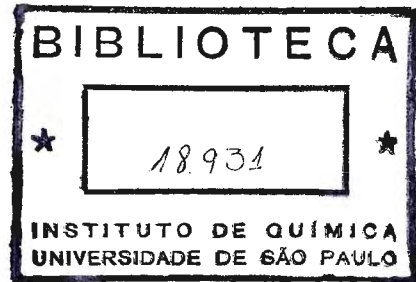


Recebido em 27/05/10



**INSTITUTO DE QUÍMICA**

USP



**sistema  
peroxidase tripanotiona-dependente  
em *Trypanosoma cruzi***

**jorge alberto lópez rodríguez**

**são paulo  
2000**

0-1  
18931  
18931



# "Sistema Peroxidase Tripanotiona- Dependente em *Trypanosoma cruzi*".

**JORGE ALBERTO LÓPEZ RODRÍGUEZ**

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS - ÁREA: BIOQUÍMICA.

**Aprovado por:**

---

**Profa. Dra. MARIA JÚLIA MANSO ALVES**  
IQ - USP  
(Orientadora e Presidente)

---

**Profa. Dra. VIRGÍNIA BERLANGA CAMPOS JUNQUEIRA**  
IQ - USP

---

**Prof. Dr. JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA FILHO**  
UNIFESP

---

**Prof. Dr. PAULO LEE HO**  
IB

---

**Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETO**  
IB - USP

**SÃO PAULO**  
**20 DE JUNHO DE 2000.**

a

Aldo, Virginia e Beto, Sonia, Alexandre, Luiz,  
Fátima, Roberto, Doña Ángela, Alzira, Edith,  
Roseli, Marinêi, Renata e Marinêz, para  
quem:

"cultivo una rosa blanca  
en julio como en enero,  
para el amigo sincero  
que me da su mano franca..."

(Versos Sencillos XXXIX de José Martí)

## **agradecimentos**

Desejo mui reconhecidamente, agradecer a Bayardo B. Torres, a Célia L. Braga, a Cibele R. Carlos, a Débora R. de Oliveira, a Flávio Maximiano, a Henryk Kalisz, a Iolanda M. Cuccovia, a J. Ribamar S. Ferreira Jr., Luciano Fietto, a M. Inês Cardillo, a Maria Júlia M. Alves, a Marisa Montemartini, a Milton C.S. Oliveira, a Telma Schwindt, a Walter Colli, assim como a todas as **PESSOAS**, que de uma maneira ou de outra, se envolveram com este trabalho, pelo estímulo e pelo encorajamento, recebidos, algumas vezes, na forma de críticas cruas e merecidas, bem como pela visão e perspectivas científicas e, também, de vida que por elas me foram apresentadas.

Ainda, expresso o agradecimento às **PESSOAS** e aos **ÓRGÃOS DE FOMENTO CIENTÍFICO** que, dotados de alto espírito científico, contribuíram generosamente com valiosas informações, com doações e outros suportes materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

## resumo

*Trypanosoma cruzi*, causador da tripanossomíase americana, é um microrganismo exposto a uma variedade de espécies reativas de oxigênio, geradas como consequência do metabolismo de drogas tripanocidas, ou pelo hospedeiro como resposta fisiológica à invasão, além daqueles produzidos internamente em consequência dos processos oxidativos do parasita. Em qualquer circunstância, as células precisam proteger-se contra os produtos da redução parcial do oxigênio.

Os tripanossomatídeos são aparentemente deficientes na defesa antioxidante. Embora possuindo uma superóxido dismutase, carecem de glutathione peroxidase e catalase, que são necessárias para a remoção do peróxido de hidrogênio. Além disso, glutathione, o maior composto sulfidrílico antioxidante em células de mamíferos, está presente em baixas concentrações nos tripanossomatídeos. No seu lugar, têm um composto *sui generis*, um conjugado de glutathione e de espermidina, conhecido como tripanotiona (N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-bis(glutathionil)espermidina), o qual junto com a tripanotiona redutase e o sistema peroxidase tripanotiona-dependente, parece estar envolvido no mecanismo de defesa antioxidante em *Crithidia fasciculata*. Este sistema parece existir em outros tripanossomatídeos, representando um importante alvo quimioterápico.

A existência deste sistema metabólico em *T. cruzi* foi demonstrada inicialmente por uma baixa atividade peroxidásica tripanotiona-dependente, detectada em extratos celulares de formas epimastigotas e tripomastigotas. Imunoquimicamente, a existência deste sistema foi evidenciada ao se usar anticorpos heterólogos contra triparredoxina (Cf16) e triparredoxina peroxidase (Cf21) de *C. fasciculata*. Enquanto a reatividade em epimastigotas de *T. cruzi* é homogeneamente distribuída no citoplasma, as formas tripomastigotas apresentam uma reatividade descontínua localizada próxima à membrana plasmática. Os mesmos anticorpos policlonais foram utilizados para identificar por Western blot, as proteínas correspondentes em *T. cruzi*, sendo reconhecidas duas proteínas com massas moleculares aparente de 16 e 21 kDa, Tc16 e Tc21, respectivamente.

Oligonucleotídeos foram então sintetizados baseados em regiões conservadas de seqüências codantes de DNA de peroxirredoxinas de tripanossomatídeos e de outros organismos e utilizados em ensaios de PCR com cDNA, amplificando-se um produto de 525 pb. Esta seqüência parcial apresentou uma homologia de 75% com o gene da triparredoxina peroxidase de *C. fasciculata*. No mesmo período foi depositada no GenBank (acc. nº. AJ012101) uma seqüência codante para uma

proteína do tipo peroxirredoxina em *T. cruzi* e que apresentou uma homologia de 100% em relação à seqüência (correspondente às posições 1 a 525 de Acc. Nr. AJ012101).

Utilizando a seqüência publicada, novos oligonucleotídeos correspondentes às regiões 5' e 3' foram desenhados, o gene putativo da triparredoxina peroxidase em *T. cruzi* (Tc21) foi amplificado a partir de DNA de *T. cruzi* por PCR, o produto clonado no vetor pET21b(+) e expresso em *E.coli* BL21(DE3). A proteína obtida apresentou atividade de tripanotiona peroxidase. Esta enzima, a triparredoxina peroxidase é membro de uma família de proteínas antioxidantes, denominadas de peroxirredoxinas, que são caracterizadas pela presença de dois domínios conservados - VCP, contendo as cisteínas envolvidas na catálise.

Em relação à triparredoxina, apesar das várias tentativas empreendidas, o isolamento do respectivo gene foi infrutífero. No entanto, sua existência foi demonstrada por Western blot e imunofluorescência usando-se o anticorpo contra a triparredoxina de *C. fasciculata*. A triparredoxina de *C. fasciculata* é um membro da super-família das tiorredoxinas, com uma massa molecular de 16 kDa, maior que a tiorredoxina em vertebrados. Embora possuindo o motivo WCPPCR próximo à extremidade N-terminal, o qual é similar ao motivo WCGPCK(R), típico do sítio ativo das tiorredoxinas, a triparredoxina mostra uma baixa identidade em relação a estas últimas.

A demonstração da existência de triparredoxina, triparredoxina peroxidase e tripanotiona redutase em *T. cruzi* sugere similaridade com o sistema de peroxidase descrito em *C. fasciculata* e que a defesa antioxidante em *T. cruzi* envolve um sistema enzimático mediado por tripanotiona e dependente de NADPH.

As evidências disponíveis confirmam a existência do sistema peroxidase tripanotiona-dependente em *T. cruzi*, contrariando a afirmativa prévia da literatura que considerava a redução de peróxidos como uma reação não-enzimática. Esses resultados abrem a perspectiva de utilização do sistema como um potencial alvo para o desenvolvimento de quimioterápicos.

## abstract

The American trypanosome *Trypanosoma cruzi* is exposed to a variety of toxic oxygen metabolites normally produced by endogenous processes as well as by responses to drugs or the action of the immune system. In either case, the cells need to be protected against the products of the partial reduction of oxygen. Trypanosomes are particularly weak in antioxidant defenses. Although possessing superoxide dismutase activity, they lack glutathione peroxidase and catalase which are necessary for the removal of hydrogen peroxide. Moreover, glutathione, the major antioxidant sulphhydryl compound in mammalian cells, is present in low concentration in trypanosomes. Instead they contain a unique cofactor, a glutathione-spermidine conjugate, known as trypanothione (N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-bis(glutathionyl)spermidine) which together with its ancillary enzymes, trypanothione reductase and trypanothione-dependent peroxidase system, appears to play a central role in the antioxidant defense mechanism in *C. fasciculata*. This system seems to be widespread among trypanosomatids, being an important target for a direct chemotherapeutic attack.

The existence of this metabolic system in the human pathogen *T. cruzi* is supported by a low trypanothione-dependent peroxidase activity. It was found in crude extracts of epimastigote and trypomastigote forms using *t*-butyl hydroperoxide as oxidant. The existence of this metabolic pathway in *T. cruzi* is demonstrated by immunohistochemistry using antibodies raised against tryparedoxin (Cf16) and tryparedoxin peroxidase (Cf21) from *C. fasciculata*. Epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* display strong immunoreactivity by indirect immunofluorescence with these antibodies. While in epimastigotes immunofluorescence is homogeneously distributed in the cytoplasm, in trypomastigotes – the infective form for vertebrates – it appears in a discontinuous manner closer to the cytoplasmic side of the plasma membrane. These polyclonal antibodies were employed to identify, by Western blot, the corresponding *T. cruzi* proteins. Two proteins with apparent molecular masses of 16 and 21 kDa, Tc16 and Tc21, were, respectively, recognized.

In addition, oligonucleotides were synthesized using sequences based on the conserved regions of DNA coding sequence of peroxiredoxin from trypanosomatids and other organisms. Using these primers in PCR assays with cDNA, a product with 525 bp was amplified. This partial gene sequence shared identity with the homologous enzyme of *C. fasciculata*. The partial tryparedoxin peroxidase gene sequence of *T. cruzi* (Tc21) obtained up to this point (corresponding to positions 1 to



525) matched 100% with a published sequence presumed to encode a peroxiredoxin-type protein in *T. cruzi* (acc. nr. AJ012101).

Taking advantage of this full-length open reading frame, the putative Tc21 gene from *T. cruzi* was amplified from genomic DNA by PCR, cloned the PCR product into the vector pET21b(+) and expressed in *E. coli* BL21(DE3). Activity of tryparedoxin peroxidase was measured by an heterologous coupled system monitoring the NADPH consumption upon hydroperoxide addition. This enzyme is a member of the peroxiredoxin family of antioxidant proteins and is characterized by the presence of two conserved domains - VCP - containing redox active cysteines.

Although attempted, the isolation of the tryparedoxin gene was not successful. Notwithstanding, the existence of the protein was apparent as seen by Western blot and immunofluorescence using the *C. fasciculata* heterologous antibody. Tryparedoxin is a new member of the thioredoxin superfamily of proteins isolated from *C. fasciculata*. With a molecular weight of 16 kDa, it is larger than thioredoxin from vertebrates. Moreover, apart from the sequence motif WCPPC near its N-terminus, which is similar to the thioredoxin-type active site motif WCGPCK(R), tryparedoxin display low similarity to the classical thioredoxin. The active motif WCPPCR is common to all known tryparedoxins.

The demonstration of the existence of tryparedoxin, tryparedoxin peroxidase and trypanothione reductase in *T. cruzi* suggests that the antioxidant defense of this pathogenic protozoan also depends on the NADPH-fuelled, trypanothione-mediated enzymatic hydroperoxide metabolism, similarly to the *C. fasciculata* metabolic pathway.

As opposed to previous claims, the available evidence confirms the existence of trypanothione peroxidase activity in *T. cruzi*, making the enzymes system as molecular targets for the design of trypanocidal compounds.

## abreviaturas e símbolos

Cf16	triparredoxina de <i>C. fasciculata</i>
Cf21	triparredoxina peroxidase de <i>C. fasciculata</i>
Da	dalton
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	aceleração da gravidade
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropiltio- $\beta$ -D-galactosídeo
kDa	kilodalton
LB	meio de Luria-Bertani
LIT	infusão de fígado e triptose
LLC-MK <sub>2</sub>	células epiteliais de rim de macaco <i>Rhesus (Macaca mulata)</i>
NP-40	nonidet-P-40 (octilifenoxi)-polietoxietanol
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PMSF	fluoreto de <i>p</i> -fenilmetilsulfonila
Prx	peroxirredoxina
RT-PCR	transcriptase reversa e reação da polimerase em cadeia
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBS	solução salina tamponada com Tris
Tc16	triparredoxina de <i>T. cruzi</i>
Tc21	triparredoxina peroxidase de <i>T. cruzi</i>
TLCK	clorometilcetona de N- $\alpha$ - <i>p</i> -tosil-L-lisina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TS <sub>2</sub>	tripanotiona dissulfeto (forma oxidada)
T(SH) <sub>2</sub>	dihidrotripanotiona (forma reduzida)

## lista de tabelas

Tabela		página
1	Prevalência e incidência de casos de infecção humana por <i>T. cruzi</i> em países do Cone Sul (1985 - 1996)	6
2	Porcentagem de cura em grupos de camundongos inoculados com diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> e tratados com agentes quimioterápicos ativos	8
3	Identificação de potenciais alvos quimioterápicos em <i>T. cruzi</i>	9
4	Níveis de glutathione, glutathionylpermidine e dihydrotrypanothione	14
5	Velocidade inicial do metabolismo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por várias espécies de Tripanossomos e Leishmanias	28
6	Atividade enzimática do sistema peroxidase trypanothione-dependente em <i>C. fasciculata</i>	28

## lista de figuras

Figura		página
1	Distribuição geográfica da contaminação humana por <i>T. cruzi</i> e migração dos países endêmicos para os países desenvolvidos	4
2	Distribuição geográfica das principais espécies de triatomíneos que são vetores de <i>T. cruzi</i>	5
3	Glutationa	10
4	Tripanotiona	12
5	Fórmula molecular da homotripanotiona	13
6	Fluxo de equivalentes reduzidos de NADPH a hidroperóxido	15
7	Comparação de sistemas, dependentes de NADPH, que detoxificação hidroperóxido	17
8	Reatividade por imunofluorescência indireta de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) com o anticorpo contra Cf21 de <i>C. fasciculata</i>	30
9	Reatividade por imunofluorescência indireta de amastigotas e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) com o anticorpo contra Cf21 de <i>C. fasciculata</i>	31
10	Reatividade por imunofluorescência indireta de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) com o anticorpo contra Cf16 de <i>C. fasciculata</i>	32
11	Reatividade por imunofluorescência indireta de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) com o anticorpo contra Cf16 de <i>C. fasciculata</i>	33
12	Análise por "immunoblotting" após fracionamento de extrato celular total das formas de <i>T. cruzi</i> com o anticorpo anti-Cf21	35
13	Análise por "immunoblotting" após fracionamento de extrato celular total das formas de <i>T. cruzi</i> com o anticorpo anti-Cf16	36
14	Seqüências nucleotídica e de aminoácidos do gene da triparredoxina peroxidase de <i>T. cruzi</i>	37
15	pEt-Tc21 - Estrutura do plasmídeo usado para a expressão da triparredoxina peroxidase em <i>E. coli</i>	39
16	Análise da expressão da triparredoxina peroxidase recombinante por SDS-PAGE e "immunoblotting"	40

17	Análise da triparredoxina peroxidase recombinante purificada por SDS-PAGE e "immunoblotting"	41
18	Alinhamento de seqüências da triparredoxina peroxidase de <i>T. cruzi</i> com várias peroxirredoxinas putativas ou identificadas como peroxirredoxinas de vários organismos	42
19	Amplificação parcial de suposta seqüência da triparredoxina de <i>T. cruzi</i> e homologia com seqüências existentes no GenBank	44
20	Alinhamento da triparredoxina de <i>T. cruzi</i> com outras seqüências de proteínas homólogas identificadas em outros tripanossomatídeos	45
21	Reconstituição do sistema peroxidase tripanotiona-dependente de <i>T. cruzi</i>	47
22	Reatividade do anticorpo anti-Tc21 por "immunoblotting" nas frações solúvel e membranas de epimastigota e de tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	49
23	Reatividade do anticorpo anti-Cf16 por "immunoblotting" nas frações solúvel e membranas de epimastigota e de tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	50
24	Alinhamento das seqüências das peroxirredoxinas de <i>T. cruzi</i>	51

# Índice

**resumo**

**summary**

**abreviaturas e símbolos**

**lista de tabelas**

**lista de figuras**

	pág.
<b>1. introdução</b>	1
<b>1.1 tripanossomatídeos</b>	2
<b>1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	2
<b>1.3 quimioterapia</b>	7
<b>1.4 processo de detoxificação de peróxidos</b>	9
1.4.1 em células de mamíferos	9
1.4.2 em tripanossomatídeos	11
<b>1.5 objetivos</b>	18
<b>2. material e métodos</b>	19
<b>2.1 parasitas</b>	20
<b>2.2 preparação de extratos celulares de parasitas</b>	20
2.2.1 extrato celular total	20
2.2.2 extrato celular e obtenção de fração membranas	20
<b>2.3 determinação de concentração proteica</b>	20
<b>2.4 eletroforese</b>	20
2.4.1 eletroforese em gel de poliacrilamida	20
2.4.2 eletroforese em gel de agarose	21
<b>2.5 ensaio enzimático</b>	21
<b>2.6 obtenção de anticorpos</b>	21

<b>2.7</b>	<b>localização imunoquímica do antígeno</b>	21
2.7.1	reação de imunofluorescência indireta	21
2.7.2	Western-blot	22
<b>2.8</b>	<b>extração de DNA genômico de <i>Trypanosoma cruzi</i></b>	22
<b>2.9</b>	<b>extração de RNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> e síntese de cDNA</b>	22
<b>2.10</b>	<b>isolamento do gene da triparredoxina peroxidase</b>	23
2.10.1	amplificação parcial do gene	23
2.10.2	isolamento, clonagem e seqüenciamento do gene	23
2.10.3	expressão e purificação da Tc21 recombinante	24
<b>2.11</b>	<b>tentativa de isolamento do gene da triparredoxina</b>	25
<b>3.</b>	<b>resultados e discussão</b>	26
<b>3.1</b>	<b>resultados preliminares</b>	27
3.1.1	atividade enzimática em extratos celulares das formas de <i>T. cruzi</i>	27
3.1.2	imunodeteccção do sistema peroxidase tripanotiona-dependente	29
3.1.2.1	localização celular de triparredoxina e de triparredoxina peroxidase	29
3.1.2.2	análise por "imunoblotting"	34
<b>3.2</b>	<b>sistema peroxidase tripanotiona-dependente em <i>T. cruzi</i></b>	34
<b>3.2.1</b>	<b>isolamento e expressão do gene da triparredoxina peroxidase</b>	34
<b>3.2.2</b>	<b>tentativa de isolamento do gene da triparredoxina</b>	43
<b>3.2.3</b>	<b>demonstração da atividade de peroxidase tripanotiona-dependente</b>	46
<b>3.2.4</b>	<b>localização do sistema peroxidase tripanotiona-dependente</b>	46
<b>4.</b>	<b>conclusão</b>	52
<b>5.</b>	<b>referências bibliográficas</b>	54
<b>6.</b>	<b>anexos</b>	
	▪ publicações	
	▪ <i>curriculum vitae</i>	

## **1. introdução**



## 1.1 tripanossomatídeos

Os protozoários flagelados da família *Trypanosomatidae* estão entre os mais freqüentes patógenos de áreas tropicais e sub-tropicais.

Estes microrganismos têm complexos ciclos de vida, sendo alguns deles os agentes causadores de problemas tais como a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), a tripanossomiase africana (*T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*), leishmaniose cutânea (*Leishmania tropica*), leishmaniose visceral (*L. donovani*), e leishmaniose mucocutânea (*L. mexicana amazonensis*).

Muitos desses agentes patogênicos encontram-se em reservatórios silvestres e estima-se que mais de 30 milhões de pessoas sofrem infecções por tripanossomos e por leishmanias [102, 103].

## 1.2 *Trypanosoma cruzi*

Dentre as doenças parasitárias, encontra-se a doença de Chagas, cujo agente etiológico é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem *Kinetoplastidae* e à família *Trypanosomatidae*.

*Trypanosoma cruzi* é transmitido por insetos triatomíneos hematófagos da família *Reduviidae*, sendo os principais transmissores o *Panstrongylus megistus*, o *Triatoma infestans* e o *Rhodnius prolixus*. Os hospedeiros vertebrados somam uma grande variedade de espécies, incluindo o homem. O ciclo biológico do parasita se inicia quando triatomíneos se contaminam durante a ingestão de sangue de mamíferos infectados contendo a forma tripomastigota. Os parasitas ingeridos sofrem uma diferenciação para a forma epimastigota no lúmen intestinal do inseto, onde ocorre a proliferação parasitária, que, ao atingirem o intestino posterior, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, infectivas, eliminadas nas fezes e urina. A infecção pelo *T. cruzi* inicia-se quando os parasitas eliminados pelo inseto encontram uma descontinuidade na pele ou mucosa do vertebrado. No hospedeiro, os parasitas invadirão células, sofrendo uma diferenciação para a forma amastigota que é o estágio proliferativo no hospedeiro vertebrado. Estas se diferenciam sucessivamente para as formas epimastigotas intracelulares [2] e tripomastigotas, sendo estas últimas aquelas que poderão cair na circulação ou invadir diretamente novas células próximas [10].

A doença de Chagas pode apresentar duas fases, uma aguda e outra crônica. Frequentemente, as manifestações clínicas são brandas ou inexistentes, levando a que, no diagnóstico clínico, sejam considerados aspectos epidemiológicos associados à presença de anticorpos contra o parasita ou à presença do próprio *T. cruzi*. Na fase aguda da doença podem ser encontrados parasitas circulantes, enquanto que na fase crônica pode haver comprometimento cardíaco e de outros órgãos [10].

A doença de Chagas, juntamente com outras parasitoses (leishmaniose, malária e esquistossomose), é uma das doenças parasitárias mais sérias da América Latina, com um alto impacto sócio-econômico. Dados sorológicos indicam que 18 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi*, e que em torno de 100 milhões fazem parte do grupo de risco de contrair a infecção [26, 102, 103]. Como enfermidade enzoótica, a tripanosomíase americana tem uma difusão muito ampla, abrangendo praticamente as três Américas e estendendo-se a endemia a outros países devido à migração, como é mostrado na figura 1 [79].

A doença pode ser transmitida por vários mecanismos. O mais importante e já citado é a transmissão via inseto vetor, responsável por mais de 80% da contaminação de humanos pelo parasita. Os programas de saúde pública têm fomentado o controle domiciliar mediante o uso de inseticidas, na tentativa de interromper o ciclo de transmissão que envolve o vetor triatomíneo, permitindo que 89% dos municípios em regiões altamente endêmicas no Brasil estejam livres desta forma de transmissão. Esse tipo de controle, no entanto, não permite descontinuidade no programa e o grande número de barbeiros encontrados em algumas regiões do Brasil, como o Nordeste, têm alarmado os pesquisadores da área. A figura 2 mostra a distribuição geográfica das principais espécies de vetores triatomíneos de *T. cruzi* [83].

A transfusão sanguínea é o segundo mecanismo importante de transmissão. Por isso os métodos de controle têm tido grande ênfase nos bancos de sangue, levando a uma redução de 6,5% para 1%, na taxa de contaminação por transfusão sanguínea [80]. A transmissão congênita, embora numericamente menor, é o terceiro mais importante mecanismo de transmissão [26]. Outras formas são o transplante de órgãos e a contaminação acidental. Embora os avanços obtidos nos últimos anos no controle do vetor e transfusão sanguínea, o problema com as pessoas já infectadas permanece sem solução [26, 102, 103]. Na tabela 1 são apresentados dados referentes à prevalência e incidência da doença de Chagas em países do cone sul, de acordo com publicações da Organização Mundial da Saúde [103].

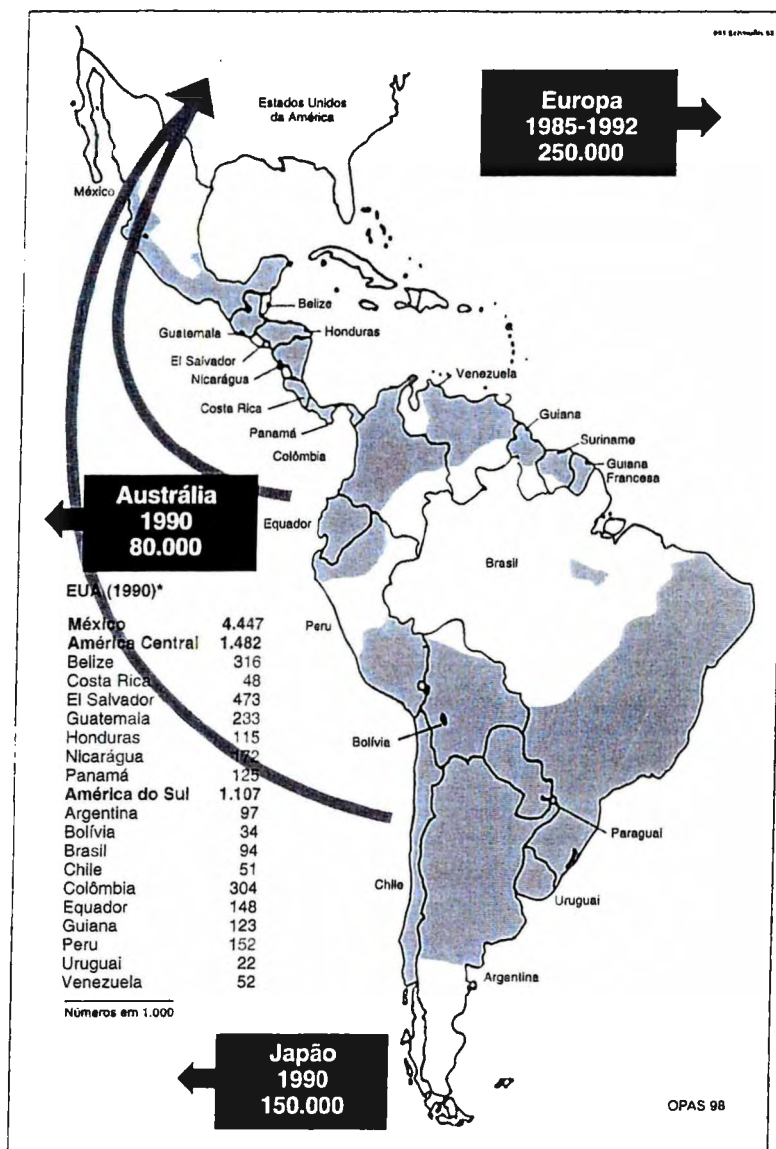


Figura 1 Distribuição geográfica da contaminação humana por *T. cruzi* e migração dos países endêmicos para os países desenvolvidos [c.f. 79]

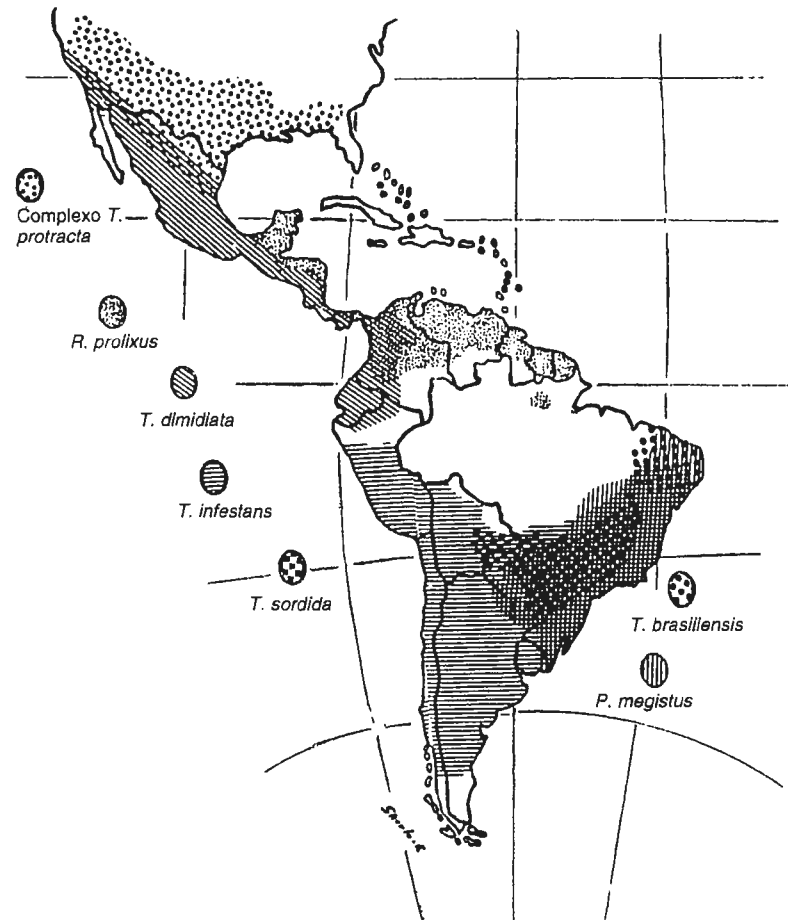


Figura 2 Distribuição geográfica das principais espécies de triatomíneos que são vetores de *T. cruzi* [c.f. 83]

Tabela 1 Prevalência e incidência de casos de infecção humana por *T. cruzi* em países do Cone Sul (1985 - 1996)

País	População (x 1000)	População de risco (x 1000)	Prevalência (x 1000)	Incidência (1985) (x 1000)	Redução (%) da taxa de infecção no grupo de 0-14 anos (1985-1996)	Estimativa de incidência em 1996 (x 1000)
Argentina	34995	6900	2640	53	80,0 (*)	10
Bolívia	7593	300	1333	48	ND	48
Brasil	164424	41054	6340	169	96,0	7
Chile	14478	1654	187	4	75,0	1
Paraguai	5090	1475	397	14	60,0 (*)	5,6
Uruguai	3204	975	37	0,614	96,0	0,02
<b>total</b>	<b>229784</b>	<b>55058</b>	<b>10934</b>	<b>289</b>	<b>83,0</b>	<b>49</b>

(\*) Taxa de infecção no grupo de 18 anos

[retirada da referência 103]

### 1.3 quimioterapia

Não existindo vacinas capazes de prevenir a infecção por *Trypanosoma*, a quimioterapia é a única possibilidade de tratamento da população infectada [26, 96]. No entanto os quimioterápicos mais utilizados neste caso são inadequados face à baixa eficiência e à alta toxicidade, além da possibilidade de aumento da resistência dos parasitas às drogas.

Na tripanossomíase africana, causada por organismos da sub-espécie *brucei*, drogas como pentamidina,  $\alpha$ -difluorometilornitina, suramina e melarsoprol continuam sendo usadas na fase aguda, sendo altamente tóxicas para o paciente e, ainda, espécie-efetivas. Com *Leishmania* sp, o tratamento é feito com antimônio pentavalente, cuja toxicidade não é tão séria para o paciente, mas o desenvolvimento de resistência é responsável pelo aumento da doença observado [c.f. 70].

Com a doença de Chagas, apesar da ênfase dada ao controle para a interrupção da transmissão, a necessidade de tratamento à população infectada permanece. A quimioterapia usada, baseada em compostos nitrofurânicos (nifurtimox) e, principalmente, em nitroimidazólicos (benzonidazol), é efetiva na fase aguda onde foi observada uma alta eficácia, traduzida pela cura de 76% dos pacientes tratados. Na fase crônica da doença, tem sido observado um resultado oposto, observando-se um fracasso em 77% dos casos, uma cura de apenas 8% e um resultado duvidoso em 16% dos pacientes [14]. É necessário ressaltar que a eficácia do tratamento com benzonidazol tem sido verificada apenas em crianças [102]. Mesmo assim, os resultados mostram que estas drogas são parcialmente efetivas, sendo atribuído o fracasso no tratamento não à droga, mas ao parasita, pois algumas cepas de *T. cruzi* mostram diferentes graus de suscetibilidade aos quimioterápicos como é apresentado na tabela 2 [11]. Além do metabolismo da droga em si, sua absorção pelo parasita tem que ser considerada nesse contexto [93, 94]. Além disto, as drogas antes citadas causam sérios efeitos colaterais ao agirem inespecificamente sobre o binômio parasita-hospedeiro [14, 65, 72].

Em relação ao mecanismo de ação do nifurtimox, acredita-se que o mesmo exerce efeitos citotóxicos devido à redução de grupos nitro em radicais nitroânions e espécies reativas de oxigênio. Benzonidazol, cujo modo de ação não está bem elucidado, gera radicais nitroânions e espécies de oxigênio, num mecanismo de reação que envolve a modificação covalente de macromoléculas via intermediários da nitrorredução [55, 56, 57].

Tabela 2 Porcentagem de cura em grupos de camundongos inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi* e tratados com agentes quimioterápicos ativos

Cepa	Quimioterápico	Dose	Camundongo Nº tratado/nº curado	% de cura
CL	nitrofurazona	100 mg/Kg, 25 x	54 / 32	59,2
Y	nitrofurazona	100 mg/Kg, 25 x	48 / 0	0,0
Berenice	nifurtimox	100 mg/Kg, 20 x	60 / 53	88,3
CL	nifurtimox	100 mg/Kg, 20 x	34 / 26	76,4
Y	nifurtimox	100 mg/Kg, 20 x	33 / 6	18,1
FL	nifurtimox	100 mg/Kg, 20 x	58 / 13	22,4
CL	2-nitroimidazol	100 mg/Kg, 20 x	35 / 12	34,3
Y	2-nitroimidazol	100 mg/Kg, 20 x	33 / 3	9,0

[retirada da referência 11]

A busca de componentes específicos do parasita tem sido o objetivo de vários trabalhos. Nela, componentes celulares, fisiologicamente relevantes como alvos, tornam-se fundamentais para o desenho e descoberta de medicamentos para o combate às doenças infecto-contagiosas, como as causadas por diversos tripanossomos. Neste sentido, esforços multidisciplinares têm enfatizado diversos aspectos (bioquímico, genético, imunológico, biológico), em que o alvo é identificado e caracterizado em relação a sua estrutura e a sua função. Possíveis alvos quimioterápicos têm sido identificados especialmente através da bioquímica comparada (e.g. ergosterol, tripanotiona) e da biologia comparativa (e.g. cinetoplasto). As principais áreas consideradas para uma intervenção quimioterápica são apresentadas na tabela 3, onde são feitas as citações referentes aos alvos potenciais. Esta tabela deverá ser rapidamente ampliada quando o genoma humano e o do parasita forem conhecidos, expondo novos possíveis alvos para o desenho racional de quimioterápicos [105].

Tabela 3 Identificação de potenciais alvos quimioterápicos em *T. cruzi*

Alvo quimioterápico	referência
triptanotona (tióis, poliaminas, metabolismo AdoMet)	7, 48, 77
purinas	76, 95
metabolismo do folato e da pteridina	68
biossíntese do mRNA (" <i>trans</i> -splicing")	1, 58
cinetoplasto	81, 88
biossíntese do ergosterol	97
transialidase, âncora de GPI	25, 33
proteínases (e.g. cisteína proteínases)	24, 66
glicossomo	17, 99

AdoMet: adenosil metionina; GPI: âncoras de glicosil-fosfatidil inositol

## 1.4 processo de detoxificação de peróxidos

### 1.4.1 em células de mamíferos

Todos os organismos aeróbios apresentam defesa contra o estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio geradas durante o metabolismo oxidativo. Entre elas estão o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e seus sub-produtos. Essas espécies danificam biomoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Para prevenir esse dano celular, ao longo da evolução foi selecionado um sistema de defesa pelos organismos que compreende várias enzimas e moléculas antioxidantes com um papel vital na detoxificação, como a catalase, a superóxido dismutase, uma variedade de peroxidases e o sistema da glutathione [13, 23]. Assim, por exemplo, a superóxido dismutase catalisa a transformação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2 + O_2$ , enquanto que  $H_2O_2$  é decomposto a  $H_2O + O_2$  pela catalase, peroxidases e glutathione peroxidase. Embora a catalase seja capaz de decompor  $H_2O_2$ , é praticamente inativa frente a hidroperóxidos orgânicos, diferentemente da glutathione peroxidase que é altamente ativa com os compostos antes citados [98].

Em células de mamíferos, a principal via de detoxificação de  $H_2O_2$  envolve a glutathione peroxidase, que age conjuntamente com NADPH, glutathione e glutathione redutase. A glutathione, o tripeptídeo L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina, é um composto tiólico de baixo peso molecular envolvido na manutenção do equilíbrio redox e na regulação de diversos aspectos do metabolismo, ao agir com uma coenzima em várias reações conjugando-se com xenobióticos e com metabolitos altamente reativos [32, 60]. A forma reduzida da glutathione (GSH) funciona como um agente protetor, mantendo o ambiente intracelular reduzido ao ser oxidada à forma



dissulfeto (GSSG). A glutathiona redutase preserva os níveis tiólicos ao catalisar a redução da forma dissulfeto. A figura 3 esquematiza a síntese da glutathiona (A), o seu mecanismo de proteção contra as espécies de reativas de oxigênio (B) e a sua fórmula molecular (C).

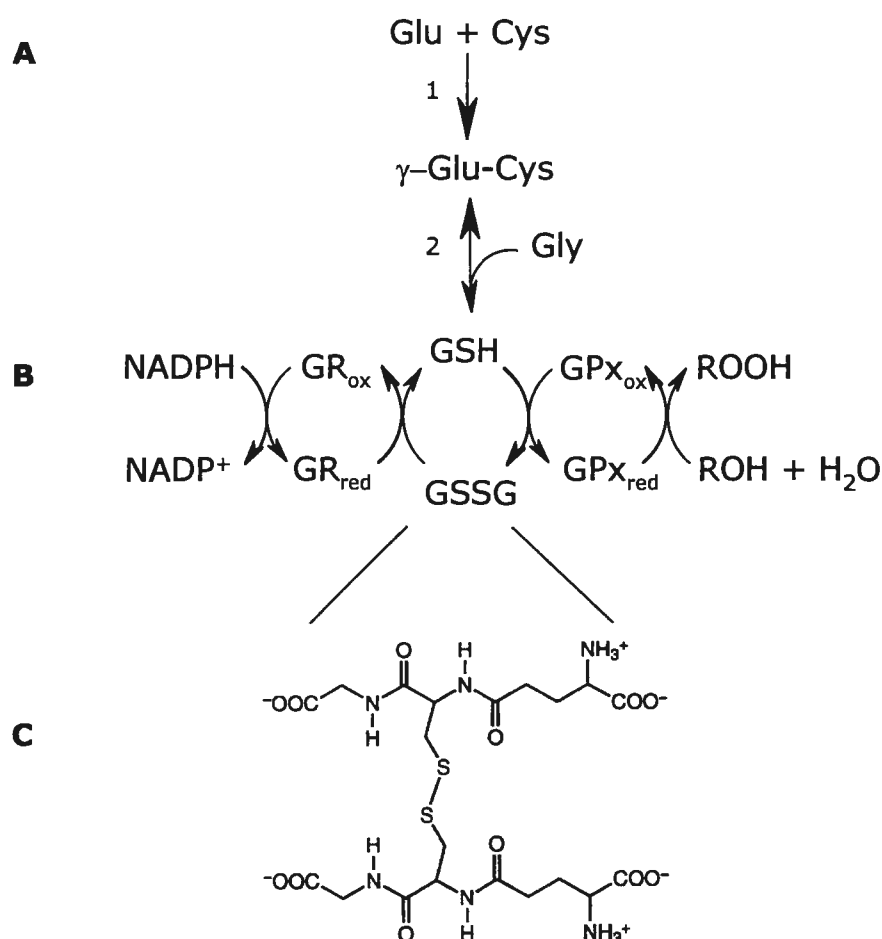


Figura 3 Glutathiona

A) biossíntese da glutathiona [98]

B) mecanismo de antioxidante [98]

C) fórmula da glutathiona dissulfeto [7]

GSH = glutathiona; GSSG = glutathiona dissulfeto

1. γ-glutamilcisteína sintetase; 2. glutathiona sintetase

### 1.4.2 em tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos na infecção do hospedeiro vertebrado estão inevitavelmente expostos a espécies reativas de oxigênio, geradas internamente como produto de processos oxidativos do parasita, ou pelo hospedeiro como resposta fisiológica à invasão ou, ainda, como consequência do metabolismo redutivo de drogas, como nifurtimox e benzonidazol [27, 28]. A capacidade destes organismos em metabolizar hidroperóxidos tem sido controversa e objeto de longas discussões.

Os tripanossomatídeos têm requisitos de  $O_2$  que dependem das espécies e do estágio do ciclo de vida do parasita [8, 23]. Enquanto que os tripanossomos africanos no estágio sangüícola são aeróbios, *T. cruzi*, *Leishmania* e *Crithidia* são aeróbio-facultativos. Embora possuam uma superóxido dismutase contendo ferro que previne o acúmulo de  $O_2^-$  [40, 52, 89], foi observada uma deficiência nos mecanismos enzimáticos para a remoção de  $H_2O_2$ , tais como catalase e glutathione peroxidase, comuns em eucariontes superiores, porém ausentes ou presentes apenas em baixíssima atividade nesses organismos [8, 27, 28, 74, 75]. Embora houvesse sido descrita uma atividade de glutathione redutase, posteriormente foi demonstrado que a capacidade do parasita para reduzir  $H_2O_2$  era dependente de um cofator tiólico, um conjugado de glutathione e espermidina, denominado tripanotiona [ $TS_2$ ;  $N^1-N^8$ -bis(glutathionil)espermidina] (Fig. 4) [30, 31]. Como em outros microrganismos, o acúmulo de dissulfetos afeta o equilíbrio tiólico-redox e, conseqüentemente, a atividade metabólica dos tripanossomatídeos. Uma flavoproteína dissulfeto redutase NADPH-dependente, a tripanotiona redutase, foi isolada como sendo a responsável pela manutenção da tripanotiona na forma ditiol [ $T(SH)_2$ ] dentro da célula [49]. A tripanotiona constitui o maior tiol ácido solúvel nesta família, cuja biossíntese está claramente elucidada, envolvendo duas enzimas, a glutathionilespermidina sintetase e a tripanotiona sintetase [47, 91], como é mostrado na figura 4.

A espermidina é uma poliamina, família de compostos químicos de baixo peso molecular, presente intracelularmente em concentrações na ordem de miligramas, tanto em procariontes como eucariontes. As poliaminas estão envolvidas numa ampla gama de funções biológicas, como a síntese proteica, o crescimento e o desenvolvimento celular. O interesse nas poliaminas em protozoários cinge-se ao fato de que seu metabolismo é inibido por drogas antiparasitárias (e.g. difluorometiornitina). Em tripanossomatídeos, a espermidina é também um precursor essencial na biossíntese da tripanotiona [32].

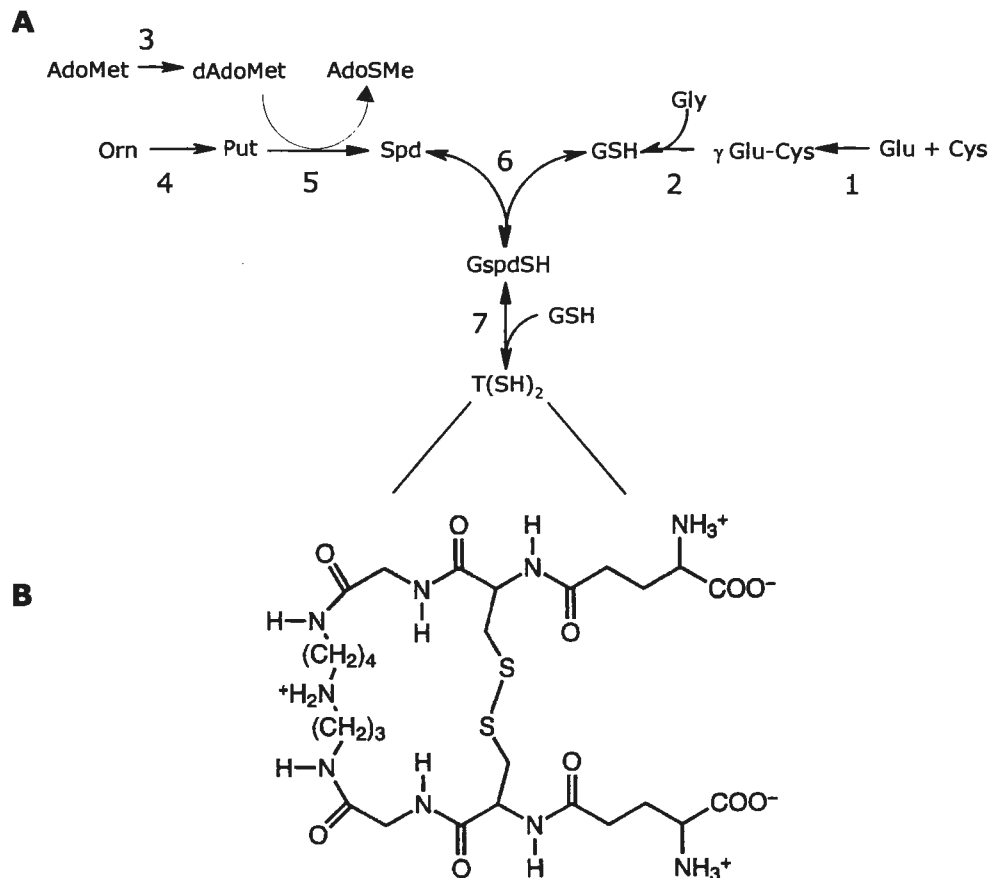


Figura 4 Tripanotione

A) biosíntese de tripanotione [32, 47, 91]

B) fórmula molecular da tripanotione dissulfeto [7]

TS<sub>2</sub> = tripanotione dissulfeto; T(SH)<sub>2</sub> = dihidrotripanotione; Orn = ornitina;  
Put = putrescina; Spd = espermidina; GSH = glutationa;  
GSH-Spd = glutationil espermidina; AdoMet = adenosil metionina;  
dAdoMet = adenosil metionina descarboxilada; AdoSMe = metiltioadenosina

1. S-adenosilmetionina descarboxilase; 2. ornitina descarboxilase

3. S-adenosilmetionina sintetase; 4.  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase;

5. glutationona sintetase; 6. glutationil espermidina sintetase;

7. tripanotione sintetase

*T. cruzi* difere de outros membros da família *Trypanosomatidae* pela sua incapacidade de sintetizar putrescina *de novo* e depende completamente de poliaminas exógenas para o seu crescimento, podendo usar cadaverina para sintetizar homotripanotiona, [N<sup>1</sup>-N<sup>9</sup>-bis(glutationil)aminopropilcadaverina], um análogo da tripanotiona (Fig. 5). Os parâmetros cinéticos da homotripanotiona determinados em relação à tripanotiona redutase foram similares aos da tripanotiona. Isto explicaria o fato de que inibidores de descarboxilases tenham pouco efeito sobre *T. cruzi*, devido à ausência dessas enzimas e à habilidade do parasita para usar as diaminas do seu meio ambiente [39].

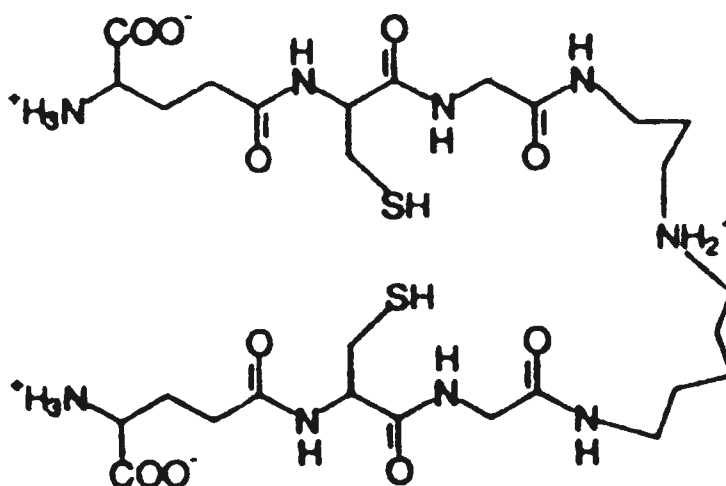


Figura 5 Fórmula molecular da homotripanotiona

Recentemente, foi detectada tripanotiona em *Entamoeba histolytica* [73]. Outros estudos, porém, têm sugerido que o metabolismo com esse tiol está ausente ou é quantitativamente insignificante neste parasita [5], deixando por enquanto este composto restrito aos tripanossomatídeos. Um outro composto tiólico, o ovotiol, envolvido em funções antioxidantes, foi isolado em *L. donovani* [84] e *C. fasciculata* [85], porém até o presente não foi detectado em *T. cruzi*.

Embora as trocas entre tióis e dissulfetos ocorram de maneira não-enzimática em outros tripanossomatídeos, *T. cruzi* possui uma enzima denominada tripanotiona-glutationa tioltransferase para catalisar este processo [67]. O motivo para isto não é conhecido, porém é possível que níveis de tripanotiona se tornem limitantes neste parasita ao se esgotarem as poliaminas. Embora a tripanotiona seja o maior componente tiólico em tripanossomatídeos, uma quantidade significativa de glutatona está presente em *T. cruzi*. Faltando glutatona redutase, um acúmulo de

GSSG e de dissulfetos (RSSR) afetam o equilíbrio redox tiólico e sua atividade metabólica geral, sendo, pois necessária a redução de dissulfetos. Na tabela 4 são apresentadas as concentrações de glutatona, espermidilglutaciona e tripanotona presentes em vários tripanossomatídeos [32].

Tabela 4 Níveis de glutatona, glutationilespermidina e dihidrotriptanotona

Organismo	GSH total nmol/10 <sup>8</sup> células	GSH recuperado como (%)		
		GSH	GSH-SPD	T(SH) <sub>2</sub>
<i>T. brucei</i> (sangüícola)	5,6	24	5	71
<i>T. brucei</i> (procíclica)	11,4	27	4	69
<i>C. fasciculata</i> (fase exponencial)	51,1	12	20	68
<i>C. fasciculata</i> (fase estacionária)	38,7	10	68	22
<i>L. b. guyanensis</i> (promastigotas)	13,7	14	4	82
<i>L. donovani</i> (promastigotas)	15,6	14	4	82
<i>T. cruzi</i> (epimastigotas)	9,5	19	2	79

[retirada da referência 32]

GSH total = [GSH] + [GSH-SPD] + [T(SH)<sub>2</sub>]

GSH = glutatona; GSH-SPD = glutationilespermedina; T(SH)<sub>2</sub> = dihidrotriptanotona

Penketh e Klein [75] descreveram que formas sangüícolas de *T. b. brucei* podiam metabolizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por um mecanismo diferente do hospedeiro, embora catalase e glutatona peroxidase estivessem ausentes. O mecanismo envolvia NADPH e o cofator T(SH)<sub>2</sub>. Foi observado atividade de tripanotona redutase, porém baixa atividade de tripanotona peroxidase. Em contrapartida, observaram alta atividade da via das pentoses, levando os autores a sugerir que o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependente de NADPH era o mecanismo envolvido na detoxificação.

Ao identificarem uma atividade de peroxidase tripanotona-dependente em *T. brucei* e *C. fasciculata*, Henderson *et alii* [37] consideraram-na como o único mecanismo para a remoção de peróxidos. Assim, *a priori*, foi estabelecido um sistema análogo ao glutatona redutase/glutatona peroxidase da célula hospedeira. Atividades similares foram determinadas em outras espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania*, que levou à conclusão de que esse processo no metabolismo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era comum em tripanossomatídeos [74]. Posteriormente, Carnieri e colaboradores [15] confirmaram uma limitada capacidade de detoxificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes estágios de *T. cruzi*. Na forma epimastigotas foram determinadas atividades de oxidase e peroxidase NADPH-dependentes, porém ausência de atividade peroxidásica tripanotona-dependente. A atividade NADPH-peroxidase foi extremamente baixa quando comparada àquela presente em células de mamíferos,

levando à sugestão de que a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  seria um evento não-enzimático envolvendo tióis intracelulares.

Esta controversa situação foi elucidada por Nogoceke *et alii* [71] ao demonstrarem em *C. fasciculata* que o sistema peroxidase tripanotiona-dependente é constituído por duas diferentes enzimas, uma com massa molecular de 16 kDa e outra de 21 kDa, denominadas de triparredoxina e triparredoxina peroxidase, respectivamente. Um processo enzimático envolvendo duas proteínas, portanto contrário às expectativas anteriores que pressupunham uma enzima análoga à glutathiona peroxidase [37]. Os autores também demonstraram que o processo de detoxificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros peróxidos é catalisado por uma cascata de três diferentes óxidorredutases: a tripanotiona redutase, triparredoxina e a triparredoxina peroxidase, usando a tripanotiona como doador de elétrons. O esquema de reações redox desde o NADPH até o hidroperóxido é mostrado na figura 6 [71], onde a tripanotiona redutase reduz a tripanotiona, a qual reduzirá a triparredoxina. A triparredoxina ao reduzir a ligação dissulfeto ( $\text{Cys}^{52} - \text{Cys}^{173}$ ) gera por sua vez a forma ativa da peroxidase, que é capaz de efetuar a redução de hidroperóxidos.

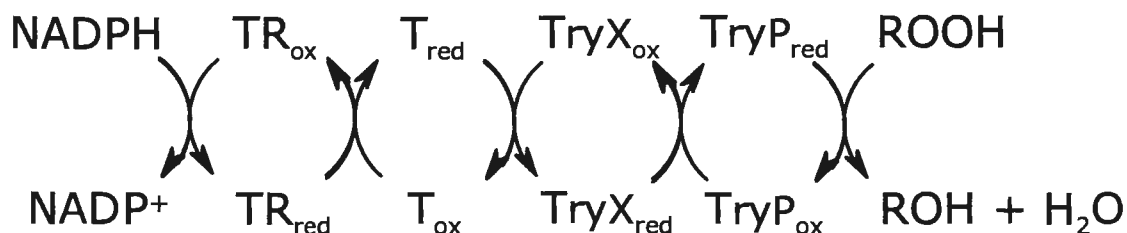


Figura 6 Fluxo de equivalentes reduzidos de NADPH a hidroperóxido [71]

TR: tripanotiona redutase; T: tripanotiona; TryX: triparredoxina;  
 TryP: triparredoxina peroxidase; ROOH: peróxido

A triparredoxina é quimicamente um membro distante da família da tiorredoxinas. Sua massa molecular excede à da massa típica de tiorredoxinas [71], e o motivo WCPPCR apresenta baixa similaridade com o motivo WCGPCK(R) das tiorredoxinas [38]. Recentemente, por mutagênese pontual no motivo WCPPCR, foi confirmado não apenas que a triparredoxina exerce a sua atividade através dele, como também, que as cisteínas do mesmo estão envolvidas na catálise [87].

Funcionalmente, esta enzima pode ser denominada de tripanotiona:peroxirredoxina oxidoreductase, por aceitar os equivalentes da redução da tripanotiona e transferi-los para a triparredoxina peroxidase.

A triparredoxina, contudo, pode servir para outros propósitos. Lüdemann *et alii* [54] ao isolarem esta proteína de *T. brucei* mostraram que a forma reduzida da mesma é substrato para a ribonucleotídeo redutase. Desta maneira, as triparredoxinas poderiam ser mediadores pleiotrópicos nos parasitas, assim como as tioredoxinas o são em outros organismos [34, 35]. Assim, esta enzima poderia ser igualmente importante na defesa antioxidante e na biossíntese do DNA [87].

A triparredoxina peroxidase, uma triparredoxina:hidroperóxido oxidoreductase, pertence à família de proteínas quimicamente denominada de peroxirredoxinas. Peroxirredoxinas compreendem diferentes enzimas antioxidantes tiol-específicas com diversas atividades biológicas, descritas inicialmente em leveduras [19, 45, 69], mas que estão amplamente distribuídas em protozoários e helmintos [59] e em mamíferos [18, 20, 21, 44, 46]. São enzimas envolvidas num mecanismo de defesa contra o dano oxidativo de macromoléculas [104]. A triparredoxina peroxidase é uma típica peroxirredoxina com duas cisteínas conservadas (Cys<sup>52</sup> e Cys<sup>173</sup>) contidas em dois motivos VCP, próximos às regiões N- e C-terminais, respectivamente [64], e envolvidos na atividade catalítica da enzima [63, 71]. Estudos recentes têm identificado e caracterizado um novo tipo de peroxirredoxinas em mamíferos, contendo um único resíduo conservado de cisteína e denominadas de 1-Cys Prx. Embora possuam uma alta atividade antioxidante, o seu papel biológico não foi ainda esclarecido [51, 59].

Assim, aparentemente, os tripanossomatídeos apresentam uma complicada via, embora não muito eficiente, para a remoção de hidroperóxidos, ao requerer três enzimas (Fig. 6), diferentemente do sistema mediado por glutathione, onde apenas duas proteínas participam da transferência de equivalentes do NADPH até o hidroperóxido. O sistema tioredoxina-dependente requer três enzimas mas, em contraste com o sistema tripanossomatídico, não envolve um mediador de baixo peso molecular. O sistema tripanotiona revela-se, portanto, diferente em relação aos sistemas análogos em mamíferos; enquanto, a tripanotiona redutase possui ainda uma identidade com as típicas glutathionas redutases de mamíferos, o restante do sistema apresenta características específicas, como é mostrado na figura 7, onde são comparados vários sistemas de detoxificação. Há entre estas redutases uma identidade de cerca de 40%, principalmente na região do sítio ativo, não sendo contudo idênticas [7].

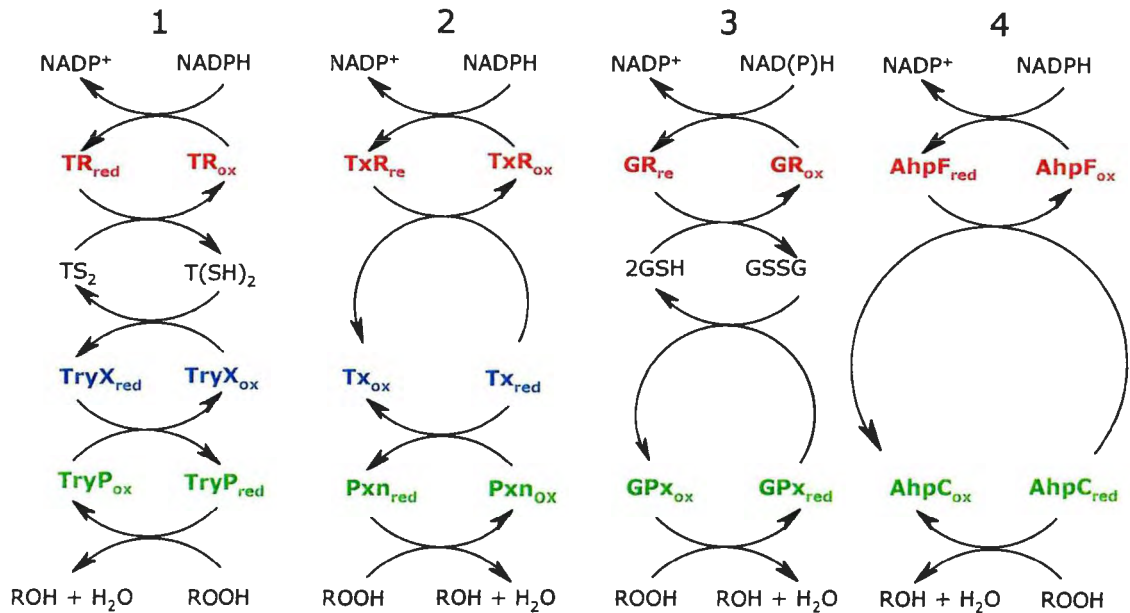


Figura 7 Comparação de sistemas de detoxificação de hidroperóxido dependentes de NADPH

1. sistema peroxidase tripanotona-dependente [71]
2. sistema mediado pela tiorredoxina [45, 59]
3. sistema mediado pela glutatona [98]
4. sistema alquil hidroperóxido redutase [20, 59]

As proteínas catalisadoras são destacadas na figura.

Recentemente, os genes da triparredoxina e da triparredoxina peroxidase em *C. fasciculata* foram clonados, seqüenciados, expressos e funcionalmente reconstituídos [36, 62, 90]. Analogamente em *L. major* [41, 53], como resultado do projeto genoma, um sistema funcional peroxidase tripanotona-dependente foi detectado. Em *T. b. rhodesiense* [29] e em *T. b. brucei* [54] têm sido isolados os genes da triparedoxina peroxidase e da triparredoxina, respectivamente. Estes estudos têm permitido ainda verificar que essas proteínas são codificadas por genes presentes em várias cópias, uma característica freqüente observada na família *Trypanosomatidae* e evidenciadas também em relação a estas proteínas [36, 53, 62, 64, 90, 100]. Recentemente em *T. cruzi*, dados experimentais têm sugerido que em relação à triparredoxina peroxidase, existe uma família multicópia [101].

A descoberta desta cascata enzimática redox e a sua confirmação em outros tripanossomatídeos abre perspectivas para potenciais pontos de desenvolvimento de inibidores, considerando-se que a quimioterapia atualmente usada é insatisfatória. Os trabalhos recentes de cristalização da triparredoxina e da



tripanotiona redutase poderão permitir o seu uso potencial como modelo estrutural na identificação e aperfeiçoamento de uma ampla faixa de novas drogas contra as infecções tripanossomais [3, 7, 43].

### **1.5 objetivos**

Considerando que a descoberta do sistema peroxidase tripanotiona-dependente em *C. fasciculata* e as perspectivas que o seu estudo poderia significar para o desenvolvimento de quimioterápicos, tornou-se importante evidenciar se o referido sistema existia em *T. cruzi*. Com base nisto, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1. detecção imunoquímica deste sistema redox mediante a utilização de anticorpos obtidos contra a triparredoxina e triparredoxina peroxidase de *C. fasciculata*;
2. isolamento, clonagem e expressão do genes da triparredoxina e da triparredoxina peroxidase.

## **2. material e métodos**

## **2.1 parasitas**

*Trypanosoma cruzi* cepa Y foi utilizado para este estudo. A forma tripomastigota foi obtida por infecção de culturas de células LLC-MK2, conforme metodologia descrita por Andrews e Colli [4]. A forma epimastigota de *T. cruzi* foi cultivada em meio LIT sob agitação a 28°C [16].

## **2.2 preparação de extratos celulares de parasitas**

### **2.2.1 extrato celular total**

Os parasitas previamente lavados com PBS foram ressuspensos em tampão de lise (tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; NP-40 a 1%; PMSF 2mM; TLCK 1mM; antipainá 2µg/mL, leupeptina 10µg/mL) e homogeneizados.

### **2.2.2 obtenção das frações membranas e solúvel**

Os parasitas (epimastigotas e tripomastigotas), após lavagem com PBS, foram ressuspensos em tampão de lise (Hepes 20 mM pH 7,6; KCl 10 mM; EDTA 2 mM; TLCK 0,1 mM; PMSF 2mM; leupeptina 10µg/mL; inibidor de tripsina 0,15µg/mL) e sonicados a 4°C com 10 pulsos de 15s com intervalos de 2 min entre cada pulso. O extrato obtido foi centrifugado (800xg/10min, Sorvall Instruments, Modelo RC5C), sendo o precipitado descartado e o sobrenadante centrifugado a 10<sup>6</sup>xg por 1h a 4°C (Beckman modelo L8-M). Desta maneira, foram obtidas as frações solúvel e membranas dos parasitas. A fração membranas (precipitado) foi ressuspensa em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4, contendo PMSF 2mM e EDTA 1 mM, e submetida à homogeneização (Potter-Elvehjem).

## **2.3 determinação de concentração proteica**

A concentração proteica das amostras foi avaliada espectrofotometricamente de acordo com o método de Bradford [9], usando a albumina sérica bovina como padrão.

## **2.4 eletroforese**

### **2.4.1 eletroforese em gel de poliacrilamida**

As proteínas dos extratos celulares dos parasitas utilizados foram fracionadas por eletroforese em condições desnaturantes usando-se géis contínuos a 12% [50]. De

acordo com as necessidades experimentais, os géis foram corados ou eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose.

#### **2.4.2 eletroforese em gel de agarose**

As eletroforeses para DNA foram feitas em gel de agarose em concentrações variando de 1 a 1,5%, de acordo com o experimento, em TAE (Tris-acetato 40mM, pH 8, EDTA 1 mM) contendo 0,5µg de brometo de etídeo/mL de gel. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra contendo Ficoll 400 a 15%, azul de bromofenol a 0,25% e xileno cianol a 0,25% [78].

#### **2.5 ensaio enzimático**

A atividade da triparredoxina peroxidase de *T. cruzi* foi determinada a 27°C, como descrito por Nogoceke *et alii* [71], exceto que no presente trabalho a T(SH)<sub>2</sub> foi gerada enzimaticamente a partir da TS<sub>2</sub>. A quantificação foi feita em ensaio heterólogo contendo NADPH 100 mM, EDTA 1 mM, peróxido de *t*-butila 50 µM, TS<sub>2</sub> 45 µM, tripanotona redutase 0,4 U, triparredoxina de *C. fasciculata* (Cf16) 12µg, triparredoxina peroxidase de *T. cruzi* (Tc21) 15µg em HEPES 50mM, pH 7,6. O consumo de NADPH foi medido espectrofotometricamente a 340nm. A atividade enzimática foi expressa como nmol de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> ou nmol de NADPH oxidado min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>.

#### **2.6 obtenção de anticorpos**

Os anticorpos foram obtidos por imunizações com 3 e 30 µg de proteína, administrada em intervalos de 7 e 15 dias em camundongos e em coelho, respectivamente. O antígeno foi administrado em adjuvante de Freund completo no primeiro inóculo e em adjuvante de Freund incompleto para os inóculos subseqüentes. As rotas de imunização foram intraperitoneal (camundongos) e subcutânea (coelho). Os antígenos usados foram triparredoxina peroxidase recombinante de *T. cruzi* (Tc21) e de *C. fasciculata* (Cf21), assim como triparredoxina de *C. fasciculata* (Cf16). As proteínas de *C. fasciculata* foram cedidas pelo Dr. H. Kalisz e pelo Dr. L. Flohé, da Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) e da Technische Universität, Braunschweig - Alemanha, respectivamente. Após 6 imunizações, o coelho foi sangrado por punção cardíaca e os camundongos por punção do plexo radial. O sangue coletado foi coagulado a 37°C por 1h, permanecendo depois a 4°C durante a noite. O soro foi coletado por centrifugação a 1000 x g e armazenado a -20°C.

#### **2.7 localização imunoquímica do antígeno**

##### **2.7.1 reação de imunofluorescência indireta**

As formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram lavadas com PBS, pH 7,5 e fixadas com *p*-formaldeído a 2% em PBS pH 7,5 por 1h à temperatura ambiente. Os parasitas foram lavados e depositados sobre as lâminas e estocadas a

-20°C até a sua utilização. As células foram incubadas com o primeiro anticorpo a 37°C durante 30 min em câmara úmida, lavadas com PBS e incubadas com o segundo anticorpo (anti-imunoglobulina total, anti-IgG ou anti-IgM de camundongo ou coelho) conjugado a isotiocianato de fluoresceína, sob as condições da primeira incubação. Após a lavagem da lâmina com PBS, a preparação foi observada em microscópio de epi-fluorescência e as imagens captadas por computador.

### **2.7.2 western-blot**

As proteínas foram fracionadas em gel de poliacrilamida-SDS a 12% [item 2.4.1] e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Bio Rad) a 50 volts por 16-18 horas a 4°C em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 4,9 M, pH 8,5). Ao final da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S a 0,2% em ácido acético a 1% por 10 min e lavadas com água deionizada. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com leite desnatado a 3% (p/v) em TBS- T (TBS 50mM pH 7,5 Tween 20 a 0,03%) durante 30 min à temperatura ambiente, e em seguida incubada com o anticorpo desejado, diluído em leite desnatado a 3% (p/v) em TBS-TT (TBS 50mM pH 7,5 Tween 20 a 0,03%, Triton X-100 a 0,05%) durante a noite a 4°C. Findo este período, a membrana foi lavada 5 vezes por 10 min com TBS-T, bloqueada novamente como descrito anteriormente e incubada por 2 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-IgG apropriada conjugada com peroxidase) diluído na solução de bloqueio. Após lavagem com TBS-T, a membrana foi revelada por quimioluminescência (ECL - Amersham-Pharmacia) e autorradiografada.

### **2.8 extração de DNA genômico de *Trypanosoma cruzi***

As formas epimastigotas ( $10^9$  parasitas/mL) foram ressuspensas numa solução contendo NaCl 150mM, EDTA 100mM, Tris 10mM pH 8, lauril sarcosinato de sódio a 0,5% e RNase A (livre de DNases) 10 $\mu$ g/mL, deixando a solução em repouso por 5 min à temperatura ambiente. Os parasitas em suspensão foram lisados, incubando-os com proteinase K (100 $\mu$ g/mL) a 50°C por 30 min com agitação esporádica. Após esta etapa, o DNA foi extraído com fenol tamponado (pH 8), com fenol-clorofórmio e com clorofórmio [92].

### **2.9 extração de RNA de *Trypanosoma cruzi* e síntese de cDNA**

Os parasitas ( $10^9$ /mL) foram centrifugados para remoção do meio de cultura e lisados em soluções monofásicas de fenol e de isotiocianato de guanidina (TRIZOL®Reagent, Gibco BRL).

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita a partir de RNA total (5µg) da forma epimastigota de *T. cruzi*, usando-se o oligo *Not I*-d(T)<sub>18</sub> como oligonucleotídeo de extensão numa reação catalisada pela transcriptase reversa (TimeSaver® cDNA Synthesis kit, Pharmacia Biotech).

## **2.10 isolamento do gene da triparredoxina peroxidase**

### **2.10.1 amplificação parcial do gene**

Três oligonucleotídeos foram utilizados para esta amplificação; dois deles, desenhados com base nos motivos VCP conservados nas regiões consenso N- e C-terminal da família das peroxirredoxinas (Prx-3': 5'-CCGCTGGGCACACYTCNC CRTG-3' e o Prx-5': 5'-CCGATGGACTTCACNTTCGTBTGYCC-3') e um terceiro, correspondente ao mini-exon (ME-5': 5'-AACGCTATTATTGATACAGTTTCTG-3'), região altamente conservada na extremidade 5' nos genes dos tripanossomatídeos [58]. RNA total da forma epimastigota de *T. cruzi* foi transcrito reversamente em cDNA fita simples e a reação de amplificação foi feita por RT-PCR, usando-se como molde o cDNA (1µL), oligonucleotídeos iniciadores (100 pmoles), dNTP (0,2mM de cada), tampão para PCR (Tris-Cl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) e *Taq* DNA polimerase (2,5 U) para um volume de reação de 50 µL. As condições de amplificação foram a) desnaturação a 94°C (30s); b) hibridação a 50 e 60°C (45s) e c) extensão a 72°C (1min). Os produtos da reação foram separados em gel de agarose e a sua purificação foi feita mediante solubilização da agarose com NaI, seguida da adição de pérolas de vidro para isolar o DNA e posterior eluição do mesmo com um tampão Tris-HCl 10 mM pH 8 e EDTA 1 mM (Sephaglas™ BandPrep, Amersham Pharmacia Biotech).

O DNA obtido foi subclonado no vetor pMOS*Blue* (Amersham) para seqüenciá-lo pelo método da cadeia de terminação do dideoxinucleotídeo, usando do seqüenciamento automático (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, PE-Applied Biosystems).

### **2.10.2 isolamento, clonagem e seqüenciamento do gene**

A seqüência codante completa do gene da triparredoxina peroxidase (Tc21) em *T. cruzi* foi amplificada por PCR usando-se DNA genômico e os oligonucleotídeos correspondentes aos codons de iniciação e de terminação do gene desenhados a partir da seqüência homóloga de triparredoxina peroxidase (acc. Nr AJ012101) depositada no GenBank (Tc21-5': 5'-GAGTTCCCATATGTCTCTGCGGAGACG-3' com sítio de restrição de *Nde I* e Tc21-3': 5'-GCTCGAGCGCGACAGCACCAA-3' com sítio de restrição de *Xho I*).

A reação de amplificação por PCR foi feita num volume de reação de 50  $\mu$ L, contendo DNA (500 $\mu$ g), oligonucleotídeos iniciadores (100 pmoles), dNTP (0,2 mM de cada), tampão para PCR (Tris-Cl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) e *Taq* DNA polimerase (2,5 U), sob as seguintes condições de amplificação I) desnaturação a 94°C (30s); II) hibridação a 50 e 60°C (45s) e III) extensão a 72°C (1min). Os produtos da reação foram separados em gel de agarose e a sua purificação foi feita mediante solubilização da agarose com NaI, seguida da adição de pérolas de vidro para isolar o DNA e a sua eluição feita com um tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8 e EDTA 1 mM (Sephaglas™ BandPrep, Amersham Pharmacia Biotech).

O DNA amplificado foi subclonado no vetor pUC18 (SureClone, Pharmacia), obtendo-se o plasmídeo pUC18/Tc21, sendo o DNA sequenciado pelo método da cadeia de terminação do dideoxinucleotídeo usando do seqüenciamento automático (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (PE-Applied Biosystems).

Minipreparações desse plasmídeo foram digeridas com *Nde* I e *Xho* I. O fragmento de DNA correspondente ao gene da Tc21 foi separado em gel de agarose a 1.2% e a sua purificação feita utilizando o sistema Sephaglas™BandPrep (Amersham Pharmacia Biotech).

O gene foi clonado no vetor de expressão pET21a (Novagen), obtendo-se o plasmídeo pET21a-Tc21. Esta construção contém uma cauda de poli-histidina para facilitar a purificação da proteína recombinante.

### **2.10.3 expressão e purificação da Tc21 recombinante**

A cepa *E. coli* BL21(DE3) expressando o gene Tc21 foi obtida pela transformação com a construção pET21a-Tc21. A bactéria transformada foi crescida a 27°C e 200 min<sup>-1</sup> em meio LB contendo ampicilina (100 $\mu$ g/mL). A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,4mM, quando a cultura bacteriana atingiu Abs<sub>600</sub>  $\approx$  0,6 e crescida durante um período adicional de 3h. As células foram centrifugadas (5000g/15min/4°C), ressuspensas em tampão de ligação contendo imidazol 10mM, sonicadas e centrifugadas (15000g/20min/4°C). O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de agarose-Ni (Ni-NTA Superflow, Qiagen). Lavagens com 3 volumes de imidazol 10mM e com 3 volumes de imidazol 100mM foram feitas antes da eluição da proteína com imidazol 500mM. As soluções contendo imidazol foram preparadas em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,9 contendo NaCl 500mM e glicerol a 10%. As frações obtidas no processo de purificação foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes. A fração contendo a Tc21 foi dessalificada e concentrada em filtro

Centricon YM-10 (Millipore). O processo de purificação foi analisado por eletroforese em gel de poli-acrilamida-SDS e por Western blot.

### **2.11 isolamento do gene da triparredoxina**

RNA total da forma epimatigota de *T. cruzi* foi transcrito reversamente em cDNA fita simples, como descrito no item 2.10. Para isolar o gene, dois oligonucleotídeos foram derivados do motivo WCPPC, correspondente ao sítio ativo da tiorredoxinas-símiles (Tc16-3': 5'-GCACGGCGGGCACCAGCTCGCGG-3 e Tc16-5': 5'-AGCTGGTGYCCSCCSTGY-3). Para a extremidade 5' do gene foram usadas a seqüência denominada de Tc16-3' e o oligonucleotídeo correspondente à região do mini-exon (ME-5': 5'-AACGCTATTATTGATACAGTTTCTG-3') [58]. A reação de amplificação foi feita por RT-PCR, usando-se cDNA (1µL), oligonucleotídeos iniciadores (100 pmoles), dNTP (0,2mM de cada), tampão para PCR (Tris-Cl 10 mM, pH 9, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) e *Taq* DNA polimerase (2,5 U) para um volume de reação de 50 µL. As condições utilizadas foram uma etapa inicial de desnaturação a 94°C (2min); 30 ciclos de: 94°C (30s), 60°C (45s) e 72°C (2min) e uma etapa final de 72°C (3min).

Para isolar a extremidade 5' do gene foi usada a seqüência Tc16-5' e um oligo(dT). As condições da reação foram uma etapa inicial de desnaturação a 94°C (2min); 30 ciclos de: 94°C (30s), 60°C (45s) e 72°C (2min) e uma etapa final de 72°C (3min).

Os produtos da reação foram separados em gel de agarose e a sua purificação foi feita mediante solubilização da agarose com NaI, seguida da adição de pérolas de vidro para isolar o DNA e posterior eluição do mesmo com um tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8 e EDTA 1 mM (Sephaglas™ BandPrep, Amersham Pharmacia Biotech).

O DNA obtido foi subclonado no vetor pMOS*Blue* (Amersham) para a etapa de seqüenciamento, feita usando o método da cadeia de terminação do dideoxinucleotídeo usando o sistema do BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (PE-Applied Biosystems).



### **3. resultados e discussão**

Trabalhos realizados na década de 80 mostraram a existência de atividade peroxidásica em extratos de diversos *Trypanosomas* e *Leishmanias* [37, 74, 75]. No entanto, devido à baixa atividade enzimática, no início dos anos 90, a redução de peróxidos em *T. cruzi* foi atribuída a um processo não-enzimático [15]. Posteriormente, os estudos realizados por Nogoceke *et alii* [70, 71] demonstraram a existência de um sistema redox tripanotiona-dependente em *C. fasciculata*. Esses resultados levaram à procura dessa cascata em *T. cruzi*, iniciando-se então este trabalho em colaboração com os laboratórios do Prof. L. Flohé e o do Prof. H. Kalisz, onde os estudos com *C. fasciculata* foram realizados.

### **3.1 resultados preliminares**

#### **3.1.1 atividade enzimática em extratos celulares das formas de *T. cruzi***

O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NADPH-dependente foi medido na fração citossólica de extratos celulares das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. As medidas de atividade enzimática observadas, embora quantitativamente baixas, são um indicativo da capacidade deste microrganismo em metabolizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados não apresentaram uma relação linear, pois ao aumentar a concentração total de proteína não foi observado incremento proporcional na atividade enzimática (dados não mostrados), o mesmo tendo sido descrito por Henderson *et al.* [37] para extratos de *C. fasciculata* e de *T. brucei*. Os valores experimentais de 48 e 66 mU, obtidos respectivamente utilizando-se 2,2 x 10<sup>5</sup> epimastigotas e 7 x 10<sup>5</sup> tripomastigotas, são, contudo, semelhantes aos determinados anteriormente por Penketh *et alii* em células intactas de vários tripanossomatídeos [74] e por Nogoceke em *C. fasciculata* [70], como é mostrado nas tabelas 5 e 6, respectivamente. Mais recentemente, foi comprovado por Wilkinson *et al.* [101] a existência de uma baixa atividade de triparredoxina peroxidase em extratos celulares de *T. cruzi*. Quando extratos celulares foram aquecidos a 100°C para a sua inativação, nenhuma atividade foi observada (dados não mostrados).

As baixas atividades enzimáticas observadas, antes citadas, podem ser devidas à utilização de extrato celular, onde vários componentes redox no extrato estão presentes ou devido à utilização de um sistema heterólogo nas medições efetuadas ou mesmo à baixa atividade do sistema em *T. cruzi*. De qualquer forma, a existência de uma enzima com atividade peroxidásica tripanotiona-dependente foi confirmada, uma vez que extratos celulares inativados, por aquecimento não

Tabela 5 Velocidade inicial do metabolismo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por várias espécies de Tripanossomos e Leishmanias

Organismo	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min (10 <sup>8</sup> células)
tripomastigotas - <i>T. cruzi</i> cepa Y	48,2
epimastigotas - <i>T. cruzi</i> cepa Y	18,3
epimastigotas - <i>T. cruzi</i> cepa X 10	4,2
tripomastigotas - <i>T. lewisi</i>	19,6
tripomastigotas - <i>T. b. rhodesiense</i>	3,5
procíclicas - <i>T. b. rhodesiense</i>	6,4
promastigotas - <i>L. donovani</i>	4,3
amastigotas - <i>L. donovani</i>	2,3
promastigotas - <i>L. brasiliensis</i>	8,3
amastigotas - <i>L. brasiliensis</i>	2,3
promastigotas - <i>L. mexicana amazonensis</i>	5,6
formas de cultura - <i>L. tarentolae</i>	3,3
tripomastigotas - <i>T. equiperdum</i> Lump 1559	3,7
tripomastigotas - <i>T. evansi</i> SN Lump 1559	3,5
tripomastigotas - <i>T. evansi</i> SAK	4,2
tripomastigotas - <i>T. vivax</i>	3,5
tripomastigotas - <i>T. congolense</i> TREU 1290	3,6

[Penketh *et al.*, ref. 74]

Tabela 6 Atividade enzimática do sistema peroxidase tripanotona-dependente em *C. fasciculata*

extrato celular (µL)	mU
10	2
20	5,8
30	8,3
40	15
50	20
75	35
80	44
100	55

[Nogoceke, ref. 70]

apresentam atividade enzimática. Sugere, portanto, que a atividade é devida a um fenômeno enzimático e não a um mero processo químico como tinha sido postulado anteriormente [15], embora com baixa atividade.

### **3.1.2 imunodeteção do sistema peroxidase tripanotiona-dependente**

Embora a tripanotiona redutase de *T. cruzi* tenha sido estruturalmente bem caracterizada [6, 7, 49], as outras enzimas que complementam o sistema peroxidase tripanotiona-dependente, a triparredoxina e a triparredoxina peroxidase, só foram isoladas recentemente, tendo sido demonstrado que as mesmas estão envolvidas no metabolismo de hidroperóxidos em *C. fasciculata* [71]. As técnicas imunoquímicas foram usadas para evidenciar o referido sistema em *T. cruzi*, utilizando-se anticorpos heterólogos (anti-Cf16 e anti-Cf21) contra as supracitadas proteínas isoladas de *C. fasciculata*.

#### **3.1.2.1 localização celular de triparredoxina e de triparredoxina peroxidase**

As formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-Cf16 e anti-Cf21. A reatividade por imunofluorescência indireta com estes anticorpos mostrou uma reação positiva em ambos os casos. A figura 8 mostra, utilizando o anticorpo anti-Cf21, uma localização citoplasmática para a triparredoxina peroxidase (Tc21) na forma epimastigota. A localização da enzima no citoplasma foi recentemente confirmada por microscopia eletrônica [101]. Nas formas tripomastigotas e amastigotas a reatividade dos anticorpos anti-Cf21 foi mais intensa com a região membranar do que com o citoplasma do parasita (Fig. 9).

Nas figuras 10 e 11 é mostrada por imunocitoquímica a presença de triparredoxina, reconhecida pelo anticorpo anti-Cf16 de *C. fasciculata*, tanto nas formas epimastigotas quanto nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Em ambas as formas, uma reatividade homogênea e citossólica é evidenciada.

As observações microscópicas de epimastigotas de *T. cruzi* são condizentes com o resultado obtido para *C. fasciculata*, onde foi mostrada uma localização citoplasmática para as enzimas deste sistema [86]. A tripanotiona redutase tem também idêntica localização em epimastigotas de *T. cruzi* [61].

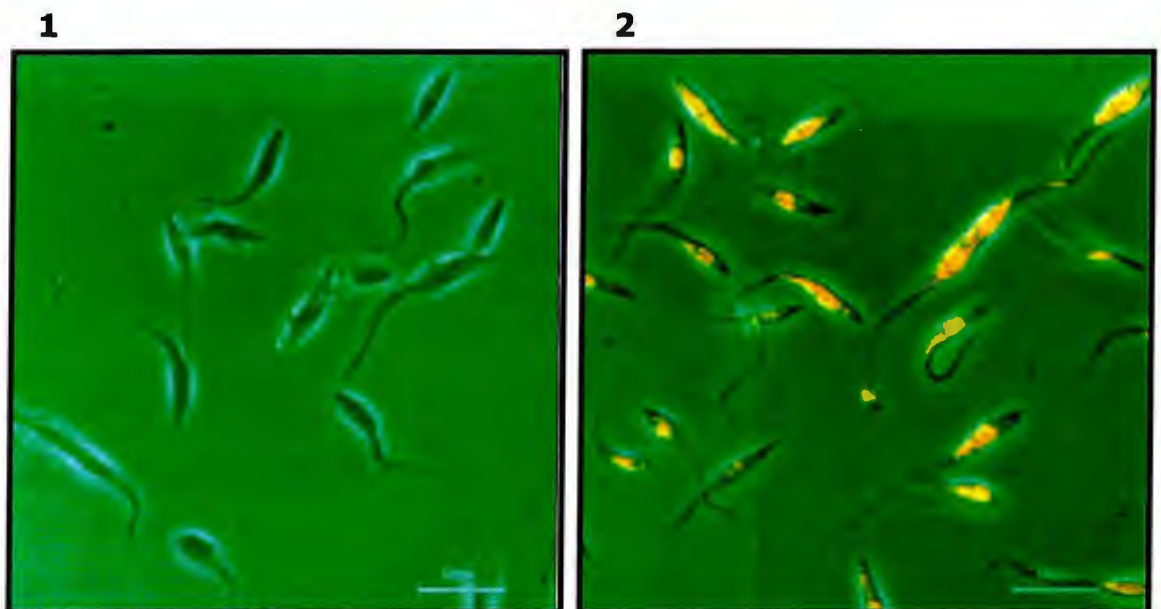


Figura 8 Reatividade por imunofluorescência indireta de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) com o anticorpo contra Cf21 de *C. fasciculata*

Formas epimastigotas foram fixadas, incubadas seguidamente com anticorpo anti-C21 e com anti-imunoglobulina de camundongo conjugada à fluoresceína, segundo descrito em Material e Métodos.

Barra=10  $\mu$ m

1. contraste de fase
2. parasitas incubados com anti-Cf21 (1:250)

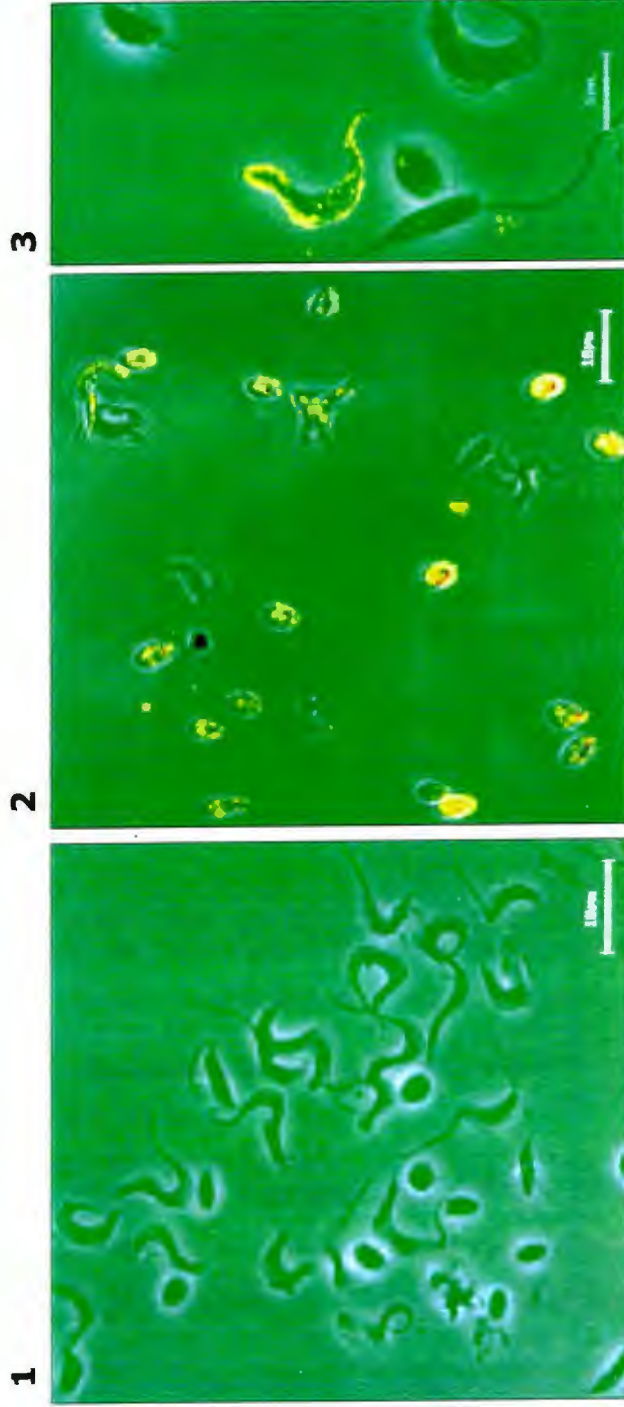


Figura 9 Reactividade por imunofluorescência indireta de amastigotas e de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) com o anticorpo contra Cf21 de *C. fasciculata*

Formas amastigotas e tripomastigotas foram fixadas, incubadas seguidamente com anticorpo anti-C21 e com anti-imunoglobulina de camundongo conjugada à fluoresceína, segundo descrito em Material e Métodos.

Barra=10 µm

1. contraste de fase
2. parasitas incubados com anti-Cf21 (1:250)
3. ampliação das formas marcadas

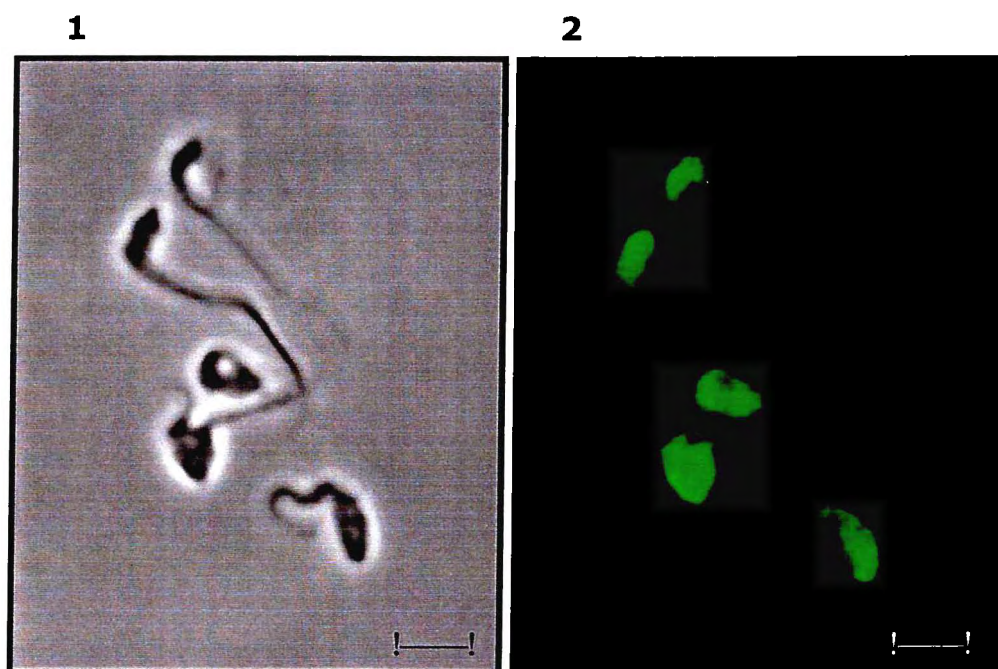


Figura 10 Reatividade por imunofluorescência indireta de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) com o anticorpo contra Cf16 de *C. fasciculata*

Formas epimastigotas foram fixadas, incubadas seguidamente com anticorpo anti-C16 e com anti-imunoglobulina de camundongo conjugada à fluoresceína, segundo descrito em Material e Métodos.

Barra=5 µm

1. contraste de fase

2. parasitas incubados com anti-Cf16 (1:100)

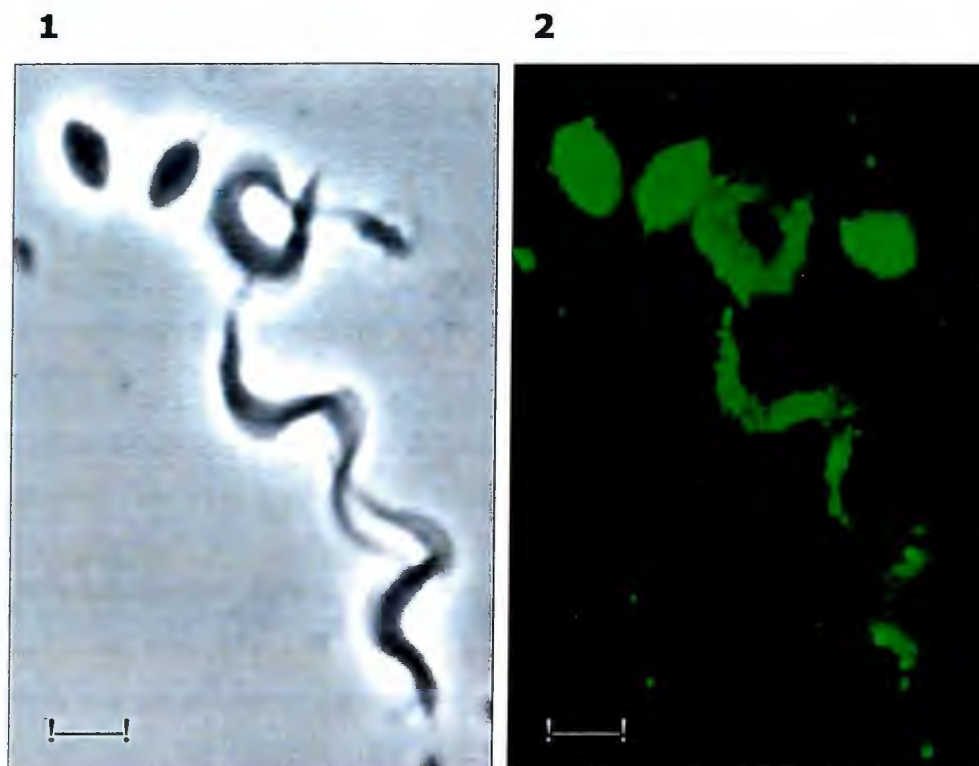


Figura 11 Reatividade por imunofluorescência indireta de tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) com o anticorpo contra Cf16 de *C. fasciculata*

Formas epimastigotas foram fixadas, incubadas seguidamente com anticorpo anti-C16 e com anti-imunoglobulina de camundongo conjugada à fluoresceína, segundo descrito em Material e Métodos.

Barra=5 µm

1. contraste de fase
2. parasitas incubados com anti-Cf16 (1:100)



### 3.1.2.2 análise por "immunoblotting"

Os anticorpos policlonais anti-Cf16 e anti-Cf21 permitiram o reconhecimento de proteínas semelhantes em *T. cruzi*. Como é mostrado na figura 12 a triparredoxina peroxidase (Tc21) foi identificada em extratos celulares totais em vários estágios da diferenciação celular do parasita. O anticorpo policlonal anti-Cf21 mostrou reatividade com uma banda de 21 kDa nos lisados de epimastigota e tripomastigota, condizente com o massa molecular já descrita em *C. fasciculata*.

A triparredoxina (Tc16) foi também identificada por "immunoblotting", em extratos de *T. cruzi* onde uma banda de 16 kDa foi evidenciada por sua reatividade com o anticorpo anti-Cf16 (Fig. 13).

Estes dados são um indicativo de que o sistema peroxidase tripanotiona-dependente está também presente em *T. cruzi*, como já fora mostrado para *C. fasciculata* [71].

## 3.2 sistema peroxidase tripanotiona-dependente em *T. cruzi*

### 3.2.1 isolamento e expressão do gene da triparredoxina peroxidase

Um fragmento de 525 pb foi amplificado por PCR a partir de cDNA, usando-se os oligonucleotídeos desenhados a partir de regiões consenso, como descrito no item 2.11.2. O produto foi clonado em pUC18 originando o plasmídeo pTc21p e seqüenciado. A análise deste fragmento de DNA mostrou uma seqüência de leitura aberta, com alta homologia em relação às seqüências de peroxirredoxinas de tripanosomatídeos já descritas (*T. brucei rhodesiense* [29], *C. fasciculata* [64, 90], *L. major* [53, 100]). O produto obtido corresponde a 90% da seqüência da Tc21, levando-se em conta o tamanho dos genes já descritos.

Nesta fase do trabalho, uma seqüência de *T. cruzi* foi submetida ao GenBank e por comparação com outras seqüências foi identificada como triparredoxina peroxidase (acc. nr. AJ012101). A seqüência parcial do gene da Tc21 obtida neste trabalho tem uma homologia de 100% em relação à publicada e corresponde às posições 1 a 525 (Fig. 14).

A seqüência codante completa foi então obtida por amplificação por PCR usando-se DNA genômico de *T. cruzi* e oligonucleotídeos correspondentes aos codons de iniciação e terminação da seqüência de leitura aberta do gene codante para a Tc21. O produto de PCR obtido continha 599 pb, codificando para uma proteína de 199 aminácidos e uma massa molecular de aproximadamente 21 kDa.

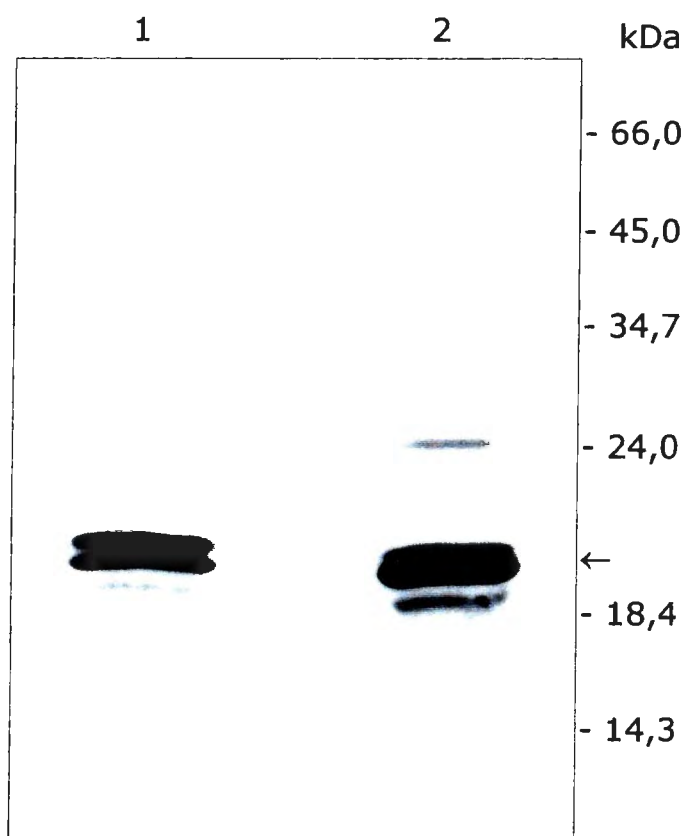


Figura 12 Análise por "immunoblotting" após fracionamento de extrato celular total das formas de *T. cruzi* com o anticorpo anti-Cf21.

O extrato de epimastigotas e tripomastigotas foi submetido a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% e Western blotting. Após a transferência, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-Cf21 (1:1000) e posteriormente reveladas por quimioluminescência, segundo Material e Métodos.

A proteína de 21 kDa (←) e as massas moleculares estão indicadas à direita.

1. extrato total de tripomastigota
2. extrato total de epimastigota

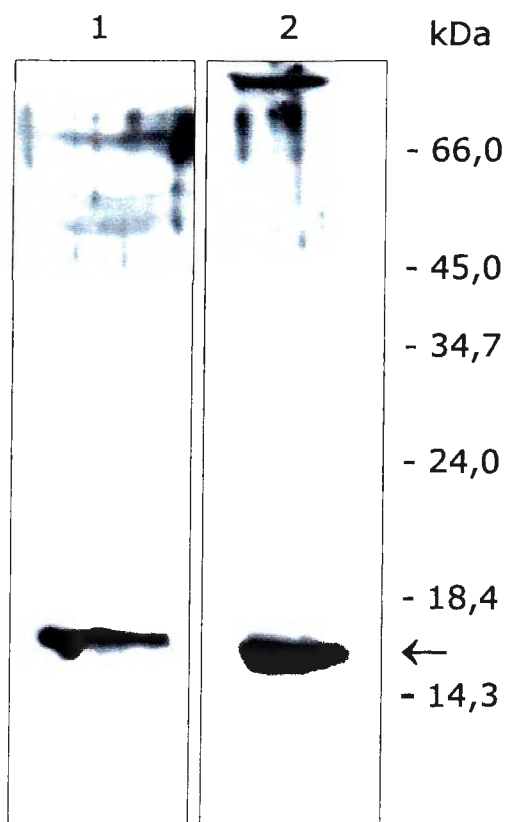


Figura 13 Análise por "immunoblotting" após fracionamento de extrato celular total das formas de *T. cruzi* com o anticorpo anti-Cf16.

O extrato de epimastigotas e tripomastigotas foi submetido a SDS-PAGE em gel de poli-acrilamida a 12% e Western blotting. Após a transferência, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-Cf16 (1:100) e posteriormente reveladas por quimioluminescência, segundo Material e Métodos.

A proteína de 16 kDa (←) e as massas moleculares estão indicadas à direita.

1. extrato total de tripomastigota
2. extrato total de epimastigota

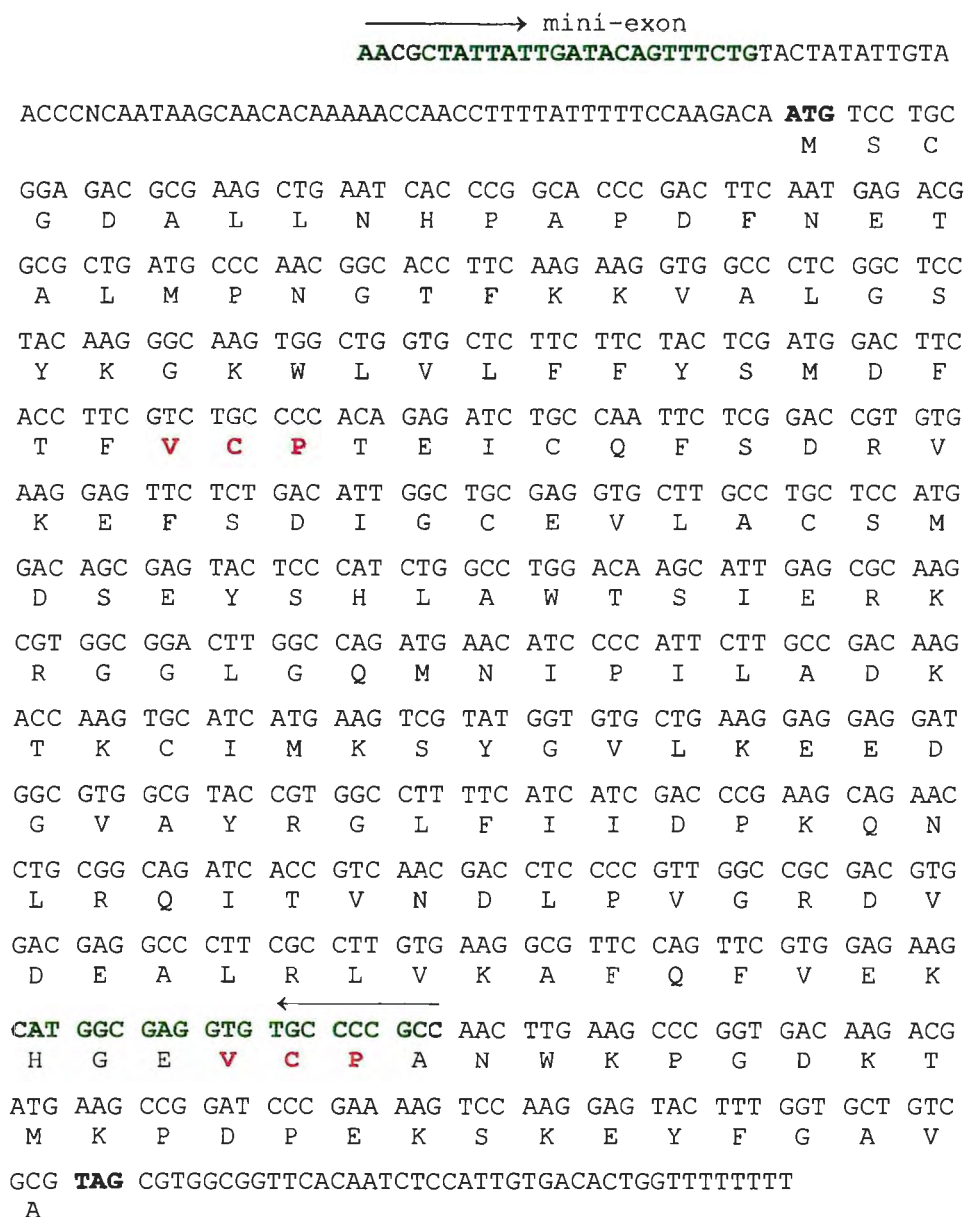


Figura 14 Sequências nucleotídica e de aminoácidos do gene da triparredoxina peroxidase de *T. cruzi*

A seqüência completa está no GenBank (acc. nº AJ012101)

As setas delimitam o produto da amplificação parcial e as seqüências dos oligonucleotídeos usadas no PCR.

Codons de iniciação e de terminação estão indicados em negrito

Motivos VCP estão indicados em vermelho

O gene foi clonado no vetor pET21b para a expressão da proteína em *E. coli* BL21(DE3) (Fig. 15). O crescimento de células transformadas com o plasmídeo pET21b-Tc21 na presença de IPTG resultou na expressão de uma proteína, que migrou com uma massa molecular aparente de  $\approx 25$  kDa ao ser analisada por eletroforese e por Western blot (Fig. 16). Este valor está correlacionado com a massa determinada a partir da seqüência primária de aminoácidos mais a cauda de histidinas (2180 Da) na região N-terminal. A figura 16 mostra o aumento da síntese do peptídeo de  $\approx 25$  kDa, ao longo do tempo após indução com IPTG.

A adição de seis resíduos de histidinas facilita o processo de purificação de proteínas recombinantes em colunas de resina contendo  $\text{Ni}^{2+}$ . Após a eluição com imidazol 500 mM, a proteína se apresentou homogênea após análise em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e "immunoblotting", como é mostrado na figura 17.

As peroxirredoxinas são uma família de proteínas amplamente distribuídas em vários organismos, desde eucariontes até mamíferos. O alinhamento das seqüências de peroxirredoxinas mostrado na figura 18 apresenta entre seus membros uma similaridade oscilando na faixa de 35 a 83%. 26 resíduos são estritamente conservados, inclusive na Tc21, podendo a seqüência de consenso ser expressa por:

$$x_n \text{AX}_{5-6} \text{FX}_9 \text{GX}_3 \text{VX}_2 \text{FX}_1 \text{PX}_2 \text{FTFVCPTEx}_{21} \text{SX}_1 \text{DX}_7 \text{WX}_{16-19} \text{DX}_{15-16} \text{GX}_3 \text{RX}_2 \text{FX}_2 \text{DX}_{27} \text{AX}_1 \text{QX}_{8-13} \text{WX}_n$$

onde  $x_n$  representa uma seqüência de aminoácidos qualquer.

O alinhamento ainda mostra os dois grupos de proteínas, classificadas como 1-Cys e 2-Cys, de acordo com a presença ou não de dois resíduos de cisteína integrando os motivos VCP, próximos às regiões amino- e carboxi-terminal [59]. O primeiro resíduo de cisteína no motivo VCP da região amino-terminal é característico da família das peroxirredoxinas. O resíduo de cisteína próximo à região carboxi-terminal integra também um motivo VCP, presente apenas em parte das seqüências alinhadas. No caso de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-AHPR), esse motivo aparece alterado para LCA, estando, porém, a cisteína em posição homóloga à das proteínas 2-Cys. Já no caso da peroxirredoxina de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc-TSA), a cisteína correspondente a esse motivo, apresenta-se deslocada. As cisteínas desses dois motivos são essenciais para a atividade peroxidásica [22, 63, 64, 71]. A Tc21 pertence à família das peroxirredoxinas 2-Cys, que possuem dois motivos VCP conservados, provavelmente com a Cys<sup>52</sup> e a Cys<sup>173</sup> envolvidas na catálise.

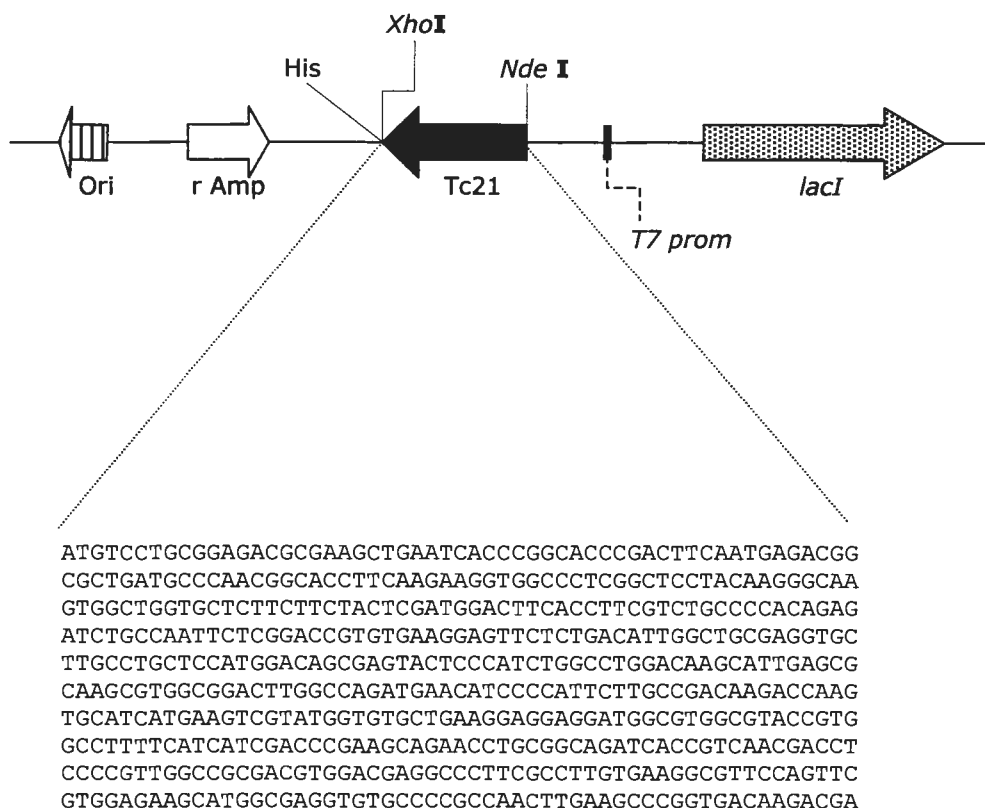


Figura 15 pEt-Tc21 - Estrutura do plasmídeo usado para a expressão da triparredoxina peroxidase em *E. coli*

Os sítios de restrição (*Xho I* e *Nde I*) onde o gene da triparredoxina peroxidase (*Tc21*) foi clonado estão indicados na figura.

*His*: seqüência codante para cauda de histidina;  
*r Amp*: resistência à ampicilina;  
*lac I*: seqüência codante para LacI;  
*ori*: origem pBR322;  
*T7 prom*: promotor T7

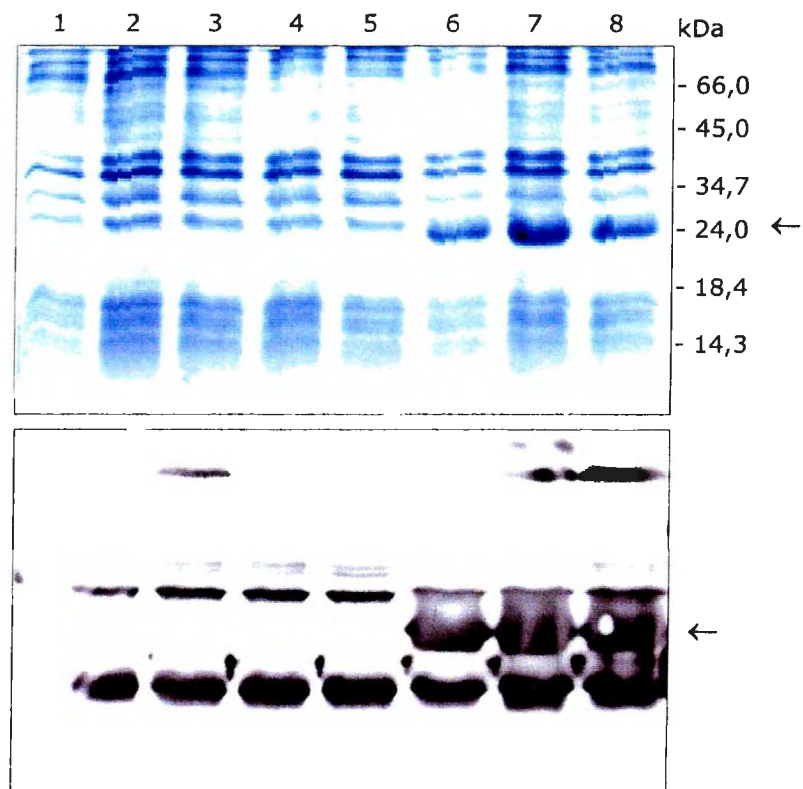


Figura 16 Análise da expressão da tripartredoxina peroxidase recombinante por SDS-PAGE (A) e "immunoblotting" (B)

As bactéria *E. coli* foram sonicadas e o sobrenadante foi submetido a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% e Western blotting. Após a transferência, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-Cf21 (1:300) e posteriormente revelada por quimioluminescência, segundo Material e Métodos.

linhas 1-4: controle em *E. coli* com BL21(DE3)[pET21b]

linhas 5-6: expressão da Tc21 em *E. coli* com BL21(DE3)[pET21b-Tc21]

linhas 1 e 5: amostras tomadas no tempo 0 (antes da indução com IPTG)

linhas 2-4 e 6-8: amostras tomadas entre 1-3 h após indução com IPTG

A Tc21 (←) e as massas moleculares estão indicadas à direita.

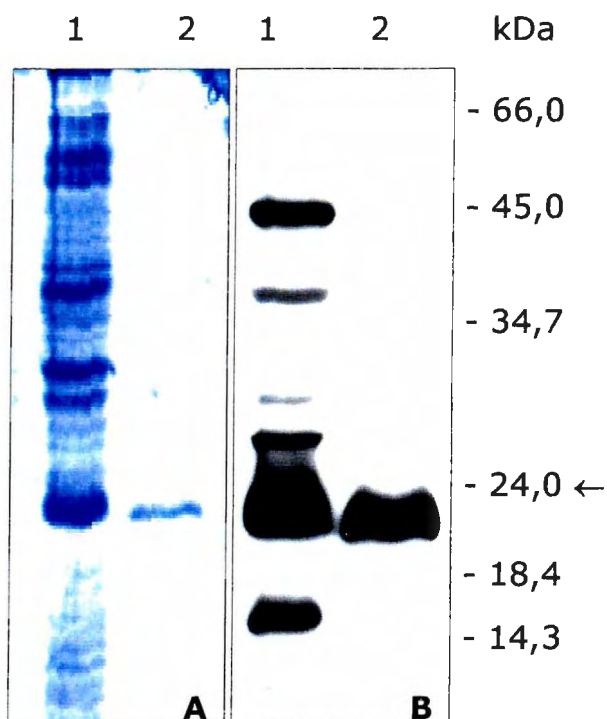


Figura 17 Análise da triparredoxina peroxidase recombinante purificada por SDS-PAGE (A) e "immunoblotting" (B)

A proteína foi submetida a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% e Western blotting. Após a transferência, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-Cf21 (1:300) e posteriormente revelada por quimioluminescência, segundo Material e Métodos.

1. sobrenadante total de *E. coli* com BL21(DE3)[pET21b-Tc21]
2. Tc21 recombinante purificada

A Tc21 (←) e as massas moleculares estão indicadas à direita.



Tc21	~~~~~M	SCGDAKLNHP	APDFNETALM	PNGTFKKVAL	TSYKKGWLVL	50
Cf21	~~~~~M	SCGAAKLNHP	APEFDDMALM	PNGTFKKVSL	SSYKGYVVL	
Tb-TxP	~~~~~M	SCGDAKLNHP	APHFNEVALM	PNGTFKKVDL	ASYRGKWVVL	
Lm-TxP	~~~~~M	SCGNAKINSP	APSFEEVALM	PNGSFKKISL	SSYKKGWVVL	
Bs-AHPR	~~~~~	~~~MSLIGKE	VLPFEAKA.F	KNGEFIDVTN	EDLKGQWSVF	
Ec-AHPR	~~~~~	~~~~MSLINTK	IKPFKNQA.F	KNGEFIEITE	KDTEGRWSVF	
Hs-NKEF- $\alpha$	~~~~~M	SSGNAKIGHP	APNFKATAVM	PDGQFKDISL	SDYKGYVVF	
Hs-NKEF- $\beta$	~~~~~M	ASGNARIGKP	APDFKATAVV	.DGAFFKEVKL	SDYKGYVVL	
Sc-TSA	~~~~~	~~MVAQVQKQ	APTFKKTAVV	.DGVFDEVSL	DKYKGYVVL	
Mt-AHPR	MPLLTIGDQF	PAYQLTALIG	GDLSKVDKQ	PGDYFTTITS	DEHPGKWRVV	
Tc21	<b>FFYPMDFTFV</b>	<b>CPTEICQFSD</b>	RVKEFSDIGC	EVLACSMDS	YSHLAWTSIE	100
Cf21	<b>FFYPMDFTFV</b>	<b>CPTEIIQFSD</b>	DAKRFAEINT	EVISCSCDSE	YSHLQWTSVD	
Tb-TxP	<b>FFYPLDFTFV</b>	<b>CPTEICQFSD</b>	RVKEFNDVDC	EVIACSMDS	FSHLAWTNE	
Lm-TxP	<b>FFYPLDFTFV</b>	<b>CPTEVIAFSD</b>	SVSRFNEI LNC	EVLACSIDSE	YAHLQWTLQD	
Bs-AHPR	<b>CFYPADFTFV</b>	<b>CPTELEDLQE</b>	QYAALKELGV	EVYSVSTDTH	FVHKGWHDS	
Ec-AHPR	<b>FFYPADFTFV</b>	<b>CPTELGDVAD</b>	HYEELQKLG	DVYAVSTDTH	FTHKAWHSS	
Hs-NKEF- $\alpha$	<b>FFYPLDFTFV</b>	<b>CPTEIIAFSD</b>	RAEEFKKLN	QVIGASVDSH	FCHLAWVNT	
Hs-NKEF- $\beta$	<b>FFYPLDFTFV</b>	<b>CPTEIIAFSN</b>	RAEDFRKLG	EVLGVSVDSD	FTHLAWINT	
Sc-TSA	<b>AFIPLAFTFV</b>	<b>CPTEIIAFSE</b>	AAKKFEEQGA	QVLFASDTSE	YSLLAWTNIP	
Mt-AHPR	<b>FFWPKDFTFV</b>	<b>CPTEIAAFSK</b>	LNDEFEDRDA	QILGVSIDSE	FAHFQWRA..	
Tc21	RKRGGLGQMN	IPILADKTKC	IMKSYGVLKE	EDGVAYRGLF	IIDPKQNLRQ	150
Cf21	RKKGGLGPM	IPMLADKTKG	IARAYGVLDE	DSGVAYRGVF	IIDPNGKLRQ	
Tb-TxP	RKKGGLGTMN	IPILADKTKS	IMKAYGVLKE	EDGVAYRGLF	IIDPQNLRQ	
Lm-TxP	RKKGGLGTMA	IPMLADKTKS	IARSYGVLEE	SRGVAYRGLF	IIDPHGMLRQ	
Bs-AHPR	EK...ISKIT	YAMIGDPSQT	ISRNFDVLDE	ETGLADRGT	IIDPDGVIQT	
Ec-AHPR	ET...IAKIK	YAMIGDPTGA	LTRNFDNMRE	DEGLADRATF	VVDPQGIIQA	
Hs-NKEF- $\alpha$	KKQGGGLGPMN	IPLVSDPKRT	IAQDYGVLKA	DEGISFRGLF	IIDDKGILRQ	
Hs-NKEF- $\beta$	RKEGGLGPLN	IPLLADVTRR	LSEDYGVLT	DEGIAYRGLF	IIDGKGVLRQ	
Sc-TSA	RKEGGLGPI	IPLLADTNHS	LSRDYGVLT	EEGVALRGLF	IIDPKGVIIRH	
Mt-AHPR	QHNDLKTL	FPMLSDIKRE	LSQAAGVLNA	D.GVADRVT	IVDPNNEIQF	
Tc21	ITVNDLPVGR	DVDEALRLVK	<b>AFQFVEKH.G</b>	<b>EVCPANWKP</b>	DKTMKPDPEK	200
Cf21	IIINDMPIGR	NVEEVIRLVE	<b>ALQFVEEH.G</b>	<b>EVCPANWKK</b>	DAKKKEGH~~	
Tb-TxP	ITVNDLPVGR	NVDETLRLVK	<b>AFQFVEKH.G</b>	<b>EVCPANWKP</b>	SKTMKADPNG	
Lm-TxP	ITVNDMPVGR	SVEEVLRLLE	<b>AFQFVEKH.G</b>	<b>EVCPANWKK</b>	APTMKPEPKA	
Bs-AHPR	VEINAGGIGR	DASNLVNKVK	<b>AAQYVRQNP</b>	<b>EVCPAKWEEG</b>	GETLTPSLDL	
Ec-AHPR	IEVTAEGIGR	DASDLLRKIK	<b>AAQYVASHPG</b>	<b>EVCPAKWEEG</b>	EATLAPSLDL	
Hs-NKEF- $\alpha$	ITVNDLPVGR	SVDETLRLVQ	<b>AFQFTDKH.G</b>	<b>EVCPAGWKP</b>	SDTIKPDVQK	
Hs-NKEF- $\beta$	ITVNDLPVGR	SVDEALRLVQ	<b>AFQYTDH.G</b>	<b>EVCPAGWKP</b>	SDTIKPNVDD	
Sc-TSA	ITVNDLPVGR	NVDEALRLVE	<b>AFQWTDKN.G</b>	<b>TVLPNWT</b>	AATIKPTVED	
Mt-AHPR	VSATAGSVGR	NVDEVLRVLD	<b>ALQ...S.D</b>	<b>ELCACNWRK</b>	DPTLDAGELL	
Tc21	SKEYFGAVA~	210				
Cf21	~~~~~					
Tb-TxP	SQDYFSSMN~					
Lm-TxP	SVEGYFSKQ~					
Bs-AHPR	VGKI~~~~~					
Ec-AHPR	VGKI~~~~~					
Hs-NKEF- $\alpha$	SKEYFSKQK~					
Hs-NKEF- $\beta$	SKEYFSKHN~					
Sc-TSA	SKEYFEAANK					
Mt-AHPR	KASA~~~~~					

Figura 18 Alinhamento de seqüências da triparredoxina peroxidase de *T. cruzi* com várias peroxirredoxinas putativas ou identificadas como peroxirredoxinas de vários organismos.

Aminoácidos de motivos estritamente conservados estão marcados em negrito

Tc: *T. cruzi*; Cf: *C. fasciculata*; Lm: *L. major*; Tb: *T. b. rhodesiense*; Bs:

*B. subtilis*; Ec: *E. coli*; Hs: *H. sapiens*; Sc: *S. cerevisiae*; Mt: *M. tuberculosis*

AHPR: alquil-hidroperóxido redutase; NKEF: "natural killer enhancing factor"

TSA: "thiol-specific antioxidant"

Dois triptofanos e uma glutamina estão estritamente conservados nas triparredoxinas peroxidases e são importantes na atividade enzimática, principalmente o Trp<sup>87</sup>, próximo à Cys<sup>52</sup> do primeiro motivo VCP. A substituição do Trp<sup>87</sup> por His, Glu e Asp na triparredoxina peroxidase de *C. fasciculata* resultou em perda da atividade enzimática. A substituição da Trp<sup>178</sup> gerou uma enzima menos ativa [63], mostrando que esse aminoácido é importante, mas não essencial.

É necessário frisar que a Tc21 apresenta esses motivos estritamente conservados nesta família de proteínas, sendo portanto definida como uma peroxirredoxina 2-Cys com uma atividade funcional de peroxidase. Esta enzima apresenta uma similaridade oscilando entre 70 a 83% ao ser comparada às peroxirredoxinas já descritas em outros tripanossomatídeos (*C. fasciculata*, *T. b. rhodesiense* e *L. major*) mostrando a alta conservação existente nos genes destes microrganismos [12, 29]

### 3.2.2 tentativa de isolamento do gene da triparredoxina

Um fragmento de 225 pb foi amplificado por PCR a partir de cDNA de *T. cruzi*, usando-se os oligonucleotídeos desenhados da região consenso correspondente ao sítio ativo das tiorredoxinas-símiles (WCPPC) e da região do mini-exon (extremidade 5'), como descrito no item 2.12. O fragmento de DNA foi clonado em pUC18, seqüenciado e a análise da seqüência não apresentou homologia com tiorredoxinas-símiles já descritas em tripanossomatídeos. Além disso, embora apresentando o codon de iniciação, foram verificados vários codons de terminação ao longo da seqüência, apesar de apresentar alta homologia com uma seqüência descrita no GenBank (Fig. 19).

Tentativas de isolar o gene com oligonucleotídeos iniciadores referentes às regiões do mini-exon, do sítio ativo e oligo-dT foram infrutíferas. Neste mesmo período foi submetida ao GenBank uma seqüência (acc. nr. AF106855), que embora apresentando uma baixa similaridade (37%) em relação às isoformas de triparredoxina de *C. fasciculata* [36, 62, 90] e de *T. brucei* [54], esta proteína foi classificada como triparredoxina por apresentar o motivo WCPPC, correspondente ao sítio ativo da enzima (Fig. 20).

Provavelmente, a Tc16 pertence a uma família multigênica, cujos membros estariam envolvidos em diferentes papéis metabólicos, sendo mediadores redox pleiotrópicos em tripanossomatídeos, assim como as tiorredoxinas estão envolvidas na transferência de equivalentes reduzidos e em outros processos metabólicos [38, 87]. Lüdemann *et alii* [54], em estudos preliminares, evidenciaram que a triparredoxina de *T. brucei* é um substrato para a ribonucleotídeo redutase, reforçando a hipótese acima.

## A

mini-exon

```

AACGCTATTATTGATACAGTTTCTGTACTATATTTTTTTGAGTGAGACCGATTACCTTTA      60
TGTCTTCTGCCTTCCNATGGTGTAGGATGTAATGAAAGGCATTTTCTTTTTTACATGTTTT      120
TTTTCTTTTTTTATTAGAGGACAGCTGCGCAAGCTGTAACAAATAATAAAAAGAGTTTTT      180
TCCTCAACGGTGTGCATGCGTGCCTAAAGGCATGCGTGCAGGTTTTTTCGCCCCCTCTCCC      240
GCGAGCTGGTGCCCGCCGTGC                                             263

```

## B

gb|AF052831|AF052831 *Trypanosoma cruzi* CL Brener cosmid 1o17 chromosome 3

Score = 216 bits (109), Expect = 2e-54

Identities = 115/117 (98%)

```

TC16?:      74  attagaggacagctgcgcaagctgtaacaaataataaaaagagtttttctcaacggtg      133
CLBrener 7407  attagaggacagctgcgcaagctgtaacaaataataaaaagagtttttctcaacggtg      7348

```

```

TC16?:      134  tcatgcgctgcctaaaggcatgctgaggtttttgccccctctcccgcgagctgg      190
CLBrener 7347  tcatgcgctgcctacaggcatgctgaggtttttgccccctctcccgcgagctgg      7291

```

Score = 83.8 bits (42), Expect = 1e-14

Identities = 42/42 (100%)

```

TC16?:      1  atgtcttctgccttccaatggtgtaggatgtaatgaaaggca 42
CL Brener  7479 atgtcttctgccttccaatggtgtaggatgtaatgaaaggca 7438

```

gb|AF055913|AF055913 *C. fasciculata* tryparedoxin (TryX) gene, complete cds

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.003

Identities = 23/23 (100%)

```

Tc16?      180  ccgcgagctggtgcccccgctgc 202
TryX       549  ccgcgagctggtgcccccgctgc 571

```

gb|AF055986|AF055986 *C. fasciculata* tryparedoxin II (txnII) gene, complete cds

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.003

Identities = 23/23 (100%)

```

Tc16?:      180  ccgcgagctggtgcccccgctgc 202
txnII:     306  ccgcgagctggtgcccccgctgc 328

```

gb|AF084456.1|AF084456 *C. fasciculata* tryparedoxin I (txnI) gene, complete cds

Score = 46.1 bits (23), Expect = 0.003

Identities = 23/23 (100%)

```

Tc16?      180  ccgcgagctggtgcccccgctgc 202
txnI :     167  ccgcgagctggtgcccccgctgc 189

```

Figura 19 Amplificação parcial de suposta seqüência da triparredoxina de *T. cruzi* (A) e homologia com seqüências existentes no GenBank (B)

Regiões sublinhadas em A indicam os oligonucleotídeos usados na amplificação

```

1 50
Cf16II MYHTLLYDFR DSVPHMSGLK KFFFPYSTNVL KGAAADIALP SLAGKT.VF
Cf16I  ~~~~~~ ~~~~~MSGLD KYLPGIEKLR RG.DGEVEVK SLAGKL.VFF
Tb16   ~~~~~~ ~~~~~MSGLA KYLPGATNLL SK.SGEVSLG SLVGKT.VFL
Tc16   ~~~~~~ ~~~~~MLPRV LGAGTLELLR QDGSNVTASK ALQGKKYLLV

51 100
Cf16II YFSASWCPPC RAFTPQLIDF YKAHAEKKNF EVMLISWDES AEDFKDY...
Cf16I  YFSASWCPPC RGFTPQLIEF YDKFHESKNF EVVFCTWDEE EDGFAGY...
Tb16   YFSASWCPPC RGFTPVLAEF YEKHHVAKNF EVVLISWDEN ESDFH...
Tc16   YLSASWCPPC RFFTPKLAAF YESFHNSHNF EIVFVSQDRD ERSMQAYFHN

101 150
Cf16II ..YAKM.... .....PWLA LPFEDRKGME .FLTTFDVK SIPTLVGVEA
Cf16I  ..FAKM.... .....PWLA VPFAQSEAVQ .KLSKHFNVE SIPTLIGVDA
Tb16   ..YGKM.... .....PWLA LPFDQRSTVS .ELGKTFGVE SIPTLITINA
Tc16   QKYSKLAVRG GEGSHGDWLA VPYEQAKRLG VTLMQTYAIR GIPMLLLFDL

151 200
Cf16II DSGNIITTQA RTMVVKDPE. AKDFPWPVNE AKK~~~~~ ~~~~~
Cf16I  DSGDVVTTTRA RATLVKDPE. GEQFPWKDAP ~~~~~ ~~~~~
Tb16   DTGAIIGTQA RTRVIEDPD. GANFPWPN~~ ~~~~~ ~~~~~
Tc16   ETGELVTRNA RDLVARNLDT AEGFPWAGNT DGEGLRGSYW NQLFLVFIIA

201 208
Cf16II ~~~~~~
Cf16I  ~~~~~~
Tb16   ~~~~~~
Tc16   SVLYQFWR

```

Figura 20 Alinhamento da triparredoxina de *T. cruzi* com outras seqüências de proteínas homólogas identificadas em outros tripanossomatídeos.

Motivo conservado em destaque corresponde ao sítio ativo

Tc16: *T. cruzi* (acc. nr. AF10685); Cf21 I: *C. fasciculata* (acc. nr. AF084456)

Cf21 II: *C. fasciculata* (acc. nr. AF055986) Tb16: *T. b. brucei* (acc. nr. AJ006403)

### 3.2.3 demonstraçãõ da atividade de peroxidase tripanotiona-dependente

Baseando-se na similaridade entre a Tc21 e peroxirredoxinas de tripanossomatídeos [29, 64], foi testada atividade peroxidásica usando-se a triparredoxina recombinante (Cf16) de *C. fasciculata* para reduzir a Tc21 e o substrato final, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A figura 21 mostra que o catabolismo de peróxidos é feito pela ação combinada de três diferentes proteínas (Fig. 21a-c). A atividade de peroxidase depende da presença de Tc21 (Fig. 21b) e de Cf16 (Fig. 21c), assim como de tripanotiona e de tripanotiona redutase, de acordo com a hipótese estabelecida por Nogoceke *et alii* [71]. Os pequenos decréscimos de absorbância na curva **e** da figura 20 correspondem principalmente ao efeito da diluição do NADPH, observados durante o experimento imediatamente após a adição das proteínas e dos substratos da reação. Podem também acontecer pequenos decréscimos devido à redução da Cf16 pela T(SH)<sub>2</sub>, e da Tc21 pela Cf16. A curva **d** (Fig. 21) é um indicativo de que a reação só acontece se os três componentes proteicos estão presentes: a triparredoxina, a triparredoxina peroxidase e a tripanotiona redutase. Esses experimentos forneceram para atividade de proteína recombinante um valor de 2,2 U mg<sup>-1</sup>. Não se conhecendo o valor da atividade da proteína nativa de *T. cruzi*, pode-se somente dizer que o valor obtido é condizente com o de 2,51 U mg<sup>-1</sup>, determinado para a triparredoxina peroxidase recombinante de *C. fasciculata* [64]. Nesse caso em particular, o valor é três vezes menor que o mostrado pela proteína nativa (5,83 U mg<sup>-1</sup>) [71]. Esta diferença foi atribuída pelos autores à presença da cauda de histidinas na extremidade carboxílica.

De acordo com esses resultados, pode então ser proposto um mecanismo similar de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *T. cruzi*, de acordo com a hipótese estabelecida por Nogoceke *et alii* [71] em *C. fasciculata* que envolve duas enzimas: a triparedoxina peroxidase (Tc21) e o homólogo da Cf16 em *T. cruzi*, dois substratos: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e T(SH)<sub>2</sub>, além de dois componentes do sistema de reação: tripanotiona redutase e o NADPH.

### 3.2.4 localização do sistema peroxidase tripanotiona-dependente

Utilizando-se a proteína Tc21 recombinante purificada, obteve-se um anticorpo policlonal que, por imunofluorescência indireta, reconhece como esperado tanto epimastigotas como tripomastigotas de *T. cruzi* (dados não mostrados). Para localizar o antígeno, as frações solúvel (após centrifugação do extrato celular a 10<sup>5</sup> x g) e precipitada, contendo membranas do parasita, foram submetidas a "Western blotting" com o anticorpo anti-Tc21. Em epimastigotas e em tripomastigotas, o antígeno foi detectado tanto na fração solúvel como na precipitada. Esses resultados mostram que pelo menos parte do antígeno pode

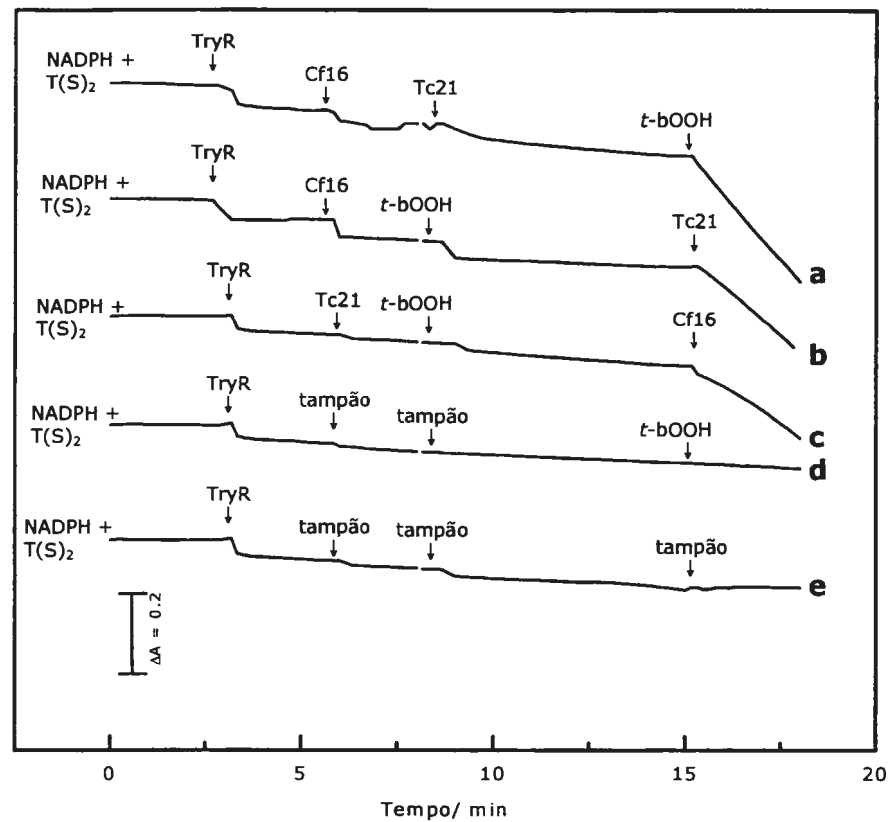


Figura 21 Reconstituição do sistema peroxidase tripanotona-dependente de *T. cruzi*.

Experimentos feitos a 27°C num sistema heterólogo de reação a partir de componentes isolados de *C. fasciculata* e *T. cruzi*.

O teste foi feito com NADPH 0,1mM em HEPES 50mM pH 7,6 contendo peróxido de *t*-butil 50 μM, T(SH)<sub>2</sub> 45 μM, triparredoxina de *C. fasciculata* (Cf16) 12μg, Tc21 15μg e tripanotona redutase 0,4U. O consumo de NADPH foi medido espectrofotometricamente a 340nm

estar associado a membranas de alguma organela (Fig. 22). A localização desse antígeno no entanto só poderá ser conhecida após experimentos envolvendo imunolocalização por microscopia de transição. Deve-se ressaltar no entanto que a reatividade do anticorpo anti-Cf21 com tripomastigotas observada por microscopia confocal (Fig. 9), sugere a localização da Tc21 também na membrana plasmática, o que não foi observado em epimastigotas.

Nesse contexto, é interessante lembrar que recentemente foi descrita uma peroxirredoxina mitocondrial em *T. cruzi* [101], com 60% de similaridade com o gene codante da Tc21 e que por microscopia de transmissão foi localizada circundando o cinetoplasto. A proteína mitocondrial é uma peroxirredoxina Cys-1, uma vez que não apresenta o resíduo de cisteína na posição 173. Ambas as peroxirredoxinas, a mitocondrial e a citossólica (Fig. 24), são idênticas na região correspondente ao motivo VCP N-terminal (FTFVCPTE), motivo típico das peroxirredoxinas [59].

Na figura 22 observa-se também uma banda de  $\approx 44$  kDa reconhecida pelo anticorpo anti-Tc21 em extratos celulares das formas de *T. cruzi*. A presença de dímeros e polímeros é descrita para outras peroxirredoxinas e parece ser uma característica comum desta família de proteínas [22, 44, 45, 82], sendo observada também quando a proteína recombinante foi analisada.

Resultados análogos têm sido obtidos com as peroxirredoxinas citoplasmática e mitocondrial de *T. cruzi* [101], de *C. fasciculata* [70, 71, 90] e de *L. major* [53].

Quanto à localização da Tc16, experimentos feitos mostraram que o antígeno reconhecido pelo anticorpo anti-Cf16 se encontra somente na fração solúvel, tanto na forma epimastigota quanto na forma tripomastigota de *T. cruzi* (Fig. 23), sugerindo uma localização citossólica.

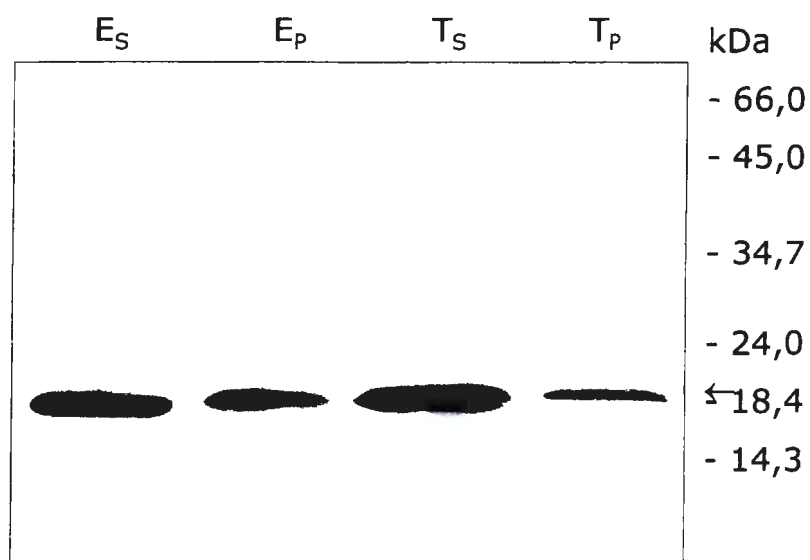


Figura 22 Reatividade do anticorpo anti-Tc21 por "immunoblotting" nas frações solúvel e membranar de epimastigota e de tripomastigota de *T. cruzi*

As preparações de proteínas membranares e solúveis foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% e Western blotting. Após a transferência, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-Tc21 (1:200) e posteriormente reveladas por quimioluminescência, segundo Material e Métodos.

A proteína de 21 kDa ( $\leftarrow$ ) e as massas moleculares estão indicadas à direita.

E = epimastigotas; T = tripomastigotas

S = fração solúvel; P = precipitado ou fração membranar

As frações foram obtidas por centrifugação a  $10^5 \times g$



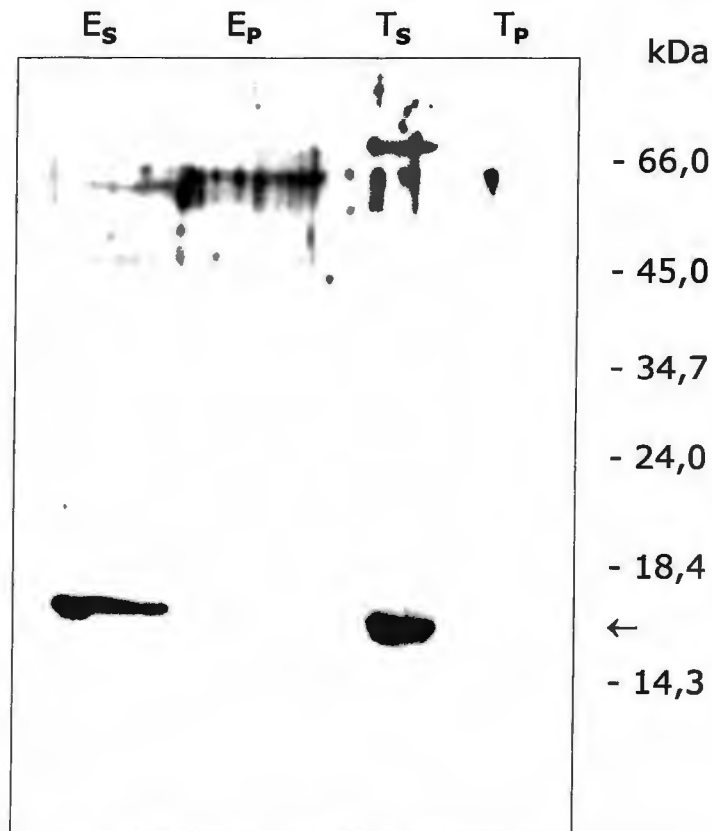


Figura 23 Reatividade do anticorpo anti-Cf16 por "immunoblotting" nas frações solúvel e membranar de epimastigota e de tripomastigota de *T. cruzi*

As preparações de proteínas membranares e solúveis foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% e Western blotting. Após a transferência, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-Cf16 (1:200) e posteriormente reveladas por quimioluminescência, segundo Material e Métodos.

A proteína de 16 kDa (←) e as massas moleculares estão indicadas à direita.

E = epimastigotas; T = tripomastigotas  
S = fração solúvel; P = precipitado ou fração membranar

As frações foram obtidas por centrifugação a  $10^5 \times g$

```

Tc21-m  MFRRMAVTSL QKGLSRR AFC NTLRLNLNDY QAYKTATVRE AAPEWAGKAV 50
Tc21    ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~ MSCGDAKLNH PAPDFNETAL

Tc21-m  V.NGKIQDIS LNDYKGYV LLFYPMDFTF VCPTEITAFS DAQAEFDKIN 100
Tc21    MPNGTFKKVA LTSYKQWLV LLFYPMDFTF VCPTEICQFS DRVKEFSDIG

Tc21-m  TQVAVSCDS QYSHLAWINT PRNKGG LGEM SIPVLSDLTK EIARDYGVLI 150
Tc21    CEVLACSMDS EYSHLAWTSI ERKRGG LGQM NIPILADKTK CIMKSYGVLK

Tc21-m  EEQGISLRGL FIIDDKGILR HITVNDLPVG RNVEEVL RVV QAFQYVDKNG 200
Tc21    EEDGVAYRGL FIIDPKQNLR QITVNDLPVG RDVDEALRLV KAFQFVEKHG

Tc21-m  DVIPCNWRPG KPTMK..TEK ANEYFEKNA 229
Tc21    EVCPANWKPG DKTMKPDPEK SKEYFGAVA

```

Figura 24 Alinhamento das seqüências das peroxirredoxinas de *T. cruzi*

Tc21: peroxirredoxina citossólica (acc. nr. AJ012101)  
Tc21: peroxirredoxina mitocondrial (acc. nr. AJ0026226)  
▼ domínios contendo as cisteínas dos motivos redox ativos  
Motivos conservados estão indicados em negrito

#### **4. conclusão**

Os resultados experimentais apresentados mostram que o sistema peroxidase tripanotiona-dependente existe em *T. cruzi*, confirmando que a Tc21 é responsável pela redução de  $H_2O_2$  e, que surpreendentemente, a Cf16, de *C. fasciculata*, foi eficiente na redução da peroxidase.

Muito embora o sistema enzimático peroxidase tripanotiona-dependente precise ser melhor estudado e as condições para a medida do ensaio enzimático melhor estabelecidos, a informação bioquímica obtida experimentalmente indica se tratar de agentes celulares envolvidos no estresse oxidativo. Frente aos dados apresentados, a hipótese de que a redução de peróxidos em *T. cruzi* seria um processo meramente não-enzimático, deve ser cuidadosamente reavaliada. Além disso, dados na literatura mostram que esse sistema está presente em outros patógenos, apontando novos alvos potenciais para o desenvolvimento racional de inibidores, abrindo novas estratégias a serem usadas no combate à doença, levando-se em conta que os atuais quimioterápicos são insatisfatórios.

Considerando os resultados apresentados, pode-se concluir:

1. que, o reconhecimento por métodos imunoquímicos confirmou a existência do sistema peroxidase tripanotiona-dependente em *T. cruzi*;
2. que, o isolamento, clonagem e expressão do gene da triparredoxina peroxidase (Tc21) num sistema heterólogo permitiu obter uma proteína de 21 kDa, cuja identificação funcional ao catalisar a redução de  $H_2O_2$ , permite classificá-la como uma peroxidase;
3. que, a triparredoxina peroxidase de *T. cruzi* apresentou dois resíduos de cisteína (Cys<sup>52</sup> e Cys<sup>173</sup>) inseridos nos dois motivos VCP e, portanto, uma típica peroxirredoxinas;
4. que, *T. cruzi* não é totalmente deficiente na sua capacidade para detoxificar hidroperóxidos;
5. que, o sistema de detoxificação depende de três enzimas (tripanotiona redutase, triparredoxina e triparredoxina peroxidase), dois substratos (tripanotiona e hidroperóxido), além do doador de elétrons para se processe a reação redox do fluxo de equivalentes reduzidos.

## **5. referências bibliográficas**

1. Aksoy S (1993) A family of target site-specific retrotransposons interrupts spliced leader RNA genes in trypanosomatids. **J. Parasitol.**, **79**:645-651
2. Almeida-de-Faria M, Freymüller E, Colli W & Alves MJM (1999) *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Exp. Parasitol.**, **92**:263-274
3. Alphey SA, Leonard GA, Gourley DG, Tetaud E, Fairlamb AH & Hunter WN (1999) The high resolution crystal structure of recombinant *Crithidia fasciculata* trypanothione reductase. **J. Biol. Chem.**, **274**:25613-25622
4. Andrews NW & Colli W (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J. Protozool.**, **29**:264-269
5. Ariyanayagam MR & Fairlamb AH (1999) *Entamoeba histolytica* lacks trypanothione metabolism. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **103**:61-69
6. Bayley S, Smith K, Fairlamb AH & Hunter WH (1993) Substrate interactions between trypanothione reductase and N'-glutathionylspermidine disulfide at 0.28-nm resolution. **Eur. J. Biochem.**, **231**:67-75
7. Bond CS, Zhang Y, Berriman M, Cunningham ML, Fairlamb AH & Hunter WN (1999) Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, **7**:81-89
8. Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF & Stoppani AOM (1980) Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, **188**:643-648
9. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**:248-254
10. Brener Z (1992) *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. In: **Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. Wendel S. *et al.*, ed.; Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia: São Paulo, p.49-80
11. Brener Z, Costa CA & Chiari C (1976) Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. **Rev Inst. Med. Trop. São Paulo**, **18**:450-455
12. Bringaud F, Vedrenne C, Cuvillier A, Parzy D, Baltz D, Tetaud E, Pays E, Venegas J, Merlin G & Baltz T (1998) Conserved organization of genes in trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **94**:249-264
13. Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, **58**:79-110
14. Cançado JR (1999) Tratamento etiológico da doença de Chagas pelo benzonidazol. In: **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Brener Z *et al.*, ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, cap 19, p.389-405
15. Carnieri, EGS; Moreno, SNJ & Docampo, R (1993) Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **61**:79-86
16. Castellani O, Ribeiro LV & Fernandes JF (1967) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozool.** **14**:447-451

17. Cazzulo JJ (1992) Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEB J.**, **6**:3153-3161
18. Cha MK & Kim IH (1995) Thioredoxin-linked peroxidase from human red blood cell:evidence of the existence of thioredoxin and thioredoxin reductase in human red blood cell. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **217**:900-907
19. Chae HZ, Chung SJ & Rhee SG (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. **J. Biol. Chem.**, **269**:27670-27678
20. Chae HZ, Kang SW & Rhee SG (1999) Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. **Methods Enzymol.**, **300**:219-226
21. Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G & Rhee SG (1994) Cloning and sequencing of 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
22. Chae HZ, Uhm TB & Rhee SG (1994) Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**:7022-7026
23. Chance B, Sies H & Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, **59**:527-605
24. Coombs GH & Motram JC (1997) Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitol.**, **114**:S61-S80
25. Costa F, Franchin G, Pereira-Chioccola VL, Ribeirão M, Schenkman S & Rodrigues MM (1998) Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine**, **16**:768-774
26. Dias JCP & Schofield CJ (1999) The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control 90 years since Carlos Chagas discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**(suppl. I): 103-121
27. Docampo R & Moreno SNJ (1990) Free radical metabolism in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cell on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, **6**:223-238
28. Docampo R & Stoppani AOM (1979) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **197**:317-321
29. El-Sayed NMA, Alarcón CM, Beck JC, Sheffield VC & Donelson JE (1995) cDNA expressed sequence tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into the biology of the parasite. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **73**:75-90
30. Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT & Cerami A (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, **227**:1485-1487
31. Fairlamb AH & Cerami A (1985) Identification of a novel thiol-containing cofactor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **14**:187-198
32. Fairlamb AH & Cerami A (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. **Annu. Rev. Microbiol.**, **46**:695-729
33. Ferguson MAJ (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J. Cell. Sci.**, **112**:2799-2809

34. Flohé L (1998) The Achilles's heel of trypanosomatids: trypanothione-mediated hydroperoxide metabolism. **BioFactors**, **8**:87-91
35. Flohé L, Hecht HJ & Steinert P (1999) Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Rad. Biol. Med.**, **27**:966-984
36. Guerrero SA, Flohé L, Kalisz HM, Montemartini M, Nogoceke E, Hecht HJ, Steinert P & Singh M (1998) Sequence, heterologous expression and functional characterization of tryparedoxin I from *Crithidia fasciculata*. **Eur. J. Biochem.**, **259**:789-794
37. Henderson GB, Fairlamb AH & Cerami A (1987) Trypanothione dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **24**:39-45
38. Holmgren A (1984) Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin. **Methods Enzymol.**, **107**:295-300
39. Hunter KJ, Le Quesne SA & Fairlamb AH (1994) Identification and biosynthesis of N<sup>1</sup>, N<sup>9</sup>- bis (glutathionyl) aminopropylcadaverine (homotrypanothione) in *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Biochem.**, **226**:1019-1027
40. Ismail SO, Paramchuk W, Sheyky YA, Reed SG, Bhatia A & Gedamu L (1997) molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **86**:187-197
41. Ivens AC, Lewis SM, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan HM & Smith DF (1998) A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. **Genome Res.**, **8**:135-145
42. Jeong J S, Kwon SJ, Kang SW, Rhee SG & Kim K (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem.**, **38**:776-783
43. Kalisz HM, Nogoceke E, Gommel DU, Hofmann B, Flohé L & Hecht HJ (1999) Crystallization and preliminary X-ray analysis of tryparedoxin I from *Crithidia fasciculata*. **Acta Cryst.**, **D55**:696-698
44. Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC & Rhee SG (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor  $\alpha$ . **J. Biol. Chem.**, **273**:6297-6302
45. Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG & Stadtman EA (1988) The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. **J. Biol. Chem.**, **263**:4704-4711
46. Knoops B, Clippe A, Bogard C, Arsalane K, Wattiez R, Hermans C, Duconseille E, Falmagne P & Bernard A (1999) Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. **J. Biol. Chem.**, **274**:30451-30458
47. Koenig K, Menge U, Michael Kieß M, Wray V, & Flohé L (1997) Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. **J. Biol. Chem.**, **272**:11908-11915
48. Krauth-Siegel RL & Coombs GH (1999) Enzymes of parasite thiol metabolism as drugs targets. **Parasitol. Today.**, **15**:404-409
49. Krauth-Siegel RL, Enders B, Henderson GB, Fairlamb AH & Schirmer RH (1987) Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. **Eur. J. Biochem.**, **164**:123-128



50. Laemmli UK (1970) Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-685
51. Lee TH, Yun SL, Kim, SU, Kim YM, Choi I, Kang SW, Rhee SG & Yu DY (1999) Characterization of the murine gene encoding 1-Cys peroxiredoxin and identification of highly homologous genes. **Genes**, **234**:337-344
52. Le Trant N, Meshnick SR, Kitchener K, Eaton JW & Cerami A (1983) Iron-containing superoxide dismutase from *Crithidia fasciculata*. **J. Biol. Chem.**, **258**:125-130
53. Levick MP, Tetaud E, Fairlamb AH & Blackwell JM (1998) Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **96**:125-137
54. Lüdemann H, Dormeyer M, Sticherling C, Stallmann D, Follmann H & Krauth-Siegel RL (1998) *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. **FEBS Lett.**, **431**:381-385
55. Marr JJ & Docampo R (1986) Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. **Rev. Infect Dis.**, **8**:884-903
56. Masana M, de Toranzo EGD & Castro JA (1984) Reductive metabolism and activation of benznidazole. **Biochem. Pharmacol.**, **33**:1041-1045
57. Maya JD, Repetto Y, Agosín M, Ojeda JM, 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
58. McCarthy-Burke C, Taylor ZA & Buck GA (1989) Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, **82**:177-189
59. McGonigle S, Dalton JP & James ER (1998) Peroxiredoxin: a new antioxidant family. **Parasitol. Today**, **14**:139-145
60. Mehlotra RK (1996) Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. **Crit. Rev. Microbiol.**, **22**:295-314
61. Meziane-Cherif D, Aumercier M, Kora I, Sergheraert C, Tartar A, Dubremetz JF & Ouaisi MA (1994) *Trypanosoma cruzi*: immunolocalization of trypanothione reductase. **Exp. Parasitol.**, **79**:536-541
62. Montemartini M, Kalisz HM, Kieß M, Nogoceke E, Singh M, Steinert P & Flohé L (1998) Sequence, heterologous expression and functional characterization of a novel tryparedoxin of *Crithidia fasciculata*. **Biol. Chem.**, **379**:1137-1142
63. Montemartini M, Kalisz HM, 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
64. Montemartini M, Nogoceke E, Singh M, Steinert P, Flohé L & Kalisz HM (1998) Sequence analysis of the tryparedoxin peroxidase gene from *Crithidia fasciculata* and its functional expression in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, **273**:4864-4871
65. Morello A (1988) The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanism in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **90C**:1-12
66. Morty RE, Lonsdale-Eccles JD, Morehead J, Caler EV, Mentele R, Auerswald EA, Coetzer TH, Andrews NW & Burleigh BA (1999) Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases. **J. Biol. Chem.**, **274**:26149-26156

67. Moutiez M, Aumercier M, Schöneck R, Meziane-Cherif D, Lucas V, Aumercier P, Ouaiissi A, Sergheraert C & Tartar A (1995) Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, **310**:433-437
68. Nare B, Luba J, Hardy LW & Beverley SM (1997) New approaches to Leishmania chemotherapy: pteridine reductase 1 (PTR1) as a target and modulator of antifolate sensitivity. **Parasitol.**, **114**:S101-S110
69. Netto LES, Chae HZ, Kang SW, Rhee SG & Stadtman ER (1996) Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. **J. Biol. Chem.**, **271**:15315-15321
70. Nogoceke E (1998) Enzymatic trypanothione-dependent hydroperoxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. Göttingen: Cuvillier Verlag. (P.h. D. Thesis: Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, ISBN 3-89712-077-1)
71. Nogoceke E, Gommel DU, Kieß M, Kalisz HM & Flohé L (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. **Biol. Chem.**, **378**:827-836
72. Nozaki T, Engel FC & Dvorak JA (1996) Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:111-117
73. Ondarza RN, Tamyó EM, Hurtado G, Hernández E & Iturbe A (1997) Isolation and purification of glutathionyl-spermidine and trypanothione from *Entamoeba histolytica*. **Arch. Med. Res.**, **28**:S73-S75
74. Penketh PG, Kennedy WPK, Patton CL & Sartorelli AC (1987) Trypanosomatid hydrogen peroxide metabolism. **FEBS Lett.**, **221**:427-431
75. Penketh PG & Klein RA (1986) Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **20**:111-121
76. Pérez J, Gallego C, Bernier-Villamor V, Camacho A, González-Pacanowska D & Ruiz-Pérez LM (1999) Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, **27**:771-777
77. Persson K, Åslund L, Grahn B, Hanke J & Heby O (1998) *Trypanosoma cruzi* has not lost its S-adenosylmethionine decarboxylase: characterization of the gene and the encoded enzyme. **Biochem J**, **333**:527-537
78. Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) **Molecular Cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory: New York, 2nd ed., pp1.25-1.28, 6.9-6.13
79. Schmuñis GA (1999) A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Brener Z *et al.*, ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, cap. 1, p.1-15
80. Schmuñis GA (1999) Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**(suppl I):93-101
81. Schnare MN & Gray MW (1999) A candidate U1 small nuclear RNA for trypanosomatid protozoa. **J. Biol. Chem.**, **274**:23691-23694
82. Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH & Rhee SG (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. **J. Biol. Chem.** No prelo

83. Sherlock IA (1999) Vetores. In: ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Brener Z *et al.*, ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, cap. 3, p.21-40
84. Spies HSC & Steenkamp DJ (1994) Thiols of intracellular pathogens. Identification of ovothiol A in *Leishmania donovani* and structural analysis of a novel thiol from *Mycobacterium bovis*. **Eur. J. Biochem.**, **224**:203-213
85. Steenkamp DJ & Spies HSC (1994) Identification of a major low-molecular-mass thiol of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata* as ovothiol A. **Eur. J. Biochem.**, **223**:43-50
86. Steinert P, Dittmar K, Kalisz HM, Montemartini M, Nogoceke E, Rohde M, Singh M, & Flohé L (1999) Cytoplasmatic localization of the trypanothione peroxidase sistema in *Crithidia fasciculata*. **Free Rad. Biol. Med.**, **26**:844-849
87. Steinert P, Plank-Schumacher K, Montemartini M, Hecht HJ & Flohé L (2000) Permutation of the active site motif of tryparedoxin 2. **Biol. Chem.**, **381**:211-219
88. Stuart K (1991) RNA editing in mitochondrial mRNA of trypanosomatids. **Trends Biochem. Sci.**, **16**:68-72
89. Temperton NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ & Kelly JM (1998) Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **96**:167-176
90. Tetaud E & Fairlamb AH (1998) Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **96**:111-123
91. Tetaud E, Manai F, Barrett MP, Nadeau K, Walsh CT & Fairlamb AH (1998) Cloning and characterization of the two enzymes responsible for trypanothione biosynthesis in *Crithidia fasciculata*. **J. Biol. Chem.**, **273**:19383-19390
92. Treco DA (1989) Preparation of genomic DNA. In: **Current Protocols in Molecular Biology**. Ausubel FM *et al.*, ed.; John Wiley & Sons: New York, pp2.1.1-2.17
93. Tshako MH, Alves MJM, Colli W, Brener Z & Augusto O (1989) Restricted bioreductive metabolism of a nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Biochem. Pharmacol.**, **38**:4491-4496
94. Tshako MH, Alves MJM, Colli W, Filardi LS, Brener Z & Augusto O (1991) Comparative studies of nifurtimox uptake and metabolism by drug-resistant and susceptible strains of *Trypanosoma cruzi* infections. **Comp. Biochem. Physiol.**, **99C**:317-321
95. Ullman B & Carter D (1997) Molecular and biochemical studies on the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases of the pathogenic haemoflagellates. **Int. J. Parasitol.**, **27**:203-213
96. Urbina JA (1999) Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**(suppl. I): 349-355
97. Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazard K, Piras MM, Piras R, Pérez N, Wincker P & Ryley JF (1996) Cure of short-and long-term experimental Chagas' disease using D0870. **Science**, **273**:969-971
98. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D & Flohé L (1995) Diversity of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, **252**:38-53

99. Vickerman K (1994) The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int. J. Parasitol.**, **24**:1317-1331
100. Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R & Reed SG (1998) Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. **Infect. Immun.**, **66**:3279-3289
101. Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragón A & Kelly JM (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, **275**:8220-8225
102. WHO-World Health Organization (1998) Division of Control of Tropical Diseases (CTD): Progress Report 1996
103. WHO-World Health Organization (1998) Special programme for research and training in tropical Diseases (TDR) progress 1995-1996. 14th programme report of the UNDP/World Bank/WHO
104. Yim MB, Chae HZ, Rhee SG, Chock PB & Stadtman EA (1994) On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. **J. Biol. Chem.**, **269**:1621-1626
105. Zingales B, Rondinelli E, Degraeve W, da Silveira JF, Levin M, Le Paslier D, Modabber F, Dobrokhotov B, Swindle J, Kelly JM, Åslund L, Hoheisel JD, Ruiz AM, Cazzulo JJ, Pettersson U & Frasch AC (1997) The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. The *Trypanosoma cruzi* genome consortium. **Parasitol. Today**, **13**:16-22

## **6. anexos**

## OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)  
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO