



RENATA VILELA RODRIGUES

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA
TRIPAREDOXINA PEROXIDASE EM *TRYPANOSOMA*
CRUZI

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

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Renata Vilela Rodrigues
e aprovada para () entrega e entrega

10/02/2001
Fernanda Ramos Gadelha

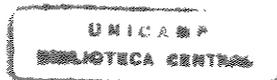
ORIENTADORA: PROFa. DRa. FERNANDA RAMOS GADELHA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS EDUARDO SOARES NETTO

80090100

CAMPINAS - 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	R618c
V.	Ex.
TOMBO BC/	44179
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	26/04/01
N.º CPD	

CM-00155026-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R618c

Rodrigues, Renata Vilela

Caracterização da atividade enzimática da triparedoxina peroxidase em *Trypanosoma cruzi*/Renata Vilela Rodrigues. – Campinas, [s.n], 2000.
67f: il.

Orientadora: Fernanda Ramos Gadelha

Co-Orientador: Luis Eduardo Soares Netto

Dissertação(mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Peroxidase. 3. Bioquímica. I. Gadelha, Fernanda Ramos. II. Netto, Luis Eduardo Soares. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 12 de Janeiro de 2001

Banca Examinadora:

Titulares:

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha
(IB - UNICAMP)



Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira
(IB - UNICAMP)



Profa. Dra. Maria de Fátima Nepomuceno
(Faculdade de Eng. Química - UNIMEP)



Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo
(IB - UNICAMP)



"Se nós fossemos náufragos no meio do oceano, tendo apenas um pedaço de madeira no qual nos apoiar e nos salvar, nela deveria estar escrita a palavra SONHO. Porque se um ser humano perder tudo mas ainda tiver sonhos, ele irá vencer novamente."

Kevin Costner

Dedico esta dissertação
às pessoas mais importantes em minha vida

Ricardo, Osvaldo e Maria Isoldina

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida para trabalhar em prol de um futuro sempre melhor;

À Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha que não só se fez orientadora, mas uma amiga e cúmplice dos momentos que somente nós sabemos quão bons ou difíceis foram;

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto pela amizade e orientações;

À Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves pela colaboração com nosso trabalho;

Ao Prof. Dr. Jorge A. López pela grande ajuda com nossas discussões;

À Denise, Satie e Carmem pelas nossas discussões e importantes contribuições a este trabalho

Ao Luis Henrique não só pelo apoio técnico, mas pela grande amizade e bondade encontradas em todos os momentos por que passamos... você é único;

À todas as meninas do laboratório de Bioenergética e Oxidações Biológicas pelas contribuições, bons momentos e amizade;

Às secretárias Marina, Andréia e Mírian, pela amizade e ajuda com a burocracia;

Aos meus pais Osvaldo e Isoldina... toda a grande dedicação que sempre tiveram resultou em minha chegada até aqui... parabéns por realmente serem PAIS;

Ao Ricardo... só nós sabemos por quantas alegrias e crises passamos desde a faculdade... esta dissertação também é sua... parabéns;

À agência CAPES e à FAPESP, por terem financiado este trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ABREVIACÕES	ix
INTRODUÇÃO	01
1. Doença de Chagas	02
2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
3. Cálcio	08
4. Detoxificação do oxigênio	09
5. “Thiol-specific antioxidant” (TSA)	14
6. Triparedoxina	18
7. Triparedoxina peroxidase	19
8. Localização dos compostos do sistema de peroxidases	20
OBJETIVOS	22
MATERIAIS E MÉTODOS	24
1. Cultura de células	25
2. Preparo do extrato protéico total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3. Preparo do extrato protéico total de <i>Trypanosoma cruzi</i> para Western blotting	26
4. Determinação da atividade antioxidante da triparedoxina peroxidase	27
5. Obtenção do “Shedding” de <i>Trypanosoma cruzi</i> epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y	27
6. Western blotting	28
7. Análises estatísticas	29

RESULTADOS	30
1. Identificação da triparedoxina peroxidase em extrato protéico total de <i>Trypanosoma cruzi</i> epimastigotas	31
2. Determinação da atividade da glutamina sintetase de acordo com o tempo de incubação com o sistema oxidante na presença do extrato protéico total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3. Determinação da proteção conferida à glutamina sintetase contra o sistema oxidativo por diferentes concentrações de extrato protéico total de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4. Efeito do pré- tratamento dos extratos protéicos totais com NEM	35
5. Quantificação da triparedoxina peroxidase presente em extratos protéicos totais de <i>Trypanosoma cruzi</i> epimastigotas com diferentes dias de crescimento	37
6. Identificação e quantificação da triparedoxina em extratos protéicos totais de <i>Trypanosoma cruzi</i> epimastigotas das cepas Y e Tulahuen 2 com diferentes dias de crescimento	38
7. Presença da triparedoxina peroxidase em “shedding” de <i>Trypanosoma cruzi</i> epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y com 5 dias de crescimento.....	39
DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO I	56

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar a atividade enzimática da triparedoxina peroxidase (TXNp) em duas cepas de *T. cruzi* que apresentam diferentes resistências ao estresse oxidativo.

A identificação da TXNp foi feita em extratos celulares totais da forma epimastigota de *T. cruzi* das cepas Y e Tulahuen 2. De um modo geral, a cepa Tulahuen 2 tem uma concentração maior desta enzima do que a Y. Variações na concentração da TXNp dentro de uma mesma cepa com origens geográficas diferentes também foi observada.

A TXNp obtida em extratos celulares totais de *T. cruzi* epimastigotas possui função antioxidante, protegendo a glutamina sintetase (GS) contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo sistema oxidante DTT/Fe³⁺/O₂. Parece não estar envolvida com a proliferação celular, uma vez que uma correlação não pôde ser estabelecida através da análise por Western blotting entre os diferentes dias de crescimento e a quantidade desta proteína.

A triparedoxina (TXN) também foi encontrada nos mesmos extratos e variações em sua concentração foram observadas quando as cepas e seus diferentes dias de crescimento foram comparados. Neste caso também as células Tulahuen 2 apresentaram uma maior concentração da TXN. Uma maior resistência às EROs geradas pelo sistema DTT/Fe³⁺/O₂ pode ser explicada pela maior concentração de TXN e TXNp encontradas. Isto levaria a um metabolismo de hidroperóxidos mais efetivo, quando comparado à cepa Y.

Os “sheddings” de *T. cruzi* de ambas as formas (epimastigota e tripomastigota) mostraram a liberação de TXNp para o meio extracelular.

ABSTRACT

The objective of this work was to characterize and compare the trypanothione peroxidase (TXNp) enzymatic activity in two strains of *T. cruzi* that have different resistances to oxidative stress.

TXNp identification was made in total cellular extracts from epimastigote of Y and Tulahuen 2 strain. In a broad sense, Tulahuen 2 strain has a higher concentration of this enzyme when compared to the Y strain. Differences in TXNp concentration into a same strain with different geographic origins were also observed.

TXNp present in total cellular extracts from *T. cruzi* epimastigote has an antioxidant function, protecting glutamine synthetase (GS) against reactive oxygen species (ROS) produced by the DTT/Fe³⁺/O₂ oxidant system. It appears not to be involved with cellular proliferation, since a correlation could not be established using Western Blot analysis, between the different growth days and the amount of this protein.

Trypanothione (TXN) was also found in the same extracts and variation in its concentration were observed when strains and different growth days were compared. Also in this case, Tulahuen 2 cells had a higher concentration of TXN. The higher resistance observed in the Tulahuen 2 strain against ROS generated by DTT/Fe³⁺/O₂ system can be explained by the higher concentration of TXN and TXNp found. This would lead to a hydroperoxide metabolism system more effective, when compared to the Y strain.

T. cruzi sheddings of both forms (epimastigote and trypomastigote) showed liberation of TXNp to the extracellular environment.

ABREVIACOES

ADP: Adenosina difosfato

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato

Ca²⁺: Cálcio

Cf₁₆: Triparedoxina de *Crithidia fasciculata*

Cf₂₁: Triparedoxina peroxidase de *Crithidia fasciculata*

DMEM: "Dulbeccos's modified Eagle medium"

DNA: cido desoxiribonucleico

DTT: Ditioneitol

EREs: Espécies reativas de enxofre

EROs: Espciens reativas de oxigênio

GS: Glutamina sintetase

GSH: Glutathiona

GST: Glutathiona S-transferase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

LIT: "Liver Infusion Tryptose"

Na₂EDTA: cido etilenodiaminotetracético (sal de sódio)

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT: "Nitroblue tetrazolium"

NEM: N-etilmaleimida

O₂⁻: nion superóxido

O₂²⁻: on peróxido

OH[·]: Radical hidroxil

Δg O₂: Oxignio singlet

PBS: Tampão salina fosfato

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoreto

Prxs: Peroxiredoxinas

RSSR⁻: Radical ânion dissulfeto

R_{SOO}[·]: Radical peroxisulfenil

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

RS: Radical tiil

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SODs: Superóxido dismutases

TSA: "Thiol-specific antioxidant"

TbrTSA: "Thiol-specific antioxidant" de *Trypanosoma brucei*

TbrTrx: Tioredoxina de *Trypanosoma brucei*

TPx: Tioredoxina peroxidase

Trx: Tioredoxina

TrxR: Tioredoxina redutase

T(SH)₂: Tripanotiona reduzida

TS₂: Tripanotiona oxidada

TR: Tripanotiona redutase

TXN: Triparedoxina

TXNp: Triparedoxina peroxidase

INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

No continente americano, mais precisamente na América do Sul (Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e Venezuela), a doença de Chagas causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), constitui um grave problema de saúde pública. Estima-se que um quarto da população da América Latina encontra-se em regiões onde há o risco de se contrair a doença (World Health Organization, 1995).

No Brasil, cerca de 4 a 6 milhões de pessoas encontram-se acometidas por esta doença de característica crônica, que pode ser incapacitante e debilitante. Na fase crônica, são comuns as arritmias e cardiomiopatias congestivas que resultam em cardiomegalia, megaesôfago e megacólon (Tanowitz *et al*, 1992). Esta patologia apresenta grande impacto sócio-econômico e cultural em nosso país, sendo a principal causa de aposentadoria precoce (Ribeiro & Rocha, 1998). Além da forma crônica, aproximadamente 60% das pessoas infectadas apresentam a forma indeterminada da doença, isto é, são assintomáticas e têm reações sorológicas positivas, eletrocardiograma de tórax e estudo contrastado de esôfago e cólon normais (Ianni & Mady, 1998).

A via mais importante de transmissão da doença é pelo contato com fezes de insetos triatomíneos infectados (*Triatoma infestans*), popularmente conhecidos como “barbeiros”. Em função das grandes correntes migratórias, a doença de Chagas classicamente considerada uma enfermidade rural, passou a atingir centros urbanos e regiões não endêmicas como os Estados Unidos, provavelmente como resultado de transfusões de sangue por imigrantes infectados. Além desses mecanismos, as transmissões congênitas, por transplantes de órgãos, por acidentes de laboratório e pelo leite materno também foram relatadas (Roberts & Janovy, 1996).

Juntamente com ministros da saúde e autoridades dos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), dos países andinos (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) e de alguns países da América Central (Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México, Nicarágua e Panamá), a OMS desenvolveu um programa tanto para interromper a transmissão transfusional nesses locais quanto para eliminar a transmissão vetorial até 2010 nos países do Cone Sul. Em 1997, o Uruguai atingiu esta meta (World Health Organization, 1998a).

No Brasil é estimado que, devido à migração, cerca de 300.000 indivíduos

infectados vivem na cidade de São Paulo e mais de 200.000 no Rio de Janeiro (Dias, 1992). O número de internações causadas pela doença vêm decrescendo. Segundo o Ministério da Saúde foram de 1.836 em 1990, 1.232 em 1994 e 966 em 1995. Entretanto, não há estimativa do total de casos existentes, por se tratar de uma doença que, no início, é assintomática (Azevedo, 1999).

A figura abaixo mostra os países onde ocorre alta incidência de contaminação por *T. cruzi* e a migração da doença dos países endêmicos para os desenvolvidos (Figura 1).

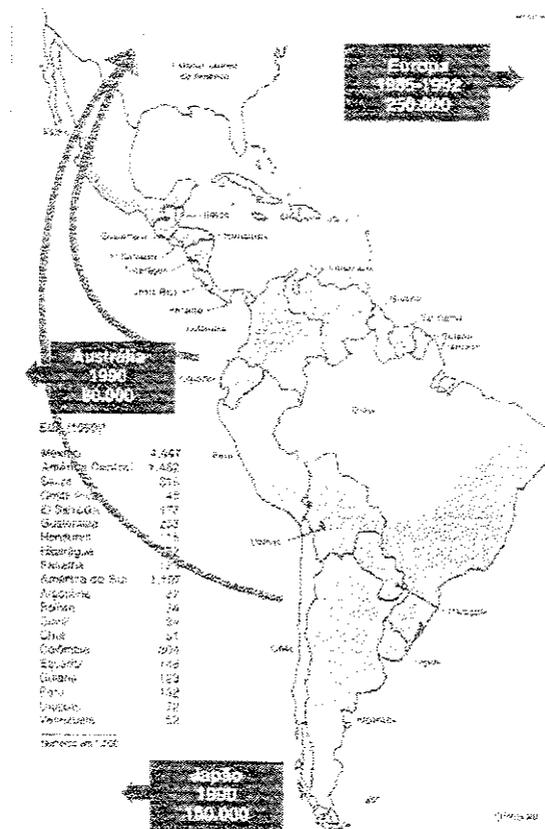


Figura 1: Distribuição geográfica da contaminação humana por *T. cruzi* e migração dos países endêmicos para os países desenvolvidos (Schmuñis, 2000).

Contra a transmissão transfusional desta patologia, a Organização Mundial de Saúde (OMS) indica a utilização do cristal violeta, ou violeta genciana, nos Bancos de Sangue do país de acordo com Nussenzweig *et al*, que em 1953 relatou a ação tripanossomicida deste composto e propôs seu uso em Bancos de Sangue (World Health Organization, 1998b). Quando adicionado ao sangue e incubado à 4°C por 24 horas, o

cristal violeta é capaz de acabar com a forma sanguínea do parasita (Temperton, 1998). A violeta genciana possui uma ação fotodinâmica (Docampo *et al*, 1988), onde a luz visível causa sua fotoredução a um radical livre centrado no carbono (Reszka *et al*, 1986). Este radical se autooxida sob condições aeróbicas gerando ânion superóxido (O_2^-) e conseqüentemente, por dismutação, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Reszka *et al*, 1986; Docampo *et al*, 1988).

Atualmente não há vacinas contra o *T. cruzi*. Estão em estudo vacinas de DNA, que induziriam a imunidade antiparasitária através da utilização de um antígeno de superfície da forma tripomastigota, membro da superfamília das trans-sialidasas e responsável por uma resposta imune em camundongos (Wizel *et al*, 1998).

O tratamento da infecção por *T. cruzi* é complicado, uma vez que o protozoário não é susceptível à maioria das drogas testadas, incluindo as efetivas contra os tripanossomas africanos e outros protozoários (Tanowitz *et al*, 1992). Atualmente a droga de escolha é o benznidazol (Rochagan[®], Roche), derivado nitroimidazólico com eficácia de aproximadamente 60 à 80% (Canesin & Barreto, 1997). Os produtos da metabolização desta droga se ligam covalentemente a componentes macromoleculares da célula (Diaz de Toranzo *et al*, 1988; Morello, 1988). Entretanto, os resultados não são muito satisfatórios, principalmente na fase crônica da doença, onde além de curar somente alguns casos, é tóxico para os pacientes (Tanowitz *et al*, 1992). O nifurtimox (Lampit[®], Bayer), um derivado nitrofurano, não se encontra mais disponível no Brasil; existem controvérsias quanto sua eficácia, pois a diferença entre a DE50 (metade da dose efetiva máxima) e a DL50 (metade da dose letal máxima) é muito pequena (Canesin & Barreto, 1997; Opperdoes, 1997). Seu mecanismo de ação envolve a produção de radicais nitroreduzidos altamente reativos que mediam a formação de O_2^- , H_2O_2 e radical hidroxil (OH) pela sua redução intracelular e participação em um ciclo redox (Repetto *et al*, 1996). Em quantidade muito maior do que a produzida pelo benznidazol, esses radicais tóxicos de oxigênio causavam efeitos colaterais sérios (Giulivi *et al*, 1988). Outro inconveniente dessas drogas é que ambas foram classificadas como mutagênicas (Gorla *et al*, 1989).

2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* pertence a ordem *Kinetoplastida* (Família *Trypanosomatidae*) que

inclui outros agentes etiológicos como *Leishmania donovani* e *Trypanosoma brucei* (Roberts & Janovy, 1996). Os protozoários desta família são organismos unicelulares, distinguidos pela presença de um único flagelo e pelo cinetoplasto (Rey, 1991a). O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, alternando entre um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado, com mudanças na sua morfologia de acordo com sua fase evolutiva e com o hospedeiro em que se encontra (Rey, 1991a; Tanowitz *et al*, 1992), conforme mostrado na figura 2.

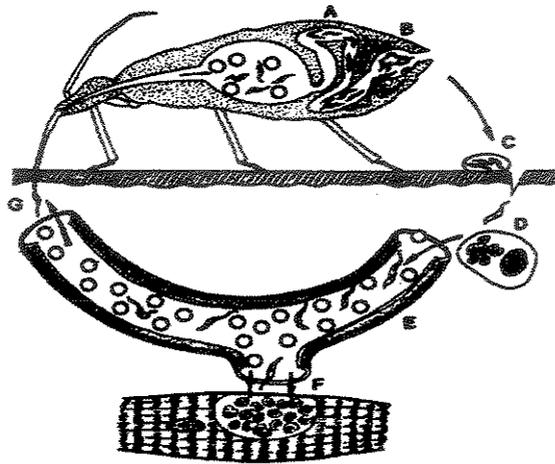


Figura 2: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* (Rey, 1991b).

O *T. cruzi* apresenta três principais formas evolutivas, relacionadas a três ambientes diferentes de desenvolvimento: epimastigota, encontrada no hospedeiro invertebrado e as formas amastigota e tripomastigota encontradas intracelularmente e extracelularmente no sangue, respectivamente (Rey, 1991a; Tanowitz *et al*, 1992).

A via clássica de transmissão ocorre a partir do “barbeiro”, que ao picar um hospedeiro vertebrado infectado com *T. cruzi* ingere as formas tripomastigotas. Estas no seu intestino se diferenciam em epimastigotas e se dividem por divisão binária. Num período de três a quatro semanas, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos e se acumulam no reto, por onde são liberados, juntamente com as fezes e a urina do vetor no momento da picada (Tanowitz *et al*, 1992, Souza, 2000). Não somente a

forma tripomastigota metacíclica é liberada neste momento, mas também são encontrados epimastigotas que não se diferenciaram (Souza, 2000).

Caso o vertebrado picado possua fissuras na pele, resultante de ferimento causado muitas vezes pela coceira que a saliva do triatomíneo provoca, os tripanossomas invadem as células cutâneas em mais ou menos 2 horas. A forma tripomastigota metacíclica pode, potencialmente, penetrar e se desenvolver em qualquer tipo celular encontrado no local, exceto em neutrófilos e eosinófilos; já a epimastigota é fagocitada por células com capacidade fagocítica existentes no local, sendo rapidamente digerida (Souza, 2000).

Aderido à célula hospedeira, o *T. cruzi* é endocitado por ela, sendo que este processo é maior em certas fases do ciclo da célula, como na fase S, durante a qual o DNA cromossômico está sendo duplicado. Além do mais, há indícios de que a endocitose também depende da quantidade adequada de receptores (glicoproteínas) na membrana celular. A forma epimastigota, ao contrário da tripomastigota, mesmo aderida à célula não é capaz de invadi-la (Rey, 1991b).

Logo após a penetração do parasita na célula, via formação de pseudópodos, a forma tripomastigota metacíclica é encontrada no interior de um vacúolo parasitóforo. Nele inicia-se a transformação dos tripomastigotas metacíclicos em amastigotas com destruição simultânea da membrana do vacúolo (Souza, 2000). Após algum tempo, os amastigotas estão livres e em contato com as estruturas citoplasmáticas da célula hospedeira, onde iniciam uma divisão binária, com duração de cerca de 14 horas. Depois de aproximadamente 5 dias, há a transformação dos amastigotas em tripomastigotas, que são liberados no espaço intercelular pela rotura da membrana da célula hospedeira. Este rompimento é aparentemente causado pelo intenso movimento dos flagelos dos tripomastigotas, sendo também liberados além dos tripomastigotas, os amastigotas e algumas formas de transição (Souza, 2000). Sugere-se que todas essas formas possuam capacidade de infectar outras células no próprio ambiente ou atingir a corrente sanguínea e distribuir-se por todo o organismo do hospedeiro (Souza, 2000). Elas podem invadir os mais variados tipos de células de diferentes órgãos, tais como fibras musculares estriadas (cardíacas ou esqueléticas), células nervosas ou células do fígado, baço, esôfago, cólon, entre outros (Roberts & Janovi, 1996).

Este hospedeiro vertebrado poderá agora, com os tripanossomas em sua corrente circulatória, infectar outros triatomíneos que eventualmente venham picá-lo para se alimentar.

A membrana celular do *T. cruzi* apresenta, como em todas as células, uma bicamada lipídica. A densidade de proteínas observada em sua superfície varia de acordo com as espécies e com a fase evolutiva dos parasitas. Sua superfície externa possui carga elétrica, que está diretamente relacionada com a presença de ácido siálico associado à glicolipídeos de membrana e desempenha importante papel na interação parasita-macrófago. No entanto, certas proteínas e glicoproteínas possuem importância fundamental para a penetração dos tripomastigotas em células não-fagocitárias (Rey, 1991a).

A interação dos componentes da membrana do parasita com a célula hospedeira ocorre de maneira específica, sendo que oligossacarídeos (Meirelles *et al*, 1983), polipeptídeos e glicoproteínas parecem estar envolvidos no processo (Zingales & Colli, 1985; Lima & Villalta, 1989). O processo de invasão celular apresenta o envolvimento de glicoproteínas de superfície. Algumas dessas moléculas são estágio-específicas; outras constituem verdadeiras famílias multigênicas. Nos tripomastigotas metacíclicos parecem estar envolvidas as glicoproteínas de superfície gp35/50, gp82 e gp90 (Yoshida *et al*, 1989; Ruiz *et al*, 1993; Ramirez *et al*, 1993), enquanto que nos tripomastigotas sanguíneos ou de culturas de tecidos elas não são detectáveis (Yoshida *et al*, 1989). Além dessa diferença, parece que diferentes moléculas de superfície são utilizadas por diferentes cepas na invasão celular. A gp82 é citada como a principal molécula envolvida na interação parasita-hospedeiro da cepa CL na invasão de células Vero, enquanto que na cepa Tulahuen ela não demonstra ter um papel fundamental (Ramirez *et al*, 1993).

O *T. cruzi* apresenta muitas variações morfológicas e fisiológicas, bem como diferenças em sua patogenicidade e infectividade, levando alguns autores a falarem em "complexo cruzi". Um dimorfismo na repetição do gene mini-exon do *T. cruzi* relacionado a diferenças no genótipo do RNA ribossomal das cepas também é encontrado. A partir da infectividade e da existência desse dimorfismo, a seguinte divisão das cepas foi inicialmente proposta (Souto *et al*, 1996):

Cepas do tipo 1: possuem elevadas taxas de multiplicação, alta parasitemia e tropismo por macrófagos na fase inicial da infecção; são altamente resistentes à drogas e possuem alta infectividade (exemplos: cepas Y e Peru);

Cepas do tipo 2: com taxas relativamente baixas de multiplicação, traços irregulares de parasitemia e miotropismo, principalmente pelo miocárdio; são sensíveis às drogas tripanossomicidas, apresentando baixa infectividade (exemplo: cepas Tulahuen e 12 SF);

Cepas do tipo 3 ou 1/2: possuem taxa de multiplicação lenta, picos de parasitemia baixos e tardios e miotropismo com predominância para os músculos cardíacos (exemplo: cepa Colômbia).

3. Cálcio

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* é submetido a mudanças dramáticas nas concentrações de Ca^{2+} livre no meio. As formas tripomastigotas e epimastigotas proliferam em um meio com alta concentração de Ca^{2+} livre (cerca de 1mM), enquanto as formas amastigotas desenvolvem-se no meio intracelular, onde a concentração de Ca^{2+} é mais baixa (da ordem de 0,1mM). As formas epimastigotas apresentam uma concentração de Ca^{2+} intracelular em torno de 40-80nM (Moreno *et al*, 1991; Oz *et al*, 1992) e os amastigotas e tripomastigotas, cerca de 10-20nM (Moreno *et al*, 1991).

O Ca^{2+} intracelular atua como um segundo mensageiro no controle de várias funções celulares, como secreção, contração e diferenciação (Docampo & Moreno, 1996), sendo observada em células musculares uma correlação precisa entre o conteúdo de cálcio dos compartimentos intracelulares e a habilidade da célula em iniciar a síntese de DNA e se dividir (Short *et al*, 1993).

Muitos parasitas intracelulares podem utilizar as vias de transdução de sinais do hospedeiro e usar a sinalização do cálcio para sua internalização (Docampo & Moreno, 1996). Nos *T. cruzi* tripomastigotas foram observados aumentos transitórios de Ca^{2+} no citosol, que podem ser necessários para o rearranjo local do citoesqueleto, permitindo o acesso e fusão dos lisossomas no local de penetração do *T. cruzi* (Tardieux *et al*, 1994). No entanto, de acordo com Tardieux e colaboradores, a forma epimastigota não apresentou

indução de sinalização de Ca^{2+} , muito provavelmente explicando sua incapacidade em invadir células de mamíferos.

A interação de drogas com o metabolismo de Ca^{2+} e funções mediadas por proteínas Ca^{2+} -dependentes pode explicar a atividade de algumas drogas em parasitas. O aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico causado por drogas que provocam estresse oxidativo através de O_2^- , H_2O_2 e oxidações de tióis, resulta em alterações patológicas da função mitocondrial e na ativação de várias enzimas catabólicas Ca^{2+} -dependentes, como fosfolipases, proteases e endonucleases, que contribuiriam para a morte celular (Orrenius *et al*, 1989; Nicotera *et al*, 1990).

Ridgley e colaboradores (1999) demonstraram em *T. brucei brucei* procíclico que a morte celular está associada com mudanças na habilidade da mitocôndria (uma das organelas responsáveis pelo transporte de Ca^{2+}) em modular a concentração deste cátion, juntamente com a desorganização das propriedades do invólucro nuclear provocado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela resistência humana (Ridgley *et al*, 1999). Interessantemente, muitos aspectos da morte celular em resposta às EROs são similares à apoptose em células mamíferas, incluindo a destruição da função mitocondrial, a redistribuição do Ca^{2+} celular, mudanças na permeabilidade do invólucro nuclear e a fragmentação do DNA nuclear dependente de Ca^{2+} (Welburn *et al*, 1996).

4. Detoxificação do oxigênio

Como parasita, o *T. cruzi* está exposto a várias EROs geradas durante a reação de defesa do organismo hospedeiro, bem como as EROs resultantes de seu próprio metabolismo (Guerrero *et al*, 1999). São classificados como EROs o O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , íon peróxido (O_2^{2-}) e oxigênio singlet ($\Delta\text{g O}_2$) (Halliwell & Gutteridge, 1989). Espécies reativas de enxofre (EREs), como radical tiil (RS^\cdot), radical ânion dissulfeto (RSSR^-) e radicais peroxisulfenil (RSOO^\cdot) também são formados durante o processo celular. Quando o doador de elétrons é um tiol, EREs são geradas juntamente com as EROs (Chae *et al*, 1999).

O sistema de defesa dos tripanossomatídeos contra espécies oxidantes difere substancialmente do metabolismo análogo do hospedeiro, sendo considerado deficiente. Por esses motivos tem sido apontado como um alvo em potencial para o desenvolvimento

de drogas tripanossomicidas mais específicas (Temperton, *et al*, 1998; Nogoceke *et al*, 1997).

Superóxido dismutases (SODs) são metaloenzimas encontradas em diversas espécies de organismos e que possuem diferentes isoformas (Cu/Zn, Mn e Fe-SOD). Nos tripanossomas, bem como em outros protozoários, encontrou-se apenas a isoforma dependente de ferro (Fe-SOD) (Tannich *et al*, 1991). Ela foi detectada em *T. cruzi* epimastigota, sendo ainda desconhecida nas outras formas de desenvolvimento do parasita (Ismail *et al*, 1997). Temperton e colaboradores (1996) identificaram dois genes em *T. cruzi* onde, pelo menos um deles codificava para Fe-SOD (Temperton *et al*, 1996). Contudo, Ismail *et al* (1997) identificaram duas SODs em tripanossoma (Fe-SODA e Fe-SODB) que mostraram maior homologia à Fe-SOD de procariotos (Ismail *et al*, 1997). A Fe-SODA se mostrou constitutiva e a Fe-SODB exibiu uma expressão estágio-específica, com níveis aumentados durante a fase epimastigota do parasita, comparada com as fases tripomastigota e amastigota (Ismail *et al*, 1997). As SODs foram identificadas no citoplasma e na mitocôndria de *T. cruzi* (Temperton *et al*, 1998), compartimentos celulares onde ocorrem os ciclos redox. No entanto, a participação das SODs como defesa contra o estresse oxidativo é questionável, uma vez que a expressão da Fe-SOD causou maior susceptibilidade do *T. cruzi* a drogas tripanossomicidas, que agem produzindo O_2^- , provavelmente devido a ineficiência do parasita em detoxificar o H_2O_2 gerado pela dismutação do O_2^- (Temperton *et al*, 1998).

A catalase normalmente está ausente (Carnieri *et al*, 1993), apesar de já terem sido relatados traços da mesma nos parasitas (Guerrero *et al*, 1999). Sua ausência pode ser parcialmente compensada pela relativa abundância de glutathione S-transferase (GST) presente nos tripanossomatídeos (Yawetz & Agostin, 1981). GSTs catalisam a reação entre glutathione reduzida e compostos eletrofilicos e têm uma ampla especificidade por substratos, incluindo atividade de peroxidase para hidroperóxidos lipídicos e detoxificação de um grande número de xenobióticos. A conjugação de xenobióticos eletrofilicos com a glutathione é um sistema de detoxificação importante nos *T. cruzi* epimastigotas. O envolvimento das GSTs na resistência adquirida à drogas vem sendo relatado, tendo essas enzimas um papel específico na atenuação dos efeitos tóxicos de drogas produtoras de radicais livres (Callahan *et al*, 1991).

A glutathiona peroxidase parece estar ausente (Boveris *et al*, 1980), embora também tenha sido relatada a presença de pequenos traços nos tripanossomatídeos (Guerrero *et al*, 1999). Uma atividade muito baixa de glutathiona peroxidase independente de selênio foi relatada em extratos celulares de *T. cruzi*, utilizando-se *t*-butyl-hidroperóxido e hidroperóxido de cumeno como substrato (Boveris *et al*, 1980).

Não existem relatos da presença de vitamina E, β -caroteno (Docampo, 1990) e xantina oxidase (Morgan *et al*, 1986) nesses parasitas.

Clark e colaboradores (1994), demonstraram a presença de ascorbato e atividade da dehidroascorbato redutase em *T. cruzi* tripomastigota e epimastigota, sugerindo uma atividade enzimática na redução da vitamina C (Clark *et al*, 1994). Os tripomastigotas apresentam uma quantidade maior de dehidroascorbato e ascorbato por mg de proteína em relação à forma epimastigota; no entanto, a proporção ascorbato-dehidroascorbato foi vista como estágio-dependente, onde os tripomastigotas possuem a predominância da forma reduzida (aproximadamente 95%), em contraste com os epimastigotas (24 a 47%) (Clark *et al*, 1994). Krauth-Siegel & Lüdemann (1996), mostraram que organismos dependentes de tripanotiona (uma molécula de baixa massa molecular presente em tripanossomatídeos) possuem exclusivamente uma redução espontânea do dehidroascorbato pela tripanotiona (Krauth-Siegel & Lüdemann, 1996). De acordo com este grupo, essa redução se assemelha em muito com a promovida pela glutathiona, mas é mais rápida.

A família das tioredoxinas (Trxs) é constituída por pequenas proteínas com massa molecular de aproximadamente 12000 Da e um motivo redox ativo conservado Cys-Gly-Pro-Cys (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000).

Schöneck *et al* (1994) identificou um cDNA na forma epimastigota de *T. cruzi* da cepa Y que codifica uma proteína denominada Tc52 com propriedades estruturais e funcionais relacionadas à família das tioredoxinas e glutaredoxinas envolvidas em reações redox tiol-dissulfeto. Esta proteína apresenta um motivo similar ao encontrado nas seqüências da glutathiona S-transferase e *in vitro*, sua forma pura pode funcionar como tioltransferase (Moutiez *et al*, 1995). *In vitro* e *in vivo*, também se revelou um fator imunossupressivo potente ((Fernandez-Gomez *et al*, 1998).

Recentemente, Reckenfelderbäumer *et al* (2000) clonaram e superexpressaram em *Trypanosoma brucei brucei* um gene, provavelmente de cópia única, que codifica tioredoxina. Este gene codifica uma proteína de 107 resíduos de aminoácidos e se mostra expresso em todos os estágios do desenvolvimento do parasita. A proteína codificada apresenta 56% de identidade com a tioredoxina putativa de *L. major* (Myler *et al*, 1999) e mostra similaridades de 21% com a tioredoxina de *E.coli* e de 33% com a tioredoxina I de levedura (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000).

De acordo com este grupo, a tioredoxina de *T. brucei* (TbTrx) contém um motivo WCGPC, característico das tioredoxinas clássicas, e um único resíduo de cisteína (Cys-67) em adição aos dois encontrados no sítio ativo. Há especulações de que este resíduo esteja envolvido na formação de um dímero verificado em ensaios de imunoblot. Em mamíferos, além dos resíduos encontrados em seu sítio ativo, as tioredoxinas possuem dois outros resíduos de cisteína (Cys-68 e Cys-72) que formam dímeros inativos tanto em sua forma reduzida quanto na oxidada (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000).

Funcionalmente, a TbTrx se mostra uma doadora de elétrons, estimulando a reação da ribonucleotídeo redutase (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000), que necessita de um tiol para se reduzir e tornar-se ativa (Holmgren, 1989). A ativação da ribonucleotídeo redutase promovida pela TbTrx é comparada à causada pela triparedoxina (TXN) de *T. brucei* e pela Trx de *E. coli* (Lüdemann *et al*, 1998). Isso mostra que, provavelmente, tripanossomas desenvolveram dois sistemas de fornecimento de elétrons para os precursores da síntese de DNA, como ocorre em outros organismos. Porém, não se sabe ainda se a TbTrx doa equivalentes reduzidos para a detoxificação de hidroperóxidos, como acontece com as tioredoxinas clássicas em outros seres vivos. Sabe-se que a TbTrx pode ser reduzida pela tioredoxina redutase humana, mas não pela tripanotiona redutase de *T. cruzi*, sugerindo a presença de uma tioredoxina redutase (Reckenfelderbäumer *et al*, 2000).

A glutathiona (GSH) é o principal composto tiólico de baixa massa molecular encontrado em plantas e animais. Possui a função de proteger proteínas e membranas celulares do ataque de peróxidos e outros radicais livres. Nos tripanossomatídeos está presente em baixas concentrações, sendo encontrada em sua maior parte (80%) como N¹-glutathionil-espermidina e como N¹,N⁸-bis-(glutathionil)-espermidina (tripanotiona-T(SH)₂).

Análoga à GSH, a T(SH)₂ participa da regulação do ciclo redox de tióis, estando envolvida na detoxificação de hidroperóxidos (Callahan *et al*, 1993).

Nos tripanossomatídeos, a T(SH)₂ é essencial para a manutenção de uma razão ideal tiol/dissulfeto (Callahan *et al*, 1993) por ser responsável pela regeneração da triparedoxina redutase. Essa regeneração é considerada o passo limitante do metabolismo de hidroperóxidos dependente de T(SH)₂ (Gommel *et al*, 1997). Nesse sistema de metabolismo, a T(SH)₂ pode ser oxidada pelo H₂O₂ ao dissulfeto cíclico correspondente (TS₂), sendo regenerada às custas de NADPH pela tripanotiona redutase (Bailey *et al*, 1993; Jacoby *et al*, 1996).

A biossíntese da T(SH)₂ envolve a participação de duas enzimas dependentes de ATP (Smith *et al*, 1992; Koenig *et al*, 1997): a glutationilespermidina sintetase que forma a N¹- e a N⁸-glutacionilespermidina e a tripanotiona sintetase, que catalisa a adição de uma segunda GSH a cada um dos intermediários (Tetaud *et al*, 1998). Já a biossíntese dos precursores, espermidina e glutaciona é idêntica à descrita para células de mamíferos (Callahan *et al*, 1993).

Nogoceke *et al* (1997) identificaram duas proteínas distintas e essenciais para a catálise da redução de hidroperóxidos dependente de T(SH)₂: Cf₁₆ e Cf₂₁. Elas foram isoladas a partir de *C. fasciculata* e mais tarde denominadas triparedoxina (Cf₁₆; TXN) e triparedoxina peroxidase (Cf₂₁; TXNp). Nenhuma delas têm similaridades com a superfamília da glutaciona peroxidase ou à hemeproteínas (Nogoceke *et al*, 1997). A TXN é considerada um aceptor de ditióis, ou seja, de T(SH)₂, e a TXNp é homóloga a uma família de proteínas com diversas funções (Chae, Uhm & Rhee, 1994b). Dentre estas proteínas encontram-se a “thiol-specific antioxidant” (TSA) (Kim *et al*, 1988) e um produto de um gene associado à proliferação (Prospéri *et al*, 1993), além de outras. O fluxo dos equivalentes reduzidos do NADPH para o hidroperóxido em *C. fasciculata*, proposto por Nogoceke e colaboradores é mostrado na figura 3:

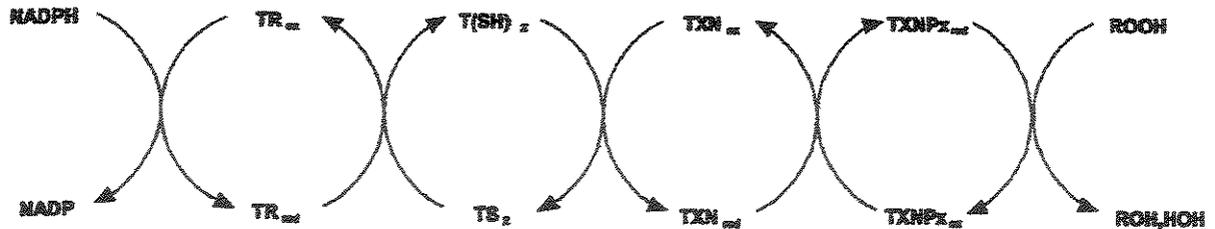


Fig. 3: Esquema do metabolismo de hidropéroxido mediado pela tripanotona. TR, tripanotona redutase; T(SH)₂, tripanotona; TXN, triparedoxina; TXNp, triparedoxina peroxidase; ROOH, alquil hidropéroxido (Nogoceke *et al*, 1997).

A tripanotona redutase (TR) é uma oxidoreductase que, em sua forma reduzida, reduz a T(SH)₂ à expensas de NADPH. Por sua vez, a T(SH)₂ reduz a TXN, que passa os equivalentes reduzidos para a TXNp, responsável pela detoxificação do hidropéroxido. A deficiência em TR promove uma interrupção no crescimento e aumento na sensibilidade ao H₂O₂ em *C. fasciculata* (Guerrero *et al*, 1999).

Com a descoberta desta nova via demonstrou-se que a baixa capacidade dos tripanossomatídeos em lidar com o estresse oxidativo se deve a regeneração limitada da TXN reduzida pela T(SH)₂ (Nogoceke *et al*, 1997) e não pela oxidação não enzimática da T(SH)₂ pelo H₂O₂, como proposto por Carnieri *et al* (1993). Além disso, a baixa eficiência molar de sua peroxidase terminal (TXNp) lhe confere característica limitada, quando comparada à alta eficiência das selenoperoxidases e ao alto K_m da T(SH)₂, apesar de ser considerada análoga ao sistema peroxidase dependente de GSH dos eucariotos superiores (Flohé *et al*, 1999b).

Em termos terapêuticos, esta nova via acrescenta dois novos candidatos, ou seja, a TXN e a TXNp, à lista de alvos em potencial para drogas tripanossomicidas (Nogoceke *et al*, 1997).

5. "Thiol-specific antioxidant" (TSA)

A TSA é uma enzima antioxidante de 25kDa, isolada em 1988 a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Kim *et al*, 1988) e posteriormente identificada em tecidos de mamíferos (Chae *et al*, 1994a). Em leveduras crescidas aerobicamente, constitui 0,7% da proteína solúvel total (Kim *et al*, 1989).

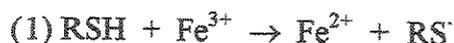
Esta enzima possui uma sequência de 195 aminoácidos contendo dois resíduos de cisteína (Cys-47 e Cys-170) (Chae *et al*, 1994c). Foi mostrado que Cys-47 é essencial para sua atividade, caracterizando-se como o sítio de oxidação (Chae *et al*, 1999). Sua estrutura é de um dímero ligado por duas ligações dissulfeto entre Cys-47 e Cys-170, contendo cada monômero um dos resíduos (Chae *et al*, 1994c).

Não foi encontrada nenhuma homologia de sequência com catalases, peroxidases e superóxido dismutases, demonstrando que a TSA é uma nova enzima antioxidante (Chae *et al*, 1994a). A TSA não apresenta nenhum grupo prostético como heme ou flavina ou metal fortemente ligado (Kim *et al*, 1988). Sua função antioxidante só é observada na presença de um tiol, uma vez que sua forma oxidada possui uma ligação dissulfeto intermolecular que só é reduzida por tióis (Chae *et al*, 1994a). Em leveduras é uma enzima citosólica, codificada pelo DNA nuclear, sendo não essencial para a viabilidade celular (Chae *et al*, 1993).

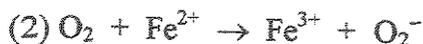
A maioria dos ensaios desenvolvidos para medir a atividade desta enzima são indiretos, baseando-se na proteção de outras enzimas contra os danos causados por sistemas oxidativos dependentes de tióis e catalisados por metais. Todavia, a atividade de TSA pode ser também medida pelo consumo de peróxidos ou de tióis (Netto *et al*, 1996). Para isto, o grupo do Dr. Stadtman propôs um ensaio que tem por princípio a proteção da inativação da glutamina sintetase (GS) pela TSA contra as EROs geradas pelo sistema de oxidação DTT/Fe³⁺/O₂ (Netto & Stadtman, 1996).

A oxidação do DTT catalisada por Fe³⁺ é um processo bifásico, caracterizado por uma fase lag durante a qual o O₂ é consumido em pequena quantidade por um mecanismo envolvendo um ciclo redox de Fe³⁺ à Fe²⁺ dependente de DTT e a conversão do O₂ à H₂O₂. Esta fase é seguida por um grande aumento no consumo do O₂, envolvendo reações de radicais livres dependentes e independentes de O₂⁻ que podem agir, embora mais lentamente, na ausência de H₂O₂. Durante essas fases, radicais livres centrados no enxofre podem ser formados, porém pouco se sabe sobre a reatividade dos mesmos (Netto & Stadtman, 1996).

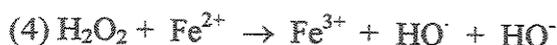
Em sistemas oxidativos como DTT/Fe³⁺/ O₂, inicialmente o DTT sofre oxidação por Fe³⁺:



Posteriormente, o Fe^{2+} é oxidado à Fe^{3+} originando $\text{O}_2^{\cdot -}$. Esta, por sua vez, pode gerar H_2O_2 por dismutação:

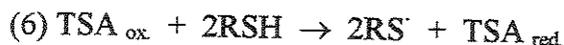
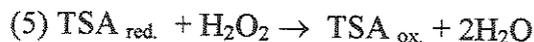


Quando o H_2O_2 reage com o Fe^{2+} pela reação de Fenton, o radical hidroxil é gerado:



O radical hidroxil é uma espécie extremamente reativa e provavelmente é responsável pela inativação da GS pelo sistema oxidativo DTT/ Fe^{3+} / O_2 , bem como por outros sistemas oxidantes catalisados por metais (Stadtman, 1990).

O mecanismo protetor de TSA se baseia na capacidade desta enzima antioxidante de decompor o H_2O_2 à H_2O . Dessa forma, a TSA previne a reação de Fenton e conseqüentemente a geração de radical hidroxil. O DTT, assim como outros tióis, regeneram a forma oxidada de TSA (Netto *et al*, 1996):



Assim, nos ensaios de proteção da GS, o DTT tem ao mesmo tempo um papel pró-oxidante (via reação 1) e antioxidante (via reação 6).

Tem sido mostrado que a GS é susceptível à inativação provocada por uma grande variedade de sistemas oxidantes, enzimáticos ou não, em geral estimulados por Fe^{3+} e requerendo a presença de oxigênio baseado no fato que Fe^{2+} e H_2O_2 sozinhos podem inativar a GS e que catalase e Mn^{2+} inibem a reação de inativação (Stadtman, 1990).

O Fe^{2+} se liga à GS por esta possuir sítios de ligação de metal. Com isso, o H_2O_2 oxida a Fe^{2+} -GS, formando EROs, como o HO^\cdot que oxida um resíduo de histidina próximo ou no sítio de ligação do íon metálico.



Esse mecanismo de inativação é sustentado pelo fato de que todos os sistemas mistos de oxidação estudados são conhecidos como catalisadores da produção de H_2O_2 e da redução de Fe^{3+} à Fe^{2+} (Rhee *et al*, 1985).

Assim, via as reações 5 e 6 pode-se observar que a TSA é capaz de proteger a GS da inativação degradando o H_2O_2 . A habilidade da TSA em proteger a GS também é atribuída ao efeito qualitativamente similar ao da catalase no consumo de O_2 , onde o H_2O_2 produzido pelo sistema oxidante é decomposto e a GS protegida (Netto *et al*, 1996).

Algumas proteínas de vários organismos apresentam homologia com a estrutura primária da TSA, as quais receberam o nome de família das peroxiredoxinas (Prx) (Chae *et al*, 1994c). A maioria delas possui dois resíduos de cisteína conservados (Chae *et al*, 1999). Uma delas é a proteína TbrTSA, presente em *Trypanosoma brucei*, que apresenta 61,8% de identidade com o produto do gene *pag* ("proliferation associated gene"), superexpresso durante a proliferação celular de células epiteliais mamárias de humanos. Além desta similaridade, a TbrTSA é semelhante à uma proteína de 23kDa induzida pelo estresse em macrófagos peritoniais de camundongo, cuja síntese é estimulada pela exposição a agentes oxidativos. Apesar da função de muitas proteínas relacionadas à TbrTSA não estarem bem caracterizadas, poderia se especular que esta proteína teria um papel importante no mecanismo de defesa dos tripanossomas e que possivelmente esteja envolvida na resposta celular tanto aos sinais de proliferação como aos de diferenciação (El-Sayed *et al*, 1995).

Webb *et al* (1998) demonstraram a presença da TSA em várias espécies de *Leishmania*, com expressão tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas. A partir da imunização de camundongos BALBc com uma TSA recombinante associada com a interleucina 12 houve o desenvolvimento de uma resposta imune potente que conferia ao animal proteção contra a infecção por *Leishmania major*. Em pacientes com leishmaniose cutânea ou visceral foram detectados títulos de anticorpos específicos contra a TSA. Esses

dados sugerem que a TSA pode ser útil como componente de uma vacina contra a leishmaniose (Webb et al, 1998).

A TSA foi a primeira peroxidase a ser identificada como aceptora imediata de elétrons da tioredoxina (Trx), sendo então renomeada para tioredoxina peroxidase (TPx). Já a família de proteínas homólogas continuou denominada Prx e não de família das TPx porque nem todos os membros dessa família utilizam a tioredoxina como doadora de elétrons (Chae et al, 1999).

6. *Triparedoxina*

A triparedoxina (TXN), proteína da superfamília das tioredoxinas, faz parte do sistema de peroxidase inicialmente caracterizado em *C. fasciculata* (Nogoceke et al, 1997). Sua concentração mínima estimada neste tripanossomatídeo é de 5% da proteína solúvel total (Nogoceke et al, 1997).

Monomérica e com massa molecular de 16kDa, a TXN tem como função mediar o fluxo de equivalentes reduzidos da T(SH)₂ à TXNp, que reduz H₂O₂ e alquilhidroperóxidos (Gommel et al, 1997). Contudo, ao contrário da tioredoxina (Trx), que se regenera a partir da transferência imediata de equivalentes reduzidos da tioredoxina redutase, a TXN recebe esses equivalentes da T(SH)₂ (Nogoceke et al, 1997). De acordo com análises cinéticas, a TXN é considerada um catalisador essencial do metabolismo de hidroperóxidos em tripanossomatídeos (Gommel et al, 1997).

A TXN é homóloga a um peptídeo semelhante à tioredoxina de *Caenorabiditis elegans*. Ela contém o motivo WCPPC, parecido com o sítio ativo da tioredoxina (WCG(A)PC) (Nogoceke et al, 1997) e apresenta atividade de oxidoreductase em ditióis (Loferer & Hennecke, 1994). De acordo com Gommel et al (1997) este motivo corresponde ao sítio ativo da triparedoxina e o resíduo de cisteína amino-proximal é o mais reativo (Gommel et al, 1997). Em geral, motivos do tipo CXXC são característicos de proteínas que catalisam reversivelmente a redução de dissulfetos e CPPC é tido como um forte redutor (Guerrero et al, 1999). Porém, com exceção do motivo, a TXN mostra pouca similaridade à uma tioredoxina clássica (Follmann & Häberlein, 1995) ou outras proteínas com motivo CXXC (Nogoceke et al, 1997; Guerrero et al, 1999). Além disso, a TXN é

muito maior do que as tioredoxinas devido à extensão dos C- e N-terminais (Montemartini *et al*, 1998b).

A TXN citada acabou sendo denominada TXNI devido à identificação de uma nova TXN em *C. fasciculata*. Montemartini e colaboradores (1998b) descobriram em *Crithidia* uma nova TXN denominada TXNII. A sequência de aminoácidos da TXNII difere substancialmente da sequência da TXNI e das tioredoxinas. Somente seus motivos apresentam identidade. Mas quando expressa heterologicamente em *E. coli*, a TXNII substitui eficientemente a TXNI no sistema peroxidase tripanossomal. No entanto, isso não implica que o papel biológico das TXNs esteja caracterizado, pois a diversidade estrutural entre elas pode sugerir distintos caminhos metabólicos (Montemartini *et al*, 1998b). Além disso, diferenças nos parâmetros cinéticos de ambas foram identificadas. O baixo K_m da TXNII caracteriza uma maior afinidade da enzima pela tripanotiona (Guerrero *et al*, 1999) comparada a TXNI.

Em *T. brucei*, a estrutura primária da TXN tem 57% de identidade com a proteína de *C. fasciculata* (Lüdemann *et al*, 1998) e não contém nenhum sítio de ligação específico para a glutathione (Bushweller *et al*, 1994). Dados indicam que a TXN é regenerada não-enzimaticamente pela T(SH)₂ por trocas tiol/dissulfeto, pois a redução promovida pela T(SH)₂ se mostra rápida (Lüdemann *et al*, 1998). Há autores que acreditam que as TXN podem formar uma nova classe de oxiredutases tiol-dissulfeto, por se comportarem em alguns aspectos como tioredoxina clássica ou como glutaredoxina (Lüdemann *et al*, 1998).

7. Triparedoxina Peroxidase

A triparedoxina peroxidase (TXNp), com massa molecular de 21kDa, pertence às peroxiredoxinas, podendo ser comparada com as tioredoxinas peroxidases de levedura e mamíferos (Chae & Kim, 1995). Por ser pequena como as outras Prxs, a TXNp só é ativa como oligômero (Tetaud & Fairlamb, 1998; Flohé *et al*, 1999b). Mas, em contraste com as outras Prxs, é capaz de reduzir hidroperóxidos orgânicos ou lipídicos (Nogoceke *et al*, 1997), com atividade similar (Tetaud & Fairlamb, 1998).

O mecanismo catalítico exato da TXNp não é conhecido e parece ser muito complexo. Já a atividade peroxidásica da família das Prxs pôde ser entendida a partir da

estrutura de uma Prx humana, a hORF6. O grupo SH da cisteína N-proximal é ligado por ponte salina a arginina e ligado por um hidrogênio à um resíduo de histidina, assim associado e propenso à reagir com H_2O_2 (Flohé *et al*, 1999a).

Com os conhecimentos da hORF6, foi iniciado um programa de mutagênese da TXNp (Flohé *et al*, 1999a), baseado numa sequência de quatro resíduos que potencialmente ativam um grupo tiol (Montemartini *et al*, 1998a). Esses resíduos estão presentes em muitas Prxs e dois deles, triptofano e glutamina, são responsáveis por ativar resíduos de selenocisteína em glutathione peroxidases (Maiorino *et al*, 1995; Epp *et al*, 1983). No entanto, as diferenças entre a TXNp e a hORF6 não permitem que qualquer hipótese mecanística seja provada ou não.

A cinética da TXNp envolve um mecanismo ping-pong e a catálise por ela realizada tem a participação de dois resíduos de cisteína (Cys52 e Cys173) (Nogoceke *et al*, 1997). Homologamente à tioredoxina peroxidase (Chae *et al*, 1994b), a troca das cisteínas da TNXp por serinas abole (Cys52Ser) ou reduz dramaticamente (Cys173Ser) a atividade da enzima (Montemartini *et al*, 1999). Estas alterações na atividade da TXNp são sustentadas pela semelhança com as Prxs. O único grupo redox ativo das Prxs com atividade peroxidásica apresenta dois resíduos de cisteínas conservados; o primeiro é obrigado a se manter no motivo VCP para ocorrer a reação com o redutor específico e o segundo se mostra indispensável para a reação com o oxidante (Montemartini *et al*, 1998a).

Em *Crithidia*, a concentração mínima de TXNp estimada é próxima de 5% da proteína solúvel total, compensando sua baixa eficiência molar (Nogoceke *et al*, 1997; Steinert *et al*, 1999). No entanto, a constante para a reação da TXNp de *C. fasciculata* com H_2O_2 (Nogoceke *et al*, 1997; Montemartini *et al*, 1998b) é de duas a três vezes mais baixa do que a de qualquer outra selenoperoxidase conhecida (Flohé *et al*, 1999b). Já a constante para a regeneração da TXNp reduzida pela TXN é alta o suficiente para manter a enzima pronta para exercer sua função, já que o suprimento da TXN reduzida não é drasticamente prejudicado (Flohé *et al*, 1999b).

8. Localização dos Componentes do Sistema de Peroxidases

De acordo com Steinert *et al* (1999), todos os componentes do sistema de peroxidases de *C. fasciculata* (TXNI, TXNII e TXNp) estão localizados no citosol (Steinert

et al, 1999; Lopez *et al*, 2000). Isto permite que eles atuem em conjunto sem que as membranas subcelulares promovam a diminuição do fluxo de equivalentes reduzidos, tornando o sistema eficiente (Nogoceke *et al*, 1997). A TR também é encontrada no citosol do *T. cruzi*, porém de modo não restrito (Meziane-Cherif *et al*, 1994). Por analogia, o sistema de detoxificação de hidroperóxidos deveria proteger a mitocôndria, local de produção de EROs. No entanto, o sistema de peroxidases citosólico não consegue protegê-la e não foi detectado pelo grupo de Steinert nenhum componente do mesmo nesta organela (Steinert *et al*, 1999).

Wilkinson *et al* (2000) identificaram duas Prxs em *T. cruzi* epimastigota: uma no citosol, homóloga à TXNp com atividade de detoxificação de peróxidos, e outra na mitocôndria, encontrada predominantemente na periferia da célula com uma aparente concentração em volta do cinetoplasto. A existência dessa enzima mitocondrial sugere a localização de toda a maquinaria necessária para manter essa Prx reduzida na mitocôndria ou a compartimentalização do sistema redox do tripanossoma entre o citosol e a organela em questão (Wilkinson *et al*, 2000). Não se tem relatos da tripanotiona em estruturas subcelulares, mas em *T. brucei* existe uma forte evidência de que a tripanotiona redutase se encontra exclusivamente no citosol (Smith *et al*, 1991). Caso isto seja verdade em *T. cruzi*, a Prx mitocondrial sugere a presença de um sistema transportador e/ou redutor de tióis. Nos tripanossomatídeos, devido à presença de tripanotiona somente no citosol, é possível a existência de um sistema transportador/de troca diferente do sistema de GSH do hospedeiro. É possível também que a Prx mitocondrial faça parte de um sistema redox análogo ao existente no citosol. A função sugerida para essa Prx é a de proteger o genoma mitocondrial dos danos causados por peróxidos (Wilkinson *et al*, 2000).

O grupo de Wilkinson também cita que células transformadas de tripanossomas que superexpressaram as peroxidases citossólica e mitocondrial apresentaram um aumento na resistência ao H₂O₂ e *t*-butilhidroperóxido. O nível de cada enzima é fator limitante no metabolismo do peróxido em suas respectivas organelas, sendo ambas enzimas protetoras do parasita em relação à presença de peróxido exógenos e endógenos. No entanto, elas se mostraram susceptíveis ao benznidazol e ao nifurtimox da mesma forma que as células selvagens, sugerindo a atividade destas drogas por outro mecanismo que não pela produção de peróxido (Wilkinson *et al*, 2000).

OBJETIVOS

A Doença de Chagas é uma enfermidade que não tem cura, nem vacina desenvolvida. Os medicamentos utilizados possuem ação apenas durante a fase aguda da doença, sendo potencialmente tóxicos para o hospedeiro.

A diferença na resistência aos fármacos antichagásicos apresentada pelas diferentes cepas do *T. cruzi*, permitiu a hipótese da existência de diferenças no sistema antioxidante do parasita, de acordo com a cepa e com a distribuição geográfica da mesma.

O sistema de detoxificação de peróxidos dos tripanossomatídeos sempre foi motivo de estudos, pois contendo uma enzima peculiar a este grupo de parasitas se encaixa dentro do modelo ideal para o desenvolvimento de novos medicamentos. Com a descoberta da TXNp e TXN, dois novos alvos em potencial para o desenvolvimento de drogas antichagásicas foram identificados.

Baseado nesses dados, os objetivos da presente tese foram:

- 1 - Identificar a TXNp em extratos protéicos totais de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas das cepas Y e Tulahuen 2. Essas duas cepas foram escolhidas por pertencerem a grupos diferentes, de acordo com a classificação proposta por Souto *et al*, 1996.
- 2 - Caracterizar a atividade enzimática da TXNp, comparando as cepas Y e Tulahuen 2.
- 3 - Quantificar a TXN e TXNp nas duas cepas.
- 4 - Verificar se há uma diferença quantitativa quanto a TXN e a TXNp nas duas cepas estudadas em diferentes dias de crescimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Ditiotreitol (DTT) foi adquirido da Amershan Life Science; L- glutamina, Hepes e N-etilmaleimida (NEM) e o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina foram obtidos da Sigma. Da BioRad (CA, EUA) foram adquiridos o sistema de detecção para Blots constituído de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), nitroblue tetrazolium (NBT) e o anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina. A Glutamina Sintetase (GS) e o anticorpo primário de coelho contra TSA purificado de levedura foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto. Os anticorpos primários de camundongo contra a triparedoxina de *C. fasciculata* e a triparedoxina peroxidase de *T. cruzi* e os "sheddings" das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram cedidos pela Dra. Maria Júlia Manso Alves.

Os outros reagentes usados possuíam grau de pureza analítico.

MÉTODOS

Durante o trabalho foram utilizadas as cepas Y (cedida pela Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves, da Universidade de São Paulo) e Tulahuen 2 (Uruguai) de *T. cruzi* epimastigotas. Todos os ensaios foram realizados a partir do extrato protéico total dos tripanossomas, sendo este preparado e armazenado no biofreezer (-70°C) até o momento do uso.

1. Cultura de células

T. cruzi epimastigotas foram cultivados à 28°C em meio LIT ("Liver Infusion Tryptose") composto de 76mM de cloreto de sódio, 5,9mM de cloreto de potássio, 12,3mM de glicose, 78,5mM de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,55% de triptose,

0,55% de infusão de fígado, 20 μ g/mL de hemina, pH 7,4 e 10% de Soro Fetal Bovino Inativado (Camargo, 1964).

As células foram coletadas por centrifugação (2500 x g por 5 minutos) e lavadas com tampão salina fosfato (PBS - 137mM de cloreto de sódio, 2,7mM de cloreto de potássio, 8,1mM de Na₂HPO₄ e 1,5 mM de KH₂PO₄ pH 7,4).

2. *Preparo do extrato protéico total de Trypanosoma cruzi*

Após serem lavadas com PBS, as células foram lavadas em meio 1 contendo 400mM de manitol, 10mM de cloreto de potássio, 2mM de EDTA, 1mM de PMSF (Phenylmethylsulphonyl Fluoride) e 20mM de Hepes pH 7,6. Ao precipitado de células foram misturadas pérolas de vidro de 75-120 μ m de diâmetro previamente lavadas com ácido clorídrico em uma razão de 1:2 (peso úmido/peso de pérolas de vidro). As células foram rompidas por abrasão em gral gelado até se obter 90% de rompimento, determinado por microscopia ótica. As pérolas de vidro, células não rompidas e restos celulares foram removidos por centrifugação à 2500 rpm por 5 minutos à 4°C (Benain *et al*, 1991). O sobrenadante (extrato protéico total) foi mantido à -70°C até o uso. A concentração de proteína foi determinada pelo método do Biureto (Gornal *et al*, 1949) na presença de 0,2% de deoxicolato.

Alguns extratos preparados a partir de culturas celulares com 5 dias de crescimento foram tratados com 0,1mM de NEM antes de serem utilizados nos experimentos.

3. *Preparo do extrato protéico total de Trypanosoma cruzi para Western blotting*

Este extrato foi preparado a partir de cultura com 5,2x10⁵ células/mL, que após cinco dias de cultura entram em início da fase estacionária de crescimento.

Depois de lavadas com PBS, as células foram ressuspensas em tampão de amostra que continha 0,02% de azul de bromofenol e 4% de β -mercaptoetanol diluídos

em uma solução-mãe, composta de 32,9% de tampão C (0,5M Tris-base Cl pH 6,8 e 0,4% de SDS), 39,5% de glicerol, 26,3% de SDS 20% e 1,3% de EDTA 0,2M em um volume de aproximadamente 80 μ L. Amostras foram separadas sem o tampão de amostra e a concentração de proteína foi estimada pelo método do Biureto (Gornal *et al*, 1949) na presença de 0,2% de deoxicolato.

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

4. Determinação da atividade antioxidante da triparedoxina peroxidase

A presença da triparedoxina peroxidase foi determinada indiretamente, monitorando sua habilidade de inibir a inativação da enzima glutamina sintetase pelo sistema tiol/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$. Os ensaios continham 7 μM Fe^{3+} , 0,1 M Hepes, pH 7,4, 0,07 mg/mL glutamina sintetase e extrato protéico total nas concentrações especificadas nas legendas das figuras. A reação foi iniciada com a adição de 0,02 M DTT e incubada à 30°C pelos tempos determinados. A atividade resultante da glutamina sintetase foi medida pela adição de 50 μ L de amostra em 2mL de "Assay Mix", composto de 150mM de glutamina, 50mM de Hepes 1M pH 7,4, 2mM de arsenato de sódio heptahidratado, 0,4mM de adenosina difosfato (ADP) e 20mM de hidroxilamina, com ajuste de pH para 7,57 antes da adição de 0,4mM de cloreto de manganês. A reação foi incubada por 10 minutos à 30°C e paralisada com a adição de 1mL de "Stop Mix" (0,2M de cloreto férrico hexahidratado e 0,3M de ácido clorídrico 6M). A absorbância resultante do complexo γ -glutamilhidroxamato- Fe^{3+} foi medida à 540nm (Kim *et al*, 1988).

5. Obtenção do "Shedding" de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y

O preparo dos "sheddings" foi feito de acordo com Gonçalves *et al*, 1991. As formas tripomastigotas foram lavadas duas vezes em DMEM ("Dulbeccos's modified Eagle medium") - 0,5% de soro fetal bovino e ressuspensas a $2,5 \times 10^9$ células/mL no mesmo meio contendo 20mM de Hepes. As formas epimastigotas sofreram o mesmo

tratamento, sendo lavadas com PBS em vez de DMEM e ressuspensas à 2×10^9 células/mL. As suspensões de tripomastigotas foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ e as de epimastigotas sob agitação à 28°C, “overnight”. Os sobrenadantes e os parasitas sedimentados foram precipitados independentemente com ácido tricloroacético gelado, numa concentração final de 10%. Em ambos os casos, os precipitados foram coletados em filtros de nitrocelulose de 0,22µm e lavados com 30mL de ácido tricloroacético 5%.

6. Western blotting

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

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

Para a imunodeteção, a membrana foi bloqueada com 4% de leite em pó desnatado em PBS por 30 minutos e logo em seguida incubada durante a noite com o anticorpo primário (contra TSA de levedura na diluição 1:1000, contra triparedoxina peroxidase de *T. cruzi* numa diluição 1:150 ou contra triparedoxina de *C. fasciculata* numa diluição 1:100). Todos foram diluídos em PBS/ 0,1% Tween 20.

Após esta incubação, a membrana foi lavada com PBS/0,1% Tween 20 e incubada por 1 hora com anticorpo secundário numa diluição 1:5000 em tampão Tris/Na⁺/Mg²⁺ (100mM Tris-Cl, pH 9,5, 100mM NaCl e 5mM MgCl₂) e lavada com PBS depois do término da incubação.

Antes da revelação, a membrana foi incubada por 10 minutos no tampão Tris/Na⁺/Mg²⁺ acima descrito. A revelação para a fosfatase alcalina foi feita usando-se 33µL de BCIP (BioRad- CA, EUA) e 66µL de NBT (BioRad- CA, EUA) em 10 mL de tampão Tris/Na⁺/Mg²⁺.

7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram desenvolvidas no método Anova, com a utilização do programa SIStat. Já a densitometria das bandas dos Western Blottings foi feita com o uso do programa ImageMaster[®] Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia biotech.

RESULTADOS

1. Identificação da triparedoxina peroxidase em extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas

A presença desta proteína em extrato protéico total de *T. cruzi* epimastigota foi determinada por Western blotting a partir de células em início da fase estacionária de desenvolvimento (Figura 4).

Foi utilizado um anticorpo produzido em coelhos contra TSA de *S. cerevisiae*, uma vez que a TXNp apresenta uma homologia de 59% com a TSA de levedura de acordo com análise feita em banco de dados (Blast). Como controle utilizou-se 4,44µg de TSA purificada de *S. cerevisiae* linhagem JD7 (coluna 1) e extrato protéico total da mesma cepa (coluna 2 e 3) em diferentes concentrações (100µg e 50µg respectivamente). As demais colunas correspondem à 100µg de extrato protéico total de diferentes cepas de *T. cruzi*: Tulahuen 0 (CT-IOC 295) (coluna 4), Tulahuen 2 (CT-IOC 296) (coluna 5), Tulahuen 2 - Uruguai (coluna 6) e Y (coluna 7).

Apesar do anticorpo utilizado não ser específico contra TXNp de *T. cruzi*, observa-se na Figura 4, colunas 4 à 7, a presença de bandas provenientes do reconhecimento da TXNp. Observando estas bandas pode-se verificar diferenças na intensidade das mesmas de acordo com a cepa, ou seja, a cepa Tulahuen 2 do Uruguai (coluna 6) apresenta uma banda mais intensa do que qualquer outra cepa de tripanossoma estudada (colunas 4 à 7). Sendo assim, as cepas Tulahuen 2 do Uruguai (coluna 6) e a cepa Y (coluna 7) foram selecionadas para esse estudo, pois além de pertencerem à grupos diferentes a Tulahuen 2 (Uruguai) possui uma maior quantidade de TXNp. Apesar da Tulahuen 2 apresentar maior sensibilidade ao benzidazol e ao nifurtimox do que a cepa Y (Souza, 2000; Zingales *et al*, 1998); ela (coluna 6) apresenta maior quantidade de TXNp do que a Y (coluna 7).

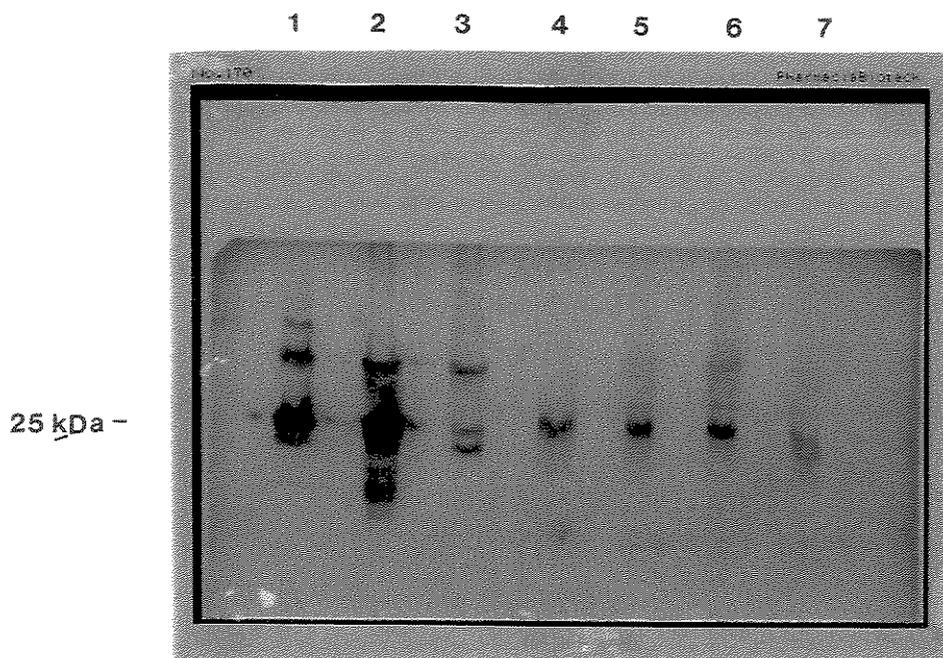


Figura 4: Presença da Triparedoxina Peroxidase em extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas de diferentes cepas. A presença desta enzima no extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi* epimastigota foi determinada por Western blotting, utilizando anticorpo anti-TSA de *S. cerevisiae* na diluição 1:1000. Coluna 1: TSA purificada de *S. cerevisiae* (4,44 μ g); Coluna 2: extrato celular de *S. cerevisiae* da linhagem JD7 (100 μ g); Coluna 3: extrato celular de *S. cerevisiae* da linhagem JD7 (50 μ g); Coluna 4: *T. cruzi* Tulahuen 0 (CT-IOC 295) (100 μ g); Coluna 5: *T. cruzi* Tulahuen 2 (CT-IOC 296) (100 μ g); Coluna 6: *T. cruzi* Tulahuen 2 do Uruguai (100 μ g); Coluna 7: *T. cruzi* Y (100 μ g)

2. Determinação da atividade da glutamina sintetase de acordo com o tempo de incubação com o sistema oxidante na presença do extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi*

A Figura 5 representa a medida da atividade da TXNp como protetora da GS contra o sistema oxidativo quando incubada por diferentes tempos com extrato protéico total de *T. cruzi* das cepas Y e Tulahuen 2. Nela são apresentados apenas os melhores representantes dos resultados obtidos com cada cepa.

Ao se incubar 0,07mg/mL de GS somente com o sistema oxidante DTT/Fe³⁺/O₂ (7 μ M Fe³⁺ e 0,02M DTT) obteve-se total inativação da enzima em 10 minutos (Figura 5, barra verde).

Quando se incubou 5,6mg/mL do extrato protéico total de *T. cruzi* com a GS e o sistema oxidante DTT/Fe³⁺/O₂ nas mesmas concentrações utilizadas acima por 10, 30 e 60 minutos, observou-se com o passar do tempo uma queda significativa na porcentagem de atividade da enzima quando utilizou-se extrato protéico total da cepa Y (de 85,4% em 10 minutos passou para 78,3% em 1 hora ($P = 0,053$)) (Figura 5, barras azuis escuras), indicando uma queda na propriedade protetora deste extrato com o passar do tempo. O contrário aconteceu com a cepa Tulahuen 2, que apresentou aumento da porcentagem de atividade entre 10 e 30 minutos (de 81,1% para 97,2%) e se manteve praticamente constante após este período (Figura 5, barras azuis claras).

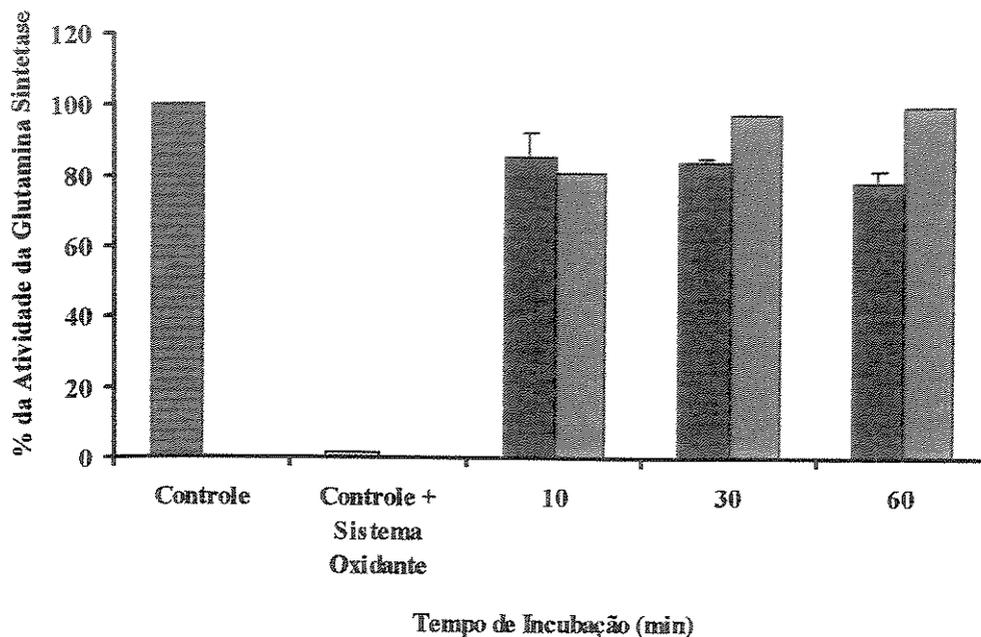


Figura 5: Variação do tempo mostrando a proteção da glutamina sintetase pela triparedoxina peroxidase, presente no extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas, contra o sistema DTT/Fe³⁺/O₂. A mistura de inativação continha 0,02M DTT, 7 μ M Fe³⁺, 0,1M HEPES pH 7,4, 0,07 mg/mL glutamina sintetase na presença de 5,6mg/mL de extrato protéico total de *T. cruzi* epimastigota das cepas Y (■) e Tulahuen 2 (▨). O controle (■) continha apenas 0,07 mg/mL glutamina sintetase e (▨) representa o controle de inativação da GS pelo sistema oxidativo na ausência de extrato. As reações foram realizadas à 30°C em um volume total de 50 μ L nos tempos indicados acima. O ensaio para a atividade da glutamina sintetase e a preparação do extrato protéico total foram feitos como descrito em Materiais e Métodos (entre os resultados de Y e Tulahuen 2: para 10 minutos, $P = 0,263$; 30 minutos, $P = 0,009$; e para 60 minutos, $P = 0,046$).

3. *Determinação da proteção conferida à glutamina sintetase contra o sistema oxidativo por diferentes concentrações de extrato protéico total de Trypanosoma cruzi*

Na Figura 6 está representada a atividade da GS após sua incubação com o sistema oxidante na presença de diferentes concentrações de extrato protéico total de *T. cruzi*. Novamente são apresentados os melhores representantes dos resultados obtidos com ambas as cepas. As concentrações do sistema oxidante e da GS foram as mesmas da Figura 5 e o tempo de incubação de 15 minutos. Este tempo foi escolhido para o ensaio pois com 10 minutos de incubação da GS com o sistema oxidante, obtém-se uma total inativação da enzima.

Os resultados da Figura 6 mostram um aumento de 20% na atividade da GS com o aumento da concentração do extrato da cepa Y de 0,7 para 1,4mg/mL ($P = 0,043$). A atividade da GS manteve-se praticamente constante quando utilizou-se concentrações maiores de extrato, indicando que em concentrações superiores à 1,4mg/mL a proteção promovida pela TXNp existente no extrato da cepa Y atinge seu máximo.

Com a cepa Tulahuen 2 a atividade da GS já é alta (82%) com 0,7mg/mL de extrato protéico total, mantendo-se praticamente constante independente do aumento da concentração do mesmo.

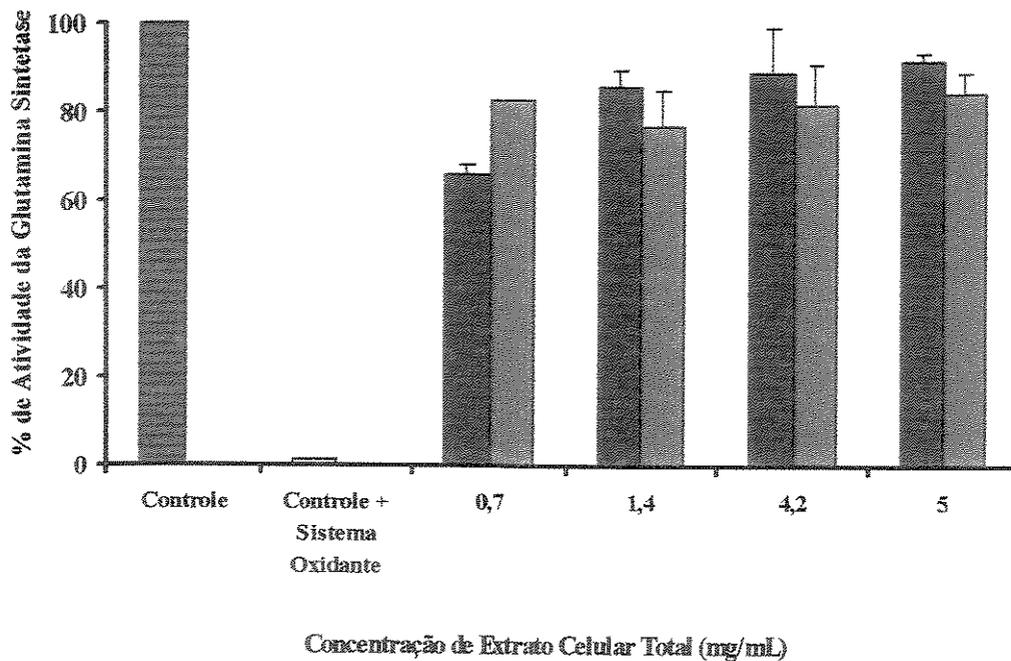


Figura 6 - Proteção da glutamina sintetase pela triparedoxina peroxidase presente em extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas contra o sistema DTT/Fe³⁺/O₂. A mistura de inativação continha 0,02M DTT, 7μM Fe³⁺, 0,1M HEPES pH 7,4, 0,07mg/mL glutamina sintetase na presença de diferentes concentrações de extratos protéicos totais de *T. cruzi* das cepas Y (■) e Tulahun 2 (▒), como indicado na figura. O controle (■) continha apenas 0,07 mg/mL de glutamina sintetase e o controle com o sistema oxidativo (▒) era composto pela mistura de inativação na ausência de extrato celular. As reações foram realizadas por 15 min à 30°C em um volume total de 50μL. O ensaio para a atividade da glutamina sintetase e a preparação do extrato celular foram feitos como descrito em Materiais e Métodos (comparando-se os resultados da Y e Tulahun 2: para 0,7mg/mL, $P = 0,001$; 1,4mg/mL, $P = 0,173$; 4,2mg/mL, $P = 0,707$; e 5,0mg/mL, $P = 0,494$).

4. Efeito do pré- tratamento dos extratos protéicos totais com NEM

Na Figura 7 são analisados os efeitos do NEM na determinação da atividade da GS incubada com extratos protéicos totais de *T. cruzi* das cepas Y e Tulahun 2 pré-tratados com 0,001M do agente alquilante antes de serem conservados à -70°C. Nesta figura são apresentados apenas os melhores representantes dos resultados obtidos com cada cepa.

O NEM é um agente que promove a alquilação de tióis, podendo ser utilizado para confirmar se a enzima promotora da proteção da GS é uma enzima tiólica, possuindo em sua estrutura resíduos de cisteína. O extrato protéico total pré-tratado com NEM

deveria, em caso da presença de enzima tiólica funcional, apresentar uma menor proteção da GS, pois a enzima perderia sua atividade com sua alquilação.

Quando se incubava a GS com o sistema oxidante DTT/Fe³⁺/O₂ e os extratos protéicos totais de ambas as cepas, observa-se uma atividade da GS de 82% com a Y e 92% com a Tulahuen 2 (Figura 7). Já com o extrato celular tratado com NEM, os resultados da cepa Y mostram uma menor atividade da GS (uma diferença de 18% em relação ao extrato não tratado, $P = 0,057$), o que não ocorre com a cepa Tulahuen 2, apresentando variação pouco significativa na atividade da enzima (de 92% com o extrato não tratado para 90% com o extrato pré-tratado, $P = 0,898$).

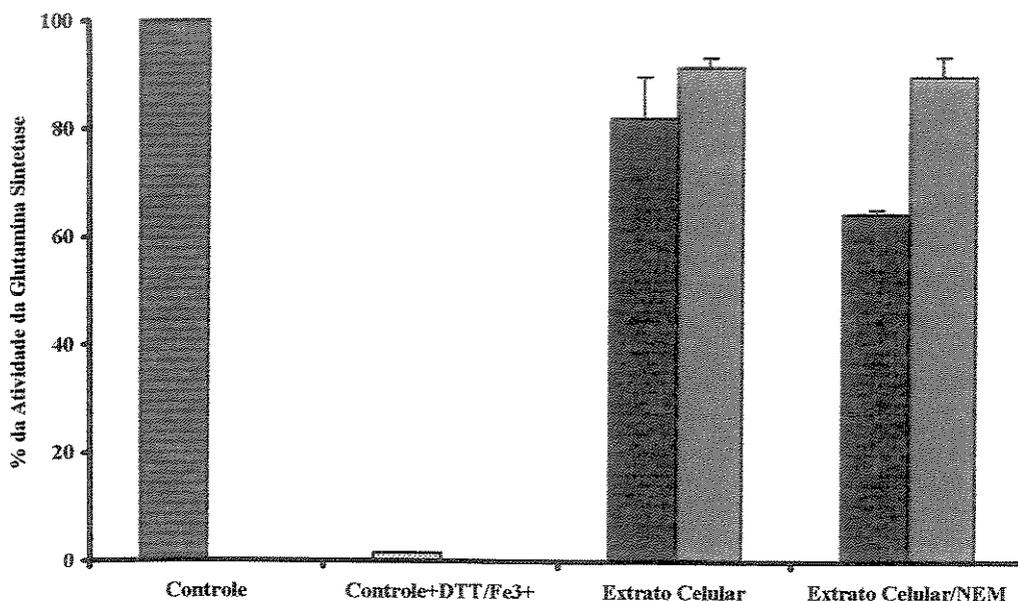


Figura 7: Proteção da glutamina sintetase contra o sistema DTT/Fe³⁺/O₂ pela Triparedoxina peroxidase de extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas das cepas Y (■) e Tulahuen 2 (▨), tratados ou não com N-etilmaleimida. A mistura de inativação continha 0,02M DTT, 7μM Fe³⁺, 0,1M HEPES pH 7,4, 0,07mg/mL glutamina sintetase e 5,6mg/mL de extrato celular de *T. cruzi* epimastigotas previamente tratados, ou não, com 0,001M N-etilmaleimida (NEM). O controle (■) continha apenas 0,07 mg/mL glutamina sintetase e o controle com o sistema oxidativo (▨) continha a mistura de inativação na ausência de extrato celular. As reações foram realizadas por 15 min à 30°C num volume total de 50μL. O ensaio para a atividade da glutamina sintetase e a preparação do extrato celular foram feitos como descrito em Materiais e Métodos (para as amostras com extrato celular não tratado, $P = 0,373$ e para as amostras com extrato celular pré-tratado com NEM, $P = 0,009$).

5. *Quantificação da triparedoxina peroxidase presente em extratos protéicos totais de Trypanosoma cruzi epimastigotas com diferentes dias de crescimento*

A presença desta proteína em extrato celular total de *T. cruzi* epimastigota foi determinada a partir de células em diferentes fases de desenvolvimento (fases lag, log e estacionária), como mostrado na Figura 8. Na coluna 14 foi utilizado como padrão 1,2 μ g de TSA purificada de *S. cerevisiae* e nas demais colunas foram aplicados 80 μ g de extrato celular total das cepas Y e Tulahuen 2 com diferentes dias de crescimento. O anticorpo utilizado foi anti-Tc21 de *T. cruzi* numa diluição de 1:150.

Utilizando-se o programa ImageMaster[®] Total Lab versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech, variações na intensidade e, conseqüentemente, na quantidade de TXNp foram detectadas. Na Figura 8, as colunas 1 à 6 correspondem aos extratos protéicos totais da cepa Tulahuen 2 (Uruguai) referentes ao 8^o, 7^o, 6^o, 5^o, 4^o e 3^o dias de crescimento respectivamente. O terceiro dia de crescimento (Figura 8, coluna 6) é o que possui menor quantidade de TXNp (aproximadamente 2,4 μ g), enquanto que o oitavo dia (Figura 8, coluna 1) é o que possui a maior quantidade (por volta de 4,4 μ g). Com relação à cepa Y observou-se no quinto dia de crescimento (coluna 10), uma menor quantidade de TXNp (aproximadamente 1,6 μ g), enquanto que no oitavo dia de crescimento (Figura 8, coluna 7), há uma maior quantidade (aproximadamente 2,7 μ g). Observa-se que não há aumento ou diminuição progressivos com o desenvolvimento do *T. cruzi*; porém, o último dia de crescimento tanto da cepa Y (Figura 8, coluna 7) quanto da cepa Tulahuen 2 (Figura 8, coluna 1) correspondente à fase estacionária de desenvolvimento são os que possuem uma maior quantidade de TXNp. Vale a pena ressaltar que ao se comparar as cepas entre si, pode-se verificar uma intensidade muito maior das bandas da cepa Tulahuen 2 do que a encontrada na Y.

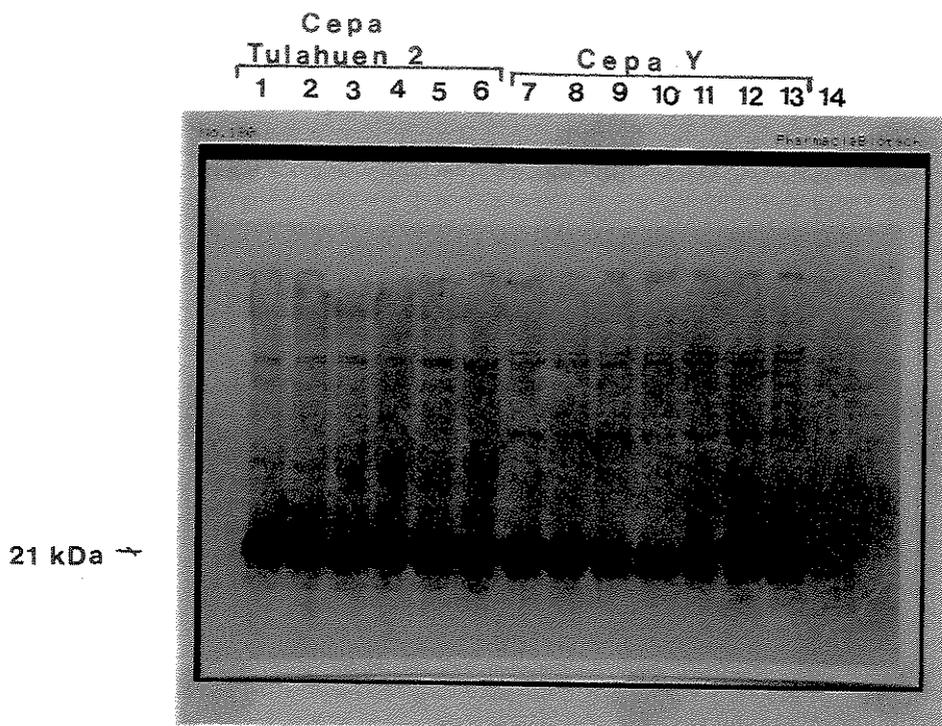


Figura 8: Comparação entre a quantidade de triparedoxina peroxidase existente em extrato protéico total de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas das cepas Y e Tulahuen 2 em diferentes fases do desenvolvimento celular. A presença desta enzima no extrato protéico total de *T. cruzi* epimastigotas foi determinada por Western blotting, utilizando anticorpo anti-Tc 21 de *T. cruzi* (diluição 1:150). Da Coluna 1 à 6: extratos celulares de *T. cruzi* da cepa Tulahuen 2 com 8, 7, 6, 5, 4 e 3 dias de crescimento (80µg), respectivamente; da coluna 7 à coluna 13: extratos celulares de *T. cruzi* da cepa Y com 8, 7, 6, 5, 4, 3 e 2 dias de crescimento (80µg), respectivamente; Coluna 14: TSA purificada de *S. cerevisiae* (1,20µg). A quantidade de TXNp estimada pelo programa ImageMaster® Total Lab, versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech é: Coluna 1: 4,3596µg; Coluna 2: 3,0583µg;; Coluna 3: 3,2918µg; Coluna 4: 3,0736µg; Coluna 5: 2,4392µg; Coluna 6: 2,7654µg; Coluna 7: 2,6770µg; Coluna 8: 2,2939µg; Coluna 9: 1,8038µg; Coluna 10: 1,5772µg; Coluna 11: 2,1939µg; Coluna 12: 2,1332µg; Coluna 13: 1,9565µg.

6. Identificação e quantificação da triparedoxina em extratos protéicos totais de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas das cepas Y e Tulahuen 2 com diferentes dias de crescimento

Na Figura 9 foram aplicados 75µg dos extratos das cepas Y (colunas 1 à 4) e Tulahuen 2 (colunas 5 à 8) com 3, 4, 5, e 6 dias de crescimento. O anticorpo utilizado foi anti-Cf₁₆ na diluição de 1:100. Este anticorpo é policlonal.

Analisando o resultado do Western blotting através do programa ImageMaster® Total Lab versão 1.0 da Amersham Pharmacia Biotech, observou-se um aumento progressivo na intensidade das bandas entre uma mesma cepa, indicando que a quantidade

de TXN parece estar ligada com a fase de desenvolvimento do parasita.

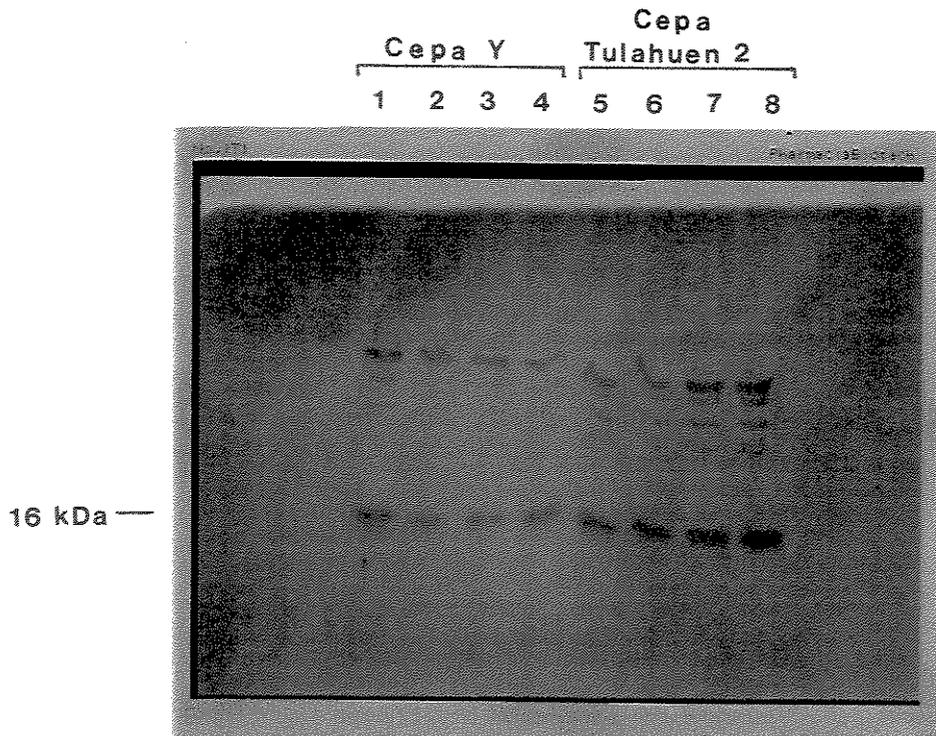


Figura 9: Comparação entre a quantidade de triparedoxina existente em extrato celular total de *T. cruzi* epimastigotas das cepas Y e Tulahuen 2 em diferentes fases do desenvolvimento celular. A presença desta enzima no extrato proteico de *T. cruzi* epimastigota foi determinada por Western blotting, utilizando anticorpo anti-Cf₁₆ de *C. fasciculata* (diluição 1:100). Da Coluna 1 à Coluna 4: extratos celulares de *T. cruzi* da cepa Y com 3, 4, 5 e 6 dias de crescimento (75µg), respectivamente; da Coluna 5 à Coluna 8: extratos celulares de *T. cruzi* da cepa Tulahuen 2 com 3, 4, 5 e 6 dias de crescimento (75µg), respectivamente.

7. Presença da triparedoxina peroxidase em “shedding” de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y com 5 dias de crescimento

Na Figura 10, observa-se a liberação da TXNp ao meio extracelular pelo *T. cruzi* epimastigota e tripomastigota da cepa Y. Os “sheddings” de *T. cruzi* foram cedidos gentilmente pelo Dr. Jorge Alberto López e preparados de acordo com Materiais e Métodos. Entretanto cada solução continha um número diferente de células, não permitindo a comparação entre as formas, mas somente se estava ocorrendo liberação da TXNp para o meio.

Utilizou-se anticorpo anti-Cf₁₆ de *T. cruzi* (diluição 1:100) e TSA purificada de *S. cerevisiae* como padrão (0,24µg) tendo como objetivo determinar se o anticorpo contra

Cf₁₆ conseguiria reconhecer a TSA de levedura (Figura 10, coluna 5). Nenhuma banda foi reconhecida nas linhas 1, 2 e 3, correspondente respectivamente aos extratos das cepas Y, Y (CT-IOC 106) e Tulahuen 2 (CT-IOC 296). Já a cepa Tulahuen 2 do Uruguai (Figura 10, coluna 4) apresentou uma banda nítida, aproximadamente 72% mais intensa que o padrão. A coluna 6, correspondente ao “shedding” da forma epimastigota, apresentou uma banda discreta, menos intensa do que a conseguida com a TSA purificada (cerca de 82% em relação ao padrão), muito menor do que a vista na forma tripomastigota (Figura 10, coluna 7), que resultou em uma banda mais visível.

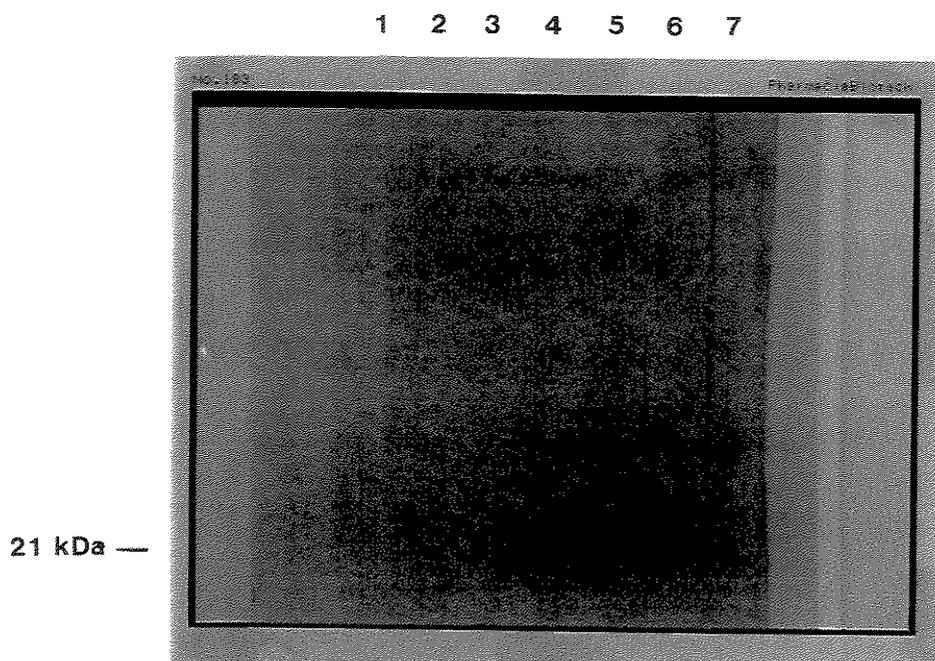


Figura 10: Determinação da presença de triparedoxina peroxidase em “shedding” de *T. cruzi* epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y. A presença desta enzima no shedding de *T. cruzi* epimastigota e tripomastigota foi determinada por Western blotting utilizando extratos protéicos totais em início de fase estacionária de crescimento. Foram aplicados 47µg de proteína, 4µL de shedding de epimastigotas e 10µL de shedding de tripomastigotas, utilizando anticorpo anti-Cf₁₆ de *C. fasciculata* (diluição 1:100). Coluna 1: cepa Y; Coluna 2: cepa Y (CT-IOC 106); Coluna 3: cepa Tulahuen 2 (CT-IOC 296); Coluna 4: cepa Tulahuen 2 do Uruguai.; Colunas 6 e 7: respectivamente “shedding” de epimastigotas e “shedding” de tripomastigotas; Coluna 5: TSA purificada de *S. cerevisiae* (0,24µg).

DISCUSSÃO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

A presença da TXNp em extratos celulares protéicos totais de *T. cruzi* epimastigota nas diferentes cepas foi determinada por Western blotting (Figura 4). Bandas de intensidades diferentes foram observadas, apresentando a cepa Tulahuen 2 (Uruguai) uma banda de maior intensidade. Diferenças também foram observadas entre cepas Tulahuen com origens geográficas diferentes.

A cepa Tulahuen 2 do Uruguai apresentando uma maior sensibilidade às drogas antichagásicas e uma maior concentração de TXNp como evidenciado pelos dados do Western blotting, vem dar suporte aos dados descritos na literatura que os efeitos deletérios dessas drogas não devem estar ligados diretamente à geração de H_2O_2 (Maya *et al*, 1997).

Baseado no mecanismo de inativação oxidativa da GS, foram realizados ensaios para se determinar, indiretamente, a atividade enzimática da TXNp presente em extratos protéicos totais de *T. cruzi*.

Na Figura 5, os resultados obtidos com a cepa Y mostraram uma diminuição significativa da proteção da GS ao se aumentar o tempo de incubação ($P = 0,053$ para os resultados obtidos nos tempos 10 e 60 minutos). Já para a cepa Tulahuen 2 o aumento do tempo não promoveu alterações na proteção. Por conter uma quantidade maior de TXNp e provavelmente uma regeneração mais rápida da mesma, a sua capacidade de proteger macromoléculas contra o dano oxidativo parece ser independente do tempo de incubação.

Quanto maior a concentração de extrato protéico e, conseqüentemente de TXNp, maior a proteção conferida à GS (Figura 6). Isto foi nitidamente verificado em pequenas concentrações de extrato celular (0,7mg/mL de proteína total), onde a cepa Y demonstrou menor proteção à GS do que a Tulahuen 2 ($P = 0,001$ entre seus resultados). Já a partir de 1,4mg/mL de extrato celular total, cada uma das cepas separadamente manteve um índice de proteção praticamente constante, pois a porcentagem de atividade da GS aumentou sensivelmente, não sendo significativa a variação encontrada entre um resultado e outro. Foram observadas diferenças nessa proteção quando se comparou ambas as cepas a partir de 1,4mg/mL de proteína; entretanto, elas não foram consideradas significativas ($P = 0,173, 0,707$ e $0,494$ para 1,4, 4,2 e 5mg/mL respectivamente) (Figura 6).

Com esses resultados pôde-se concluir que a TXNp de *T. cruzi* existente em extrato celular total do parasita possui atividade detoxificadora de hidroperóxidos *in vitro* quando se utiliza como sistema oxidante DTT/ Fe^{3+}/O_2 . Como a TSA, ela é capaz de

proteger macromoléculas da ação do H_2O_2 e dos produtos de seu metabolismo através de sua regeneração por compostos tiólicos.

As proteínas do sistema de detoxificação de hidroperóxidos dos tripanossomatídeos (TR, T(SH)₂, TXN e TXNp) possuem em sua estrutura grupos tiólicos responsáveis pelo fluxo de equivalentes reduzidos no sistema redox. Como isso está implicado no princípio catalítico desse tipo de proteína, Nogoceke e colaboradores, 1997, testaram a susceptibilidade da Cf₁₆ e da Cf₂₁ ao NEM e a iodoacetamida, reagentes de modificação específicos para cisteína que alquilam este aminoácido, fazendo a proteína perder sua função (Nogoceke *et al*, 1997). Cf₁₆ em sua forma reduzida foi irreversivelmente inativada pelos agentes alquilantes e na forma oxidada se mostrou inerte contra a S-alquilação. Cf₂₁ reduzida foi susceptível à inibição por NEM, mas oxidada não, pois o NEM é um reagente de modificação específico para cisteínas, que contém sulfidrilas, e não por seu dímero, a cistina, que contém pontes dissulfeto (Nogoceke *et al*, 1997).

Em nossos resultados, uma diminuição da porcentagem de atividade da GS foi observada quando se incubou o extrato celular protéico total com NEM em comparação ao extrato submetido ou não (controle) ao sistema oxidante DTT/Fe³⁺/O₂ (Figura 7). Assim, o NEM alquila os resíduos de cisteína funcionais da TXNp e não da TXN, pois esta pode se encontrar oxidada. Sua alquilação leva à inativação da enzima por interrupção do fluxo de equivalentes reduzidos, promovendo assim a diminuição na proteção da GS.

Porém, nos experimentos com o extrato protéico total, o NEM (1mM) promoveu um efeito muito pequeno em extratos da cepa Tulahuen 2 (Figura 7, barras verdes) (*P* de 0,898 entre extrato celular sem tratamento e pré-tratado com o agente alquilante). O mesmo não ocorreu com a cepa Y (Figura 7, barras azuis), que apresentou uma variação significativa entre os extrato não tratado e pré-tratado (*P* = 0,057). Este resultado confirma os do Western Blotting (Figura 4), entretanto a concentração de NEM usada não parece ter sido suficiente para oxidar a TXNp que se encontra em maior concentração na cepa Tulahuen 2.

Quando Nogoceke e colaboradores identificaram a Cf₂₁, observaram que esta enzima possuía homologia com uma proteína, produto de um gene associado à proliferação celular de células epiteliais mamárias de humanos (Nogoceke *et al*, 1997). Neste sentido, foi verificado se havia uma variação na concentração das TXN e TXNp nas diferentes fases

de crescimento das duas cepas estudadas. A Figura 8 mostrou um aumento na quantidade de TXNp na fase estacionária de desenvolvimento para ambas as cepas. Entretanto, a TXNp não deve participar diretamente da proliferação celular, pois na fase log não se vê quantidades maiores da enzima (Figura 9, colunas 2, 3 e 4 da cepa Y e colunas 7 e 8 da cepa Tulahuen 2).

Foi observado para a TXN um aumento progressivo relacionado ao desenvolvimento do parasita. Ao contrário da Y, a cepa Tulahuen 2 possui quantidades muito semelhantes de TXN em todos os dias de crescimento, tendo um ligeiro aumento nesta quantidade com o passar do desenvolvimento do parasita (Figura 9, da coluna 5 à coluna 8). Além disso, ela possui mais TXN do que a Y em todos os dias de crescimento (Figura 9). Esta diferença na quantidade de TXN é mais facilmente observada na cepa Y por esta ter uma quantidade menor de TXN.

Para se verificar a liberação para o meio extracelular de TXNp por *T. cruzi* epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y em condições de estresse, TXNp foi detectada por Western blotting (Figura 10, colunas 6 e 7) no "shedding" dessas células. Apesar do número de células tripomastigotas usado ter sido maior do que a de epimastigotas pode-se observar que esta proteína é liberada para o meio extracelular. Essa liberação em condições de estresse sugere a tentativa do parasita em se proteger das condições adversas do meio.

Este trabalho abre caminho para um estudo da expressão da TXNp e da TXN, a fim de caracterizar melhor em que condições elas são mais sintetizadas. Isto pode ser feito tanto em situações de desafio com hidróperóxidos quanto em situações normais de crescimento em meio de cultura. Esses resultados poderão trazer a definição de qual enzima possui maior importância na resistência diferenciada entre as cepas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo, Cláudio. Dr. Carlos Chagas – médico, sanitarista e cientista. [online] Disponível na Internet via WWW.URL:<http://netium.com.br/Icpa/Doença.htm>, 1999.
- Bailey, S., Smith, K., Fairlamb, A. H. & Hunter, W. H. (1993) Substrate interactions between trypanothione reductase and N¹-glutathionylspermidine disulphide at 0.28nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, **213**: 67-75.
- Benain, G., Losada, S., Gadelha, F. R. & Docampo, R. (1991) A calmodulin-activated (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase is involved in transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **280**: 715-720.
- Boveris, A., Sies, H., Martino, E., Docampo, R., Turrens, J. & Stoppani, A. (1980) Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.*, **188**: 643-648.
- Bushweller, J. H., Billeter, M., Holmgren, A. & Wüthrich, K. (1994) The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **235**: 1585-1597.
- Callahan, H. L. & Beverley, S. M. (1991) Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, **266**: 18427-18430.
- Callahan, H. L., James, E. R. & Crouch, R. K. Oxidants and anti-oxidants in trypanosomiasis and leishmaniasis. In: ____. *Free Radicals in Tropical Diseases*. Switzerland: Harewood Academic Publishers, 1993. p. 81-110.
- Camargo, E. P. (1964) Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Ver. Inst. Med. Trop.*, **6**: 93-100.
- Canesin, M. F. & Barreto, A. C. P. *Rev. Soc. Cardiol. Est. S.P.*, **2**, 233-239, 1997.
- Carnieri, E. G. S., Moreno, S. N. J. & Docampo, R. (1993) Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **61**: 79-86.
- Chae, H., Kim, I., Kim, K. & Rhee, S. (1993) Cloning, sequencing and mutation of a thiol - specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 16815-16821.
- Chae, H. Z., Chung, S. J. & Rhee, S. G. (1994a) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.*, **269**: 27670-27678.

- Chae, H. Z., Uhm, T. B. & Rhee, S. G. (1994b) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine-47. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 7022-7026.
- Chae, H. Z., Robinson, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G. & Rhee, S. G. (1994c) Cloning and sequencing of a thiol specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 7017-7021.
- Chae, H. Z., Kang, S. W. & Rhee, S. G. (1999) Isoforms of mammalian peroxiredoxins that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.*, **300**: 219-226.
- Clark, D., Albrecht, M & Arévalo, J. (1994) Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **66**: 143-145.
- Dias, João Carlos Pinto. *Epidemiology of Chagas' Disease*. [online] Disponível na Internet via WWW.URL:<http://dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html>, 1992.
- Díaz de Toranzo, E. A., Castro, J. A., Franke de Cazzulo, B. M. & Cazzulo, J. J. (1988) Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experienta (Basel)*, **44**: 880-881.
- Docampo, R., Moreno, S. N. J., & Cruz, F. S. (1988) Enhancement of the cytotoxicity of crystal violet against *Trypanosoma cruzi* in the blood by ascorbate. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **27**: 241-248.
- Docampo, R. (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem.-Biol. Interac.*, **73**: 1-27.
- Docampo, R. & Moreno, S. N. J. (1996) The hole of calcium in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol. Today.*, **12**, 61-65.
- El-Sayed, N., Alarcon, C., Beck, J., Sheffield, V. & Donelson, J. (1995) cDNA expressed tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into the biology of the parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **73**: 75-90.
- Epp, O., Ladenstein, R. & Wendel, A. (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, **133**: 51-69.

- Fernandez-Gomez, R., Esteban, S., Gomez-Corvera, R., Kherrouche, Z. & Ouaiissi, A. (1998) *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.*, **160**: 3471-3479.
- Flohé, L., Hecht, H. J. & Steinert, P. (1999a) Glutathione and trypanthione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Rad. Biol. Med.*, **27**: 966-984.
- Flohé, L., Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Montemartini, M. & Steinert, P. Putative catalytic mechanism of tryparedoxin-peroxidase from *Crithidia fasciculata*. In: Clayton, C., Steverding, D. & Krauth-Siegel, R. L. Proceedings of the 2nd Colloquium on Trypanosoma and Leishmania Research. Heidelberg, Germany; 1999b.
- Giulivi, C., Turrens, J. F. & Boveris, A. (1988) Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem. Parasitol.*, **30**: 243-252.
- Gommel, D. U., Nogoceke, E., Morr, M., Kiess, M., Kalisz, H. M. & Flohé, L. (1997) Catalytic characteristics of tryparedoxin. *Eur. J. Biochem.*, **248**: 913-918.
- Gorla, N. B., Ladesma, O. S., Barbieri, G. P. & Larripa, I. B. (1989) Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutat. Res.*, **244**: 263-267.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol.Chem.*, **177**: 751-766.
- Guerrero, S. A., Flohé, L., Kalisz, H. M., Montemartini, M., Nogoceke, E., Hecht, H-J., Steinert, P. & Singh, M. (1999) Sequence, heterologous expression and functional characterization of tryparedoxin1 from *Crithidia fasciculata*. *Eur. J. Biochem.*, **259**: 789-794.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: _____. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, 1989. 543p. p.86 - 187.
- Holmgren, A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13963-13966.
- Ianni, B. M. & Mady, C. (1998) Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas - é eficaz o tratamento etiológico? *Arq. Bras. Cardiol.*, **70**: 59 - 61.

- Ismail, S. O., Paramchuk, W., Skeiky, Y. A. W., Reed, S. G., Bhatia, A. & Gedamu, L. (1997) Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **86**: 187-197.
- Jacoby, E. M., Schlichting, I., Lantwin, C. B., Kabsch, W & Krauth-Siegel, R. L. (1996) Cristal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase-mepacrine complex. *Prot. Struc. Gen.*, **24**: 73-80.
- Kim, K., Lim, I., Lee, K., Rhee, S. & Stadman, E. (1988) The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol /Fe (III)/O₂ mixed - function oxidation system. *J. Biol. Chem.*, **263**: 4704 - 4711.
- Kim, I.-H., Kim, K., Lee, K. & Rhee, S. G. (1989) Induction of an antioxidant protein of *Saccharomyces cerevisiae* by O₂, Fe³⁺ or 2-mercaptoethanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**: 6018.
- Koenig, K., Menge, U., Kiess, M., Wray, V & Flohé, L. (1997) Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 11908-11915.
- Krauth-Siegel, R. L. & Lüdemann, H. (1996) Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **80**: 203-208.
- Lima, M.F. & Villalta, F. (1989) *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **33**: 159-170.
- Loferer, H. & Hennecke, H. (1994) Protein disulphide oxidoreductase in bacteria. *TIBS.*, **19**: 169-171.
- Lopez, J. A., Carvalho, T. U., Souza W., Flohé, L., Guerrero, S. A., Montemartini, M., Kalisz, H. M., Nogoceke, E., Singh, M., Alves. M. J. M. & Colli, W. (2000) Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**: 767-772.
- Lüdemann, H., Dormeyer, M., Sticherling, C., Stallmann, D., Follmann, H. & Krauth-Siegel, R. L. (1998) *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Lett.*, **431**: 381-385.

- Maiorino, M., Aumann, K.-D., Brigelius-Flohé, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F. & Flohé, L. (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*, **376**: 651-660.
- Maya, J. D., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J. M., Tellez, R., Gaule, C. & Morello, A. (1997) Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **86**: 101-106.
- Meirelles, M. N. L., Martinez-Palomo, A. C., Souto-Padron, T. & de Souza, W. (1983) Participation of concanavalin a binding sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. *J. Cell Sci.*, **62**: 287-299.
- Meziane-Cherif, D., Aumereier, M., Kora, I., Sergheraert, C., Tartar, A., Dubremetz, J. F. & Ouaissi, M. A. (1994) *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization of trypanothione reductase. *Exp. Parasitol.* **79**: 536-541.
- Montemartini, M., Nogoceke, E., Singh, M., Steinert, P., Flohé, L. & Kalisz, H. M. (1998a) Sequence analysis of the tryparedoxin peroxidase gene from *Crithidia fasciculata* and its functional expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **273**: 4864-4871.
- Montemartini, M., Kalisz, H. M., Kiess, M., Nogoceke, E., Singh, M., Steinert, P. & Flohé, L. (1998b) Sequence, heterologous expression and functional characterization of a novel tryparedoxin from *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.*, **379**: 1137-1142.
- Montemartini, M., Kalisz, H. M., Hecht, H. J., Steinert, P. & Flohé, L. (1999) Activation of active site cysteine residues in the peroxiredoxin-type tryparedoxin peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur. J. Biochem.*, **264**: 516-524.
- Moreno, S. N. J., Vercesi, A. E., Pignataro, O. P. & Docampo, R. (1991) Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: presence of inositol phosphates and lack of an inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive calcium pool. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **52**, 251-262,.
- Moreno, S. N. J., Silva, J., Vercesi, A.E. & Docampo, R. (1994) Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.*, **180**: 1535-1540.

- Morello, A. (1988) The biochemistry of the mode of action of drugs and detoxication mechanism in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90c**: 87-91.
- Morgan, R., Christman, M. F., Jacobsen, F. S., Storz, G. & Ames, B. N. (1986) Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**: 8059-8063.
- Myler, P. J., Audleman, L., de Vos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A. & Stuart, K. (1999) *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**: 2902-2906.
- Netto, L. E. S. & Stadtman, E. R. (1996) The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a bifasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**: 233-242.
- Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S., Rhee, S. G. & Stadtman, E. R. (1996) Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *The J. Biol. Chem.*, **271**: 15315 - 15321.
- Nicotera, P., Bellomo, G. & Orrenius, S. (1990) The role of Ca^{2+} in cell killing. *Chem. Res. Toxicol.*, **3**: 484 - 494.
- Nogoceke, E., Gommel, D., Kiess, M., Kalisz, H. & Flohé, L. (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.*, **378**: 827 - 836.
- Nussenzweig, V., Sonntag, R., Biancalana, A., Pedreira de Freitas, J. L., Amato Netto, V. & Kloetzel, J. (1953) Ação de corantes trifeníl-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Emprego de violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. *Hospital (Rio de Janeiro)*, **44**: 731-744.
- Opperdoes, Fred. Treatment of Chagas' Disease. [online] Disponível na Internet via WWW.URL:<http://icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/chagas4.htm>, 1997.
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. & Nicotera, P. (1989) Role of calcium in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**: 281- 285.
- Oz, H. S., Wittner, M., Tanowitz, H. B., Bilezikian, J. P., Saxon, M. & Morris, S. (1992) *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of intracellular calcium homeostasis. *Exp. Parasitol.*, **74**: 390-399.

- Prospéri, M., Ferbus, D., Karczinski, I. & Goubin, G. (1993) A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J. Biol. Chem.*, **268**: 11050-11056.
- Ramirez, M. I., Ruiz, R. C., Araya, J. E., da Silveira, J. F. & Yoshida, N. (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host-cell invasion. *Infec. Immun.*, **61**: 3636-3641.
- Reckenfelderbäumer, N., Lüdemann, H., Schmidt, H., Steverding, D. & Krauth-Siegel, L. (2000) Identification and functional characterization of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Biol. Chem.*, **275**: 7547-7552.
- Repetto, Y., Opazo, E., Maya, J. D., Agosin, M. & Morello, A. (1996) Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. *Comp. Biochem. Physiol.*, **115 B**: 281-285.
- Reszka, K., Cruz, F. S. & Docampo, R. (1986) Photosensitization by the trypanocidal agent crystal violet - type I versus type II reactions. *Chem. Biol. Interact.*, **58**, 161-172.
- Rey, L. Flagelados parasitos do sangue e dos tecidos: *Trypanosomatidae*. In: _____. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991a. p. 115-127.
- Rey, L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: o parasito. In: _____. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991b. p. 128-137.
- Rhee, S. G., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. (1985) Glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, **113**: 213-241.
- Ribeiro, A. L. P. & Rocha, M. O. C. (1998) Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações a cerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **31**: 301-314.
- Ridgley, E. L., Xiong, Z. & Ruben, L. (1999) Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem. J.*, **340**: 33-40.
- Roberts, L. S. & Janovy Jr., J. Kinetoplastida: trypanosomes and their kin. In: Schmidt, G. D. & Roberts, L. S. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. Wm. C. Brown Publishers, 1996. p. 53-80.

- Ruiz, R. C., Rigoni, V. L., Gonzalez, J. C. & Yoshida, N. (1993) The 35/50kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host-cell invasion. *Par. Immunol.*, **15**: 121-125.
- Short, A., Bian, J., Ghost, T., Waldron, R., Rybak, S. & Gill, D. (1993) Intracellular calcium pool content is linked to control of cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 4986-4990.
- Smith, K., Opperdoes, F. R. & Fairlamb, A. H. (1991) Subcellular distribution of trypanothione reductase in blood stream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **48**: 109-112.
- Smith, K., Nadeau, K., Bradley, M., Walsh, C. & Fairlamb, A. H. (1992) Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Protein Sci.*, **1**: 874-883.
- Souza, W. de. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brener, Z., Andrade, Z. A. & Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 431p. p. 88-126.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A. & Zingales, B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **83**: 141-152.
- Stadtman, E. R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.*, **9**: 315-325.
- Steinert, P., Dittmar, K., Kalisz, H. M., Montemartini, M., Nogoceke, E., Singh, M. & Flohé, L. (1999) Cytoplasmic localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**: 844-849.
- Tannich, E., Bruchhaus, I., Walter, R. D. & Horstmann, R. D. (1991) Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **49**: 61-72.
- Tanowitz, H. B., Kerchhoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M. & Wittner, M. (1992) Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**: 400 - 419.
- Tardieux, I., Nathanson, M.H. & Andrews, N. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. *J. Exp. Med.*, **179**: 1017-1022.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- Temperton, N. J., Wilkinson, S. R., Meyer, D. J. & Kelly, J. M. (1998) Overexpression of a superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **96**: 167-176.
- Tetaud, E. & Fairlamb, A. H. (1998) Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **96**: 111-123.
- Webb, J., Campos-Neto, A., Ovendale, P., Martin, T., Stromberg, E., Badaro, R & Reed, S. (1998) Human and murine responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect. Immun.*, **66**: 3279-3289.
- Welburn, S. C., Dale, C., Ellis, D., Beecroft, . & Pearson, T. W. (1996) *Cell Death. Differ.* **3**: 229-236.
- Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A. & Kelly, J. M. (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **275**: 8220-8225.
- Wizel, B., Garg, N. & Tarleton, R. L. (1998) Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.*, **66**: 5073-5081.
- World Health Organization. Twelfth programe report of UNDP/ World Bank/ WHO Special programe for research and training in tropical diseases (TDR). WHO. Geneve, 1995.
- World Health Organization/Division of Control of Tropical Disease [online] Disponível na Internet via WWW.URL: <http://who.int/ctd/html/chagcsstrat.html> , 1998a.
- World Health Organization/Division of Control of Tropical Disease [online]. Disponível na Internet via WWW.URL: <http://who.int/ctd/html/chagdat/html> , 1998b.
- Yoshida, N., Mortara, R. A., Araguth, M. F., Gonzalez, J. C. & Russo, M. (1989) Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, **57**: 1663-1667.

Zingales, B. & Colli, W. *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. In: _____. Current topics in microbiology and immunology. Heidelberg: Springer-Verlag, 1985. p. 129-152.

ANEXO I

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Rodrigues, R. V., Netto, L. E. S. & Gadelha, F. R. Characterization of a thiol-specific antioxidant enzyme in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Simpósio Internacional sobre Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 Anos após a sua Descoberta. Rio de Janeiro, Abril, 1999.

Rodrigues, R. V., Netto, L. E. S. & Gadelha, F. R. Characterization of a thiol-specific antioxidant enzyme in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. Caxambu, 1999.

MANUSCRITO EM PREPARO

Characterization of tryparedoxin peroxidase on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes from two different phylogenetic lineages.