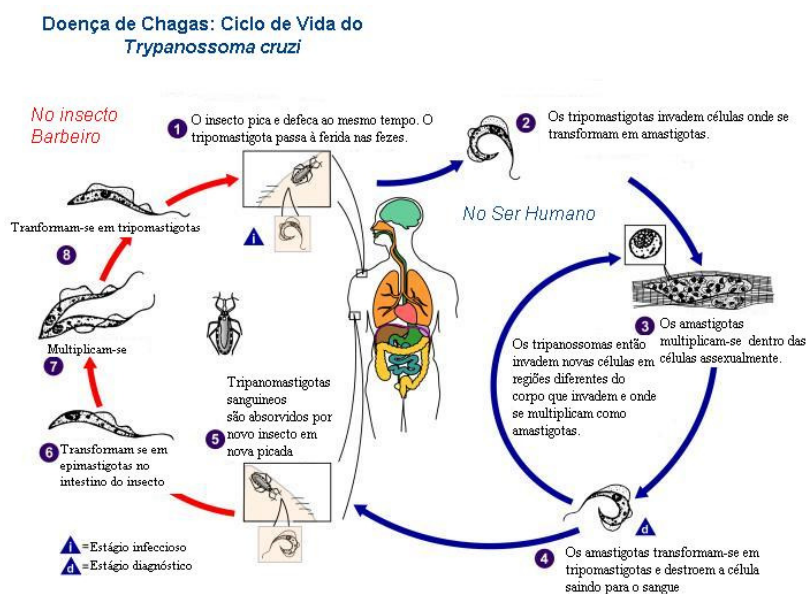


Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Chagas_ciclo_de_doen%C3%A7a.JPG. Acesso em 25/10/2011)

Os vetores transmissores da doença de Chagas são insetos triatomíneos (ordem Hemíptera, subfamília Triatominae) onde se destaca o *Triatoma infestans* que é o principal vetor e o mais bem estudado (FIOCRUZ, 2009). Sabe-se que o protozoário tem uma enorme plasticidade controlada geneticamente, que confere sua adaptação a cerca de 40 espécies de triatomíneos e a mais de 1.000 espécies de mamíferos (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Devido à disponibilidade de alimentos do vetor (sangue de humanos e animais), o mesmo é facilmente encontrado em moradias precárias nas áreas rurais ou periféricas das cidades.

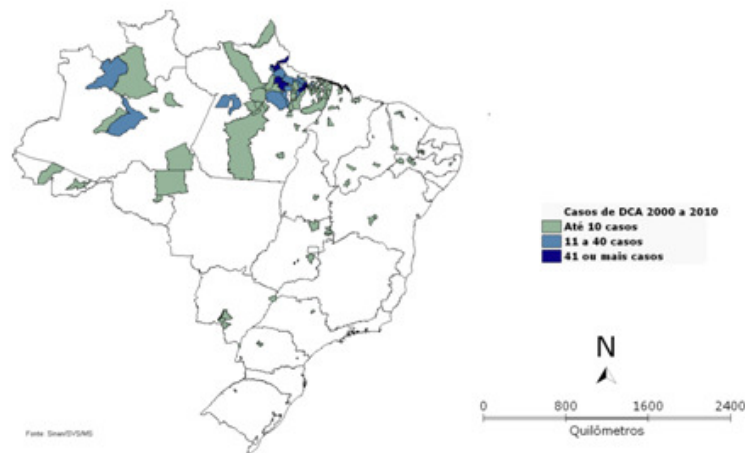
Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* conferida pela Organização Pan-Americana de Saúde o que representa um grande passo para o controle da doença (FERREIRA e TABOSA E SILVA, 2006).

A via de transmissão vetorial é extremamente importante, contudo, no Brasil, a oral tem sido a de maior prevalência nos últimos anos. Esse tipo de transmissão ocorre principalmente pela ingestão de alimentos com triatomíneos e seus dejetos, contaminados com o *T. cruzi* (PEREIRA *et al.*, 2009). Há relatos desse tipo de transmissão como o surto ocorrido em Santa Catarina pela ingestão de caldo de cana em 2005 e recentemente no Amazonas pela ingestão de suco de açaí. Em dezembro de 2007, vários casos da doença de Chagas foram notificados em Caracas, Venezuela, relacionados também com a ingestão de sucos de frutas (WHO, 2010). Outros modos de contaminação também devem ser levados em consideração como por transfusão sanguínea, de mãe para filho durante a gravidez ou no parto, transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais (WHO, 2010).

Em relação ao perfil epidemiológico, a doença de Chagas é mantida principalmente pela manutenção de seus vetores, e assim, está difundida por todo o continente americano, desde os Grandes Lagos (EUA) até o sul da Patagônia, afetando 21 países no total (SCHOFIELD, 2000). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 10 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas, principalmente na América Latina (WHO, 2010) e estima-se que em 2008, a doença tenha levado 10.000 pessoas ao óbito em todo mundo (WHO, 2010). Entretanto, constitui-se um problema mais sério nos países da América Latina, em especial Argentina, Chile, Paraguai, Uruguai e Brasil.

No Brasil, no período de 2000 a 2010, foram registrados 1.086 casos de doença de Chagas aguda (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) (Figura 2).

Casos de doença de Chagas aguda por município. Brasil, 2000 a 2010.



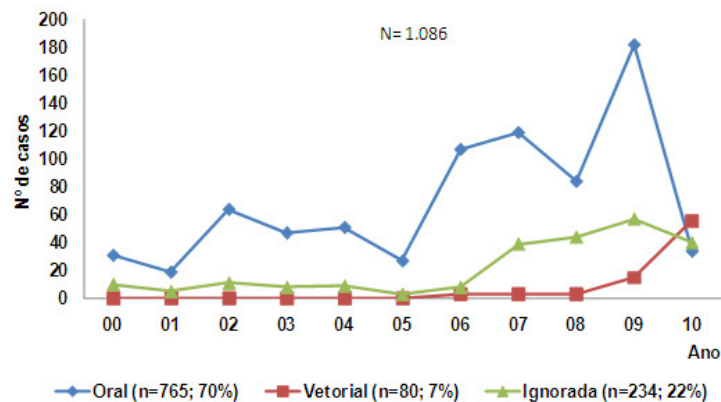
Fonte: SVS/MS. Dados sujeitos à modificação.
Dados atualizados até agosto 2011

Figura 2 – Distribuição geográfica de casos doença de Chagas aguda no Brasil.

(http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530. Acesso em 26-10-2011)

Do total de casos registrados, 70% foram por transmissão oral, 7% vetorial e em 22% dos casos não foi identificada a forma de transmissão (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) (Figura 3).

Casos confirmados de DCA segundo ano de notificação e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2010



Fonte: SVS/MS. Dados sujeitos à modificação. Dados atualizados até agosto 2011

Figura 3 – Principais modos de transmissão da doença de Chagas no Brasil de 2000 a 2010.

(http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530. Acesso em 26-10-2011)

Com relação ao número de óbitos e taxa de letalidade da doença de Chagas entre 2006 a 2010, as maiores taxas foram observadas no ano de 2006 (Figura 4) (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

“Óbitos e taxa de letalidade dos casos com DCA. Brasil, 2006 a 2010.”

Ano	Nº casos	Nº óbitos	Letalidade (%)
2006	113	7	6,19
2007	161	4	2,48
2008	131	1	0,76
2009	258	2	0,78
2010	134	4	2,99

Fonte: SVS/MS. Dados sujeitos à modificação.
Dados atualizados até abril de 2011.

Figura 4 – Óbitos e taxa de letalidade da doença de Chagas de 2006 a 2010.
(http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530 Acesso em 26-10-2011)

Entre as formas de controlar a disseminação da doença está o controle do barbeiro, a erradicação de ninhos e a construção de residências que evitem a nidificação dos percevejos. O uso de diclorodifeniltricloroetano em casas infestadas por percevejos demonstrou uma queda na transmissão da doença (MURRAY *et al.*, 2006). Apesar disso, alguns estudos apontam para o fato de que esse método tradicional usado para a aplicação de inseticidas tem se mostrado pouco eficiente na eliminação das populações das espécies de vetor que ocupam estruturas ou casas rurais em áreas endêmicas, na Argentina (AMELOTTI *et al.*, 2009). Desse modo, com a manutenção dos vetores, o risco de se contaminar com o *T. cruzi* e de desenvolver esta parasitose é grande.

Quando o homem é diagnosticado com a doença de Chagas há a possibilidade de um comprometimento cardíaco e/ou digestório e/ou nervoso, onde um tratamento precoce e eficiente se faz necessário. O tratamento atual para a doença de Chagas é limitado pela ausência de medicamentos eficazes. O fármaco de escolha normalmente é o benzonidazol (Rochagan®). Embora tenha alguma atividade contra a fase aguda da doença, tem pouca atividade contra amastigotas teciduais além dos inúmeros efeitos colaterais. Agentes alternativos incluem alopurinol e nifurtimox (Lampit®), mas também não são tão eficientes devido à grande variação na taxa de cura em função das diferentes fases da doença, bem

como da diversidade fenotípica e genotípica existente entre as cepas de *T. cruzi* (MURRAY *et al.*, 2006).

As diferentes cepas do parasita apresentam variação na virulência, no tropismo tecidual e na capacidade de manutenção da infecção no hospedeiro sendo estes dependentes de diversos fatores genéticos e bioquímicos. A espécie do *T. cruzi* consiste de várias populações de cepas classificadas em duas linhagens filogenéticas: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, onde a linhagem II é geralmente a responsável pelas infecções humanas e a I associada ao ciclo silvestre (FLORES-LÓPEZ e MACHADO, 2011). A heterogeneidade entre as cepas é também, dessa forma, responsável pela variedade de manifestações clínicas da doença (PIACENZA *et al.*, 2009a). Piacenza *et al.* (2009a) mostraram que há uma associação entre a expressão das enzimas do sistema antioxidante do parasita e a virulência durante a invasão celular. Assim, cepas que apresentam uma maior resistência ao estresse oxidativo como a Tulahuen 2 (MIELNICZK-PEREIRA *et al.*, 2007) são mais virulentas das que as que apresentam menores taxas, como a Y (PIACENZA *et al.*, 2009a).

Além das diferenças observadas entre as diferentes cepas do *T. cruzi*, estudos apontam para uma expressão diferencial do genoma do parasita nas diferentes fases do seu ciclo de vida e também ao longo da curva de proliferação (GONZÁLEZ-PINO *et al.*, 1999). Segundo González-Pino *et al.* (1999) há, por exemplo, redução nos níveis de RNAm de α - e β -tubulina da fase logarítmica para a estacionária. Os níveis de proteína também diminuem para α -tubulina, mas se mantém constantes para a β -tubulina, sugerindo regulação pós-transcricional dessa proteína. Ainda nesse estudo, foi possível observar um aumento dos níveis de ubiquitina na fase estacionária em relação à logarítmica. Isso indica que durante as fases de proliferação o parasita tem expressão proteica diferencial. Além disso, cada estágio de diferenciação expressa um padrão de proteínas específicas envolvidas no processo de adaptação ao novo ambiente (DÍAZ *et al.*, 2011). Neste processo, o parasita deve lidar com a geração exógena e endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KIERSZENBAUM *et al.*, 1974) para garantir a sua infecção. Essas moléculas altamente oxidativas são mantidas em baixas concentrações pelas vias antioxidantes do parasita.

1.2 – O sistema antioxidante dos tripanosomatídeos

Em quase todos os organismos, a manutenção de um ambiente intracelular reduzido é alcançado por meio de altas concentrações de glutathiona (GSH), um tiol de baixo peso molecular (CASTRO e TOMAS, 2008). Entretanto, no *T. cruzi*, a maior parte do conteúdo de GSH é encontrada na forma de tripanotiona ($T(SH)_2$, N^1, N^8 -bis(glutathionil)espermidina), (KRAUTH-SIEGEL e COMINI, 2008). Embora a descoberta da $T(SH)_2$ tenha ocorrido em 1985 (FAIRLAMB *et al.*, 1985), foi apenas em 1997 que o sistema antioxidante centrado nesta proteína foi elucidado em *Crithidia fasciculata* (NOGOCEKE *et al.*, 1997) e em 2000 provou-se ser verdadeiro para o *T. cruzi* (LOPEZ *et al.*, 2000). Na cascata de detoxificação de hidroperóxidos a tripanotiona redutase (TR), uma flavoproteína dependente de NADPH, mantém a $T(SH)_2$ na sua forma reduzida e assim, capaz de ser oxidada pela triparedoxina (TPN), o que leva à redução das EROs e contribui para a manutenção de um ambiente intracelular reduzido (COURA e CASTRO, 2002). Este sistema centrado na $T(SH)_2$, quando comparado ao mecanismo antioxidante dos mamíferos, apresenta aspectos únicos e assim, possibilita que as proteínas sejam apontadas como potenciais alvos para o desenvolvimento seletivo de fármacos (FLOHÉ *et al.*, 1999).

As enzimas antioxidantes atuam sequencialmente em diferentes compartimentos sub-celulares no *T. cruzi* para promover a detoxificação das EROs. O fluxo de equivalentes reduzidos da $T(SH)_2$ pode ser levado a TPN ou GSH, as quais podem transferir elétrons para as peroxidases (Figura 5). Cinco peroxidases foram identificadas em *T. cruzi*: duas peroxiredoxinas (PXs) localizadas no citosol (triparedoxina peroxidase citosólica, TcCPx) e na mitocôndria (triparedoxina peroxidase mitocondrial, TcMPx) que detoxificam eficientemente o H_2O_2 , hidroperóxidos de cadeia curta (WILKINSON *et al.*, 2000a) e peroxinitrito (PIACENZA *et al.*, 2008), duas glutathionas peroxidases não dependentes de selênio (GPXI no citosol e glicossoma e GPXII no retículo endoplasmático) que conferem resistência a hidroperóxidos de fosfolipídios e ácidos graxos (WILKINSON *et al.*, 2002a; WILKINSON, *et al.*, 2002b) e uma hemoperoxidase dependente de ascorbato (APX) no retículo endoplasmático que degrada H_2O_2 (WILKINSON *et al.*, 2003). A presença de todas essas peroxidases leva à conclusão de que o parasita anteriormente considerado

deficiente nas defesas antioxidantes (BOVERIS *et al.*, 1980), na realidade apresenta um elaborado sistema de metabolização de hidroperóxidos (Figura 5).

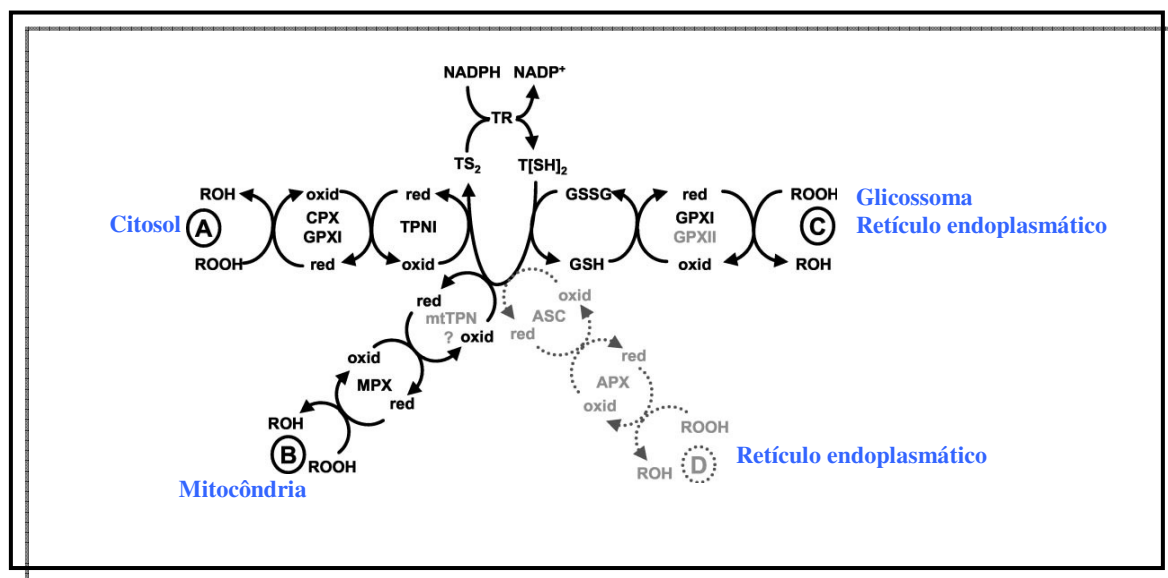


Figura 5 - Sistema de detoxificação de hidroperóxidos em Tripanosomatídeos. A tripanotiona dissulfeto (TS_2) é reduzida a dihidrotripanotiona ($T(SH)_2$) pela tripanotiona redutase (TR), uma enzima NADPH-dependente. A $T(SH)_2$ pode transferir os equivalentes reduzidos às vias redox: (A e/ou B (provável)) vias dependente da triparedoxina (TPNI para a citosólica ou mtTPN ou outra proteína para a via mitocondrial) onde as peroxidredoxinas (CPX ou MPX) reduzem o hidroperóxido (ROOH) ao álcool correspondente (ROH). (C) via dependente de glutatona onde a $T(SH)_2$ interage com a glutatona oxidada (GSSG) regenerando a GSH. GPXI também pode utilizar a TPNI como doador de elétrons. (D) Reação não enzimática entre o ascorbato e a $T(SH)_2$ (WILKINSON *et al.*, 2003).

Recentemente uma nova função foi sugerida para a cascata de detoxificação centrada na tripanotiona através de ensaios *in vitro*. Os componentes até a triparedoxina foram colocados na presença da *universal minicircle binding protein* (UMSBP) e a replicação do DNA foi observada. De modo oposto, na presença da triparedoxina peroxidase, cumene hidroperóxido e USBP, a replicação não ocorreu. Assim, a triparedoxina e a triparedoxina peroxidase através da interação com a USBP podem controlar o seu estado redox e conseqüentemente a replicação do DNA. Esses resultados apontam para uma possível atuação desse sistema como um *redox molecular switch* (SHLOMAI, 2010).

Outra enzima que faz parte do sistema antioxidante do *T. cruzi* é a superóxido dismutase (SOD), que cataliza a conversão de O_2^- em H_2O_2 . Esta enzima está presente neste parasita como uma enzima dependente de ferro (FeSOD) em contraste com a do

hospedeiro mamífero onde a Cu/ZnSOD e a MnSOD são encontradas no citosol e mitocôndria, respectivamente (DUFERNEZ *et al.*, 2006). Este aspecto faz das FeSODs promissoras candidatas para o desenvolvimento de drogas mais efetivas para o tratamento da doença de Chagas. Em *T. cruzi*, 2 genes de SOD, SODA e SODB foram clonados e caracterizados (ISMAIL *et al.*, 1997). Em *T. brucei*, a isoenzima SODB está presente no citosol e glicossoma, enquanto que a SODA e SODC estão localizadas na mitocôndria, possivelmente na matriz e espaço intermembrana, respectivamente (DUFERNEZ *et al.*, 2006). Através de análises de seqüenciamento gênico foi mostrado que os 4 tipos de SOD são comuns a todos os tripanosomatídeos. A habilidade restrita do O_2^- de atravessar as membranas biológicas é justificada pela presença da SOD em diferentes compartimentos intracelulares (DUFERNEZ *et al.*, 2006). A análise das seqüências das SODA e B do *T. cruzi* revelou uma identidade de 44% (Figura 6).

```

SODB  5      IPPLPWGYDGLAAKGLSKQQVTLHYDKHHQGYVTKLNAAAQTNSALATKSIEEII----- 59
          +P L + +      A  S +Q+ LHY KHH+ YV KLNA A T      KSIEEII
SODA  36      LPKLGFNWKDGCAPVFSRQME LHYTKHHKAYVDKLNALAGT--TYDGKSIEEII LAVAN 93

SODB  60      RTEKGPIFNLA AQIFNHTFYWESMCPNGGGEPTGKLADEINASFSGSAKFKEEFTNVAVG 119
          EK  +FN AAQ FNHTFY+  + PNG  P  L  + A FGS  +FK+ F  V
SODA  94      DAEKKGLFNQA AQHFNHTFYFRCITPNGKAMPKS-LES AVTAQFGSVEQFKDAFVQAGVN 152

SODB  120     HFGCGLAWPVKD-TNSGKLKVYQTHDAGCPLTEPNLKPLLTCDVWEHAYYVDYKNDLAGY 178
          +FG G  W  D +N  +L +  T +AGCPLT+  L+P+L  DVWEHAYY D++N  Y
SODA  153     NFGSGWTWLCVDP SNKNQLVIDNTSNAGCPLTK-GLRPVLAVDVWEHAYYKDFENRRPDY 211

SODB  179     V  179
          +
SODA  212     L  212

```

Figura 6 – Alinhamento das seqüências da SODA (GenBank: AAX84939.1) e SODB (GenBank: AAC47549.1) de *Trypanosoma cruzi*.

A importância da SOD para o *T. cruzi* foi demonstrada através da superexpressão da SODA que conferiu proteção aos epimastigotas contra a morte celular programada induzida por soro humano fresco, indicando a participação do O_2^- mitocondrial neste processo (PIACENZA *et al.*, 2007).

1.3 – Sistema antioxidante dependente da triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondrial

Um aspecto importante do sistema de defesa antioxidante do *T. cruzi* é estar centrado na tripanotiona, uma enzima restrita a essa família de parasitas (PIACENZA *et al.*, 2009a). Interessantemente, a efetividade do sistema antioxidante do *T. cruzi* tem uma correlação direta com o sucesso da infecção (PINEYRO *et al.*, 2008 e PIACENZA *et al.*, 2009b), uma vez que as proteínas desse sistema, TcCPx, TcMPx, tripanotiona sintetase, triparedoxina citosólica (TPNI) e a SODA estão entre as mais expressas durante a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (PIACENZA *et al.*, 2009a e ATWOOD *et al.*, 2005). Esse aumento na expressão capacita o parasita para lidar com o ambiente altamente oxidativo no interior dos macrófagos (ATWOOD *et al.*, 2005).

O *T. cruzi* deve lidar com as EROs tanto de origem externa como interna, sendo a mitocôndria o principal sítio gerador de EROs na célula. Em células de mamíferos, durante o metabolismo oxidativo 0.1–0.5% do oxigênio que é consumido pela mitocôndria é parcialmente reduzido, levando a formação de EROs. Classicamente, essa organela é considerada a responsável pela produção de energia necessária para a ocorrência de processos bioquímicos endergônicos na célula (CASTRO *et al.*, 2002). Atualmente, o conceito é mais abrangente e envolve a geração de EROs (CASTRO *et al.*, 2002) como o O_2^- e o H_2O_2 , moléculas sinalizadoras, que comandam o ciclo celular, proliferação e apoptose (FLOHÉ *et al.*, 1999). A dismutação do O_2^- espontânea ou catalisada pela SOD resulta na formação de H_2O_2 , uma molécula que se difunde através da membrana e/ou por meio de transportadores (aquaporinas) podendo alcançar o citosol. Quando a geração de EROs excede a capacidade antioxidante da mitocôndria, o estresse oxidativo leva ao dano mitocondrial (GIORGIO *et al.*, 2007; VERCESI *et al.*, 2006) (Figura 7).

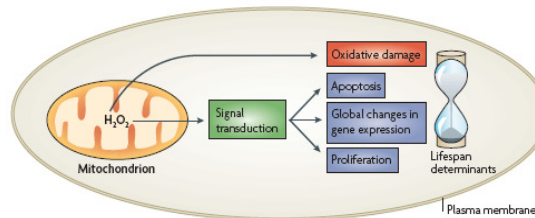


Figura 7 - H_2O_2 como determinante do tempo de vida de uma célula. O H_2O_2 pode atuar como uma molécula sinalizadora mediando mudanças na expressão gênica que afetam a morte celular e proliferação – que determinam o tempo de vida. O H_2O_2 também pode induzir a um dano oxidativo (GIORGIO *et al.*, 2007).

Finzi *et al.* (2004) demonstraram que o H_2O_2 em baixas concentrações ($\sim 20\mu M$) induz a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* e que o pré-tratamento com essa concentração e posterior tratamento com doses altas de H_2O_2 confere maior resistência ao parasita por um período de até 90 minutos. Na literatura, há cada vez mais evidências demonstrando que o H_2O_2 é um importante componente da sinalização via receptor, atuando como um mensageiro intracelular em vários processos celulares (RHEE *et al.*, 2005).

Além das funções descritas acima, a mitocôndria também possui um importante papel na produção de ATP e manutenção da homeostase intracelular de cálcio (WILKINSON *et al.*, 2000b; CADENAS, 2004). Adicionalmente, o *T. cruzi* possui uma única mitocôndria, de modo que uma disfunção nesta organela pode levar à inviabilidade celular e/ou conseqüente morte do parasita. Assim, a presença de um sistema antioxidante eficiente é fundamental para que as concentrações das EROs não estabeleçam um ambiente mitocondrial oxidativo.

Com relação ao mecanismo de detoxificação mitocondrial de hidroperóxidos, a TcCPx e TcMPx têm papel extremamente importante. Essas enzimas pertencem ao grupo de PXs, isto é, peroxidases que não necessitam de cofatores ou grupos prostéticos, usando cisteínas ativas redox para reduzir seus substratos (CASTRO e TOMAS, 2008). A TcCPx sendo citosólica, contribui para o processo mitocondrial de detoxificação de hidroperóxidos por impedir que EROs de origem exógena cheguem até a mitocôndria, bem como detoxificando as de origem mitocondrial. Ainda, com relação a TcCPx, foi demonstrado que essa PX desempenha um importante papel na proteção do parasita contra os níveis flutuantes de EROs gerados durante os processos fisiológicos (FINZI *et al.*, 2004).

Com relação à TcMPx, além da mesma desempenhar um papel importante na virulência do *T. cruzi* (PIÑEYRO *et al.*, 2008; PIACENZA *et al.*, 2009a), junto com a SODA, é superexpressa em populações de *T. cruzi* com resistência ao benzonidazol induzida *in vitro* (NOGUEIRA *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2009). Interessantemente, embora o papel da TcCPx e TcMPx como fator de virulência esteja claro (PIÑEYRO *et al.*, 2008; PIACENZA *et al.*, 2009a), elas não influenciam no processo de invasão (PIÑEYRO *et al.*, 2008). Em relação à especificidade, em um sistema dependente de tripanotona recombinante, o K_M aparente para o H_2O_2 foi de $\leq 1\mu M$ e $\leq 5\mu M$ para TcCPx e TcMPx, respectivamente (PIÑEYRO *et al.*, 2011).

Em *T. cruzi*, a superexpressão da TcCPx e TcMPx em epimastigotas confere um alto nível de proteção contra diferentes concentrações de peroxinitrito (0-200 μM e 0-400 μM para células superexpressando a TcMPx ou TcCPx respectivamente) (PIACENZA *et al.*, 2008). Paralelamente, em outro tripanosomatídeo, a *Leishmania infantum*, a superexpressão das peroxiredoxinas citosólica e mitocondrial levou a resistências a diferentes estresses oxidativos. Os parasitas que superexpressavam a citosólica eram mais resistentes ao tratamento com H_2O_2 , enquanto que os que superexpressavam a mitocondrial eram mais resistentes ao *t*-butil hidroperóxido (CASTRO *et al.*, 2002).

Em contraste com outras PXs (WOOD *et al.*, 2003), a TcMPx e TcCPx não são proteínas abundantes, sendo que a TcCPx está presente no dobro da concentração da TcMPx (PIÑEYRO *et al.*, 2008). A TcMPx difere da sua isoforma citosólica em relação à sequência ao redor da segunda cisteína ativa e da presença de um peptídeo sinal N-terminal de endereçamento para a mitocôndria (WILKINSON *et al.*, 2000a) apresentando uma identidade de 57% com a TcCPx (Figura 8).

TcMPX	36	ATVREAAPewAGKAVV-NGKIQDISLNDYKGKYVLLFYPMDFTFVCPTEITAFSDAQAE	94
		A + AP++ A++ NG + ++L YGK++VL FYPMDFTFVCPTEI FSD E	
TcCPX	6	AKLNHPAPDFNETALMPNGTFKKVALTSYKGKWLVLFFYPMDFTFVCPTEICQFSDRVKE	65
TcMPX	95	FDKINTQVVAVSCDSQYSHLAWINTPRNKGGLGEMSIPVLSDLTKEIARDYGVLIEEQGI	154
		F I +V+A S DS+YSHLAW + R +GGLG+M+IP+L+D TK I + YGVL EE G+	
TcCPX	66	FSDIGCEVLACSMDSYSHLAWTSIERKRGGGLQMNIPILADKTKCIMKSYGVLKEEDGV	125
TcMPX	155	SLRGLFIIDDKGILRHITVNDLPVGRNVEEVLRVVQAFQYVDKNGDVIPCNWRPGKPTMK	214
		+ RGLFIID K LR ITVNDLPVGR+V+E LR+V+AFQ+V+K+G+V P NW+PG TMK	
TcCPX	126	AYRGLFIIDPKQNLRIITVNDLPVGRDVEALRLVKAFQFVEKHGEVCPANWKPGDKTMK	185
TcMPX	215	--TEKANEF 222	
		EK+ EYF	
TcCPX	186	PDPEKSKEYF 195	

Figura 8 – Alinhamento das sequências da TcMPx (GenBank: CAA06923.1) e da TcCPx (GenBank: CAA09922.1) do *Trypanosoma cruzi*.

A TcMPx foi encontrada associada a mitocôndria estando localizada ao redor do kinetoplasto e assim, deve proteger o DNA mitocondrial do dano induzido por hidroperóxidos (WILKINSON *et al.*, 2000a). Além disso, essa enzima detoxifica os mesmos substratos que a TcCPx e deve atuar de maneira similar à sua isoforma citosólica, embora a tripanotiona, a tripanotiona redutase (WILKINSON *et al.*, 2002a) e a TPN não tenham sido associadas à mitocôndria. Adicionalmente, estudos demonstraram que a tripanotiona sintetase está restrita ao citosol nos epimastigotas de *T. cruzi* (FIESTAS *et al.*, 2011).

Duas triparedoxinas foram identificadas em *T. cruzi*: triparedoxina I (TcTPNI) com 51-63% de homologia com as triparedoxinas de outros tripanosomatídeos e 33% de identidade com uma segunda triparedoxina (TcTPNII) (WILKINSON *et al.*, 2002a) localizada pelo nosso grupo em colaboração com o grupo do Dr. Shane Wilkinson e o do Dr. Sergio Guerrero na região perinuclear dos epimastigotas (dados não publicados). Assim como em *T. brucei* e *C. fasciculata*, a TcTPNI não tem nenhum sinal de endereçamento e assim está restrita ao citosol (WILKINSON *et al.*, 2002a). A primeira evidência da presença de uma triparedoxina na mitocôndria veio de estudos com *L. infantum*, onde duas triparedoxinas, além da citosólica (*LiTXN1*) foram identificadas: uma de matriz mitocondrial (*LiTXN2*) (CASTRO *et al.*, 2004) e outra localizada na membrana mitocondrial externa (*LiTXN3*) (CASTRO *et al.*, 2010). Interessantemente, a *LiTXN2* não é essencial para a sobrevivência do parasita, e não pode ser substituída por nenhuma outra triparedoxina (CASTRO *et al.*, 2010). Uma vez que o genoma do *Trypanosoma* não contém nenhum outro gene capaz de codificar uma triparedoxina ativa, o conceito de que uma TPN

não é necessária para o funcionamento normal do metabolismo celular, como demonstrado para a *LiTXN2*, sugere que a TcMPx use um sistema redutor que não envolva uma TPN (CASTRO *et al.*, 2010). Sendo assim, esses resultados em conjunto com os que demonstram a ausência de proteínas chaves na mitocôndria, inviabilizam a ocorrência da detoxificação de hidroperóxidos na mitocôndria através de via similar à presente no citosol e apontam para os possíveis caminhos descritos na Figura 9.

Figura 9. Possíveis mecanismos para a oxidação da TcMPx no interior da mitocôndria. O $O_2^{\cdot -}$ é produzido pela cadeia respiratória mitocondrial (MRC), e é dismutado espontaneamente ou pela SODA em H_2O_2 , que pode ser detoxificado na mitocôndria: (1) através do sistema presente no citosol onde a TcMPx seria a molécula mediadora da interseção entre os dois sistemas (2) por um transportador de tiol que permitiria a translocação da T(SH)₂ ou TS₂ para dentro e fora da mitocôndria permitindo a sua interação com o sistema da TcCPx ou (3) através do sistema redox dihidrolipoamida desidrogenase / lipoamida que poderia substituir a TR / TS₂, uma vez que ambas proteínas estão ausentes da mitocôndria.

(1) - Interação da TcMPx com o sistema antioxidante citosólico dependente da tripanotona

(SILVA *et al.*, 2011). O que poderia explicar os resultados acima seria a de que uma proteína envolvida na detoxificação de hidroperóxidos estaria sendo expressa na membrana mitocondrial interna. Essa proteína seria uma proteína integral e permitiria a passagem de prótons para a matriz criando assim outro caminho para o retorno dos mesmos além da ATPase. Nesse sentido, a célula aumenta a velocidade da sua cadeia respiratória para trazer o potencial para níveis normais. Uma das possibilidades é a de que essa proteína seja a TcMPx, uma vez que através da análise por bioinformática da sua sequência de aminoácidos identificamos uma região altamente hidrofóbica (aminoácidos 67-89) que pode ser a responsável pelo ancoramento dessa proteína na membrana (Figura 10).

MFRRMAVTSLQKGLSRR AFCNTLRLLNLDYQAYKTATVREAAPEWAGKAVVNGKIQDISLNDYKG
 KYVLLFYPMDFTFVCPTETAFSDAQAEFDKINTQVVAVSCDSQYSHLAWINTPRNKGGLGMSIPVL
 SDLTKEIARDYGVLIEEQGISLRGLFIIDDKGILRHITVNDLPVGRNVEEVLRVVQAFQYVDKNGDVIP
 CNWRPGKPTMKTEKAN EYFEKNA

Figura 10 – Análise da sequência da TcMPx (GenBank: CAA06923.1). Sequências de aminoácidos: em amarelo: domínios contendo as cisteínas ativas redox e em azul: predição de região transmembrana (análise de bioinformática usando o TMpred e o Toppred).

Estando localizada na membrana mitocondrial interna, a TcMPx poderia interagir com a triparedoxina (TcTPNI), uma vez que a membrana mitocondrial externa é livremente permeável a pequenas moléculas (massa molecular relativa < 5.000 kDa) e íons, e assim utilizar a via clássica de detoxificação citosólica de hidroperóxidos. Dando suporte a esta hipótese, foi demonstrado que apesar de possuir um K_M maior do que a TcCPx para a triparedoxina I (citosólica) de *T. brucei*, a TcMPx é capaz de reagir com esta proteína (PIÑEYRO *et al.*, 2011).

(2) - Interação da TcMPx com o sistema antioxidante citosólico através da tripanotiona

Wilkinson e colaboradores (WILKINSON *et al.*, 2000a) levantaram a hipótese da presença de um transportador que permitiria, assim como descrito acima para a TcMPx, a interação com o sistema detoxificador de hidroperóxidos do citosol. Caso esse transportador seja uma proteína integral, também daria suporte aos resultados obtidos com relação à bioenergética conforme descrito acima (SILVA *et al.*, 2011).

(3) - Interação da TcMPx com o sistema dihidrolipoamida desidrogenase / lipoamida

Uma vez que em *L. infantum* não foi demonstrada a presença da tripanotiona redutase na mitocôndria (CASTRO *et al.*, 2008), levantou-se a possibilidade de um sistema independente da tripanotiona, sendo o responsável pela redução da TPN/TcMPx. A dihidrolipoamida desidrogenase/lipoamida pode fazer isso com uma eficiência moderada. Essa observação confronta a visão clássica da tripanotiona como o único redutor da TPN e abre novas perspectivas com relação ao envolvimento de complexos 2-oxo ácido desidrogenase na detoxificação de hidroperóxidos mitocondriais não só em *L. infantum* (CASTRO *et al.*, 2008), como também para outros tripanosomatídeos. Entretanto, observou-se posteriormente que a *LiTXN2* não é essencial para nenhuma forma do ciclo de vida da *L. infantum* (CASTRO *et al.*, 2010), inviabilizando essa hipótese; além da participação da *LiTXN2* na replicação do kDNA (via redução da UMSBP). Além disso, assim como para o *T. cruzi* não há descrição de uma triparedoxina mitocondrial, caso a interação com o sistema da dihidrolipoamida desidrogenase/lipoamida seja possível, outro redutor deve substituir a triparedoxina.

A relevância do sistema antioxidante para o parasita é alta, visto que o mesmo, em suas diferentes formas de vida, habita diferentes ambientes oxidativos além de possuir sua própria geração endógena de EROs. Esta produção ocorre principalmente pela mitocôndria, que além de ser uma por parasita, é fundamental para a sua sobrevivência. Ainda, a heterogeneidade das cepas de *T. cruzi* está relacionada com a diversidade de manifestações clínicas e de resistência à terapia. Uma melhor compreensão do sistema antioxidante do parasita nas diferentes fases de proliferação, em diferentes cepas, bem como a relação desse sistema com a bioenergética mitocondrial é de grande importância, e pode levar a descoberta de alvos terapêuticos em potencial.

2 – Objetivos

2.1 – Geral:

Avaliar a importância da TcCPx, TcMPx, SODA e B para a proliferação do *T. cruzi* e o envolvimento das triparedoxinas peroxidases com a bioenergética mitocondrial, bem como a expressão dessas enzimas nas formas epimastigota e tripomastigota de cultura.

2.2 – Específicos:

2.2.1 – Nas células controle pTEX (somente o vetor) e nas que superexpressam o gene da TcCPx ou TcMPx, determinar:

- a) o nível de expressão da TcCPx e TcMPx;
- b) a IC₅₀ para o H₂O₂ e sua concentração liberada em condições basal e sob inibição da cadeia respiratória;
- c) a produção de NADPH pela via das pentoses fosfato;
- d) o consumo de oxigênio e o potencial de membrana mitocondrial, e
- e) a produção de ATP.

2.2.2 – Nas cepas Tulahuen 2 e Y ao longo da curva de proliferação, determinar:

- a) o nível de expressão da TcCPx, TcMPx, SODA e B correlacionando-os com os níveis de;
- b) H₂O₂ liberado e produção de O₂⁻ em condição basal.

2.2.3 – Na forma tripomastigota determinar:

- a) o nível de expressão da TcCPx e TcMPx sob incubação ou não (controle) com diferentes concentrações de H₂O₂, tanto intracelular quanto no sobrenadante obtido após a incubação;
- b) o nível de expressão da TcCPx e TcMPx em relação as da forma epimastigota.

3 – Capítulo I – O papel das peroxiredoxinas de *Trypanosoma cruzi* na bioenergética mitocondrial

PubMed

US National Library of Medicine National Institutes of Health
J Bioenerg Biomembr. 2011 Aug;43(4):419-24. Epub 2011 Jul 6.

Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics.

Peloso E de F, Vitor SC, Ribeiro LH, Piñeyro MD, Robello C, Gadelha FR.

Source

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil.

Abstract

Trypanosoma cruzi cytosolic (TcCPx) and mitochondrial tryparedoxin peroxidase (TcMPx) play a fundamental role in H₂O₂ detoxification. Herein, mitochondrial bioenergetics was evaluated in cells that overexpressed TcCPx (CPx) and TcMPx (MPx) and in pTEX. In MPx, a higher expression was observed for TcCPx, and the same correlation was true for CPx. Differences in H₂O₂ release among the overexpressing cells were detected when the mitochondrial respiratory chain was inhibited using antimycin A or thenoyltrifluoroacetone. MPx had higher O₂ consumption rates than pTEX and CPx, especially in the presence of oligomycin. In all of the cells, the mitochondrial membrane potential and the ATP levels were similar. Because of the mild uncoupling that was observed in MPx, the presence or induction of a proton transporter in the mitochondrial membrane is suggested when TcMPx is expressed at higher levels. Our results show a possible interplay between the cytosolic and mitochondrial antioxidant systems in a trypanosomatid.

PMID:21732175 [PubMed - in process]

Por questões de direitos autorais o artigo em sua íntegra não está representado.

4 – Capítulo II – A expressão da triparedoxina peroxidase e superóxido dismutase, bem como a liberação de EROs estão relacionadas às fases de proliferação do *Trypanosoma cruzi*

Tryparedoxin peroxidase and superoxide dismutase expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases

Eduardo F. Peloso*, Conrado C. Gonçalves*, Thiago M. Silva*, Luis Henrique G. Ribeiro*, María Dolores Piñeyro[#], Carlos Robello[#] & Fernanda R. Gadelha^{*,1}

*Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, Campinas, SP, 13083-862, Brazil and

[#]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República and Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, 11400, Uruguay.

¹Corresponding author: Fernanda Ramos Gadelha, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, Caixa Postal: 6109, CEP: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil. Tel: +55-19-35216137; Fax: +55-19-35216130; frgad@unicamp.br.

Artigo submetido

Summary

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas' disease and the proteins of the parasite antioxidant system have been pointed out as targets for the development of an improved therapy due to the uniqueness and relevance of this system for the parasite. In order to enable a functional analysis of this system along the growth curve of epimastigotes, quantitative assays of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase and superoxide dismutase expression (TcCPx, TcMPx, SODB and SODA, respectively) in correlation to H₂O₂ release and O₂⁻ production were performed. Differences were observed regarding H₂O₂ release and O₂⁻ production not only between strains, but also along the growth curve. All the enzymes studied varied their expression as a function of time in culture in both strains. Interestingly, although at lower levels, Y strain showed the same pattern of Tulahuen 2 enzyme expression, for all the proteins studied, except for SODA. In the stationary phase of Y strain, the degree of expression of all enzymes returned to similar levels as the ones detected in the *log* phase, with the exception of TcCPx and SODA. In Tulahuen 2, a higher expression of TcMPx, SODA and SODB was detected in the early stationary phase with a further slight decrease in the late stationary phase, excluding TcMPx which showed a markedly decrease and TcCPx that increased its level. Because of the significance of ROS in redox signaling the differences described above underscore the importance of these parameters for epimastigotes proliferation and possibly differentiation into the infective forms.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, reactive oxygen species, growth curve, antioxidant defenses.

1- Introduction

In nearly all living organisms, maintenance of an intracellular reducing milieu is achieved by means of high concentrations of glutathione, a low molecular weight thiol [1]. However, in *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, most of the glutathione content is found in the form of trypanothione ($T(SH)_2$, N^1,N^8 -bis(glutathionyl)spermidine) [2,3]. Although trypanothione discovery in *T. cruzi* occurred in 1985 [4], it was not until 1997 that the antioxidant pathway centered in this protein was elucidated in *Crithidia fasciculata* [5] and in 2000 proved to be true for *T. cruzi* as well [6]. From then on, distinct enzymes with different substrate specificities and intracellular locations [1,7] were identified, leading to the conclusion that the parasite once considered deficient in the antioxidant defenses [8] in reality has an elaborate peroxide metabolism. In kinetoplastids, the redox homeostasis appears to be efficiently regulated once the parasites can successfully deal with the oxidative burst generated at the onset of infection and adapt to the different metabolic and environmental conditions imposed by their digenetic life-cycle [3]. Most importantly, because of the uniqueness of the antioxidant defense system, the proteins involved were pointed out as targets for the development of a more effective therapy than the ones currently in use [9]. Today it is clear that the capacity of *T. cruzi* antioxidant defenses is in direct correlation with the success of the infection process [10,11]. Another matter that has hampered the advances in the development of a more specific therapy is the biochemical and genetic diversity that exists among the different *T. cruzi* strains.

Among the antioxidant proteins, cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase (TcCPx and TcMPx, respectively), trypanothione synthetase, tryparedoxin (TXN) and mitochondrial superoxide dismutase (SODA) are up regulated during epimastigotes differentiation into the infective metacyclic form [9,12]. TcCPx and TcMPx belong to the group of peroxiredoxins (Px), i.e., peroxidases that do not require cofactors such as metal ions or prosthetic groups using redox active cysteines to reduce their substrates [1]. In *T. cruzi*, besides their role in virulence and as a part of the antioxidant defense system centered in trypanothione, their expression levels are inversely correlated to the levels of H_2O_2 -released upon inhibition of the mitochondrial respiratory chain [13], and together with SODA are overexpressed in *T. cruzi* populations with *in vitro*-induced resistance to

benznidazole [14,15]. Interestingly, although TcCPx and TcMPx role as virulence factor is clear [9], they do not influence the invasion process [10]. Regarding specificity, both TcCPx and TcMPx reacted very efficiently with H₂O₂, having rate constants in the 10⁶-10⁷ M⁻¹ s⁻¹ range [16]. In contrast with other peroxiredoxins [17], TcMPx and TcCPx are not abundant proteins, where TcCPx is present as twice as much as the former one [10].

Also of importance is superoxide dismutase (SOD) present in *T. cruzi* as an iron-containing enzyme (FeSOD) in contrast with the mammalian host where Cu/ZnSOD and MnSOD are found in the cytosol and mitochondrion, respectively [18]. This feature makes FeSODs promising candidates for drug design. For *T. cruzi* two SOD genes, SODA and SODB were cloned and characterized [19]. In *Trypanosoma brucei*, SODB isoenzymes are evenly distributed over the cytosol and the glycosomes while SODA and SODC are located in the mitochondrion, possibly in the matrix and intermembrane-space, respectively [18]. Analysis through genome sequencing showed that all four SOD types are common to all trypanosomatids. The restricted ability of O₂⁻ to cross biological membranes is reflected by the presence of SOD in different intracellular compartments that would impair the formation of H₂O₂, that can easily cross the membrane and reach other intracellular sites [18]. Interestingly, overexpression of SODA protected *T. cruzi* against programmed cell death induced by fresh human serum indicating the participation of mitochondrial O₂⁻ in this process [20].

The capacity for *in vitro* transformation of non-infective epimastigotes into the metacyclic, i.e., infective forms appears to be triggered by nutritional stress at the stationary phase of the parasite's growth curve. However, this is a feature that is not shared by all strains and may be lost after repeated culture *in vitro* [21]. Nevertheless, the study of the biochemical changes that take place during the growth curve of epimastigotes can provide important insights into the epimastigotes differentiation process [21,22]. The aim of this paper, and to our knowledge, the first report in *T. cruzi*, was to provide qualitative and quantitative data regarding H₂O₂ levels and O₂⁻ production and peroxiredoxin and SOD expression in two *T. cruzi* strains that markedly diverge in the resistance to oxidative stress and growth.

2- Material and Methods

2.1- Cell cultures

T. cruzi epimastigotes (5.2×10^6 cells/mL, Tulahuen 2, and Y strains, Lineages I and II, respectively) were grown in LIT medium at 28°C containing 20mg/L hemin and 10% fetal calf serum as described [23]. After 3, 5 and 7 days of growth (*log*, early and late stationary phases, respectively), cells were harvested by centrifugation ($1000 \times g$ at 4°C), washed in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.3 and the number of cells determined in a Neubauer chamber.

2.2- Determination of hydrogen peroxide release

Determination of H_2O_2 release was performed in a Hitachi F2500 fluorescence spectrophotometer, with continuous stirring as described in [13].

2.3- Preparation of antibodies, protein extracts and Western blotting analysis

Polyclonal antibodies α -TcCPx and α -TcMPx were previously obtained [10]. The recombinant proteins TcSODA and TcSODB were obtained as hexahistidine-tag proteins cloned in the pQE30 vector (Qiagen) and were expressed in the M15 *E. coli* strain and purified in a Ni^{2+} -NTA resin column. Polyclonal antibodies α -SODA and α -SODB were elicited in New Zealand White rabbits. At different growth phases, parasites were harvested by centrifugation (2500rpm, 5 min) and resuspended in 80 μ L of PBS/1mM $MgCl_2$ and the same volume of lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Tween 20, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM Na_3VO_4 , 1mM NaF, 0.1mM PMSF, aprotinin 1 μ g/mL; leupeptin 1 μ g/mL) was added. The suspension was sonicated (Bandelin Sonoplus Homogenisatoren®) for 10 cycles of 1 sec, with an interval of 1 sec and 50% max amperage. The material was kept for 2 h on ice and subsequently centrifuged (14,000 rpm, 4°C, 15 min). To the protein extract an equal volume of loading buffer was added (100mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue, 20% glycerol, 200mM β -mercaptoethanol) and samples were heated at 96°C for 4 min [14]. Protein concentration was determined by the Lowry technique in samples without loading buffer [24]. Protein extracts (20 μ g) were separated and electroblotted onto a nitrocellulose membrane using the XCell™ II mini cell system (Novex™). Membranes were blocked by incubation with 5% instant non-fat dried

milk in PBS 0.05% Tween 20 (PBS-T) for 1 h, washed and incubated in the presence of polyclonal antibodies raised against *T. cruzi* TcMPx (1:1000), TcCPx (1:5000), SODA (1:2500) and SODB (1:2500) for 2 h. After three 15 min washes with PBS-T, membranes were incubated with HRP-linked anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology®, 1:6000 dilution) for 1 h at room temperature and washed three times with PBS [13, 25]. Bands were revealed using the Super Signal® Detection Kit (Pierce). Data were analyzed by the Scion Imaging® Program normalized by loading control (α -GAPDH).

2.4- Determination of superoxide production

O₂⁻ production was assayed by MitoSOX (3,8-phenanthridinediamine, 5-(6'-triphenylphosphoniumhexyl)-5,6dihydro-6-phenyl, Molecular Probes®), a mitochondrial targeted probe, as described in [20]. Briefly, cells (3x10⁸/mL) were loaded in Krebs-Henseleit buffer (KH buffer, 15mM NaCO₃, 5mM KCl, 120mM NaCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 1.5mM NaH₂PO₄) at 28°C with 5μM MitoSOX. After 10 min, cells were washed and resuspended in KH buffer. Detection of oxidized MitoSOX (oxMitoSOX) in 10⁸cells/mL was performed in this buffer in the presence of, 50μM digitonin and 5mM succinate. Fluorescence was detected in a Hitachi F2500 fluorescence spectrophotometer at the 510 and 580 nm wavelengths, excitation and emission respectively.

2.5- Statistical analysis

Data represent averages $\pm$ standard deviations of at least three independent experiments performed in duplicate. Comparisons were conducted using Student's *t*-test in Origin 6.0 software, and data in $p < 0.05$ were considered significantly different.

3- Results and Discussion

Literature background show that when compared to Y cells, Tulahuen 2 cells have higher glucose-6-phosphate dehydrogenase activities along the growth curve, growth index, TcCPx expression [26] and respiratory rates [27]. Regarding parasitemia, i.e., the number of blood trypomastigotes/100 fields at the peak of parasitemia, both were considered attenuated strains, although Tulahuen 2 elicited a double number of parasites in relation to the other strain [9]. This prompted us to use this entire scenario to evaluate the resistance

along the growth curve that would allow us to widen our knowledge regarding the physiological role of H_2O_2 and O_2^- in *T. cruzi*.

3.1- Hydrogen peroxide release in Y strain is lower at the early stationary phase

Besides the concept that mitochondrial ROS production is an unavoidable consequence of electron leakage, another view is that variations in mitochondrial H_2O_2 release signalize to the nucleus and cytoplasm what the mitochondria is doing [28]. Nowadays, it is clear that H_2O_2 as well as other hydroperoxides are key players in metabolic regulation, a phenomenon also relevant in trypanosomatids [29].

In this sense, the first parameter analyzed was H_2O_2 release in succinate-supported oxygen consumption (Figure 1). In Y strain, H_2O_2 release in the *log* and late stationary phase are similar and $\sim 43\%$ higher than in the early stationary phase of growth. Interestingly, under our experimental conditions no H_2O_2 release could be detected in Tulahuen 2 cells. This fact can be explained by Tulahuen 2 oxygen consumption rates, which are higher than Y strain in all growth phases [27]. Higher oxygen consumption rates mean less electron leakage leading to the generation of lower ROS levels. Another point that could also explain the lower release of H_2O_2 when compared to the Y strain, would be the expression levels of the antioxidants enzymes related to their detoxification.

3.2- Cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase expression have different expression pattern

Western blotting analysis revealed that TcCPx expression increases with the age of the culture, except for Y strain in the early stationary phase where a significant decrease (16%) was observed (Figure 2C). Comparing the expression levels, Tulahuen 2 cells have higher levels than Y strain, except for the *log* phase.

TcMPx displayed a bell shape expression pattern in both strains (Figure 2F). The expression increases in the early stationary phase (seven and threefold in Tulahuen 2 and Y strains, respectively), decreasing afterwards to levels below the ones detected in the *log* phase (92 and 74 % in Tulahuen 2 and Y cells, respectively). These results correlated to H_2O_2 release in Y strain, where a 45% lower degree of H_2O_2 release was detected in the early stationary phase (Figure 1). The higher TcMPx and TcCPx expression levels in

Tulahuen 2 cells and the higher O₂ consumption rates [27] could also contribute for the lack of detection of H₂O₂ release as mentioned above.

Mammalian Pxs appear to be involved in H₂O₂-mediated intracellular signaling processes, like cell differentiation, proliferation and apoptosis and not as general antioxidant devices [1,30]. In trypanosomatids based on an *in vitro* study, a new potential physiological role for the tryparedoxin/tryparedoxin peroxidase was suggested. This system would serve as a redox-mediated molecular switch for DNA replication. In this sense, H₂O₂ reacts with Px, which in turn reacts with the universal minicircle sequence binding protein (UMSBP), that becomes oxidized so blockage of replication occurs. Additionally, release of replication inhibition is achieved by reduced TXN [31,32]. If this is true *in vivo*, it can be suggested that under oxidative stress conditions, where the levels of H₂O₂ are above normal, Px would impair DNA replication avoiding DNA damage. Also, in growing cells T(SH)₂ concentration is significantly higher than in growth-arrested cells [3] and the interaction between trypanothione and tryparedoxin is considered the bottleneck of the trypanosomatids antioxidant system [33]. Taking this into consideration, it can be speculated that TXN would be in the reduced state and DNA replication would be favored. In this sense, in Tulahuen 2 the higher levels of NADPH production during the *log* phase [26] would also keep TXN in a reduced state favoring DNA replication. This supports the fact that Tulahuen 2 cells have higher proliferation rates than Y [26].

3.3- Superoxide production is higher at the *log* phase in both strains

MitoSOXTM permeates live cells targeting specifically the parasite mitochondrion. It is oxidized by superoxide but not by other ROS, thus allowing us to correlate the production of oxMitoSOX (oxidized probe by mitochondrial O₂⁻) in the strains studied (Figure 3). Using succinate to support O₂⁻ consumption, no significant differences could be observed among strains regarding the levels of O₂⁻ produced. This generation was higher at the *log* phase and decreased in the concomitant growth phases. It is interesting to point out that in the late stationary phase, cells from both strains have higher respiratory rates [27] that would contribute for less electron leakage and consequently to less O₂⁻ generation. In addition to the oxygen consumption rates, another important factor to be considered is the level of SODs expression.

3.4- SODB and A are differentially expressed along the Tulahuen 2 and Y strains growth curves

SODB expression followed the same pattern described for TcMPx. A bell shaped expression pattern and an increase of approximately three and onefold detected for Tulahuen 2 and Y cells, respectively (Figure 4C). Interestingly, different from TcMPx, in the late stationary phase the levels decreased ~18 and 32% in Tulahuen 2 and Y strain, respectively, where levels similar to the ones detected in the *log* phase were reached in the Y strain.

Each strain had a unique SODA expression (Figure 4F). In Tulahuen 2 cells, the same pattern described for TcMPx and SODB was observed, with a decrease in about 15% in the late stationary phase. In the other strain, SODA levels were higher at the *log* phase, from where it decreased (~25%) in the early stationary phase and remained constant from then on.

Although Y cells have a higher level of SODA expression than Tulahuen 2 cells in the *log* phase, similar levels of O_2^- production were detected among both cells (Figure 3). Accordingly, in the *log* phase, Y cells have lower respiratory rates when compared to Tulahuen 2 cells that would contribute to higher levels of O_2^- generation (Figure 3). In addition, the Y strain has a large increase (100%) in the rate of O_2 consumption in the early stationary phase towards the late stationary phase [27] which would be responsible for the decrease in the generation of O_2^- .

Among all the enzymes studied only SODA showed a marked difference in expression. In mammalian cells, mitochondrial MnSOD, is considered to be one of the major antioxidant enzymes [34]. The basal expression of this enzyme is normally low, but is induced by irradiation, cytokines, interleukins and interferon, in addition to variations in the cellular redox state [35]. In *T. cruzi*, gene induction of TcSODA in epimastigotes led to increased resistance to programmed cell death induced by fresh human serum, protection of DNA fragmentation and externalization of phosphatidylserine [20]. Taking all of this into consideration, the marked divergence in SODA expression in the strains studied could contribute for the biochemical and molecular features peculiar to each strain.

4- Conclusion

In Scheme 1, a compilation of the data obtained is shown. It clearly indicates that qualitative and quantitative changes in the main antioxidant enzymes reflecting in the concentration of H_2O_2 release and O_2^- production take place as a function of time in culture of *T. cruzi* epimastigotes. These changes could explain the cells' differences in the resistance to the oxidative stress generated by H_2O_2 and could be relevant to the differentiation in the metacyclic forms. Also, since O_2^- was shown to have an important role in programmed cell death in this parasite [20], Y cells in particular could be used as a model to unravel the molecular changes that occur during this process in *T. cruzi*. Most importantly, the identification of different profiles in cells belonging to different lineages adds new steps to be overcome when performing drug-development research.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP). E.F.P., C.C.G., T.M.S. are students supported by Capes and FAPESP fellowships. Dr Ariel Silber for kindly providing us with the GAPDH antibody.

5- References

- [1] Castro H, Tomás, A. M. Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1593-06.
- [2] Repetto Y, Opazo E, Maya JD, Agosin M, Morello A. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996;115:281-5.
- [3] Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780:1236-48.
- [4] Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 1985;227:1485-7.

- [5] Nogoceke E, Gommel DU, Kiess M, Kalisz HM, Flohé L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol Chem* 1997;378:827-36.
- [6] Lopez JA, Carvalho TU, de Souza W, Flohé L, Guerrero SA, Montemartini M, Kalisz HM, Nogoceke E, Singh M, Alves MJ, Colli W. Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:767-72.
- [7] Wilkinson SR, Kelly JM. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem* 2003;384:517-25.
- [8] Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AO. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1980;188:643-8.
- [9] Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN, Basombrio MA, Radi R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int J Parasitol* 2009; 39:1455-64.
- [10] Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, Robello C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 2008;408:45-50.
- [11] Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:415-21.
- [12] Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Oppendoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 2005;309:473-6.
- [13] Peloso E de F, Vitor SC, Ribeiro LH, Piñeyro MD, Robello C, Gadelha FR. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. *J Bioenerg Biomembr* 2011;43:419-24.

- [14] Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop* 2006;100:119-32.
- [15] Nogueira FB, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SM. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res* 2009;104:835-44.
- [16] Piñeyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, Trujillo M. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 2011;507:287-95.
- [17] Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003;28:32-40.
- [18] Dufernez F, Yernaux C, Gerbod D, Noël C, Chauvenet M, Wintjens R, Edgcomb VP, Capron M, Oppenheimer FR, Viscogliosi E. The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* 2006;40:210-25.
- [19] Ismail SO, Paramchuk W, Skeiky YA, Reed SG, Bhatia A, Gedamu L. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;86:187-97.
- [20] Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J* 2007;403:323-34.

- [21] González-Pino MJ, Rangel-Aldao R, Slezynger TC. Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. DNA Cell Biol 1999;18:449-55.
- [22] Pance A, Henriquez DA. Changes in proteolytic activity during the growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem Int 1992;27:613-23.
- [23] Castellani O, Ribeiro LV, Fernandes JF. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. J Protozool 1967;14:447-51.
- [24] Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem 1972;48:422-27.
- [25] Morales J, Mogi T, Mineki S, Takashima E, Mineki R, Hirawake H, Sakamoto K, Omura S, Kita K. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. J Biol Chem 2009;284:7255-63.
- [26] Mielniczki-Pereira AA, Chiavegatto CM, López JA, Colli W, Alves MJ, Gadelha FR. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. Acta Trop 2007;101:54-60.
- [27] Silva TM, Peloso EF, Vitor SC, Ribeiro LH, Gadelha FR. O₂ consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. J Bioenerg Biomembr 2011;43:409-17.
- [28] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol 2006;141:312-22.
- [29] Flohé L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. Biotechnol Adv; 2011.

- [30] Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002;383:347-64.
- [31] Sela D, Yaffe N, Shlomai J. Enzymatic mechanism controls redox-mediated protein-DNA interactions at the replication origin of kinetoplast DNA minicircles. *J Biol Chem* 2008;283:32034-44.
- [32] Shlomai J. Redox control of protein-DNA interactions: from molecular mechanisms to significance in signal transduction, gene expression, and DNA replication. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:1429-76; 2010.
- [33] Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly JM. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J Biol Chem* 2002;277:17062-71.
- [34] Wong GH. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:205-9.
- [35] Soini Y, Vakkala M, Kahlos K, Pääkkö P, Kinnula V. MnSOD expression is less frequent in tumour cells of invasive breast carcinomas than in *in situ* carcinomas or non-neoplastic breast epithelial cells. *J Pathol* 2001;195:156-62.

Figure Legends:

Figure 1 - H₂O₂ release is lower at Y strain early stationary phase. 10⁸ cells/mL were incubated in PBS / 1mM MgCl₂ in the presence of 50μM digitonin, 5mM succinate, 1U/mL HRP, 25μM Amplex red. The data shown is the average of four independent experiments performed in duplicate ± standard errors. White bars (Y strain). Statistical analysis (*t*-test): *p*>0.05 for the indicated groups.

Figure 2 - TcCPx expression is higher at the late stationary phase and TcMPx at the early stationary phase. *T. cruzi* lysates were prepared at the depicted growth phases and resolved by SDS-PAGE (20μg protein/lane). Western blotting analysis of α-TcCPx (A) and α-TcMPx (D); Lanes 1, 2 and 3: Tulahuen 2 strain 3, 5 and 7 days, respectively; Lanes 4, 5 and 6: Y strain 3, 5 and 7 days, respectively. (B) Western blotting analysis of α-GAPDH for (A) and (E) for (D). The percentage of the band intensities of (A) and (D) were normalized to the band in lane 1 that was set to 100% and is represented in (C) and (F), respectively. The best representatives of three independent experiments are shown. Statistical analysis: *t* test: *p*> 0.05 for the indicated groups.

Figure 3 - Mitochondrial O₂⁻ production is higher at the log phase. Detection of oxMitoSOX was measured in 10⁸ cells/mL in succinate-supported O₂ consumption, in Tulahuen 2 (black bars) and Y (white bars) strains. The data shown is the average of four independent experiments performed in duplicate ± standard errors. Statistical analysis: *t* test: *p*> 0.05 for the indicated groups.

Figure 4 - SODB and SODA expression is increased at the early stationary phase in the strain with a higher resistance to H₂O₂-induced oxidative stress. *T. cruzi* lysates were prepared at the depicted growth phases and resolved by SDS-PAGE (20µg protein/lane). Western blotting analysis of α-SODB (A) and α-SODA (D); Lanes 1, 2 and 3: Tulahuen 2 strain 3, 5 and 7 days, respectively; Lanes 4, 5 and 6: Y strain 3, 5 and 7 days, respectively. (B) Western blotting analysis of α-GAPDH for (A) and (E) for (D). The percentage of the band intensities of (A) and (D) were normalized to the band in lane 1 that was set to 100% and is represented in (C) and (F), respectively. The best representatives of three independent experiments are shown. Statistical analysis: *t*-test: *p*>0.05 for the indicated groups.

Scheme 1 – Schematic representation of TcCPx, TcMPx, SODB and SODA expression along the growth curve of *T. cruzi* Tulahuen 2 and Y strains.

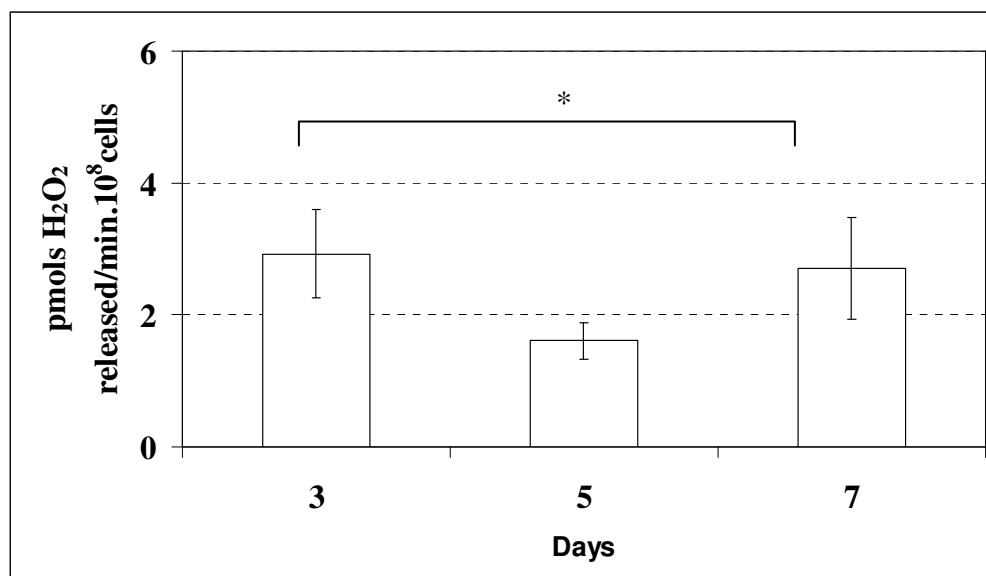


Figure 1

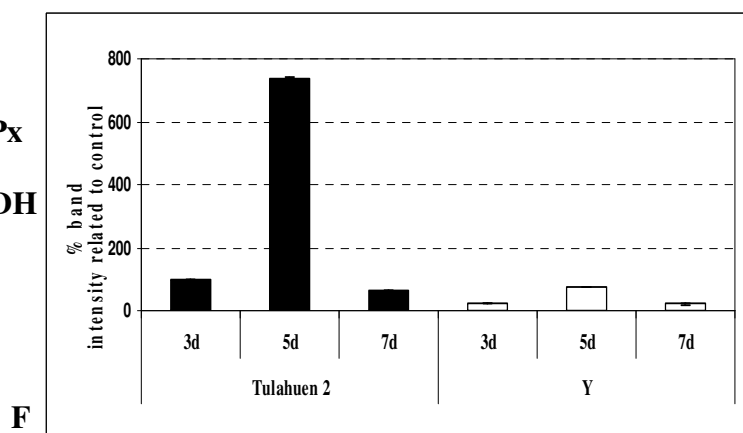
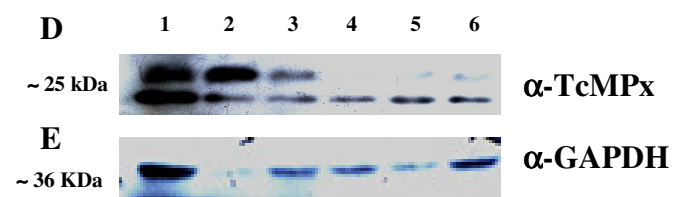
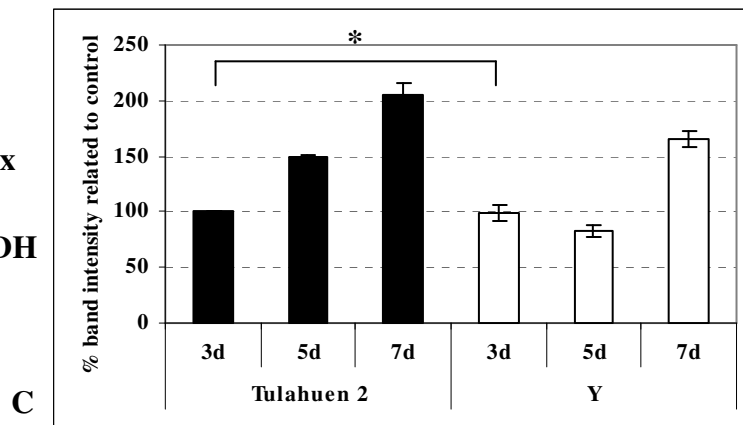
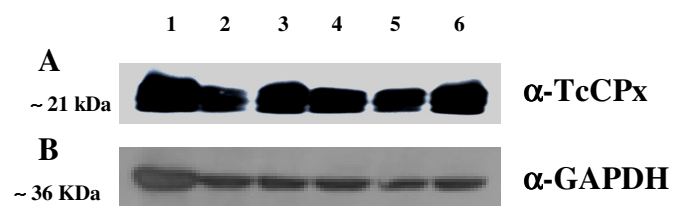


Figure 2

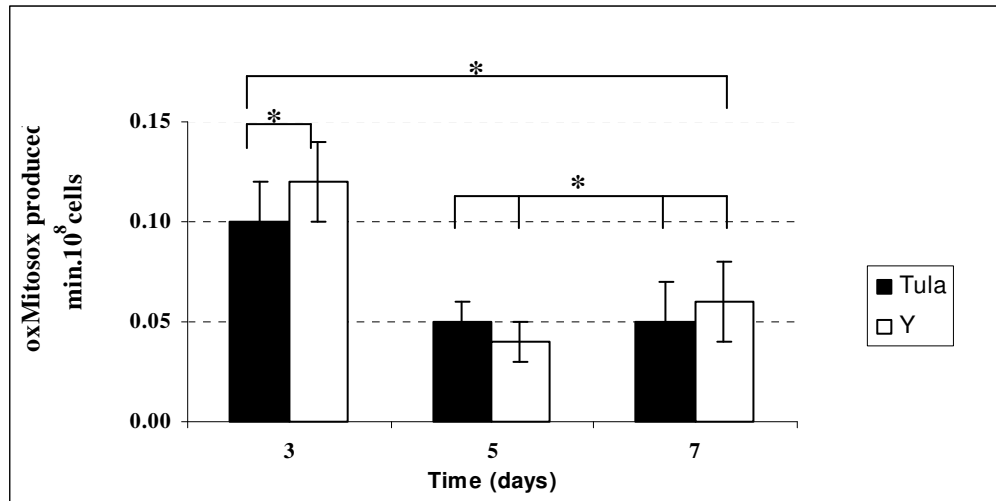


Figure 3

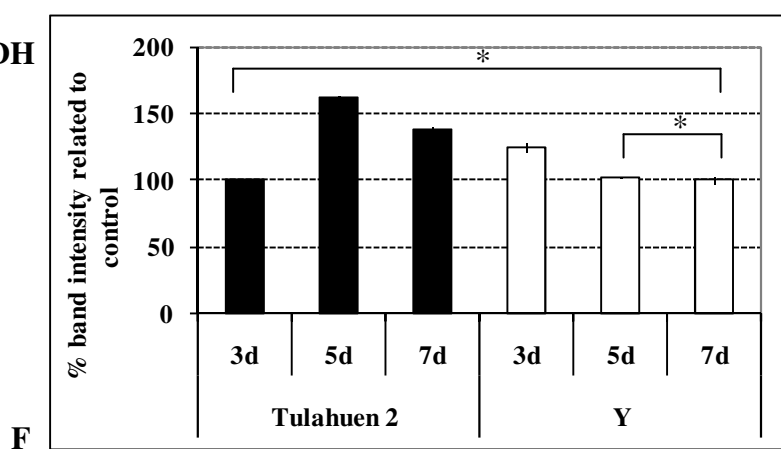
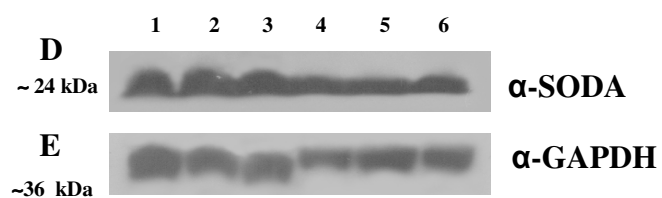
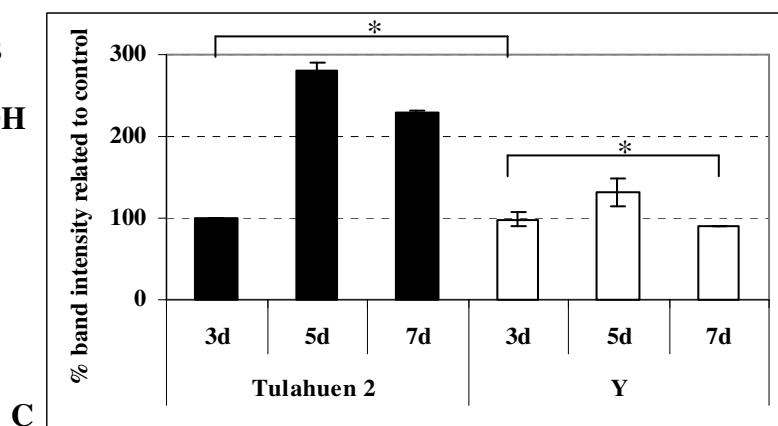
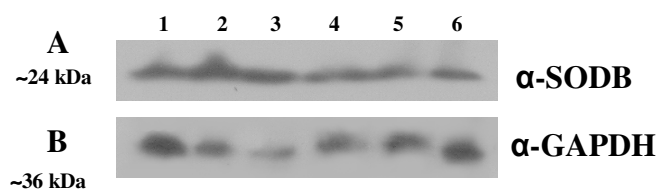
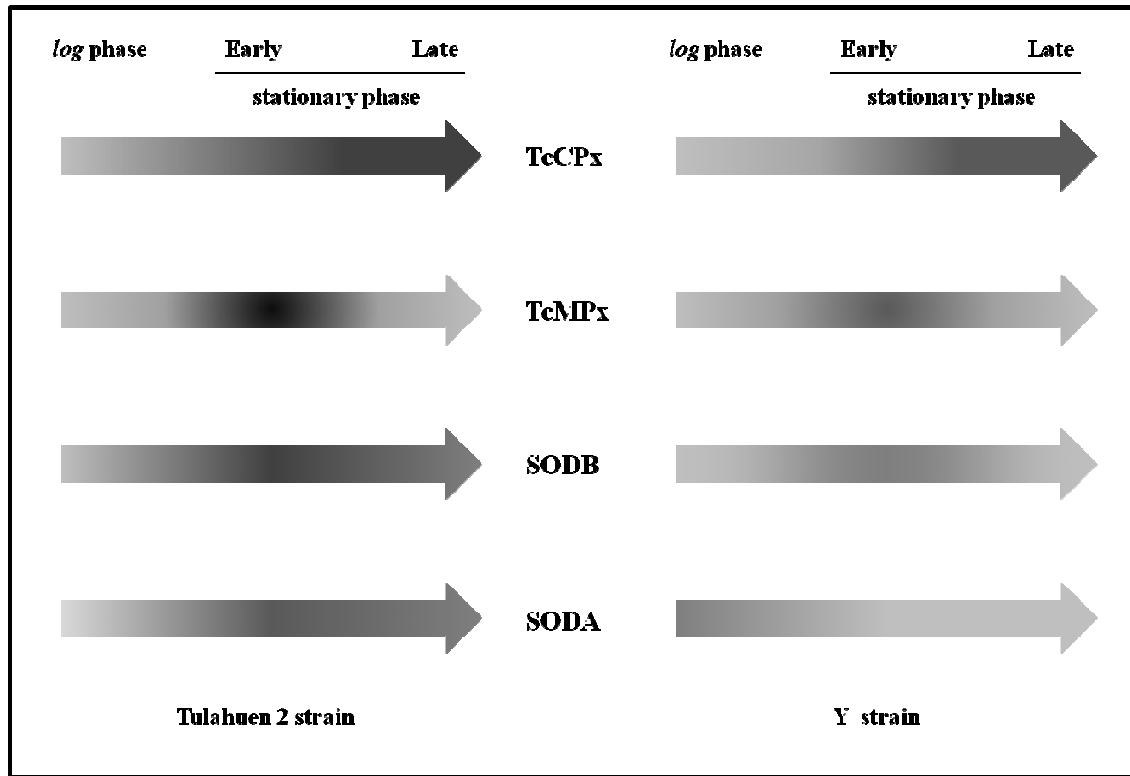


Figure 4



Scheme 1

5 – Capítulo III – Avaliação da expressão das triparedoxinas peroxidases em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* derivados de meio de cultura tratados com H₂O₂

Evaluation of triparedoxin peroxidases expression in H₂O₂ - treated *Trypanosoma cruzi* tissue-culture derived trypomastigotes

Gadelha, F.R.^{1*}, Gonçalves, C.C.¹, Mattos, E.C.², Alves, M.J.M.², Piñeyro, D.³, Robello, C.³ and Peloso, E.F.¹

¹Departamento de Bioquímica, IB, UNICAMP, Brazil, ²Departamento de Bioquímica, IQ, USP, Brazil, ³ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República and Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

*Corresponding author: Fernanda Ramos Gadelha, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, Caixa Postal: 6109, CEP: 13083-862, Campinas, São Paulo, Brazil. Tel: +55-19-35216137; Fax: +55-19-35216130; frgad@unicamp.br.

Artigo submetido

Summary

Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes repertoire are among the factors that guarantee parasite survival and maintenance of infection enabling *T. cruzi* different stages to cope with oxidative stress. Herein, the expression of cytosolic (TcCPx) and mitochondrial (TcMPx) tryparedoxin peroxidases was evaluated in tissue-culture derived trypomastigotes upon incubation with different concentrations of H₂O₂. TcCPx expression increased slightly (5.4%) in cells submitted to 10 µM H₂O₂ - treatment when compared to the control. When cells were incubated in the presence of higher H₂O₂ concentrations (20-50µM), a decrease in TcCPx expression was observed until 50µM where similar levels to the ones obtained with 20 µM were found. Under these conditions, TcMPx expression increased (~53%) with 10µM-treatment in relation to the control, followed by a reduction that reached ~46% of the control with the highest concentration tested. Interestingly, in the supernatant of these incubations, TcCPx, but not TcMPx, was detected and its levels increased concomitantly with the decrease in its expression in the intracellular compartment. When compared to the epimastigote form, the tissue-culture derived trypomastigotes, as the metacyclic form, have higher levels of both peroxiredoxins. Our data show that peroxiredoxins in the tissue-culture derived trypomastigote can be modulated under oxidative stress conditions to meet the parasite needs. Also, due to the different expression patterns observed upon H₂O₂-treatment, each peroxiredoxin may play a distinct role in protecting the parasite under oxidative stress conditions.

1. Introduction

American trypanosomiasis is a potentially life-threatening parasitic disease caused by *Trypanosoma cruzi*. There are 10 million people infected worldwide, mostly in Latin America and around 25 million people are at risk of contracting the disease (WHO, 2010). It is estimated that in 2008, more than 10,000 people deceased from this parasitic infection (WHO, 2010). Until nowadays, no vaccine has been developed against *T. cruzi* (DUMONTEIL, 2009) and the available treatment, benznidazol or nifurtimox, not only have a limited efficacy, but also lead to several side effects (WILKINSON *et al.*, 2008). In this sense, the search for new therapeutic targets has been a challenge for researchers and among the possible ones; the parasite antioxidant system has attracted attention.

T. cruzi's life cycle includes invertebrate and vertebrate hosts and three well defined forms, epimastigote (in the insect vector), trypomastigote and amastigote (bloodstream and intracellular forms, respectively in the vertebrate host) (MURRAY *et al.*, 2006). Through metacyclogenesis the epimastigote form, non-infective, differentiates in the infective form, metacyclic trypomastigotes. During its life cycle, the parasite goes through a series of morphological and biochemical modifications providing each stage with the capacity to survive in a new environment (DÍAZ *et al.*, 2011). In the vertebrate host, *T. cruzi* has to deal with high levels of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, specially H₂O₂ and peroxynitrite (ONOO⁻) produced by the macrophage (KIERSZENBAUM *et al.*, 1974). It is now clear that the capacity of *T. cruzi* to evade the host-oxidative response is in direct relation to the success of the invasion process (PIACENZA *et al.*, 2009a). *T. cruzi*'s antioxidant defenses consist of a series of pathways centered in trypanothione (T(SH)₂, N¹,N⁸-bisglutathionylspermidine), a protein unique to the trypanosomatids (FLOHE *et al.*, 1999). T(SH)₂ is synthesized by trypanothione synthetase (TcTS), an enzyme also absent in

the vertebrate host that is maintained in its reduced form by the NADPH-dependent flavoenzyme trypanothione reductase (TR). T(SH)₂ transfers NADPH reducing equivalents to tryparedoxin, an intermediate electron donor that finally transfers the reducing equivalents to a peroxidase reducing a hydroperoxide (WILKINSON *et al.*, 2003; IRIGOIN *et al.*, 2008; KRAUTH-SIEGEL e COMINI, 2008). Five distinct peroxidases have been identified in *T. cruzi*, differing in their substrate specificity and intracellular location (WILKINSON *et al.*, 2003). Tryparedoxin peroxidases have the capacity to detoxify H₂O₂, small chain organic hydroperoxides (WILKINSON, *et al.*, 2000) and peroxynitrite (PIACENZA *et al.*, 2008). Ascorbate peroxidase (APx) also detoxifies H₂O₂ and is located to the endoplasmic reticulum (WILKINSON *et al.*, 2002a). Glutathione peroxidase-I (cytosol and glycosome) e II (endoplasmic reticulum) confer resistance against fosfolipids and fatty acids hydroperoxides (WILKINSON, *et al.*, 2002a; WILKINSON, *et al.*, 2002b).

Tryparedoxin peroxidases are located to the cytosol (TcCPx, *Genbank* accession number: AJ012101) and to the mitochondrion (TcMPx, *Genbank* accession number: AJ006226), having low similarity (57%) among them (WILKINSON *et al.*, 2000). TcMPx is located around the kinetoplast suggesting its possible role in the protection of mitochondrial DNA against peroxide-mediated damage (WILKINSON *et al.*, 2000). Data on the literature have shown the importance of peroxiredoxins as key enzymes for *T. cruzi*. Parasites overexpressing TcCPx or TcMPx were able to infect and multiply more efficiently in infection experiments (PIACENZA, *et al.*, 2008; PIACENZA, *et al.*, 2009a). Overexpression of TcCPx or TcMPx conferred a high level of protection on epimastigotes, against a broad range of peroxynitrite concentrations (0-200 µM and 0-400 µM for TcMPx or TcCPx overexpressing cells, respectively) (PIACENZA, *et al.*, 2008). Also, significant differences related to the levels of H₂O₂-release by the mitochondrial respiratory chain

(MRC) in peroxiredoxins overexpressing cells were only observed when the MRC was inhibited by antimycin A or thenoyltrifluoracetone (TTFA) (PELOSO *et al.*, 2011). Interestingly, in metacyclogenesis the levels of both peroxiredoxins are increased along with TcTS but not TR or APx and this increase is more pronounced in the more virulent strains (PIACENZA, *et al.*, 2009b). Interestingly, in another trypanosomatids like *Leishmania infantum* overexpression of these peroxiredoxins led to different resistance to the oxidative stress, where parasites overexpressing the cytosolic peroxidase were more resistant to H₂O₂-treatment, while the ones that overexpressed the mitochondrial homolog were more resistant to *t*-butyl hidroperoxide (Castro *et al.*, 2002).

Taking into account the relevance of these enzymes for *T. cruzi* and that most of the protein expression studies carried out so far have been done in epimastigotes or in the metacyclic form, in this study a systematic analysis of TcCPx and TcMPx expression in tissue-culture derived trypomastigotes subjected or not to H₂O₂-treatment was performed. To our knowledge this is the first report in *T.cruzi* that shows the release of TcCPx to the incubation medium and the modulation of peroxidases under oxidative stress conditions in tissue-culture derived trypomastigotes.

2. Material and Methods

2.1 Cell culture

2.1.1 Epimastigotes (Y strain) were grown in LIT medium at 28°C containing 20mg/L hemin and 10% fetal calf serum as described (CASTELLANI *et al.*, 1967). At the early stationary phase, cells were harvested by centrifugation (1000 x g at 4°C), washed in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.3 and the number of cells was determined in a Neubauer chamber.

2.1.2 Trypomastigotes (Y strain) were collected by centrifugation (5000 rpm, 10 min) from the supernatant of infected LLC-MK2 cells cultured in DMEM in the presence of 2% of fetal calf serum. The number of cells was determined in a Neubauer chamber (ANDREWS e COLLI, 1982).

2.2 Preparation of protein extracts

T. cruzi epimastigotes (5.2×10^6 cells/mL) were incubated without H_2O_2 at 28°C for 2 h and the trypomastigotes (10^9 cells/mL) in DMEM in the presence of 0-50 μ M H_2O_2 at 37°C for 2 h. Afterwards, cells were washed for three times in PBS in the presence of phosphatase and proteases inhibitors (5mM NaF, 2mM Na_3VO_4 , 50 μ M sodium β -glycerophosphate, 1 mM PMSF and *Protease Inhibitor Cocktail* (SIGMA-ALDRICH)). Finally, the pellet was resuspended in 500 μ L of loading buffer (50mM Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 0.1% bromophenol blue; 10% glycerol; 0.7M β -mercaptoethanol).

2.3 Supernatant lyophilization

The supernatant from the incubation of trypomastigotes with or without H_2O_2 was filtered (pore 0.22 μ M), lyophilized and 50mg of the resulted powder was resuspended in 150 μ L PBS. To an aliquot of 30 μ L of this solution, 10 μ L of loading buffer was added.

2.4 Western Blotting

Proteins from cell extracts (equivalent to 2×10^7 cells) and from the H_2O_2 -incubation supernatant (30 μ L) were separated by SDS-PAGE and electroblotted onto a nitrocellulose membrane using the XCell™ II mini cell system (Novex™). Membranes were blocked by

incubation with 5% instant non-fat dried milk in PBST (PBS/0.05% Tween 20) for 1 h at 4°C, washed and incubated in the presence of polyclonal antibodies raised against *T. cruzi* TcMPx (1:2500), TcCPx (1:5000) for 1h or 24h for the supernatant proteins at 4°C. After three 15 min washes with PBST, membranes were incubated with HRP-linked anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology®, 1:6000 dilution) for 1 h at room temperature and washed three times with PBS (NOGUEIRA *et al.*, 2006; PELOSO *et al.*, 2011). Bands were revealed using the Super Signal® Detection Kit (Pierce). Data were analyzed by the Scion Imaging® Program normalized by loading control (α -GAPDH).

2.5 Statistical analysis

Data represent averages $\pm$ standard deviations of at least two independent experiments performed in duplicate. Comparisons were conducted using Student's *t*-test in Origin 6.0 software (*Student's t*-test), and data in $p < 0.05$ were considered significantly different.

3. Results

During *T. cruzi*'s life cycle the enzyme profile varies among the different forms in order to allow the parasite to survive in an environment with different challenges (DÍAZ *et al.*, 2011). The proteins of the antioxidant defense system, especially TcCPx and TcMPx, are among the ones that are upregulated during metacyclogenesis, allowing the parasite to deal with the oxidative stress generated by the macrophage (PIACENZA *et al.*, 2009b). The cells that are able to get by this oxidative challenge can subsequently escape from the vacuole and establish the infection. Once, most of the H₂O₂-challenging studies and subsequently evaluation of trypanothione peroxidases expression have been done with the

epimastigote form, herein these levels in tissue-culture derived trypomastigote were investigated.

In Figure 1, a western blotting analysis of TcCPx expression in trypomastigotes submitted to H₂O₂-challenge and in the supernatant of the incubation medium was performed. At 10μM H₂O₂ a slight, but significant increase in its expression in relation to control (5.4%) was observed followed by a steep reduction (61.7%) at 30μM H₂O₂ (Figure 1D, white bars). At 40μM the expression levels remained as under 30μM treatment, but at 50μM an increase of approximately 13.2% was observed in relation to the levels detected in 40μM treatment (Figure 1D, white bars). Regarding the trypomastigotes proteins released to the incubation medium under H₂O₂-treatment there was also a decrease in its expression, which increases in a direct correlation to the H₂O₂ concentration till 50μM, where a decrease of 20% related to the results obtained with the 40μM H₂O₂-treatment is observed (Figure 1D, black bars).

Regarding TcMPx expression, an increase of 52.8% was observed with 10μM H₂O₂-treatment in relation to the control, decreasing gradually its levels to the order of 98.5% with 50μM treatment in relation to 10μM H₂O₂-treatment. Interestingly, no TcMPx could be detected in the supernatant of the H₂O₂ incubation medium (data not shown).

Additionally, TcCPx and TcMPx expression in the epimastigote and trypomastigote forms were evaluated. In Figure 3 is shown that the trypomastigote form has higher levels of both enzymes (111.5% e 25.3% for TcCPx and TcMPx, respectively) than the non-infective form.

4. Discussion

T. cruzi resistance to the oxidative stress is associated to their repertoire of antioxidant enzymes. Before its differentiation in the metacyclic form, the epimastigotes are submitted to an oxidative environment due to the presence of heme in the vector intestinal tract (PAES *et al.*, 2011). This compound besides acting as a proliferation factor, at high levels has an important cytotoxic action through ROS generation (AFONSO *et al.*, 1996; KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005), that can occur during the degradation of hemoglobin as a consequence of the release of high amounts of heme (PAES *et al.*, 2011). In this sense, the antioxidant defense system for the epimastigote form is essential for the maintenance of an intracellular reducing milieu.

The differential pattern of protein expression in *T. cruzi* is noticeable during the metacyclogenesis process, although some proteins suffer no change in the different forms of the parasite. Paba *et al.* (2004) showed through proteomic analysis that the majority of the proteins have the same level of expression in the three forms of the parasite, suggesting that the features of each *T. cruzi* stage is the result of the differential expression of a reduced number of proteins (PABA *et al.*, 2004). In *Leishmania infantum*, it was observed differential expression of 60 proteins among the amastigote and promastigote forms (El FAKHRY *et al.*, 2002). Also, Díaz *et al.*, identified similarities among the proteins of *T. cruzi* present in the three forms, where a higher expression of the proteins involved in the antioxidant defense was observed (DÍAZ *et al.*, 2011). Trypanosomatids do not have catalase or selenium glutathione peroxidase, but have a series of pathways centered in trypanothione (KRAUTH-SIEGEL e COMINI, 2008) that allow the parasite to some extent to deal with the oxidative stress coming from exogenous or even endogenous sources.

Among these proteins part of the antioxidant defense system, TcCPx and TcMPx have been the subject of many studies because of their role in virulence (PIACENZA *et al.*, 2008), although having no effect in the invasion process (PINEYRO *et al.*, 2008).

The levels of TcCPx released in the supernatant of the H₂O₂-incubation medium increased concomitantly with the increase in the H₂O₂ concentration used in the treatment and with the decrease in the expression of TcCPx present in trypomastigotes. It is important to point out that TcCPx expression did not increase in relation to the levels observed under no treatment. Bioinformatics analysis of TcCPx sequence did not reveal any secretion sequence, so how this protein is released to the medium remains unclear.

TcMPx had a different pattern of expression in culture trypomastigotes submitted to H₂O₂-treatment where a significant increase followed by a decrease in its expression was observed. Most importantly, no TcMPx could be detected in the supernatant of the H₂O₂-incubation medium.

Comparing the tissue-culture derived trypomastigote with the epimastigote stage, it is clear that the former one and also the metacyclic forms (PIACENZA *et al.*, 2009b) have higher TcCPx and TcMPx levels. Bloodstream trypomastigotes (C3C clone) are also more resistant to H₂O₂-treatment than epimastigotes (TANAKA *et al.*, 1983), suggesting that in these cells the levels of peroxiredoxins must be also higher than the non-infective forms. In contrast with our results, Piñeyro *et al.* (2008) demonstrated that TcCPx and TcMPx levels were similar in all *T. cruzi* stages when the Dm28c strain was used. Two reasons can be pointed out to explain these differences: first, the high degree of both structural and functional heterogeneity among *T. cruzi* strains (DVORAK *et al.*, 1988; BRISSE *et al.*, 1998) that could modulate their pathogenicity, survival and adaptability (BRISSE *et al.*, 1998; ENGEL *et al.*, 1990) and second the different components of parasite and host cell

that take part in the invasion process and consequently play a role in signaling exchanges (ALVES e MORTARA, 2009). In this case, the variety of molecules involved increases when different *T. cruzi* strains are compared (ALVES e MORTARA, 2009).

Taken all together upon incubation with H_2O_2 , TcCPx does not increase its expression but it is released into the incubation medium concomitantly with a decrease in its intracellular concentration. On the contrary, TcMPx does have an increase in its expression but it is not released into the incubation medium. These results suggest that peroxiredoxins in tissue-culture derived trypomastigotes go through different regulation upon H_2O_2 -induced oxidative stress raising new questions regarding the different roles played by these proteins in protecting the parasite against this stress.

5. References

- AFONSO, S. G. *et al.* Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 28, n. 4, p. 415-20, Apr 1996.
- ALVES, M. J.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 76-88, Jul 2009.
- ANDREWS, N. W.; COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J Protozool**, v. 29, n. 2, p. 264-9, May 1982.
- BRISSE, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: How many relevant phylogenetic subdivisions are there? **Parasitol Today**, v. 14, n. 5, p. 178-9, May 1998.
- CASTELLANI, O. *et al.* Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J Protozool**, v. 14, n. 3, p. 447-51, Aug 1967.
- DÍAZ, M. L. *et al.* Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1673-82, Aug 2011.
- DUMONTEIL, E. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. **Infect Gentet Evol**, v. 9, p. 1075-82, Apr 2009.
- DVORAK, J. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: elemental composition heterogeneity of cloned stocks. **Mol Biochem Parasitol**, v. 31, n. 1, p. 19-26, Oct 1988.
- EL FAKHRY, Y. *et al.* A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v. 2, n. 8, p. 1007-17, Aug 2002.
- ENGEL, J. C. *et al.* Isolate-dependent differences in the oxidative metabolism of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 39, n. 1, p. 69-76, Feb 1990.
- FLOHÉ, L. *et al.* Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 966-84, Nov 1999.
- IRIGOIN, F. *et al.* Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radic Biol Med**, v. 45, p. 733-42, 2008.
- KIERSZENBAUM, F. *et al.* Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 112, n. 5, p. 1839-44, May 1974.
- KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1236-48, Nov 2008.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicol Lett**, v. 157, n. 3, p. 175-88, Jul 2005.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 5^a ed, Rio de Janeiro, 2006.

NOGUEIRA, F. B. *et al.* Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. **Acta Trop**, v. 100, n. 1-2, p. 119-32, Nov 2006.

PABA, J. *et al.* Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 1052-9, Apr 2004.

PAES, M. C. *et al.* The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol Res**, v. 2011, p. 174614, Feb 2011.

PELOSO, E. F. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. **J Bioenerg Biomembr**, v. 43, n. 4, p. 419-24, Aug 2011.

PIACENZA, L. *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J**, v. 410, n. 2, p. 359-68, Mar 2008.

PIACENZA, L. *et al.* Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 415-21, Aug 2009a.

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 13, p. 1455-64, Nov 2009b.

PIÑEYRO, M. D. *et al.* Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene**, v. 408, n. 1-2, p. 45-50, Jan 2008.

TANAKA, Y. *et al.* Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. **Infect Immun**, v. 41, n. 3, p. 1322-31, Sep 1983.

WILKINSON, S. R. *et al.* Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 11, p. 8220-5, Mar 2000.

WILKINSON, S. R. *et al.* TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. **Biochem J**, v. 364, n. Pt 3, p. 787-94, Jun 2002a.

WILKINSON, S. R. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J Biol Chem**, v. 277, n. 19, p. 17062-71, May 2002b.

WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. **Biol Chem**, v. 384, n. 4, p. 517-25, Apr 2003.

WILKINSON, S. R, *et al.* A mechanism for corss-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, p.197-283, May 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). **Geneva: World Health Organization, 2010. Disponível em:** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. Acesso em 25 de outubro 2011.

Figure Legends

Figure 1. TcCPx expression analysis in culture trypomastigotes and in the supernatant of the H₂O₂ - incubation medium. Trypomastigotes (2×10^7 cells) were incubated in the presence of 0-50 μ M H₂O₂ at 37°C for 2h. *T. cruzi* lysates and the supernatant concentration were prepared as described. (A) *Western blotting* (α -TcCPx) in parasite lysates; (B) *Western blotting* (α -GAPDH) in the supernatant of the H₂O₂-incubation medium. Lanes 1: 0 μ M (control), and 2: 10 μ M, 3: 20 μ M, 4: 30 μ M, 5: 40 μ M, 6: 50 μ M H₂O₂. (C) Western blotting analysis of α -TcCPx in the supernatant of the incubation medium for (A). (D) The percentage of the band intensities of (A) were normalized to the band in lane 1 that was set to 100%. The best representative of two independent experiments is shown. *Statistical analysis*: *t* test: $p > 0.05$ for the indicated groups.

Figura 2. Western blotting analysis of TcMPx expression in culture trypomastigotes. Trypomastigotes (2×10^7 cells) were incubated in the presence of 0-50 μ M H₂O₂ at 37°C for 2h. *T. cruzi* lysates and the supernatant concentration were prepared as described. (A) *Western blotting* (α -TcMPx) in parasite lysates; Lanes 1: 0 μ M (control), and 2: 10 μ M, 3: 20 μ M, 4: 30 μ M, 5: 40 μ M, 6: 50 μ M H₂O₂. (C) Western blotting analysis of α -GAPDH for (A). (D) The percentage of the band intensities of (A) were normalized to the band in lane 1 that was set to 100%. The best representative of two independent experiments is shown. *Statistical analysis*: *t* test: $p < 0.05$.

Figura 3. Epimastigotes have lower levels of TcCPx and TcMPx when compared to trypomastigotes derived from culture cells. *T. cruzi* lysates from epimastigotes and trypomastigotes subjected to no treatment were prepared as described. (A) *Western blotting* (α -TcCPx); (B) *Western blotting* (α -TcMPx); (C) Loading control with α -GAPDH; Lanes: 1: epimastigote e 2: trypomastigote. (D) The percentage of the band intensities of (A) were normalized to the band in lane 1 that was set to 100%. The best representative of two independent experiments is shown. *Statistical analysis: t test: $p < 0.05$.*

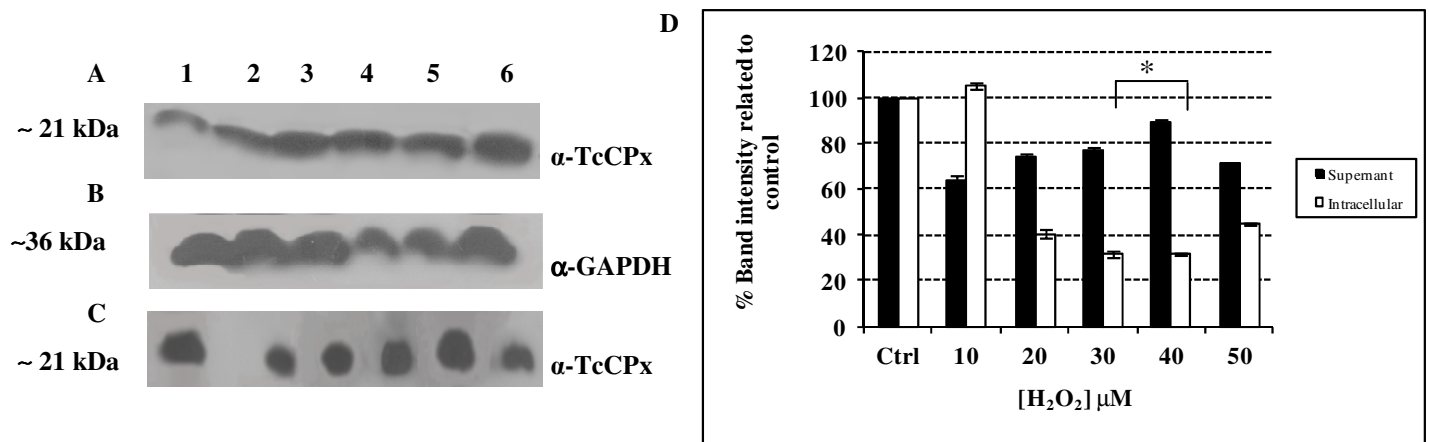


Figure 1 – Gadelha *et al*

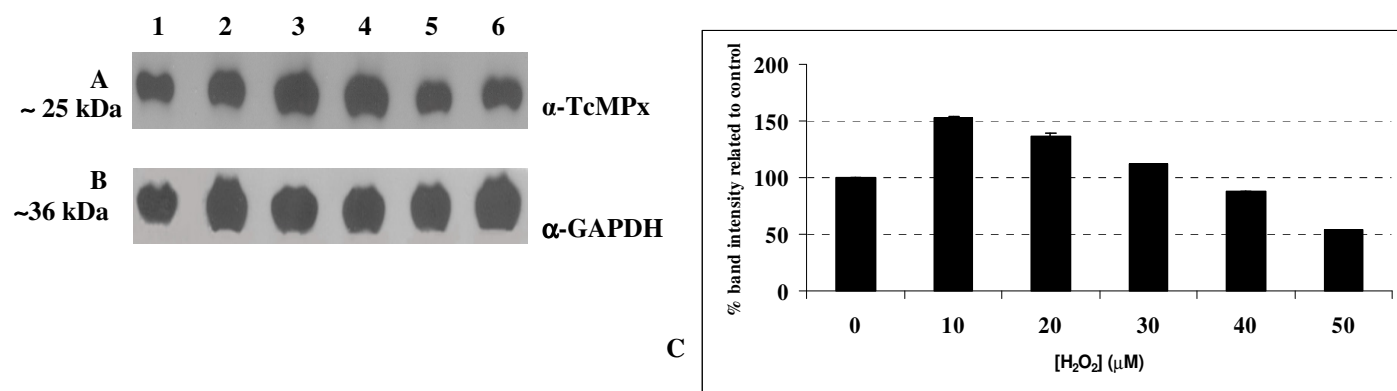


Figure 2 – Gadelha *et al*

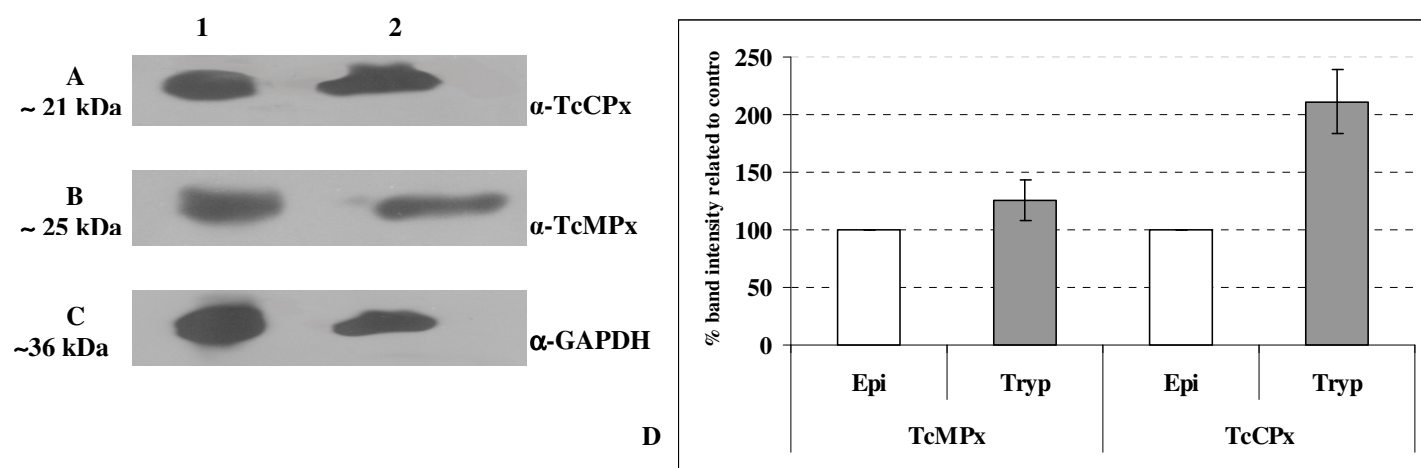


Figure 3 – Gadelha *et al*

6 – Discussão

O papel das peroxiredoxinas de *Trypanosoma cruzi* na bioenergética mitocondrial

A mitocôndria é o principal sítio de produção de ATP em células eucarióticas e é um importante sítio gerador de EROs. Além disso, um sistema de defesa antioxidante eficiente é necessário para prevenir os efeitos do estresse oxidativo. Em *T. cruzi*, demonstrou-se a participação deste sistema na proteção contra a morte celular programada conferida pela superexpressão da SODA, que foi induzida por soro humano fresco (PIACENZA *et al.*, 2007) e também pelo tratamento com nifurtimox ou tratamento com benzonidazol (PRATHALINGHAM *et al.*, 2007). Esses resultados dão suporte à relevância das vias de detoxificação de EROs na sobrevivência do parasita.

A contribuição da TcCPx e TcMPx na bioenergética mitocondrial, foi demonstrada através da utilização de transformantes estáveis que superexpressavam a TcMPx (MPx), a TcCPx (CPx) ou continham apenas o vetor pTEX (controle) (PELOSO *et al.*, 2011). Como esperado, as células MPx mostraram um aumento na expressão da TcMPx. Interessantemente, as células CPx também mostraram maiores níveis de TcMPx comparado com o pTEX e as células MPx tiveram um aumento na expressão da TcCPx (PELOSO *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem uma interação entre os sistemas de defesa antioxidante presentes no citosol e na mitocôndria dando suporte a hipótese 1 e 2 da Figura 9 da introdução.

A taxa de proliferação (GI) das células MPx (PELOSO *et al.*, 2011) foi significativamente diferente das células pTEX, mas não das CPx. Baixas concentrações de H₂O₂ estimulam a proliferação celular em células de *T. cruzi* (FINZI *et al.*, 2004), de mamíferos (WIESE *et al.*, 1995) e de fungos (DAVIES *et al.*, 1995). Assim, células com uma maior conteúdo de TcMPx e TcCPx mantém níveis de H₂O₂ menores do que nas células controle, o que justifica o aumento na proliferação, uma vez que a menor concentração de H₂O₂ permite este estímulo. Em relação à resistência ao estresse oxidativo que é gerado pelo H₂O₂, outros estudos tem registrado um aumento de 2 vezes (WILKINSON *et al.*, 2000a) e de 1,4 vezes (PIACENZA *et al.*, 2008) na resistência ao estresse oxidativo mediado pelo H₂O₂ em CPx e MPx, respectivamente. Sob nossas

condições experimentais, a resistência aos efeitos mediados pelo H_2O_2 foi aumentada nas células MPx em 1,4 vezes e para a CPx em 1,2 vezes (FINZI *et al.*, 2004).

Nas células de mamíferos, a maior parte da produção de EROs mitocondrial é derivada do vazamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, principalmente nos complexos I, II e III (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Interessantemente a liberação do H_2O_2 mitocondrial em epimastigotas não foi detectada nas células CPx e MPx em condições basais. Diferenças significativas foram observadas somente quando a cadeia respiratória mitocondrial foi inibida usando Antimicina A (AA) ou tenoiltrifluoroacetona (TTFA), os quais inibem os complexos III ou II, respectivamente. Devido à falta de um inibidor do complexo I de tripanosomatídeos (HERNANDEZ e TURRENS, 1998), não foi possível estabelecer a contribuição deste complexo para a liberação de EROs. Com a inibição da cadeia respiratória mitocondrial por estes inibidores, ficou evidente a proteção conferida pela TcMPx, uma vez que menores níveis de H_2O_2 do que os da célula CPx foram liberados. Sob nossas condições experimentais, a inibição pelo TTFA levou a um maior aumento na liberação de H_2O_2 comparado com a inibição com a AA. Esses resultados confirmam os achados prévios em *Leishmania donovani* (METHA e SHAHA, 2004), indicando o complexo II como o principal sítio gerador de H_2O_2 intramitocondrial nos tripanosomatídeos. O H_2O_2 é relativamente estável e permeável nas membranas celulares, além de poder ser transportado por aquaporinas presentes na membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Assim, o H_2O_2 se difunde da mitocôndria para o citosol e é removido pelas peroxidases citosólicas, tais como TcCPx, o que explica os menores níveis dessa EROs nas células CPx quando comparadas com as controle. Os maiores níveis de TcMPx que foram observados nas células CPx, podem também contribuir para os menores níveis de H_2O_2 liberados comparados com aqueles das células controle.

As vias antioxidantes em *T. cruzi* têm sido descritas até agora por usar a tripanotona, que é reduzida pela TR usando NADPH como doador de elétrons (WILKINSON *et al.*, 2003). Assim, a cascata de detoxificação de hidroperóxidos somente funciona apropriadamente se o NADPH estiver sendo fornecido. Interessantemente, as células MPx mostraram níveis maiores de produção de NADPH comparados com as células pTEX e similares às células CPx. Como descrito acima, o mecanismo do sistema

antioxidante mitocondrial não está bem compreendido. Como proposto na Figura 9 se uma interação entre este sistema de defesa antioxidante e o citosólico existir, uma das origens mitocondriais para esta coenzima pode ser a via das pentoses fosfato que está presente no citosol. Adicionalmente, o aumento do GI nas células que superexpressam as PXs pode ser uma consequência de um aumento na atividade da glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) nesses parasitas. Em *T. cruzi*, a cepa Tulahuen 2 tem um GI e a atividade da G6PD aumentada comparada com a da cepa Y (MIELNICZKI-PEREIRA *et al.*, 2007). Além disso, um aumento do GI foi registrado em células de mamíferos que superexpressam a G6PD (TIAN *et al.*, 1998).

As células MPx tiveram uma taxa de respiração maior e uma taxa de controle respiratório (RCR) menor do que as outras células. Essa taxa é usada para indicar a forte correlação entre a cadeia respiratória mitocondrial e a fosforilação oxidativa. O aumento nas taxas de consumo de oxigênio na presença de oligomicina (Estado 4) leva a respiração mitocondrial a um estado não fosforilante (VERCESI *et al.*, 1991) e reflete um leve desacoplamento da cadeia respiratória. Interessantemente, este desacoplamento parcial e menor RCR não alterou significativamente o $\Delta\Psi$ ou a produção de ATP nas MPx.

A ativação das vias de leve desacoplamento, tais como as proteínas desacopladoras (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998) ou os canais de K^+ sensíveis ao ATP (FACUNDO *et al.*, 2007), que são reguladores chave da geração de EROs mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009), diminuem a eficiência da fosforilação oxidativa e aumentam o transporte de elétrons (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Além disso, o desacoplamento parcial da cadeia respiratória nas células MPx pode ocorrer por um processo similar. Embora não exista evidência para a presença de um sistema dependente de tripanotona na mitocôndria de *T. cruzi*, o sistema de detoxificação mitocondrial pode estar ligado a outro sistema de redução, como proposto por Wilkinson *et al.* (2000a). Este sistema de redução poderia ser o citosólico, onde uma proteína ancorada na membrana mitocondrial poderia servir de ligação entre os dois sistemas. Assim, uma outra via para a reentrada de elétrons na matriz mitocondrial seria estabelecida, levando a um leve desacoplamento e uma menor RCR. As células MPx aumentariam suas taxas respiratórias para manter o $\Delta\Psi$ em níveis desejáveis para a produção de ATP.

Outra possibilidade é que em baixos níveis, todos os componentes da via dependente de tripanotona estejam presentes na mitocôndria. A isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (JO *et al.*, 2001) ou a NADH transhidrogenase, que é encontrada em células de mamíferos, podem ser a origem do NADPH mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). A NADH-transhidrogenase funciona como uma bomba de prótons usando a gradiente eletroquímico de H^+ gerado na respiração para deslocar a reação no sentido de formação de NADPH (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Contudo, a NADH-transhidrogenase não foi identificada em tripanosomatídeos.

Embora pesquisas posteriores devam ser conduzidas para testar as hipóteses acima, os resultados apresentados indicam pela primeira vez uma possível interconexão entre os sistemas de defesa antioxidante presentes na mitocôndria e no citosol em um tripanosomatídeo. Além disso, sugerem a presença ou indução de um transportador de H^+ não identificado na membrana mitocondrial do *T. cruzi* quando a TcMPx está expressa em níveis mais altos.

A expressão da triparedoxina peroxidase e superóxido dismutase, bem como a liberação de EROs estão relacionadas às fases de proliferação do *Trypanosoma cruzi*

De acordo com a literatura, quando comparada às células Y, as Tulahuen 2 têm maior atividade da G6PD ao longo da curva de proliferação, maior taxa de proliferação, maior expressão da TcCPx (MIELNICZKI-PEREIRA *et al.*, 2007) e taxas respiratórias (SILVA *et al.*, 2011). Em relação à parasitemia, ou seja, o número de tripomastigotas sangüíneos/100 campos no pico da parasitemia, ambas as cepas foram consideradas atenuadas, embora a Tulahuen 2 tenha o dobro de número de parasitas em relação à outra cepa (PIACENZA *et al.*, 2009a).

Além do conceito de que a produção mitocondrial de EROs é uma inevitável consequência do vazamento de elétrons, as variações na liberação de H_2O_2 mitocondrial sinalizam para o núcleo e citoplasma a condição fisiológica da mitocôndria naquele momento (HALIWELL, 2006). O H_2O_2 , bem como outros hidroperóxidos tem papel chave na regulação metabólica, um fenômeno também relevante em tripanosomatídeos (FLOHÉ, 2011).

Na cepa Y, a liberação de H_2O_2 nas fases *log* e estacionária tardia são similares e maior do que no início da fase estacionária de proliferação. Interessantemente, sob nossas condições experimentais nenhuma liberação de H_2O_2 pode ser detectada na Tulahuen 2, o que pode ser explicado pelas taxas de consumo de oxigênio nesta cepa, que são maiores do que na Y em todas as fases de proliferação (SILVA *et al.*, 2011). Maiores taxas no consumo de oxigênio significam menos vazamento de elétrons pela MRC, o que leva a menores níveis de EROs. Além disso, a não detecção de H_2O_2 na cepa Tulahuen 2 está relacionada aos níveis das enzimas antioxidantes envolvidas na detoxificação desta EROs uma vez que essa cepa tem maiores níveis das PXs em relação à Y, exceto na fase *log*.

A expressão das PXs segue padrões diferentes, onde a TcCPx aumenta com a progressão da proliferação e a TcMPx diminui. Esses resultados estão correlacionados à liberação de H_2O_2 na cepa Y, onde um menor grau de liberação de H_2O_2 foi detectado no início da fase estacionária. Os maiores níveis de expressão da TcMPx e TcCPx na Tulahuen 2 e as maiores taxas de consumo de oxigênio (SILVA *et al.*, 2011) desta cepa podem também contribuir para a não detecção da liberação de H_2O_2 como mencionado acima.

Acredita-se que as PXs de mamíferos estejam envolvidas em processos de sinalização intracelular mediados pelo H_2O_2 , como diferenciação celular, proliferação e apoptose e não somente como antioxidantes em geral (HOFMANN *et al.*, 2002; CASTRO e TOMAS, 2008). Em tripanosomatídeos, baseado em estudo *in vitro*, um novo papel fisiológico em potencial para a triparedoxina/triparedoxina peroxidases foi sugerido. Este sistema funcionaria como um *interruptor redox molecular* para a replicação do DNA. Neste sentido, o H_2O_2 reage com a triparedoxina, que por sua vez reage com a UMSBP, que torna-se oxidada e então bloqueia a replicação. Adicionalmente, a liberação da inibição da replicação é alcançada pela redução da triparedoxina (SELA *et al.*, 2008; SHLOMAI, 2010). Se isto for confirmado *in vivo*, pode-se sugerir que sob condições de estresse oxidativo, onde os níveis de H_2O_2 estão maiores, as peroxiredoxinas prejudicariam a replicação do DNA evitando assim o seu comprometimento. Também, a concentração de T(SH)₂ em células em proliferação é significativamente maior do que nas células com proliferação menor (KRAUTH-SIEGEL e COMINI, 2008) e a interação entre tripanotona e triparedoxina é considerada o “gargalo” do sistema antioxidante dos tripanosomatídeos (WILKINSON *et al.*, 2002a). Levando isto em consideração, pode-se especular que a

triparedoxina no estado reduzido favoreceria a replicação do DNA. Assim, na Tulahuen 2 os maiores níveis de produção de NADPH durante a fase *log* (MIELNICZKI-PEREIRA *et al.*, 2007) poderiam manter também a triparedoxina no estado reduzido, favorecendo assim a replicação do DNA. Isto justifica o fato de que as células Tulahuen 2 têm maiores taxas de proliferação do que a Y (MIELNICZKI-PEREIRA *et al.*, 2007).

Nas cepas estudadas foi observada uma similaridade em relação à produção de O_2^- , de modo que esta foi maior na fase *log* e diminui nas fases de proliferação concomitantes. É importante ressaltar que na fase estacionária tardia, as células de ambas as cepas tiveram maiores taxas respiratórias (SILVA *et al.*, 2011) o que contribui para uma menor perda de elétrons e conseqüentemente menor geração de O_2^- . Além das taxas de consumo de oxigênio, outro fator envolvido com a produção de O_2^- é o nível de expressão das SODs.

Com relação à expressão, as SODB e A são diferencialmente expressas ao longo da curva de proliferação das cepas Tulahuen 2 e Y, onde a SODB apresentou o mesmo padrão descrito para a TcMPx e o perfil de expressão da SODA foi específico para cada cepa. Embora as células Y tenham maiores níveis de expressão da SODA do que a Tulahuen 2 na fase *log*, níveis similares de produção de O_2^- foram detectados entre ambas as células. Isso pode ser explicado, já que na fase *log*, as células Y têm menores taxas respiratórias quando comparadas a Tulahuen 2. Além disso, a cepa Y tem um aumento na taxa de consumo de oxigênio no início da fase estacionária em direção à fase estacionária tardia (SILVA *et al.*, 2011) o que seria responsável pela redução na geração de O_2^- .

Entre todas as enzimas estudadas, somente a SODA mostrou uma marcada diferença em sua expressão. Em células de mamíferos, a MnSOD mitocondrial é considerada uma das principais enzimas antioxidantes (WONG, 1995). A expressão basal desta enzima é normalmente baixa, mas é induzida por irradiação, citocinas, interleucinas e interferon, além de variações no estado redox celular (SOINI *et al.*, 2001). Em *T. cruzi*, a indução da TcSODA em epimastigotas levou ao aumento de resistência à morte celular programada induzida por soro humano fresco, proteção da fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilserina (PIACENZA *et al.*, 2007).

Levando tudo isso em consideração, a diferença marcante de expressão da SODA nas cepas estudadas pode contribuir para os aspectos bioquímicos e moleculares peculiares a cada cepa.

Avaliação da expressão das triparedoxinas peroxidases em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* derivados de meio de cultura tratados com H₂O₂

Como descrito acima, a resistência do *T. cruzi* ao estresse oxidativo está associada ao seu repertório de enzimas antioxidantes. Antes de sua diferenciação na forma metacíclica, os epimastigotas são submetidos a um ambiente oxidativo devido à presença do grupo heme presente nas hemoglobinas do sangue ingerido no trato intestinal do vetor (PAES *et al.*, 2011). Este composto além de atuar como um fator de proliferação, em níveis elevados, tem uma importante ação citotóxica pela geração de EROs (AFONSO *et al.*, 1996; KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005), que ocorre devido à presença de ferro em sua estrutura e que pode participar da reação de Fenton (RYTER e TYRRELL, 2000). Neste sentido, o sistema de defesa antioxidante para a forma epimastigota é essencial para a manutenção de um meio intracelular reduzido.

O padrão diferencial de expressão protéica no *T. cruzi* é notado durante o processo de metaciclogênese, embora algumas proteínas não sofram mudanças nas diferentes formas do parasita. Paba *et al.* (2004) demonstraram através de análises proteômicas que a maioria das proteínas tem o mesmo nível de expressão nas três formas do parasita, sugerindo que as características de cada estágio do *T. cruzi* seja o resultado da expressão diferencial de um número reduzido de proteínas (PABA *et al.*, 2004). Em *L. infantum*, observou-se uma expressão diferencial de 60 proteínas entre as formas amastigota e promastigota (EL FAKHRY *et al.*, 2002). Também, Díaz *et al.* (2011) identificaram similaridades entre as proteínas presentes nas três formas de *T. cruzi*, onde uma maior expressão das enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes foi observada (DÍAZ *et al.*, 2011).

Os tripanosomatídeos, não possuem catalase ou glutathione peroxidases dependente de selênio, mas possuem uma série de vias centradas na tripanotiona (KRAUTH-SIEGEL e COMINI, 2008) que permite ao parasita de certo modo a lidar com o estresse oxidativo de origem endógena e exógena. Dentre essas proteínas do sistema de defesa antioxidante, a TcCPx e TcMPx têm sido alvo de estudos devido ao seu papel na virulência (PIACENZA *et al.*, 2008), embora não tenham efeito no processo de invasão (PIÑEYRO *et al.*, 2008).

Os níveis de TcCPx liberados no sobrenadante quando os tripomastigotas de cultura foram incubados com H₂O₂ aumentaram concomitantemente com o aumento na

concentração de H_2O_2 usado no tratamento e com a redução na expressão da TcCPx presente intracelularmente. É importante ressaltar que a expressão da TcCPx não aumentou em relação aos níveis observados na condição sem tratamento. Análises de bioinformática da sequência da TcCPx não revelaram nenhuma sequência de secreção, então como esta proteína é liberada para o meio extracelular não está claro.

Interessantemente, a TcMPx teve um padrão de expressão diferente, onde um aumento significativo foi seguido por uma redução gradativa em relação ao aumento da concentração de H_2O_2 . Outro fator de grande relevância foi que a TcMPx não pôde ser detectada no sobrenadante do meio de incubação com H_2O_2 .

Comparando os tripomastigotas de meio de cultura com os epimastigotas, os primeiros e também as formas metacíclicas (PIACENZA *et al.*, 2009a) têm maiores níveis de expressão da TcCPx e TcMPx. Os tripomastigotas sangüíneos são também mais resistentes ao tratamento com H_2O_2 do que os epimastigotas (TANAKA *et al.*, 1983), sugerindo que nestas células os níveis das PXs devem ser também maiores nas formas não infectivas. Em contraste com os nossos resultados, Piñeyro *et al.* (2008) demonstraram que na cepa DM28c os níveis de TcCPx e TcMPx foram similares em todos os estágios do *T. cruzi*. Duas razões podem ser pontuadas para explicar essas diferenças: primeiro, o alto grau de heterogeneidade funcional e estrutural entre as cepas de *T. cruzi* (DVORAK *et al.*, 1988; BRISSE *et al.*, 1998) que podem modular sua patogenicidade, sobrevivência e adaptabilidade (BRISSE *et al.*, 1998; ENGLE *et al.*, 1990) e segundo os diferentes componentes (proteínas/glicoproteínas e outros glicoconjugados) do parasita e da célula do hospedeiro que participam do processo de invasão e conseqüentemente desempenham um papel nas trocas de sinalização (ALVES e MORTARA, 2009). Neste caso, a variedade de moléculas envolvidas aumenta quando diferentes cepas de *T. cruzi* são comparadas (ALVES e MORTARA, 2009).

Levando em consideração todos os aspectos relacionados com a incubação dos tripomastigotas de cultura com H_2O_2 , a TcCPx não aumentou sua expressão, mas é liberada no meio de incubação concomitantemente com uma redução em sua concentração intracelular. Por outro lado, a TcMPx teve um aumento em sua expressão, mas não foi liberada no meio de incubação. Esses resultados indicam que as PXs de tripomastigotas de cultura passam por diferentes regulações sob estresse oxidativo induzido por H_2O_2 ,

sugerindo que estas proteínas desempenham diferentes papéis na proteção do parasita contra este estresse.

7 – Conclusão

- A superexpressão das PXs não influencia na bioenergética mitocondrial do *T. cruzi* apesar de ter sido detectado um leve desacoplamento nas células que superexpressam a TcMPx. Uma possível interação entre os sistemas antioxidantes citosólico e mitocondrial foi observada;
- Verificou-se um padrão diferencial de expressão das TcCPx, TcMPx, SODA e SODB nas cepas Tulahuen 2 e Y ao longo da curva de proliferação.
- O nível de expressão das PXs em tripomastigotas de cultura é maior do que nos epimastigotas e pode ser modulado sob condições de estresse oxidativo. Detectou-se a TcCPx no sobrenadante do meio de incubação dos tripomastigotas com o H₂O₂, mas não a TcMPx.

8 – Perspectivas

A relevância do sistema de defesa antioxidante para o *T. cruzi* é extremamente alta, visto que o mesmo capacita o parasita a lidar com o estresse oxidativo nos diferentes ambientes em que vive. Os resultados obtidos com essa tese reforçam a relevância deste sistema na resistência às espécies reativas de oxigênio nas diferentes formas do parasita. Assim, a caracterização funcional, a exata localização intracelular de componentes do sistema antioxidante dependente da TcMPx, além de seu interatoma devem ser mais estudados, já que este sistema devido à sua relevância na viabilidade e virulência pode ser um alvo terapêutico em potencial.

9 – Referências Bibliográficas

AFONSO, S. G. *et al.* Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 28, n. 4, p. 415-20, Apr 1996.

ALVES, M. J.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 76-88, Jul 2009.

AMELOTTI, I. *et al.* Experimental evaluation of insecticidal paints against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), under natural climatic conditions. **Parasit Vectors**, v. 2, n. 1, p. 30, Sep 2009.

ATWOOD, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-6, Jul 2005.

BOVERIS, A. *et al.* Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v. 188, n. 3, p.643-8, Jun 1980.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAUDE. **Portal da Saúde. Doença de Chagas**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>. Acesso em 25 de outubro 2011.

BRISSE, S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: How many relevant phylogenetic subdivisions are there? **Parasitol Today**, v. 14, n. 5, p. 178-9, May 1998.

CADENAS, E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. **Mol Aspects Med**, v. 25, n. 1-2, p. 17-26, Apr 2004.

CASTRO, H. *et al.* Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 11, p. 1552-62, Dec 2002.

CASTRO, H. *et al.* Two linked genes of *Leishmania infantum* encode tryparedoxins localised to cytosol and mitochondrion. **Mol Biochem Parasitol**, v. 136, n. 2, p. 137-47, Aug 2004.

CASTRO, H.; TOMÁS, A. M. Peroxidases of trypanosomatids. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 9, p. 1593-606, Sep 2008.

CASTRO, H. *et al.* *Leishmania infantum*: provision of reducing equivalents to the mitochondrial tryparedoxin/tryparedoxin peroxidase system. **Exp Parasitol**, v. 120, n. 4, p. 421-3, Dec 2008.

CASTRO, H. *et al.* Mitochondrial redox metabolism in trypanosomatids is independent of tryparedoxin activity. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12607, May 2010.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease Chemoterapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, Oct 2002.

DAVIES, J. M. *et al.* Transient adaptation to oxidative stress in yeast. **Arch Biochem Biophys**, v. 317, n. 1, p. 1-6, Feb 1995.

DÍAZ, M. L. *et al.* Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1673-82, Aug 2011.

DUFERNEZ, F. *et al.* The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 2, p. 210-25, Jan 2006.

DVORAK, J. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: elemental composition heterogeneity of cloned stocks. **Mol Biochem Parasitol**, v. 31, n. 1, p. 19-26, Oct 1988.

EL FAKHRY, Y. *et al.* A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v. 2, n. 8, p. 1007-17, Aug 2002.

ENGEL, J. C. *et al.* A. Isolate-dependent differences in the oxidative metabolism of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 39, n. 1, p. 69-76, Feb 1990.

FACUNDO, H. T. *et al.* Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 7, p. 1039-48, Apr 2007.

FAIRLAMB, A. H. *et al.* Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1485-7, Mar 1985.

FERREIRA, I. L. M.; TABOSA E SILVA, T. P. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Rev da Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 5, p. 507-9, Out 2006.

FIESTAS, L. *et al.* Unravelling trypanothione biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. In: SFRBM, VII Meeting of the SFRBM South American Group, 2011. São Pedro. p.91.

FINZI, J. K. *et al.* *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133, n. 1, p. 37-43, Jan 2004.

FIOCRUZ. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Doença de Chagas**. 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas>. Acesso em: 25/10/2011.

FLOHÉ, L. *et al.* Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 966-84, Nov 1999.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnol Adv**, May 2011.

FLORES-LÓPEZ, A. C.; MACHADO, C. A. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p.e1272, Aug 2011.

GIORGIO, M. *et al.* Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 722-8, Sep 2007.

GONZÁLEZ-PINO, M. J. *et al.* Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **DNA Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 449-55, Jun 1999.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-22, Jun 2006.

HERNANDEZ, F. R.; TURRENS, J. F. Rotenone at high concentrations inhibits NADH-fumarate reductase and the mitochondrial respiratory chain of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 93, n. 1, p. 135-7, May 1998.

HOFMANN, B. *et al.* Peroxiredoxins. **Biol Chem**, v. 383, n. 3-4, p. 347-64, Apr 2002.

ISMAIL, S. O. *et al.* Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 86, n. 2, p. 187-97, Jun 1997.

JO, S. H. *et al.* Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺- dependent isocitrate dehydrogenase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 16168-76, May 2001.

KIERSZENBAUM, F. *et al.* Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 112, n. 5, p. 1839-44, May 1974.

KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Lett**, v. 425, n. 2, p. 213-6, Mar 1998.

KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 4, p. 333-43, Aug 2009.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1236-48, Nov 2008.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicol Lett**, v. 157, n. 3, p. 175-88, Jul 2005.

LOPEZ, J. A. *et al.* Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 5, p. 767-72, Mar 2000.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **J Biol Chem**, v. 279, n. 12, p. 11798-813, Mar 2004.

MIELNICZKI-PEREIRA, A. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. **Acta Trop**, v. 101, n. 1, p. 54-60, Jan 2007.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 5^a ed, Rio de Janeiro, 2006.

NOGOCEKE, E. *et al.* A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. **Biol Chem**, v. 378, n. 8, p. 827-36, Aug 1997.

NOGUEIRA, F. B. *et al.* Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. **Acta Trop**, v. 100, n. 1-2, p. 119-32, Nov 2006.

NOGUEIRA, F. B. *et al.* Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitol Res**, v. 104, n. 4, p. 835-44, Mar 2009.

PABA, J. *et al.* Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 1052-9, Apr 2004.

PAES, M. C. *et al.* The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol Res**, v. 2011, p. 174614, Feb 2011.

PELOSO, E. F. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. **J Bioenerg Biomembr**, v. 43, n. 4, p. 419-24, Aug 2011.

PEREIRA, K. S. *et al.* Chagas' disease as a foodborne illness, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. Acesso em 25 de outubro 2011.

PIACENZA, L. *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochem J**, v. 403, n. 2, p. 323-34, Apr 2007.

PIACENZA, L. *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochem J**, v. 410, n. 2, p. 359-68, Mar 2008.

PIACENZA, L. *et al.* Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 415-21, Aug 2009a.

PIACENZA, L. *et al.* Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 13, p. 1455-64, Nov 2009b.

PIÑEYRO, M. D. *et al.* Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene**, v. 408, n. 1-2, p. 45-50, Jan 2008.

PIÑEYRO, M. D. *et al.* Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Arch Biochem Biophys**, v. 507, n. 2, p. 287-95, Mar 2011.

PRATHALINGHAM, S. R. *et al.* Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodB1* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 2, p. 755-8, Feb 2007.

RHEE, S. G. *et al.* Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 5-6, p. 619-26, 2005 Jun 2005.

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Hemeoxygenase has both pro-and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med**, v. 15, n. 28, p. 289-309, Jan 2000.

SCHOFIELD, C. J. *Trypanosoma cruzi* the vector-parasite paradox. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 535-544, Sep 2000.

SELA, D. *et al.* Enzymatic mechanism controls redox-mediated protein-DNA interactions at the replication origin of kinetoplast DNA minicircles. **J Biol Chem**, v. 283, n. 46, p. 32034-44, Nov 2008.

SHLOMAI, J. Redox control of protein-DNA interactions: from molecular mechanisms to significance in signal transduction, gene expression, and DNA replication. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 9, p. 1429-76, Nov 2010.

SILVA, T. M. *et al.* O₂ consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. **J Bioenerg Biomembr**, v. 43, n. 4, p. 409-17, Aug 2011.

SOINI, Y. *et al.* MnSOD expression is less frequent in tumour cells of invasive breast carcinomas than in in situ carcinomas or non-neoplastic breast epithelial cells. **J Pathol**, v. 195, n. 2, p. 156-62, Sep 2001.

TANAKA, Y. *et al.* Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. **Infect Immun**, v. 41, n. 3, p. 1322-31, Sep 1983.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 32-44, May 2009.

TIAN, W. N. *et al.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. **J Biol Chem**, v. 273, n. 17, p. 10609-17, Apr 1998.

VERCESI, A. E. *et al.* Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* *in situ*. **J Biol Chem**, v. 266, n. 22, p. 14431-4, Aug 1991.

VERCESI, A. E. *et al.* Mitochondrial Ca^{2+} transport, permeability transition and oxidative stress in cell death: implications in cardiotoxicity, neurodegeneration and dyslipidemias. **Front Biosci**, v. 11, p. 2554-64, Aug 2006.

WIESE, A. G. *et al.* Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, n. 1, p. 231-40, Apr 1995.

WILKINSON, S. R. *et al.* Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 275, n. 11, p. 8220-5, Mar 2000a.

WILKINSON, S. R. *et al.* Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. **Biochem J**, v. 352 Pt 3, p. 755-61, Dec 2000b.

WILKINSON, S. R. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. **J Biol Chem**, v. 277, n. 19, p. 17062-71, May 2002a.

WILKINSON, S. R. *et al.* TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. **Biochem J**, v. 364, n. Pt 3, p. 787-94, Jun 2002b.

WILKINSON, S. R. *et al.* RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 31640-6, Aug 2003.

WONG, G. H. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. **Biochim Biophys Acta**, v. 1271, n. 1, p. 205-9, May 1995.

WOOD, Z. A. *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 1, p. 32-40, Jan 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Geneva: World Health Organization, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. Acesso em 23 de março 2011.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Sistema antioxidante de *Trypanosoma cruzi*: expressão protéica nas diferentes formas, ao longo da curva de proliferação e o seu envolvimento na bioenergética mitocondrial":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(XX) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. 2008/II-01, Instituição: UNICAMP

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. _____, Instituição: _____

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Eduardo de Figueiredo Peloso
Aluno: (Eduardo de Figueiredo Peloso)

Fernanda Ramos Gadella
Orientador: (Fernanda Ramos Gadella)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Marcelo Lancellotti
Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura