



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO
EM CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*
NATURALMENTE RESISTENTES AO
BENZONIDAZOL**



Rio Claro

2009

ANDRÉA AKIKO NAKAIMA KOHATSU

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM CEPAS DE
Trypanosoma cruzi NATURALMENTE RESISTENTES AO
BENZONIDAZOL

Orientadora: Profa. Dra. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI

Co-orientador: Dr. MARCO TÚLIO ALVES DA SILVA

Supervisor: Prof. Dr. MAURÍCIO BACCI JÚNIOR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel.

Rio Claro

Dezembro 2009

574.88 Kohatsu, Andréia Akiko Nakaima
K79a Avaliação do metabolismo oxidativo em cepas de
trypanosoma cruzi naturalmente resistentes ao benzonidazol /
Andréia Akiko Nakaima Kohatsu. - Rio Claro : [s.n.], 2009
94 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Regina Maria Barretto Cicarelli
Co-Orientador: Marco Túlio Alves da Silva

1. Biologia molecular. 2. Proteínas antioxidantes. I.
Título.

Aos meus pais Celina e Antônio pelo apoio e compreensão.

Sem vocês nada disso teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora a professora Regina Cicarelli pela oportunidade de eu realizar esse trabalho, por todo apoio e incentivo, que foram fundamentais para o meu crescimento científico.

A todos do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitos, Dani, Gabi, Greici e Joyce pela companhia e amizade.

Em especial ao Marco Túlio, pela ajuda e paciência nos experimentos, as discussões científicas e amizade que foram fundamentais para o meu aprendizado e para a conclusão desse trabalho.

À Giovana pela ajuda nos experimentos e amizade.

À técnica do laboratório, Elisete, pela ajuda com os coelhos, pelas conversas e amizade.

À Aline pelas análises morfológicas dos parasitas e sua amizade.

*Ao professor João Aristeu por ter cedido as cepas de *T. cruzi*.*

Às minhas amigas de Rio Claro, Luíza e Cíntia por todos os momentos e apoio.

Enfim, a todas as pessoas que fizeram parte da construção desse trabalho de alguma forma, dentro do laboratório ou do lado de fora, sempre me incentivando.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”.

Pasteur

RESUMO

O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, é responsável pela infecção de milhões de pessoas na América Latina. No momento há apenas dois fármacos disponíveis, o nifurtimox (5-nitrofurano), teve o uso descontinuado no Brasil, e o benzonidazol (2-nitroimidazole), embora ambos possuam ações limitadas, visto que dependem da fase da doença, das condições fisiológicas do hospedeiro, da suscetibilidade e variabilidade genética da cepa. Assim, a busca de novas moléculas torna-se urgente e necessária, bem como a compreensão do mecanismo de resistência aos fármacos tripanocidas. Alguns estudos relatam aumento na produção de enzimas que atuam na defesa celular, as quais, provavelmente, poderiam ser responsáveis pela resistência de certas cepas do parasita. Tais enzimas têm funções importantes na sobrevivência e crescimento dos parasitas: superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima que elimina radicais superóxido ao convertê-los em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular; *old yellow enzyme* (OYE), que é uma NADPH flavina oxidoreductase e pode estar envolvida na redução de substâncias tripanocidas; e, peroxiredoxina (Prx), que catalisa a redução de peróxidos. O objetivo deste projeto é avaliar a suscetibilidade de diferentes cepas ao benzonidazol, clonar, sequenciar e expressar enzimas possivelmente envolvidas na resistência a este fármaco e realizar análises morfológicas serão nos parasitos após serem expostos à substância em questão. Futuramente os anticorpos policlonais obtidos a partir das proteínas recombinantes de Prx, SOD e OYE serão empregados para avaliar o nível de expressão das mesmas em parasitas tratados e não tratados com o benzonidazol.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, proteínas antioxidantes, benzonidazol

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Casos mundiais estimados da doença de Chagas em 2009.
- Figura 2** Esquema geral da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 3** Forma epimastigota de *T.cruzi* no vetor e em meio de cultura.
- Figura 4** Forma tripomastigota sanguínea de *T.cruzi*.
- Figura 5** Forma amastigota de *T.cruzi* presente em tecido cardíaco.
- Figura 6** Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas.
- Figura 7** Mapa do vetor pGEM-T *Easy Vector System*.
- Figura 8** Mapa do vetor de expressão pET28a.
- Figura 9** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, amplificação e purificação de Prx, OYE e SOD.
- Figura 10** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, confirmação de clonagem de e extração de DNA plasmidial de Prx, SOD e OYE.
- Figura 11** Alinhamento múltiplo das sequências de Prx de tripanosomatídeos.
- Figura 12** Alinhamento múltiplo das sequências de OYE de tripanosomatídeos.
- Figura 13** Alinhamento múltiplo das sequências de SOD de tripanosomatídeos.
- Figura 14** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, linerização do vetor pET28a, digestão de Prx, OYE e SOD e purificação do DNA digerido.
- Figura 15** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, confirmação da subclonagem de Prx, OYE e SOD em vetor pET28a e extração de DNA plasmidial .
- Figura 16** Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His para verificar a indução da expressão de Prx recombinante.
- Figura 17** *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His para verificar a indução da expressão de OYE e SOD recombinante.
- Figura 18** Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His para verificar a solubilidade de Prx recombinante.

- Figura 19** SDS-PAGE 15% corado pelo *Coomassie Brilliant Blue* R-250 da purificação de Prx recombinante e *Western Blotting* para confirmar a produção de anticorpos policlonais anti-Prx.
- Figura 20** *Western Blotting* para confirmar a reação entre o anticorpo policlonal anti-Prx com a proteína nativa Prx (extrato total de *T. cruzi*).
- Figura 21** Fotomicrografias referentes às formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* no tempo 0, sem exposição ao benzonidazol.
- Figura 22** Fotomicrografias referentes às formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, após 48 horas de indução com benzonidazol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Primers utilizados para a amplificação das sequências nucleotídicas
Tabela 2	Primers universais utilizados para a confirmação da clonagem.
Tabela 3	Avaliação da suscetibilidade das diferentes cepas ao benzonidazol.
Tabela 4	Porcentagem de identidade de Prx da cepa Y de <i>T.cruzi</i> com outros tripanosomatídeos.
Tabela 5	Porcentagem de identidade de OYE da cepa Y de <i>T.cruzi</i> com outros tripanosomatídeos.
Tabela 6	Porcentagem de identidade de SOD da cepa Y de <i>T.cruzi</i> com outros tripanosomatídeos.
Tabela 7	Quantificação de parasitos, cepa Y, durante a indução com benzonidazol.
Tabela 8	Quantificação de parasitos, cepa Bolívia, durante a indução com benzonidazol.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Curva de crescimento dos parasitos expostos ao benzonidazol com indução por até 72 horas.
- Gráfico 2** Análise morfométrica da cepa epimastigota Y antes da exposição ao benzonidazol e após 48 horas.
- Gráfico 3** Análise morfométrica da cepa epimastigota Y, comparação entre os tempos 0, sem exposição ao benzonidazol e após 48 horas de exposição ao benzonidazol.

ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de amônio
BSA	Soroalbuminafetal
CHAPS	(3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate)
DAB	(3,3'- <i>diaminobenzidinetetrahydrochloride</i>)
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos trifosfatados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EtBr	Brometo de etídeo
ETOH	Álcool etílico
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Luria-Bertani
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
MTT	<i>Tetrazolium MTT 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio</i>
PBS	Tampão Fosfato Estéril
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMS	<i>Phenazine methosulfate</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
Primer S	Primer S - Primer sense
Primer AS	Primer AS - Primer anti-sense

Primer F	Primer forward
Primer R	Primer reverse
q.s.p	Quantidade suficiente para
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TB	Tampão Tris
TBS	Tampão Tris salino
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Doença de Chagas	17
1.2. Morfologia do parasito	19
1.3. Ciclo biológico de transmissão	21
1.4. Sintomatologia	24
1.5. Diagnóstico clínico e laboratorial	25
1.6. Terapêutica	26
1.7. Metabolismo do estresse oxidativo	29
1.7.1. Peroxiredoxina (Prx).....	30
1.7.2. Superóxido dismutase (SOD).....	31
1.7.3. <i>Old yellow enzyme</i> (OYE).....	33
 2. OBJETIVOS	 35
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 36
3.1. Meios de Cultura	36
3.2. Soluções e Reagentes	37
3.3. Metodologias	43
3.3.1. Cultivo de parasitas	43
3.3.2. Avaliação de suscetibilidade ao benzonidazol	43

3.3.3. Cálculo do índice de citotoxicidade (IC ₅₀)	45
3.3.4. Extração de DNA genômico	45
3.3.5. Construção de primers e alinhamento múltiplo	45
3.3.6. Amplificação das sequências nucleotídicas	46
3.3.7. Purificação das sequências nucleotídicas	47
3.3.8. Reação de clonagem	47
3.3.8.1. Reação de ligação do inserto no vetor de clonagem pGEM-T Easy Vector System (Promega).....	47
3.3.8.2. Preparação de <i>E. coli</i> competente	48
3.3.8.3. Reação de transformação	49
3.3.8.4. Confirmação da clonagem	49
3.3.9. Extração de DNA plasmidial (mini-prep).....	50
3.3.10. Reação de sequenciamento	51
3.3.11. Reação de subclonagem	52
3.3.11.1. Linearização do vetor de expressão pET28a (Novagen) e digestão do inserto	52
3.3.11.2. Reação de ligação do inserto no vetor pET28a (Novagen)	52
3.3.11.3. Confirmação de subclonagem	53
3.3.12. Produção de proteínas recombinantes	54
3.3.12.1. Indução da expressão de proteínas recombinantes	54
3.3.12.2. Purificação de proteínas recombinantes	55
3.3.13. Quantificação de proteínas	56
3.3.14. Produção de anticorpos policlonais	56
3.3.15. Detecção de proteínas nativas	57
3.3.16. Testes da indução dos parasitos com benzonidazol	58

3.3.17. Mensuração das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1. Avaliação de suscetibilidade das cepas de <i>T. cruzi</i> ao benzonidazol ...	60
4.2. Amplificação e purificação da ORF de Prx, OYE e SOD	61
4.3. Clonagem em vetor pGEM - T <i>Easy System</i> e extração de DNA plasmidial	63
4.4. Análise de sequências de tripanosomatídeos	65
4.4.1. Análise de sequências de Prx de tripanosomatídeos	65
4.4.2. Análise de sequências de OYE de tripanosomatídeos	67
4.4.3. Análise de sequências de SOD de tripanosomatídeos	69
4.5. Linearização do vetor pET28a, digestão de Prx, OYE e SOD e purificação do DNA digerido	70
4.6. Sub-clonagem em vetor pET28a e extração de DNA plasmidial	72
4.7. Indução da produção de proteína recombinante de Prx, OYE e SOD	74
4.8. Teste de solubilidade da proteína recombinante Prx	75
4.9. Expressão e purificação da proteína Prx recombinante produção de anticorpos policlonais anti-Prx	76
4.10. Reação dos anticorpos policlonais com a proteína Prx nativa	77
4.11. Testes da indução dos parasitos com o benzonidazol	78
4.12. Avaliação do nível de expressão de Prx	81
4.13. Mensuração das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	81

5. CONCLUSÕES	87
----------------------------	-----------

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
--	-----------

1) INTRODUÇÃO

1.1) Doença de Chagas

A tripanossomose americana ou doença de Chagas é uma zoonose que se estende dos Grandes Lagos na América do Norte ($\sim 42^{\circ}\text{N}$) até o sudeste da Patagônia ($\sim 46^{\circ}\text{S}$), ocorrendo amplamente na América Latina (REY, 1991; DIAS, 2005; JANNIN e VILLA, 2007; MURTA et al., 2008). Os países mais afetados são Brasil, Argentina, Chile, Colômbia e Venezuela (REY, 1991).

A estimativa do número de indivíduos infectados com o *T. cruzi* em áreas endêmicas da América Latina reduziu desde a década de 1980, atingindo 16-18 milhões de pessoas na metade da década e no início de 1990, reduzindo para 11 milhões no fim dos anos 90; sendo 7,6 milhões em 2006. Dados demonstram a presença de imigrantes provenientes da América Latina infectados pelo *T. cruzi* em diferentes países, com estimativas de 1.067 casos na Austrália entre 2005-2006; 1218, no Canadá em 2001; 5.125 na Espanha em 2003; e de 56 a 357 mil casos nos Estados Unidos no período de 1981 a 2005 (SCHMUNIS, 2007). Os casos mundiais estimados em 2009 podem ser vistos na figura 1 (<http://www.chagas-rompe-el-silencio.com/problematicachagas.html>).

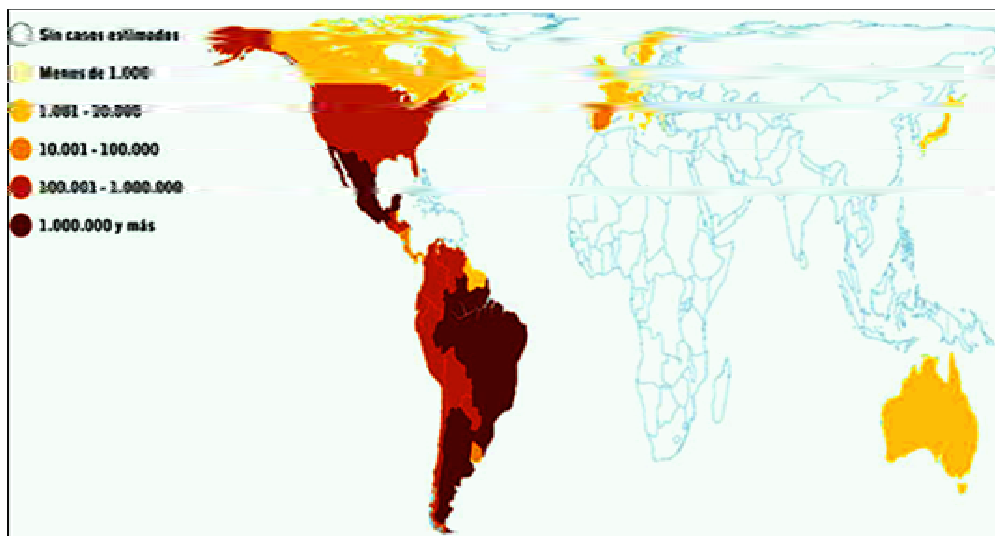


Figura1: Casos mundiais estimados da doença de Chagas em 2009.

Fonte: <http://www.chagas-rompe-el-silencio.com/problematicachagas.html>.

Acessado em 24/09/09.

Descoberta em 1909 por Carlos Chagas observou-se que a Doença de Chagas afetava basicamente populações rurais extremamente pobres que viviam em moradias em péssimas condições, as quais permitiam uma condição ideal de domiciliação do inseto (DIAS e SCHOFIELD, 1999).

A doença é causada pelo flagelado *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* e transmitido pelo inseto triatomíneo (hemíptero hematófago da família Reduviidae). Esse protozoário pertence ao sub-gênero *Schizotrypanum*, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (REY, 1991; DIAS, 2005).

A ordem Kinetoplastida é composta por protozoários flagelados que apresentam cinetoplasto, porção de DNA presente na mitocôndria única dos parasitos (REY, 1991; DIAS, 2005). A família Trypanosomatidae reúne parasitos que infectam uma variedade de organismos (Reinos Protista, Vegetal e Animal) e que possuem um único flagelo (REY, 1991). A figura 2 ilustra o esquema geral da forma epimastigota de *T. cruzi*.

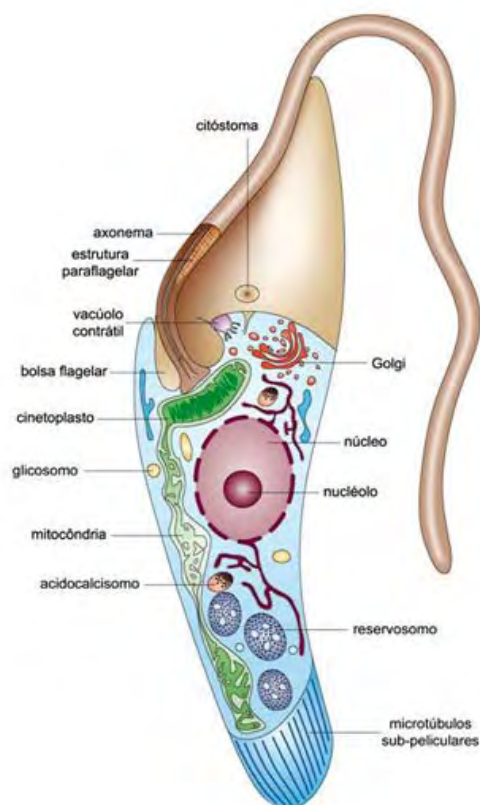


Figura 2: Esquema geral da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>.

Acessado em 12/10/09.

1.2) Morfologia do parasito

O *T. cruzi* apresenta principalmente as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota. As formas epimastigotas (figura 3) caracterizam-se por serem alongadas, apresentam o cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo, o flagelo surge à frente e próximo ao núcleo e emerge na extremidade anterior do parasito. São as formas replicativas e móveis encontrados no vetor, ocorrendo nas porções iniciais ou médias do intestino, bem como são as formas de cultivo em meio de cultura (REY, 1991; DIAS, 2005).

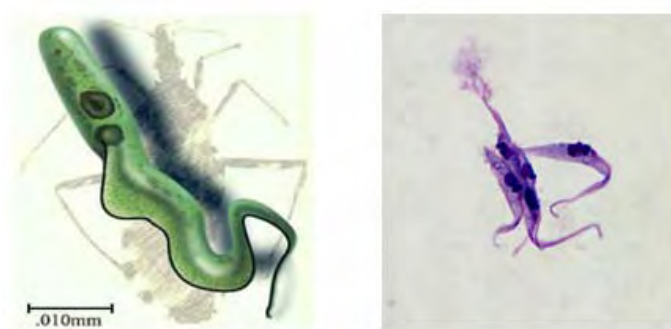


Figura 3: Forma epimastigota de *T. cruzi* no vetor e em meio de cultura.
 Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>;
http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm.
 Acessado em 10/09/09.

As formas tripomastigotas (figura 4) possuem a membrana ondulante e o cinetoplasto posicionado entre o núcleo e a região posterior, são as formas não replicativas, fusiformes e alongadas. É a forma infectante que no hospedeiro vertebrado ocorre no sangue, podendo estar presente também no sistema mononuclear fagocítico (SFM), fibras musculares estriadas (cardíacas ou esqueléticas), fibras lisas e células nervosas. Os tripomastigotas metacíclicos são parecidos morfológicamente com os tripomastigotas sanguíneos, sendo as formas infectantes liberadas nas fezes do vetor (REY, 1991; DIAS, 2005).



Figura 4: Forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi*.
 Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>;
http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm.
 Acessado em 10/09/09.

As formas amastigotas (figura 5) apresentam o núcleo grande, circular e excêntrico, cinetoplasto bem visível. Ocorrem no hospedeiro vertebrado, adotando a forma intracelular esférica ou ovalada. É a forma replicativa e não móvel (flagelo curto que não se exterioriza). Pode estar presente no interior de vários tipos de células, mas predominantemente nas fibras musculares estriadas e lisas e no sistema fagocítico mononuclear, pode ocorrer em cultura de células. Nessa forma sofre diferenciação no sangue, onde se transforma em tripomastigotas que invadirão outras células (REY, 1991; DIAS, 2005).

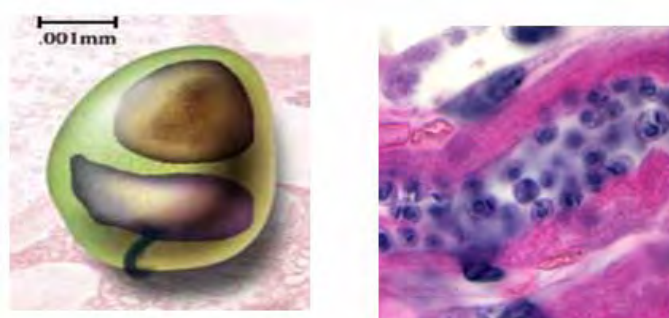


Figura 5: Forma amastigota de *T. cruzi* presente em tecido cardíaco.

Fonte: <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>;

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/TrypanosomiasisAmerican_il.htm.
Acessado em 10/09/09.

1.3) Ciclo biológico e transmissão

As variações morfológicas e o ciclo de vida se devem a uma adaptação aos distintos habitats e situações biológicas pelos quais passa o parasito (REY, 1991; DIAS, 2005). O ciclo de vida do parasito alterna entre vertebrados (ordens Marsupialia, Edentata, Chiroptera, Rodentia, Logomorpha, Artiodactila, Carnívora e Primates) e insetos vetores hematófagos (os principais gêneros são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e o *Rhodnius*), com diferenças principais nos estágios de desenvolvimento em cada hospedeiro e formas intra e extracelular (REY, 1991; DIAS, 2005).

Podem ser distinguidos três ciclos de transmissão (REY, 1991): o silvestre, que ocorre entre vetores e reservatórios presentes nos ecótopos naturais; o paredoméstico, onde os animais parasitados vivem próximos das casas e podem ser sinantrópicos, como gambás e ratos; o doméstico, o qual apresenta animais domésticos e o homem a fonte de infecção, sendo os mamíferos de pequeno porte e que estão em contato com o ser humano, geralmente, reservatórios importantes. Podem ser citados *Canis familiaris* (cão), *Felis domesticus* (gato) e animais por eles ingeridos que pode os infectar, *Rattus rattus* (rato comum), *Rattus norvegicus* (ratazana do esgoto), *Mus musculus* (camundongo) e *Cavia porcellus* (cobaia) (DIAS, 2005).

A transmissão da enfermidade pode ser: vetorial, transfusão de sangue, congênita, através de transplante de órgãos, oral ou acidental (geralmente em laboratórios ou em cirurgias de pacientes infectados). Os principais modos de transmissão são o contato com as fezes e urina de triatomíneos contaminados, transfusões sanguíneas e congênitas (RIBEIRO et al., 1987; DIAS, 2005; TEIXEIRA et al., 2006).

Na figura 6 está representado o ciclo biológico da doença. Durante a picada, o triatomíneo contaminado com *T. cruzi* defeca próximo ao local e as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes atingem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através do orifício da picada. Os parasitos invadem células do sistema fagocítico mononuclear cutâneo e se diferenciam em formas amastigotas, capazes de replicação. Saturada a célula de parasitos, inicia-se a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas. Ao ocorrer a ruptura dessa célula os tripomastigotas são liberados na corrente sanguínea e vão se disseminar pelo organismo, atacando músculos e outros tecidos. Um triatomíneo não infectado adquire as formas tripomastigotas sanguíneas ao picar um hospedeiro vertebrado contaminado. Essas formas se diferenciam em formas epimastigotas, capazes de multiplicação no intestino posterior do vetor. Na ampola retal, os parasitos se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são liberadas nas fezes (REY, 1991; DIAS, 2005).

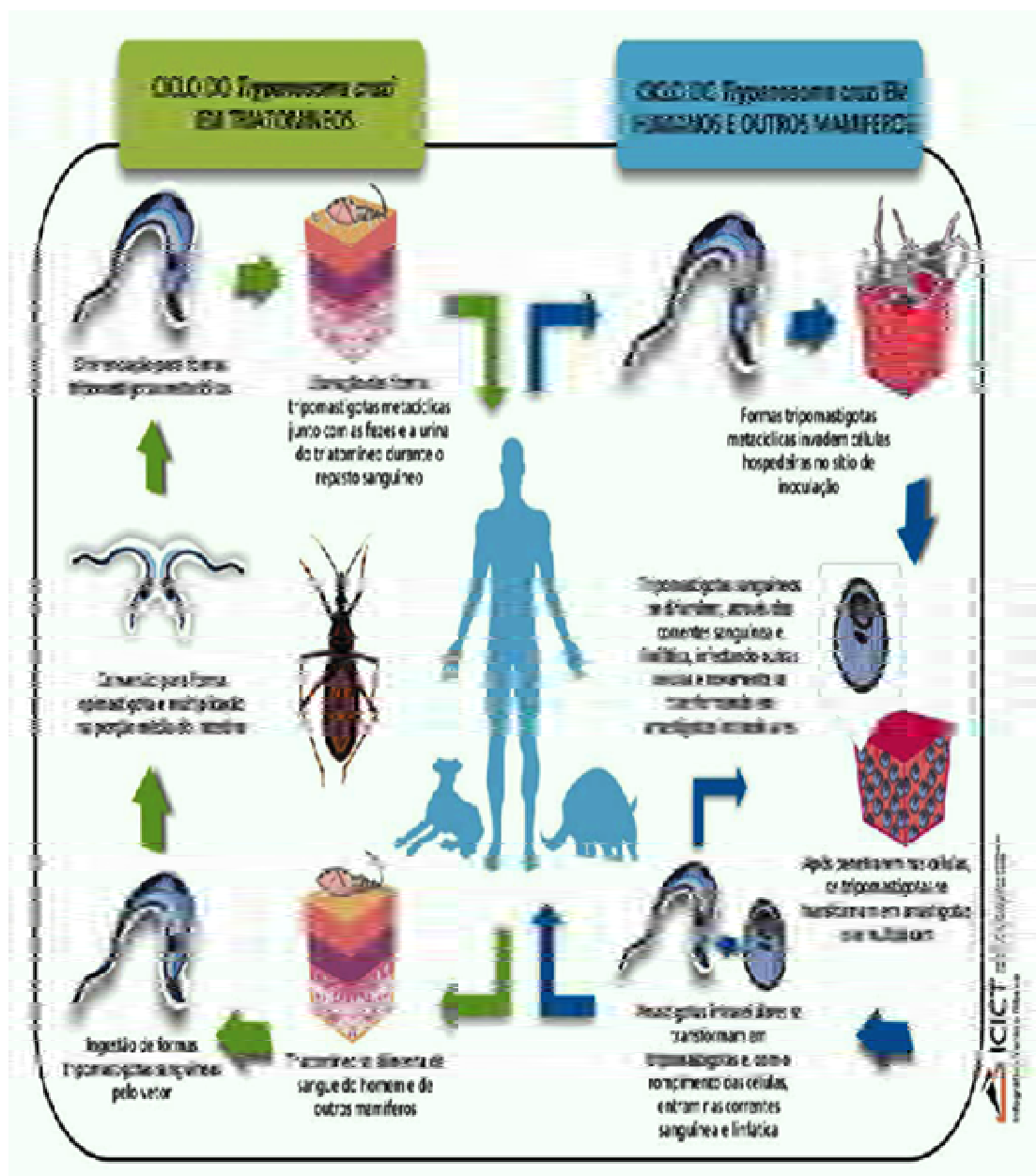


Figura 6 : Ciclo biológico da transmissão da doença de Chagas (ARGOLO et al. 2008).

Como o parasito pode ser transmitido por transfusão sanguínea, a migração de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* levou a doença para países onde não ocorria. A

doença tornou-se um potencial problema associado à migração de indivíduos contaminados de áreas endêmicas para outros países, como os Estados Unidos, Canadá, Europa oriental, Austrália e Japão. (TEIXEIRA et al., 2006).

A transmissão transplacentária tem sido reportada nos países da América Latina, como Brasil, Bolívia, Chile e Paraguai (TEIXEIRA et al., 2006; RASSI JR., 2009).

Vários pesquisadores têm estudado a importância da transmissão oral da doença de Chagas desde a metade do século 20. Somente nos últimos anos devido ao aparecimento de casos no estado de Santa Catarina em 2005 e vários outros durante os últimos 3 anos na bacia do Amazonas, principalmente associado ao consumo do fruto de palmeira ou suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), tem chamado atenção dos pesquisadores. Na metade de março de 2005, uma grande escala de casos agudos da doença tem sido reportados e associados com o consumo do suco de cana de açúcar no município de Navegantes no estado de Santa Catarina. Desses casos 25 pessoas foram diagnosticadas positivas e 3 morreram (PEREIRA et al., 2009).

1.4) Sintomatologia

Em humanos, um amplo espectro de manifestações clínicas na doença de Chagas é observado, possível reflexo da heterogeneidade entre *T. cruzi* isolados e/ou diferenças genéticas na resposta imune do hospedeiro (MARTINEZ-DÍAZ et al., 2001).

A doença de Chagas apresenta duas fases: uma fase aguda e outra crônica, podendo ser sintomática ou assintomática, sendo esta última mais frequente (REY, 1991; DIAS, 2005).

Depois da infecção e incubação, inicia-se a fase aguda da doença, com duração média entre três e oito semanas, caracterizada por ser rápida (DIAS, 2005; LANA e TAFURI, 2005). Nesta fase, cerca de 95% dos pacientes são assintomáticos. Nos casos sintomáticos, além do sinal de Romaña ou chagoma de

inoculação no local da picada, pode aparecer febre, dores nos músculos e nas juntas, sonolência, diarreia, edema, distúrbios respiratórios, perturbações neurológicas, cianose e até coma, podendo levar a morte (LANA e TAFURI, 2005; TEIXEIRA et al., 2006).

Os indivíduos que sobrevivem à fase aguda assintomática ou sintomática evoluem para a fase crônica, podendo ser sintomática ou assintomática (sem sintomas, eletrocardiograma normal, radiologia normal do coração, esôfago e cólon) (DIAS, 2005; LANA e TAFURI, 2005; TEIXEIRA et al., 2006). Apenas 1/3 dos pacientes chagásicos crônicos desenvolvem a sintomatologia da doença, sendo relatados que aproximadamente 94,5% apresentam problemas cardíacos (insuficiência cardíaca e arritmias) e os 5,5% restantes apresentam manifestações gastrointestinais (megacólon e megaesôfago), podendo resultar em morte (TEIXEIRA et al., 2006).

1.5) Diagnóstico clínico e laboratorial

No diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve-se levar em conta a epidemiologia, o diagnóstico clínico e laboratorial (DIAS, 2005; LANA e TAFURI, 2005). Elementos importantes para a suspeita da etiologia chagásica são a região de procedência do paciente, estadia em casas onde havia triatomíneos, e transfusões sanguíneas, mesmo fora das áreas endêmicas. A presença dos sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e/ou chagoma de inoculação) acompanhados de febre irregular ou ausente, adenopatia-satélite ou generalizada, hepatoesplenomegalia, taquicardia, edema generalizado ou dos pés, fazem suspeitar da fase aguda da doença. As alterações cardíacas com sinais de insuficiência cardíaca confirmada pelo eletrocardiograma e alterações digestivas e do esôfago e do cólon (reveladas por raios X) fazem suspeitar da fase crônica (REY, 1991; LANA e TAFURI, 2005).

Os métodos de diagnóstico laboratorial (Hemaglutinação indireta - HAI, Imunofluorescência Indireta - IFI e ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) apresentam diferentes resultados se aplicados na fase aguda ou crônica da

infecção. Na fase aguda, observam-se: alta parasitemia, presença de anticorpos inespecíficos e início de formação de anticorpos específicos (IgM e IgG) que podem atingir níveis elevados. Nessa fase, recomendam-se: pesquisa direta do parasito (a fresco, gota espessa, esfregaço sanguíneo, etc) e, se necessário, pesquisa indireta (xenodiagnóstico, hemocultura, xenocultura, imunodiagnóstico, etc). Na fase crônica, observam-se: baixíssima parasitemia e presença de anticorpos específicos (IgG). Nessa fase recomendam-se os métodos sorológicos (imunofluorescência, ELISA, PCR - Reação em cadeia da polimerase, etc) ou indiretos (xenodiagnóstico, hemocultura ou inoculação em animais) (REY, 1991; DIAS, 2005; LANA e TAFURI, 2005).

1.6) Terapêutica

T. cruzi é um parasito flagelado muito heterogêneo e suas populações são caracterizadas por uma diversidade morfológica, um comportamento biológico heterogêneo, uma alta variabilidade genética, e cursos clínicos distintos, o que dificulta a busca por novos fármacos contra *T. cruzi* (MORELO et al., 1994; DOST et al., 2002).

A terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar dos esforços que vêm sendo desenvolvidos por vários laboratórios e pesquisadores. Diversas substâncias estão sendo testadas em animais e, algumas delas têm sido usadas no homem, mas nenhuma consegue suprimir a infecção pelo *T. cruzi* e promover uma cura definitiva em todos os pacientes tratados (LANA e TAFURI, 2005).

Atualmente os fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas são Nifurtimox produzido pela Bayer Health Care (El Salvador) conhecido como Lampit®, e Benzonidazol produzido pela Roche como Rochagan® ou Radanil®. Lançados em 1967 e 1972, respectivamente, esses fármacos têm melhores efeitos no tratamento da fase aguda (JANNIN e VILLA, 2007).

O nifurtimox (*4[(5-nitrofurfurylidene)amino]-3-methylthiomorpholine-1,1-dioxide*), derivado de nitrofurano, desde a década de 80 a comercialização tem sido descontinuada, primeiro no Brasil, depois na Argentina, Chile e Uruguai. O modo de ação do nifurtimox envolve a geração de radical nitroânion por nitroredutases que, na presença de oxigênio, deixa intermediários reativos e sendo o *T. cruzi* parcialmente deficiente nos mecanismos de detoxificação de radicais livres, torna-se suscetível aos intermediários. O benzonidazol (*Nbenzyl-2-nitroimidazole-1-acetamide*), derivado de nitroimidazol, interfere diretamente na síntese de macromoléculas pelo *T. cruzi* e vários componentes celulares. A ação do benzonidazol parece envolver ligações covalentes ou outras interações de intermediários nitroredutores com componentes do parasito, ou ligações com DNA, lipídeos e proteínas (COURA e CASTRO, 2002; MAYA et al., 2007). Os direitos de produção do benzonidazol foram transferidos pela Roche para LAFEPE (Pernambuco) (JANNIN e VILLA, 2007). Portanto, ambos os fármacos atuam através da formação de radicais livres e /ou metabólitos eletrofílicos. O grupo nitro de ambos os fármacos é reduzido a um grupo amino pela ação de nitroredutases, com formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos. O processo inicia-se com a reação catalizada por NADPH-citocromo P-450 redutase, ela atua sobre o grupo nitro de R-NO₂-tipo de molécula, produzindo radicais intermediários de ânion nitro (R-NO₂⁻). A produção do ânion superóxido (O₂⁻) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), na presença de Fe⁺³, forma o radical livre de hidroxila (OH^{*}), este liga com lipídeos, proteínas e DNA, causando danos a eles (MAYA et al., 2007).

Ambos os medicamentos têm significantes efeitos colaterais, provavelmente como consequência do dano oxidativo ou redutor nos tecidos dos hospedeiros. Entre os efeitos colaterais, incluem anorexia, vômito, polineuropatia periférica e dermatopatia alérgica, em alguns casos isso pode levar à descontinuidade do tratamento (URBINA e DOCAMPO, 2003). As razões para as diferenças na eficácia antiparasitária dos compostos nitro-heterocíclicos nos estágios agudo e crônicos da doença são incertos, mas são relatadas as propriedades farmacocinéticas não favoráveis, como meia-vida pequena e penetração limitada nos tecidos, reduzindo suas ações nos estágios crônicos quando os parasitos são encontrados

principalmente em tecidos profundos e apresentam baixa replicação (URBINA, 2009).

A ação desses medicamentos é muito limitada, e a cura depende da fase da doença, da suscetibilidade da cepa de *T. cruzi*, das condições fisiológicas do hospedeiro, do período de tratamento, da dose e origem geográfica dos pacientes. (COURA E CASTRO, 2002; ANDRADE et al., 2008). Em adição, a terapêutica é ineficiente em imunodeprimidos e pacientes com AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (ANDRADE et al., 2008).

Depois da introdução de nifurtimox e benzonidazol, dentre a extensiva lista das classes de compostos com atividade anti *T. cruzi in vitro* e *in vivo*, nenhuma molécula foi submetida a testes clínicos, com exceção de alopurinol, itraconazol e fluconazol (COURA e CASTRO, 2002). Dentre as substâncias estudadas podem ser citadas as enzimas envolvidas na síntese de esterol, tripanotona redutase, cisteína proteinase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerases, dihidrofolate redutase e farnesilpirofosfato sintase (COURA e CASTRO, 2002; URBINA e DOCAMPO, 2003). Isso é devido em alguns casos, à ausência de forte indicação da cura efetiva, do potencial tóxico e/ou efeito teratogênico (geralmente testado somente *in vitro*) ou falta de interesse das companhias farmacêuticas na suas sínteses (COURA e CASTRO, 2002). Medicamentos alternativos têm sido testados, como alopurinol e itraconazol, embora não tenham sido ativos em um caso de reativação da doença devido ao transplante de coração. Novos fármacos, como posaconazol, ravuconazol e TAK-187, apesar dos resultados promissores pré-clínicos, ainda não foram testados clinicamente (RASSI JR., 2009). O antifúngico posaconazol (Noxafil, Schering-Plough) tem demonstrado curar ratos com infecções aguda e crônica, inclusive resistentes ao benzonidazol (RIBEIRO et al., 2009), podendo erradicar as formas intracelulares amastigotas a partir de cultura de cardiomiócitos (URBINA, 2009). Posaconazol foi registrado em 2005 na União Européia e Austrália para tratamento e, em 2006, nos Estados Unidos para a profilaxia de infecções invasivas fúngicas, tornando possível o início do desenvolvimento clínico em humanos para o tratamento da doença de Chagas crônico nos próximos 12 meses (URBINA, 2009).

Estudos pré-clínicos têm sido realizados pela DNDi (*Drugs for Neglected Disease initiative*) com a terapia combinada (benzonidazol e nifurtimox e compostos derivados de azóis), com o objetivo de reduzir a dosagem e duração do tratamento e prevenir o potencial desenvolvimento da resistência do parasito (RIBEIRO et al., 2009).

1.7) Metabolismo do estresse oxidativo

Atualmente o conhecimento da bioquímica de *T. cruzi* tem conduzido estudos no desenvolvimento de novos fármacos, bem como os seus modos de ação. Na busca por novos fármacos alguns estudos têm voltado à atenção para as vias metabólicas. A resposta imunológica do hospedeiro à infecção pode ser um possível alvo quimioterápico (MAYA et al., 2007). Um melhor entendimento dos mecanismos de defesa de *T. cruzi* contra o estresse oxidativo poderia contribuir no desenvolvimento de novos fármacos (TEMPERTON et al., 1998). A identificação de genes que são expressos de modo diferencial em populações de *T. cruzi* suscetível e resistente poderá auxiliar no entendimento das bases moleculares de resistência (NOGUEIRA et al., 2006).

Os mecanismos bioquímicos utilizados nas reações de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) são importantes na interação hospedeiro-parasito, visto que a geração de ROS dentro do hospedeiro é uma das estratégias empregadas contra patógenos invasores. Tripanosomatídeos têm uma série de transformações bioquímicas envolvendo sensores a estímulos externos e as respostas adequadas a tais. Sensibilidade à ROS pode ser um importante mecanismo de adaptação e interação de tripanosomatídeos com o ambiente (FINZI et al., 2004).

O armamento antioxidativo de *T. cruzi* está distribuído entre os diversos compartimentos celulares, sendo ativos contra os diversos tipos oxidantes. O aumento da expressão de enzimas antioxidantes pode ser considerado como uma pré-adaptação do parasito para invadir o hospedeiro vertebrado, ambiente onde é

exposto às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, produzidos pelas células do sistema imune (IRIGOÍN et al., 2008).

O sequenciamento do genoma de *T.cruzi* (EL- SAYED et al., 2005) tem permitido o uso de novas ferramentas na identificação de prováveis proteínas envolvidas no metabolismo redutor (IRIGOÍN et al., 2008).

O mecanismo de resistência a fármacos tripanocidas permanece obscuro e pobremente entendido (MURTA et al., 2006). Recentemente estudos relataram uma elevação no nível de expressão de algumas proteínas em cepas resistentes, quando tratadas com benzonidazol (MURTA et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). Dentre as enzimas podem ser citadas a calpaína, cisteína peptidase, tirosina aminotransferase, peroxiredoxina, superóxido dismutase, glutamato desidrogenase, *nucleoside diphosphate kinases* e *old yellow enzyme* (ANDRADE et al., 2008).

1.7.1) Peroxiredoxina (Prx)

Peroxiredoxina ou triparedoxina peroxidase é um dos membros da família peroxiredoxina, proteínas antioxidantes, que se caracterizam por conter um domínio conservado redutor ativo de cisteínas. A função principal é a proteção contra os danos causados por peróxidos, levando à redução dos mesmos (ANDRADE et al., 2008), atividade peroxidase e peroxinitrito redutase (PIÑEYRO et al., 2008). Em tripanosomatídeos, Prx ocorre no citosol ou na mitocôndria, podendo utilizar como substrato diferentes espécies reativas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos e peroxinitrito (HARDER et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). A enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pequenas cadeias de hidroperóxidos orgânicos e $ONOO^-$, utilizando triparedoxina como substrato redutor em combinação com a tripanotona e NADPH (PIÑEYRO et al., 2008).

Em *Leishmania donovani*, peroxiredoxina mitocondrial (LdmPrx) protege da morte celular programada, atuando na detoxificação e prevenção contra os danos em proteínas, DNA e lipídeos causados por espécies reativas do oxigênio.

Aparentemente em mamíferos, parece que a redução de Prx mitocondrial (PrxIII) pode ocasionar um acúmulo de peróxido de hidrogênio na mitocôndria, o que pode conduzir a um aumento de apoptose. Uma grande variedade de organismos apresenta Prx, sendo várias as funções, tais como detoxificação, sinalização ou diferenciação (HARDER et al., 2006).

Existem estudos demonstrando que há um aumento na expressão de Prx em *Entamoeba histolytica*, resistente ao metronidazol, e em células de mamíferos para proteger dos danos causados pelo peróxido de hidrogênio (HARDER et al., 2006; ANDRADE et al., 2008).

De acordo com Piacenza e colaboradores (2008), *T. cruzi* protege-se do ambiente oxidante por meio de peroxiredoxinas. Para estabelecer a infecção, tripomastigotas metacíclicos devem invadir macrófagos e sobreviver às condições altamente oxidativas dentro do fagossomo. Peroxiredoxinas apresentam um papel principal na minimização da formação de radicais derivados de peroxinitritos, como ânions de OH, NO₂ e CO₃ (PIACENZA et al., 2008). Nos estudos do papel de c-triparedoxina peroxidase citosólica (TXNPx) e triparedoxina peroxidase mitocondrial (m-TXNp) na invasão e sucesso na infectividade, os parasitos aumentam a expressão de peroxiredoxinas, demonstrando um importante papel na sobrevivência, replicação e diferenciação de *T. cruzi* (formas infectivas e replicativas) e poderia constituir num fator de virulência (PIÑEYRO et al., 2008).

1.7.2) Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase consiste num grupo de metaloenzimas antioxidantes que eliminam radicais superóxido ao convertê-los em oxigênio molecular; com isso os radicais produzidos dentro das células são neutralizados, o que permite uma atividade celular normal e proteção de espécies reativas do oxigênio (ROS), demonstrando um importante papel para a sobrevivência e crescimento do parasito (ANDRADE et al., 2008; MATEO et al., 2008; MURTA et al., 2008). Embora o ânion superóxido não seja muito reativo por si, esse radical é o precursor de dois fortes oxidantes. Primeiro, superóxido reage com óxido nítrico e produz peroxinitrito.

Segundo, superóxido é o precursor de peróxido de hidrogênio que na presença de metais de transição produz radicais hidroxilas. Com isso, uma série de oxidações ocorre lesionando as moléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (TURRENS et al., 2004).

Em experimentos realizados com *Entamoeba histolytica*, resistentes ao metronidazol, o nível de expressão de SOD aumentou quando submetida ao estresse provocado pela substância, indicando provavelmente uma proteção do parasito à ação tóxica do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (ANDRADE et al., 2008).

SOD tem sido reportada em vários tripanosomatídeos, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, diferentes espécies do gênero *Leishmania* (*L. aethiopica*, *L. chagasi* e *L. donovani*), *Crithidia fasciculata* e *Phytomonas* spp. (tripanosomatídeo de planta), demonstrando uma importante função na sobrevivência e crescimento do parasito (MATEO et al., 2008).

Temperton et al. (1998) demonstrou que em *T. cruzi* expostos ao benzonidazol e violeta genciana aumentam a produção de SOD (TEMPERTON et al., 1998). Em tratamentos de cepas de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol foi demonstrado um aumento na expressão de SOD (TcFeSOD-A), quando os parasitos foram expostos ao fármaco (NOGUEIRA et al., 2006).

Essa enzima pode estar localizada em vários compartimentos subcelulares, sendo a citosólica a principal localização. A presença de várias isoenzimas de SOD em diferentes localizações dentro da célula assegura uma ação mais efetiva contra eventuais aumentos de ROS intracelular, mantendo um favorável ambiente redutor, o que poderia ser considerado um fator potencial de virulência, possuindo um papel importante na sobrevivência do patógeno dentro da célula hospedeira (MATEO et al., 2008).

A classificação clássica distingue três formas de SOD de acordo com o metal co-fator presente: cobre-zinco SOD (Cu-Zn-SOD), manganês SOD (Mn-SOD) e ferro SOD (Fe-SOD), sendo que as duas primeiras ocorrem na maioria dos procariotos e eucariotos, inclusive em humanos. A terceira aparece em alguns procariotos, protozoários e cloroplastos de plantas e algas. Recentemente foi

descrito a níquel SOD em *Streptomyces spp* (MATEO et al., 2008). Todos os tripanosomatídeos apresentam SOD com o metal Ferro (IRIGOÍN et al., 2008) e, em *T. cruzi* o aumento no nível de expressão de FeSOD mitocondrial ocasiona resistência ao estímulo de morte celular programada (PIACENZA et al., 2007).

Existem quatro genes que codificam para SOD no genoma de *T. cruzi*, sendo apenas duas bem caracterizadas (IRIGOÍN et al. 2008), FeSODA e FeSODB (ISMAIL et al., 1997). Para a isoforma mitocondrial (SODA), e isoforma (SODB1), cuja compartimentalização citosólica/glicosomal foi inferida a partir da localização de estudos com *T. brucei*, novos estudos ainda são requeridos (IRIGOÍN et al., 2008).

1.7.3) *Old yellow enzyme (OYE)*

Old yellow enzyme é uma NADPH oxidoreductase que apresenta flavina-nucleotídeo (FMN) como grupo prostético (MURTA et al., 2006). OYE tem sido identificada em leveduras, plantas e bactérias, porém, não em animais (KUBATA et al., 2002). Em *T. cruzi* (TcOYE), a enzima cataliza a síntese de prostaglandina $\text{PGF}_2\alpha$ e reduz uma variedade de substâncias tripanocidas (PARODI-TALICE et al., 2004; MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008), como menadiona, β -lapachona, nifurtimox e óxido de N-4-nitroquinolona (KUBATA et al., 2002; MURTA et al., 2006).

Cepas selecionadas *in vivo* e naturalmente resistentes aumentam o nível de expressão da enzima, quando expostas ao benzonidazol. No entanto, algumas cepas de *T. cruzi* induzidas *in vitro* para resistência ao benzonidazol diminuem o nível de expressão da OYE. Talvez, se deve ao fato de que $\text{PGF}_2\alpha$ esteja envolvida no metabolismo do benzonidazol e produza ânions de radicais tóxicos que conduzem o parasito à morte (MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). De acordo com Murta e colaboradores (2006), mais de uma cópia para o gene da enzima está presente no genoma de *T. cruzi*, entretanto, em cepas resistentes selecionadas *in vitro* observou-se perda das cópias, restando apenas uma cópia. Tal fato poderia influenciar a expressão da proteína, gerando uma menor produção de TcOYE, o que poderia ser considerado um mecanismo de escape devido a uma menor produção de $\text{PGF}_2\alpha$, e consequentemente de radicais tóxicos (MURTA et

al., 2006). Esse mesmo mecanismo de escape tem sido observado em *E. histolytica* resistente ao metronidazol que reduz o nível da atividade de flavina redutase (MURTA et al., 2006; ANDRADE et al., 2008). Em *E. histolytica* transfectada para aumentar a expressão da enzima se tornou mais sensível à exposição ao metronidazol. Mutações que inativam o gene (*frxA*) de NAD(P)H flavina oxidoreductase têm sido relacionadas ao fenótipo resistente ao metronidazol em *Helicobacter pylori* (MURTA et al., 2006).

O mecanismo de resistência a fármacos utilizados contra *T. cruzi* ainda é pouco conhecido (NOGUEIRA et al., 2006; MURTA et al., 2006). Experimentos relataram que parasitos resistentes ao benzonidazol superexpressam algumas proteínas, quando expostos àquela substância (ANDRADE et al., 2008). O parasito apresenta uma alta heterogeneidade morfológica, genética, comportamental e de quadros clínicos, conferindo patogenicidade e parasitemia diferentes em cada cepa, o que dificulta o tratamento da enfermidade (DOST et al., 2002; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2001).

Baseado no exposto, este projeto propõe identificar o padrão de sensibilidade de novas cepas ao benzonidazol, avaliar alterações morfológicas em diferentes organelas do parasito quando expostas ao fármaco, bem como, clonar, sequenciar, expressar e purificar as enzimas Prx, SOD e OYE envolvidos com estresse oxidativo, para que futuramente os anticorpos policlonais produzidos a partir das mesmas possam ser empregados na determinação do nível de expressão destas enzimas em parasitos tratados e não tratados com o benzonidazol.

2) OBJETIVOS

Diante do que foi exposto, este projeto pretende avaliar a suscetibilidade de diferentes cepas ao benzonidazol, avaliar alterações morfológicas após a exposição à substância em questão e expressar enzimas possivelmente envolvidas na resistência a este fármaco. Futuramente os anticorpos policlonais obtidos a partir das proteínas recombinantes de Prx, SOD e OYE serão empregados para avaliar o nível de expressão das mesmas em parasitas tratados e não tratados com o benzonidazol.

2.1) Avaliação da citotoxicidade para o cálculo do IC₅₀ por meio da técnica de MTT de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*;

2.2) Construção de iniciadores (*primers*) específicos das sequências nucleotídicas de Prx, SOD e OYE, respectivamente, a partir de banco de dados de *T. cruzi*;

2.3) Amplificação das sequências por PCR a partir DNA genômico;

2.4) Clonagem dos produtos de PCR em vetor pGEM-T *Easy Vector System*, sequenciamento e comparação das sequências em banco de dados públicos;

2.5) Subclonagem em vetor de expressão pET28a (Novagen), expressão e teste de solubilidade das proteínas recombinantes obtidas;

2.6) Purificação das proteínas recombinantes por meio de cromatografia afinidade;

2.7) Produção de anticorpos policlonais utilizando coelhos;

2.8) Detecção por *Western Blotting*, das proteínas Prx, SOD e OYE provenientes dos extratos totais de *T. cruzi*;

2.9) Avaliar modificações morfológicas em diferentes organelas do parasito quando exposto ao benzonidazol.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Meios de cultura

Cultura de *Trypanosoma cruzi*

- LIT (*Liver Infusion Tryptose*): 68,4 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 56,3 mM Na₂HPO₄; 111 mM dextrose; 0,3% *Liver Infusion Broth* (Difco); 0,5% *tryptose*. Acertou-se pH 7,2. Filtrou-se por duas vezes utilizando papel de filtro. Então, o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos e 1 atm. Esperou-se esfriar o meio a temperatura ambiente para adicionar, no fluxo, *Haemin* (ICN) a 25 mg/L e 10% soro fetal bovino inativado (Cultilab). O meio foi acondicionado em estufa a 28 °C.

- *Haemin* (25mg/L): Dissolveu-se o *Haemin* em 50 mM NaOH. Filtrou-se no fluxo utilizando filtro de 0,22 µm.

Cultura de *Escherichia coli*

- LB e LB-ágar: 1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl. Acertou-se pH 7,0. O meio foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Para LB-ágar são adicionados 2% ágar.

- SOB: 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄.7H₂O. Ajustou-se o pH para 7,0. Esterilizado por filtração.

- SOC: SOB suplementado com 10 mM glicose e 20 mM MgCl₂.

- TB: 10 mM Pipes pH 7,0; 55 mM MnCl₂.4H₂O; 15 mM CaCl₂.2H₂O, 250 mM KCl . Esterilizado por filtração e acondicionado a 4 °C.

3.2) Soluções e reagentes

Gel de agarose

- Gel 1% e 1,5%: Pesou-se 0,25 g de agarose (0,37g no caso de 1,5%) e adicionou-se 25 ml de TAE [1X]. Aqueceu-se no forno microondas até a completa dissolução. Esfriou-se o gel e adicionou-se 0,8 μ L de brometo de etídeo (5 μ g/mL) – EtBr.
- TAE [50X]: 2 M Tris base; 5,7% ácido acético glacial; 50 mM EDTA, pH 8,0. O tampão foi diluído para se obter TAE [1X], solução utilizada para se preparar o gel de agarose e realizar a eletroforese.
- *Dye Front* (tampão de amostra): 0,125% azul de bromofenol; 0,125% xileno cianol; 30% glicerol.

Gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

- Gel de empilhamento (5%): 5% acrilamida+bis-acrilamida 40% (Sigma); 12,7% Tris-HCl 1 M, pH 6,8; 0,1% SDS 10%; 0,1% APS 10%; 0,1% TEMED.
- Gel de separação (15%): 15% acrilamida+bis-acrilamida 40%; 25% Tris-HCl, 1,5 M, pH 8,8; 10% de SDS 10%; 10% APS 10%; 0,04% TEMED.
- Tampão de amostra: 125 mM Tris-HCl; pH 6,8; 5% SDS; 25% glicerol; 2,5 mg/ml azul de bromofenol (Merck); 250 mM DTT
- Corante (*Coomassie Brilliant Blue R-250*): 0,1% *Coomassie Blue* (Gibco BRL); 40% etanol; água destilada. Agitar por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Adicionar 40% ácido acético glacial.
- Descorante: 40% etanol absoluto; 10% ácido acético glacial.
- Tampão Tris-glicina [5X]: 25 mM Tris base; 250 mM glicina, pH 8,3; 0,1% SDS 10%. O tampão foi diluído para se obter a solução de uso 1X.

Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

- Reagente *DNAzol* (Invitrogen)

Extração de DNA plasmidial (mini-prep)

- Solução I: 50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0.
- Solução II (v/v): 0,2 M NaOH; 1 % SDS.
- Solução III: 3 M acetato de potássio; 11,5% ácido acético glacial.
- Tampão de RNase: 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 15 mM cloreto de sódio.
- Fenol/Clorofórmio.
- Etanol 70% e 100%.
- RNase A 10 mg/mL

Reação de PCR

- DNA genômico 50 ng/μL
- dNTPs 10 mM
- MgCl₂ e MgSO₄ 50 mM
- Tampão PCR [10X]
- Enzima Taq DNA polimerase [5 U/μL]
- Primers (oligonucleotídeos iniciadores de cadeia - 10 pmol/μL) - tabelas 1 e 2

Tabela 1: Primers utilizados para a amplificação das sequência nucleotídicas		
Nome do iniciador	Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas clonagens (o sítio da enzima de restrição utilizada esta em destaque)	Enzima de restrição
Prx-S	5'-ATCATATGTTTCGTCGTATGGCCGTG-3'	<i>Nde I</i>
Prx-AS	5'-CGAAGCTTTCATGCGTTTTCTCAAATATTC-3'	<i>Hind III</i>
SOD-S	5'-TTCATATGTTGAGACGTGCGGTG-3'	<i>Nde I</i>
SOD-AS	5'-AAGCTTTCACAAAGTCCTTGTAGTACG-3'	<i>Hind III</i>
OYE-S	5'-TACATATGGCGACGTTCCCTGAACTTC-3'	<i>Nde I</i>
OYE-AS	5'-CTAAGCTTACGTCGGGTAATCGTTGTATC-3'	<i>Hind III</i>

Tabela 2: Primers universais utilizados para a confirmação da clonagem	
Nome do iniciador	Sequência
M 13-forward	5'-GTAAACGACGGCCAG-3'
M 13-reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Purificação do produto de PCR

- GE Healthcare Biosciences (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit)

Extração do produto de PCR de gel de agarose

- GE Healthcare Biosciences (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit)

Reação de clonagem

- Vetor pGEM – *T Easy Vector System* (Promega)
- Vetor pET28a (Novagen)
- IPTG 20 mM
- Glicose 4 mM
- MgCl_2 2mM
- X-Gal 60 $\mu\text{g/mL}$

Antibióticos

- Ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$
- Kanamicina 50 $\mu\text{g/mL}$
- Cloranfenicol 34 $\mu\text{g/mL}$

Reação de sequenciamento

- Tampão Save Money: 1 M Tris-HCl, pH 9,0; 1 M MgCl_2 .
- Loading Buffer: 5,5% de Lane Code Even (Applied Biosystems); 11,1% de Loading Color Even (Biosystem); 83,4% de formamida deionizada.

Extrato total

- Tampão de lise: 7 M uréia (Sigma); 2 M thiouréia; 40 mM Tris; 4% CHAPS (Sigma-Aldrich); 0,1 mg/mL PMSF; 0,5 µL/mL leupeptina; 1 µL/mL pepstatina A; 0,5 µL/mL aprotinina.
- Tampão *Tryp wash*: 100 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 20 mM Tris-HCl pH 7,5.

Quantificação de proteínas

- Reagente de Bradford (Bioagency)
- Soroalbuminafetal - BSA (2 mg/mL)

Purificação de proteínas recombinantes

- Tampão de lise: 50 mM NaH₂PO₄ pH8,0; 300mM NaCl; 10 mM imidazol; 2 mM DTT; 2 mM PMSF; 0,5 µL/mL leupeptina; 1 µL/mL pepstatina A; 0,5 µL/mL aprotinina.
- Tampão de solubilização: 6 M uréia (Sigma) ; 50 mM Tris-HCl pH8,0; 2 mM DTT.
- Tampão de lavagem: 50 mM fosfato pH 8,0; 300mM NaCl; 20mM imidazol; 6 M uréia.
- Tampão de eluição: 50mM fosfato pH 8,0; 300mM NaCl; 500 mM imidazol; 6 M uréia.

Western Blotting

- Solução de bloqueio (leite desnatado 5%): Dissolveu-se 17,50 g de leite desnatado em 350 mL de TBS [1x].
- TBS [1X]: 50 mM Tris; 150 mM NaCl. Autoclavou-se a 121 °C por 20 minutos e 1 atm

- PBS [10x]: 130 mM NaCl; 2,6 mM KCl ; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄. Autoclavou-se a 121 °C por 20 minutos e 1 atm. O tampão foi, então, diluído para 1X.
- PBS 1X/0,1% Tween-20: 500 mL de PBS[1X]; 500uL de Tween-20.
- Tampão Tris-glicina [5X]: O mesmo utilizado para SDS-PAGE.
- Tampão de transferência: 48 mM Tris base; 39 mM glicina; 0,037% SDS; 20% metanol ; água destilada q.s.p. 1000 mL. Acondicionar a 4°C.
- Ponceau S: 1% Ponceau S; 5% ácido acético glacial; água destilada q.s.p. 50 mL.
- Luminol 2,5mM (Sigma)
- H₂O₂ (Merk)
- DAB (Sigma-Aldrich)

Ensaio citotóxico (MTT)

- MTT (2,5 mg/mL)
- PMS (0,22 mg/mL)
- Solução 10% SDS – HCl 0,01N
- DMSO
- Benzonidazol 20 mg/mL

3.3) Metodologias

3.3.1) Cultivo de parasitos

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* das cepas Y (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953), Bolívia (FUNAYAMA e PRADO JUNIOR, 1974), Santo Inácio 1 (CERQUEIRA et al., 1998), Quaraí II (MARTINS et al., 2008), Santo Inácio 3 e Santo Inácio 8, sendo as duas últimas recentemente isoladas, foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, Departamento de Ciências Biológicas - FCF - UNESP - Campus Araraquara, SP, e cultivadas em meio LIT - *Live Infusion Tryptose* - (FERNANDES e CASTELLANI, 1966).

3.3.2) Avaliação de suscetibilidade ao benzonidazol

A técnica colorimétrica do MTT (tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo), desenvolvida por Mosmann em 1983 e modificada por Cotinguiba et al. (2009) para ensaios citotóxicos *in vitro* com formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi utilizada para os testes de suscetibilidade utilizando benzonidazol. Para tanto foram utilizadas culturas na fase log de crescimento, 1×10^7 parasitos/mL.

O sal de tetrazolium MTT é reduzido a formazan (forma um precipitado roxo) pela ação da succinato desidrogenase, presente na mitocôndria. Portanto, é possível saber se os parasitos estão vivos, pois a enzima é ativa somente em células viáveis. Quanto mais escura estiver a solução, maior a atividade metabólica das células ou viabilidade delas numa determinada cultura.

Para a montagem de uma placa ELISA de 96 poços realizou-se uma prévia contagem das formas epimastigotas de *T. cruzi* em câmara de Neubauer, utilizando-se a diluição 1:50. Foram feitos dois controles: somente parasitos e somente benzonidazol. Os testes foram realizados em triplicata.

O benzonidazol foi diluído em DMSO para a concentração desejada e em cada poço foi adicionado o volume de DMSO para obter a concentração de interesse - 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL de fármaco por poço. Em cada poço foram adicionados 95 µL de meio (controle negativo) ou de meio mais os parasitos (controle positivo e os em teste), numa concentração de 1×10^7 parasitos/mL. A concentração de parasitos utilizada foi a mesma utilizada por Cotinguiba et al. (2009). Então, a placa foi incubada em câmara úmida por 72 horas a 28 °C. Posteriormente, foram adicionados 10 µL/poço uma solução contendo MTT e PMS. Incubou-se a placa ao abrigo de luz a 28 °C por 75 minutos. Nesse momento, ocorre a redução do sal tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio em um produto colorido, *formazan*, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias. O PMS foi utilizado como um carregador intermediário de elétron para o realce do rendimento *formazan* e, a redução do período de incubação (DUTTA et al., 2005). Para a dissolução dos cristais, foram adicionados 100 µL de solução SDS 10%-0,01 N HCl, por poço. Deixou-se a temperatura ambiente por 30 min e ao abrigo de luz. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofotômetro 595 nm (Microplate Reader 550 - BioRad). Os valores obtidos foram em absorbância e a porcentagem de citotoxicidade (%C) foi calculada de acordo com a seguinte equação (MUELAS-SERRANO et al., 2000):

$$\% C = [(Gc - Gp)/Gc] \times 100$$

$$Gc = Ac - Am$$

$$Gp = Ap - Apm$$

Gc - representa o número de parasitos/mL nos poços controles

Gp - refere ao número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações de benzonidazol

Ac - corresponde ao valor de absorbância nos poços controle com parasitos (ausência do benzonidazol)

Am - representa o valor da absorbância nos poços controle sem parasitos (ausência do benzonidazol)

Ap - o valor da absorbância nos testes

Apm - o valor da absorbância das diferentes concentrações da substância na ausência do parasito

3.3.3) Cálculo do índice de citotoxicidade (IC₅₀)

A partir dos valores de absorbância, leitura a 595_{nm} em espectrofotômetro, foram obtidas as porcentagens de parasitos mortos. A seguir realizou-se o cálculo de IC₅₀, ou seja, a concentração de benzonidazol que reduz em 50% a viabilidade do parasito. Para tal, utilizou-se o programa Origin 7.0. A viabilidade foi calculada a partir da reta obtida (concentração versus porcentagem de viabilidade). Conforme resultados obtidos previamente no laboratório, a concentração de benzonidazol que corresponde a um IC₅₀ para a cepa Y é de 9,01 µg/mL, enquanto que para cepa Bolívia é de 25,00 µg/mL (PASSERINI, 2008).

3.3.4) Extração de DNA genômico

O DNA genômico da forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Y, foi extraído utilizando o reagente DNAzol (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade de DNA genômico presente na solução foi avaliada em eletroforese em gel de agarose (1,0%), em comparação com quantidade conhecidas de DNA presentes nos marcados moleculares.

3.3.5) Construção de primers e alinhamento múltiplo

Para a construção de primers foram analisadas as sequências das proteínas de interesse disponível no banco de dados públicos do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov/): peroxiredoxina

(CAA06923) superóxido dismutase A (AAX84936) e *old yellow enzyme* (U31282). Os programas NEB Cutter V 2.0 (tools.neb.com/NEBcutter2/) e Gene Runner V 3.05 (SPRUYT e BUQUICCHIO, 1994) foram utilizados para a construção de primers específicos. As sequências apresentam na extremidade da região 5' sítio de restrição para a enzima *NdeI* e *HindIII*. Tais enzimas serão importantes para a realização da subclonagem.

O programa Gene Runner V 3.05 também auxiliou na tradução da sequência de nucleotídeos a sequência de aminoácidos, determinação do peso molecular estimado e número de aminoácidos.

A análise das sequências obtidas a partir do sequenciamento foi feita através do *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Realizou-se, então, o múltiplo alinhamento, utilizando os programas BioEdit V 7.0 (HALL, 1999) e GeneDoc V 2.6.002 (NICHOLAS e NICHOLAS, 1997).

3.3.6) Amplificação das sequências nucleotídicas

Para a PCR foram utilizados: 1 µL de DNA genômico de *T. cruzi* (cepa Y) 50 ng/µL; 5 µl tampão Taq *HiFi* 10X (Invitrogen); 2 µL MgSO₄ 50 mM; 1 µL dNTP 10 mM, 1 µL primer S 10 pmol/µL; 1 µl primer AS 10 pmol/µL; 0,2 µL *Platinum Taq* DNA polimerase *High Fidelity* 5 U/µL (Invitrogen); água deionizada autoclava q.s.p. 50 µL. Realizou-se o seguinte ciclo em termociclador automático (MJ Research PTC 100 Thermal Cycler):

94 ⁰ C ----- 5 min.	
94 ⁰ C ----- 45s.	} 40 x
56 ⁰ C ----- 45s.	
72 ⁰ C ----- 1min.	
72 ⁰ C ----- 7min	
4 ⁰ C ----- ∞	

Após a PCR, o produto foi observado em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo, num transiluminador UV. Foram aplicados no gel: 1 µL de tampão de amostra + 1 µL de peso molecular 1 kb DNA *ladder plus* (Fermentas) e 1 µL de tampão de amostra + 6 µL de produto da PCR. Realizou-se a eletroforese com voltagem de 100 V, utilizando tampão TAE 1X.

3.3.7) Purificação das sequências nucleotídicas

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, segundo as orientações do fabricante. O mesmo kit foi utilizado na purificação de amostras, provenientes da digestão, a partir do gel de agarose 1% corado com BrEt.

3.3.8) Reação de clonagem

3.3.8.1) Reação de ligação do inserto no vetor de clonagem pGEM-T *Easy Vector System* (Promega)

Os produtos purificados de PCR referentes as enzimas foram utilizados para clonagem utilizando no vetor pGEM-T *Easy Vector System* (figura 7) conforme especificações do fabricante.

A reação de ligação foi realizada utilizando-se 50 ng do vetor; 5 µL tampão T4 DNA ligase *2X Rapid Ligation Buffer*; 3 µL de produto de PCR (5x mais que a quantidade molar do vetor); 1 µL de T4 DNA ligase 3 U/µl; H₂O deionizada autoclavada q.s.p. 10 µL, incubando a 4 °C *overnight*.

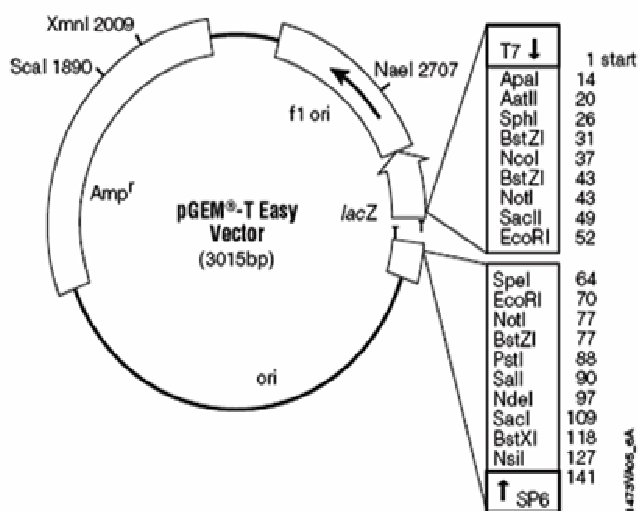


Figura 7: Mapa do vetor pGEM-T *Easy Vector System*.

Fonte: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>. Acessado em 22/08/09.

3.3.8.2) Preparação de *E. coli* competente

Preparou-se um pré-inóculo com *E. coli* DH5α. Então, estas bactérias foram adicionadas em 5 ml de meio LB contendo 5 µL de ampicilina (50 µg/mL). No dia seguinte realizou-se a diluição 1:10 da cultura, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro (DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer - Beckman) a 600 nm. A seguir a cultura foi diluída em 50 mL de meio SOB para se obter uma DO de 0,1, incubando-se a 37 °C e 200 rpm, até atingir a DO₆₀₀ = 0.6. A cultura foi transferida para um tubo e mantida em gelo por 10 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos a 4 °C, 2500 g; o sedimento foi ressuspensão, cuidadosamente, em 16 mL de solução TB resfriado. Incubou-se em gelo por 10 minutos, centrifugou-se por 10 minutos a 4 °C, 2500 g e o sedimento foi ressuspensão, cuidadosamente, em 4 mL de meio TB gelado, com 300 µL de DMSO. Incubou-se em gelo por 10 minutos. Aliquotou-se 200 µL / tubo e congelou-se em nitrogênio líquido, sendo os tubos armazenados a - 80 °C para usos posteriores. O procedimento descrito também foi empregado na preparação de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS competente, sendo utilizados 5 µL do antibiótico cloranfenicol (34 µg/mL) na preparação do pré-inóculo.

3.3.8.3) Reação de transformação

Em um tubo foram adicionados, cuidadosamente, 100 μ L de bactérias competentes (DH5 α ou BL21 (DE3)) com os produtos da reação de ligação. Deixou-se em gelo por 30 minutos. Procedeu-se com o choque térmico: 42 °C por 2 minutos, 2 minutos em gelo e 2 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se, cuidadosamente, 5 μ L de glicose (4 mM), 10 μ L de MgCl₂ (2 mM) e 485 μ L de meio SOB, previamente aquecido a 37⁰ C. Incubou-se, então, a 37⁰ C por 1 hora e 30 minutos sob agitação (150 rpm). Aproximadamente 300 μ L dessas bactérias foram incubadas em uma placa de Petri, contendo 20 mL de meio LB Agar e antibióticos adequados para cada plasmídeo.

3.3.8.4) Confirmação da clonagem

Realizou-se o repique de algumas colônias, que foram incubadas *overnight* a 37⁰ C e 200 rpm. Para confirmar quais das colônias formadas eram as positivas foi realizada uma reação de PCR utilizando: 2 μ L de cultura; 1 μ L de primer M13 Foward (10 pmol/ μ L); 1 μ L de primer M13 Reverse (10 pmol/ μ L); 0,5 μ L de dNTP (10 mM); 2 μ L MgCl₂ (50 mM); 5 μ L de tampão 10X (BioTools); 1 μ L de Taq DNA polimerase 1U/ μ L (BioTools); água deionizada autoclavada q.s.p. 50 μ L, utilizando o seguinte ciclo:

94⁰ C -----2 min.

94⁰ C ----- 45s.

56⁰ C ----- 45s.

} 40 x

72⁰ C -----1min.

72⁰ C ----- 7min

4⁰ C ----- ∞

Após a PCR, os produtos foram observados em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo, num transiluminador UV. Foram aplicados no gel: 1 µL de dye front (Fermentas) + 1 µL de peso molecular 1 kb plus (Fermentas) e 1 µL de dye front + 6 µL de produto da PCR.

3.3.9) Extração de DNA plasmidial (mini-prep)

Uma cultura de 5 mL de bactérias foi centrifugada a temperatura ambiente, a 13.000 rpm, 30 segundos, sendo o sobrenadante descartado. Foram adicionados 100 µL da Solução I gelada, dissolveu-se no vórtex e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200 µL da Solução II (1 V NaOH 0,4 M+1V SDS 2%), recentemente preparada. Homogeneizou-se por inversão (5X) e incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Foram adicionados 150 µL da Solução III gelada, homogeneizou-se por inversão (5X) e incubou-se no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se a 14.000 rpm, 4 ° C, 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde adicionou-se 1 mL de etanol 100 % e incubou-se por 10 minutos a -80 ° C. Centrifugou-se a 14.000 rpm, 4 ° C, 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 500 µL de etanol 70% gelado. Após centrifugação a 14.000 rpm, 4 ° C, 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento a vácuo por 10 minutos. Foram adicionados 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização em vórtex, realizou-se nova centrifugação a 14.000 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para outro tubo, adicionou-se 40 µL de acetato de sódio a 3M e pH 5,2 e 300µL de etanol 100% gelado. Homogeneizou-se por inversão, e incubou-se por 10 minutos a -80 ° C, centrifugou-se a 14.00 rpm, 4 ° C, 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com 750 uL de etanol 70% e centrifugou-se a 14.000 rpm, 4 ° C, 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento a vácuo por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 20 uL de água deionizada, e o DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo.

3.3.10) Reação de sequenciamento

Foram adicionados num tubo: 1 μ L de DNA (proveniente da mini-prep, aproximadamente 400 ng); 2 μ L de Tampão *Save Money*; 2 μ L de primer M13Foward 1,6 pmol/ μ L ou 2 μ L de primer M13Reverse 1,6 pmol/ μ L; 2 μ L de *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems); água deionizada autoclavada q.s.p 10 μ L. Foi realizado o seguinte ciclo no termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems):

96 °C ----- 2 min	
96 °C ----- 30 s.	} 40 x
52 °C ----- 30 s.	
60 °C ----- 1 min 30 s	
4 °C ----- ∞	

Posteriormente à PCR, adicionou-se ao tubo, 80 μ L de isopropanol 75%, incubando-se a temperatura ambiente, ao abrigo de luz, por 15 minutos; centrifugou-se por 15 minutos, 13.000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e adicionou-se lentamente 1 ml de etanol 70%, a temperatura ambiente, pelas paredes do tubo. Centrifugou-se por 5 minutos, 13.000 rpm a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado, o pellet seco a vácuo, e armazenado em freezer -20 °C até o momento de uso. Ressuspendeu-se o pellet com 2 μ L de *Loading Buffer*, contém formamida, homogeneizou-se e a amostra após aquecimento a 95 °C foi analisada em sequenciador automático *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems).

3.3.11) Reação de subclonagem

3.3.11.1) Linerização do vetor de expressão pET28a (Novagen) e digestão do inserto

Para a linerização, 30 µL de vetor pET 28a; 5 µL tampão 10X *Nde*I (BioLabs); 1,5 µL enzima *Nde*I (BioLabs); água deionizada autoclavada q.s.p. 50 µL. Para a digestão 15 µL DNA (proveniente da mini-prep da clonagem em pGEM-TEasy); 5 µL tampão 10 X *Nde*I (BioLabs); 1,5 µL enzima *Nde*I (BioLabs); água deionizada autoclavada q.s.p. 50 µL. Incubou-se *overnight* a 37 °C. A seguir as amostras foram fenolizadas (V:V), utilizando-se o mesmo procedimento a partir do passo em que ocorre a adição de fenol/clorofórmio para a extração de DNA plasmidial. Após esta etapa, adicionou-se 5 µL tampão 10X *Hind*III (Pharmacia Biotech); 1,5 µL enzima *Hind*III (Pharmacia Biotech); água deionizada autoclavada q.s.p. 50µL e incubou-se *overnight* a 37 °C. Após o término das reações, parte da amostra foi analisada em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, visualizado em transiluminador UV. Após a confirmação da linerização do vetor e a digestão do inserto, as amostras foram aplicadas em outro gel de agarose 1%, sendo que as bandas referentes ao vetor e inserto foram recortadas do gel e purificadas.

3.3.11.2) Reação de ligação do inserto no vetor de expressão pET28a (Novagen)

As ORFs (*Open Reading Frame*) das enzimas Prx, SOD e OYE foram subclonadas em vetor de expressão pET28a (Novagen), figura 8. O vetor do sistema pET possui resistência ao antibiótico kanamicina, uma origem de replicação, um sítio de clonagem múltipla e diferentes sequências adjacentes que codificam para uma variedade de peptídeos acessórios que podem ser usados na detecção da proteína alvo. Na região N-terminal do inserto é adicionada cauda de 6 histidinas (His-tag), importante para a purificação da proteína recombinante.

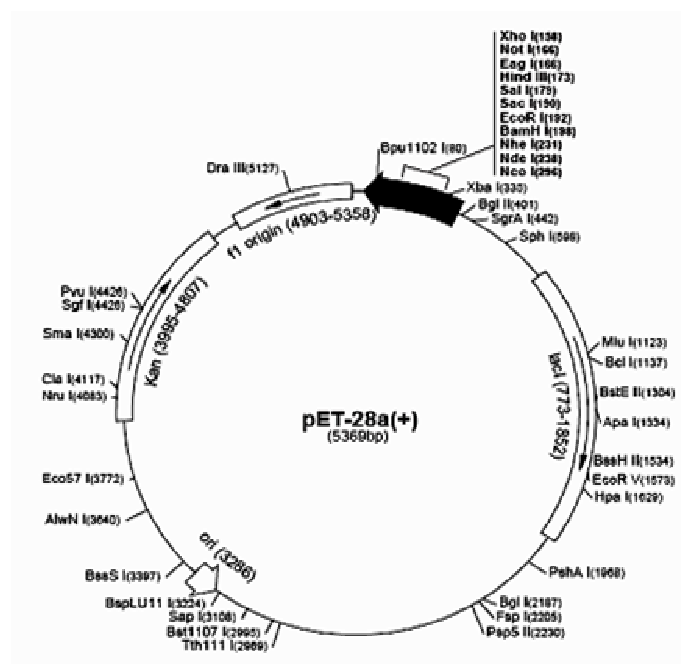


Figura 8: Mapa do vetor de expressão pET28a.

Fonte: http://www.genomex.com/vector_maps/pET28_map.pdf.

Acessado em 22/08/09.

A reação de ligação foi realizada utilizando-se 40 ng do vetor digerido, 2 µL tampão T4 DNA ligase 10X (USB), 8,5 µL produto de PCR (5x mais que a quantidade molar do vetor), 2 µL de T4 DNA ligase 1 U/µL (USB); água deionizada autoclava q.s.p. 20 µL, incubando a 16°C *overnight*.

3.3.11.3) Confirmação da subclonagem

Realizou-se o repique de algumas colônias, para isso foram repicadas colônias do meio LB-ágar para 5 mL de meio LB, contendo kanamicina (50 µg/mL). Foram incubadas as células de *E. coli* DH5α competente, contendo o vetor pET28a, *overnight* a 37°C e 200 rpm. Em um tubo foram adicionados: 2 µL de

cultura; 1 μL de primer 1 μL primer S (sentido específico para lado ORF) 10 pmol/ μL , 1 μL primer AS (anti-sentido específico para lado ORF) 10 pmol/ μL ; 0,5 μL de dNTP 10 mM; 2 μL MgCl_2 50 mM; 5 μL de tampão 10X (Biotools); 1 μL de Taq DNA polimerase 1U/ μL (Biotools); H_2O deionizada autoclavada q.s.p. 50 μL . Realizou-se o seguinte ciclo em termociclador automático (MJ Research PTC 100 Thermal Cycler):

94 ⁰ C -----5 min.	
94 ⁰ C ----- 45s.	} 40 x
56 ⁰ C ----- 45s.	
72 ⁰ C -----1min.	
72 ⁰ C ----- 7min	
4 ⁰ C ----- ∞	

Após a PCR, os produtos foram observados em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, num transiluminador UV.

3.3.12) Produção de proteínas recombinantes

3.3.12.1) Indução da expressão de proteínas recombinantes

Os vetores contendo as respectivas ORFs foram transformados em *E.coli* BL21 (DE3) pLysS, e as transformantes foram repicadas a partir do meio LB-ágar, contendo 100 μL de kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) e 20 μL de cloranfenicol (34 $\mu\text{g/mL}$). Incubou-se o pré-inóculo *overnight* a 37°C e 200 rpm. No dia seguinte realizou-se a diluição 1:10 da cultura, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro (DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer - Beckman) a 600 nm. Dilui-se a cultura em 5 mL de meio LB, contendo 25 μL de kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$), para se obter uma DO de

0,1, e incubou-se a 37°C e 200 rpm até $DO_{600nm} = 0,6$. Uma alíquota de 500 µL dessa cultura foi retirada (controle não induzido), e adicionou-se IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) na concentração de 0,4 mM. Incubou-se o restante da cultura a 37°C e 200 rpm por 4 e 16 horas, alíquotas destas etapas foram coletadas e centrifugadas.

Para verificar a solubilidade, uma cultura contendo 5 mL de meio LB, 25 µL de kanamicina (50 µg/mL) e 5 µL de cloranfenicol (34µg/mL), foi incubada *overnight* a 37°C e 200 rpm, e após a indução com IPTG em 100 mL de meio e 500 µL de kanamicina (50 µg/mL), os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 10 mL de tampão de lise, e submetidos a sonicação pulsada - 4,4 segundos de sonicação e 9 segundos de pausa - sendo o tempo total de 2 minutos, realizada no aparelho 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific). Centrifugou-se a 30.000 g por 15 minutos a 4°C, separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (sedimento), sendo este último ressuspenso em 10 mL tampão de lise. A expressão e solubilidade das proteínas foram observadas por meio de SDS-PAGE a 15% (Laemmli 1970), revelado com 0,010% de *Coomassie Brilliant Blue R-250*, e por *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal (anti-His) que reage com a cauda de histidina da proteína recombinante.

3.3.12.2) Purificação de proteínas recombinantes

A purificação das proteínas foi realizada por meio do cromatógrafo Äkta FPLC (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. A coluna preenchida com resina especial contendo níquel coordenado, que interage com a cauda de histidina presente na proteína recombinante. A coluna XK16, apresenta 5 mL de resina, foi lavada com 10 mL de água destilada para a retirada do tampão de conservação (etanol 20%). Então, ligou-se o níquel na coluna através da passagem de 5 mL (1 volume de coluna) de solução 0,1 M $NiSO_4$. A seguir lavou-se a coluna com tampão de ligação até a estabilização da condutância e absorbância, indicando que a coluna foi equilibrada. A amostra de proteína recombinante foi aplicada, lavou-

se a coluna com 25 mL de tampão de lavagem (5 volumes de coluna) e, para a eluição utilizou-se imidazol em gradiente linear, 20-500 mM. Após o término da purificação, reequilibrou-se a coluna com tampão de lavagem.

As frações obtidas foram analisadas em gel de SDS-PAGE 15% corado pelo *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,010%. As frações contendo as proteínas recombinantes de interesse foram submetidas à diálise para a retirada de uréia nas amostras. Para tal procedimento, as membranas foram fervidas, por 5 minutos, em 500 mL de água destilada contendo 1 mL de EDTA 1 mM e pH 8,0. Posteriormente, as membranas contendo as amostras foram dializadas em 1L de tampão PBS 1X, mantido sob leve agitação *overnight* a 4 °C.

3.3.13) Quantificação de Proteínas

Para determinação da concentração protéica de extratos celulares e de proteínas purificadas foi utilizado o reagente de Bradford (Bioagency), de acordo com instruções do fabricante.

Para a curva padrão preparou-se 200 µL de solução BSA (soroalbumina) a 2 mg/mL, e a partir desta solução obteve-se as demais com as seguintes concentrações: 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL. Das soluções obtidas transferiu-se 10 µL para um outro tubo, em seguida foram adicionados 10 µL tampão de eluição ou de lise, 780 µL de água deionizada e 200 µL de reagente de Bradford. Para a preparação do branco e das amostras foram utilizados 10 µL tampão de eluição ou de lise ou amostra, 790 µL água deionizada e 200 µL reagente de Bradford. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. , e a leitura óptica foi realizada a 595 nm (DU 530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer - Beckman).

3.3.14) Produção de anticorpos policlonais

Foram utilizados coelhos machos jovens (5 – 6 meses) para a indução da produção de anticorpos. Para tanto, foram inoculadas 200 µg/mL de cada proteína com 1 mL de adjuvante completo de Freund (V:V) por via intradérmica. Após 15 e 30 dias da primeira inoculação, nova dose de proteína foi injetada com 1 mL de adjuvante incompleto de Freund por meio da mesma via. Antes de iniciar as inoculações amostras de sangue da orelha do animal foram extraídas para obtenção do soro pré-imune. As frações coletadas foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C para a obtenção dos soros, e a verificação da produção de anticorpos foi feita através de *Western Blotting* utilizando proteína A como conjugado, sendo a revelação feita com DAB.

3.3.15) Detecção das proteínas nativas

Os parasitos foram ressuspensos em 30 µl de tampão de amostra, contendo DTT 250 mM, e fervidos por 10 minutos a 96 °C. As proteínas do SDS-PAGE 15% foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando 0,8 mA/cm², 50 V por 1 hora a 4 °C. Para a transferência foi utilizada tampão Tris-glicina 1X. A montagem foi a seguinte: 1 camada de papel de filtro embebido em tampão de transferência gelado, membrana embebida em tampão, gel e novamente 1 camada de papel. A membrana foi bloqueada com solução 5% de leite desnatado por no mínimo 1 hora a temperatura ambiente. Então, incubada a 4°C durante aproximadamente 18 h com 30 µL de anticorpo primário (1/500), produzido em coelhos, em 15 mL de solução de leite desnatado 2%. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS 1X/0,1% Tween-20 e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1/5.000) , por 1 hora a temperatura ambiente, mantida sob leve agitação. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS 1X/ 0,1% Tween-20. A revelação foi por quimioluminescência, processo realizado ao abrigo de luz, foram utilizados 6 mL de luminol e 20 µL de H₂O₂, incubando por aproximadamente 1 minuto. O filme, então, ficou em contato com solução reveladora, posteriormente com solução fixadora. Após, lavado com água. Como a peroxidase reage com o peróxido de

hidrogênio e o produto desta reação com o luminol, a luz emitida durante o processo é captada pelo filme de radiografia. A visualização desse processo é a formação de bandas no filme.

3.3.16) Testes da indução dos parasitos com benzonidazol

Para verificar o tempo de indução com benzonidazol, que será empregado na avaliação dos níveis de expressão das enzimas. Para tanto, uma cultura das cepas Y e Bolívia, foi contada em câmara de Neubauer.

O teste foi realizado em triplicata em placas de 96 poços, de acordo com a descrição a seguir:

- parasitos e benzonidazol (diluído em DMSO);
- parasitos e DMSO (mesmo volume daquele utilizado para benzonidazol) – controle.

A concentração de benzonidazol utilizado foi referente ao IC₅₀ de Y (9,01 µg/mL) e de Bolívia (25,00 µg/mL), sendo diluído em DMSO para um volume final de 100 µL. Tanto no tratamento como no controle o teste deveria ser iniciado (tempo 0 hora) com 1x10⁷ parasitos/mL. As contagens foram realizadas nos tempos 24, 48 e 72 horas.

3.3.17) Mensuração das formas epimastigotas de *T. cruzi*

A mensuração dos parasitos foi realizada segundo Rossi (2007). Para a mensuração dos parasitos, estes foram obtidos após os testes de indução com benzonidazol, sendo feitos nos tempos 0, 24 e 48 horas. A concentração padronizada de benzonidazol foi a referente ao IC₅₀ da cepa Y (9,01 µg/mL). Para a montagem de uma lâmina foram adicionadas 4 gotas de amostras numa câmara de suta e os parasitos foram fixados por 2 minutos com 2 mL de metanol. Após, utilizou-

se a coloração de Giemsa segundo Rosenfeld. Para tanto foi utilizado 1 mL de Giemsa filtrado e 2 mL de água destilada autoclavada, pH 7,0. Após 15 minutos de incubação, a lâmina foi lavada com água e analisada em microscópio Leitz DMRXE. As imagens foram capturadas e mensuradas em analisador de imagem Leica Qwin, utilizando o programa LEICA LIDA (Leica Image Database and Archive System), sendo os seguintes parâmetros morfológicos analisados segundo Dias e Freitas Filho (1943) e Barreto (1965): comprimento total (CT), largura do corpo (LC), área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (NA), distância da extremidade anterior ao núcleo (DNA), distância da extremidade posterior ao núcleo (DPN) e índice nuclear ($IN = PN/NA$).

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Avaliação de suscetibilidade das cepas de *T. cruzi* ao benzonidazol

A partir dos valores das absorvâncias medidas em espectrofotômetro - 595 nm - foram calculadas as porcentagens de parasitos mortos. O programa Origin V.7.0 forneceu a concentração de benzonidazol referente ao IC₅₀. Obsevou-se que a cepa mais suscetível é a Santo Inácio 1, enquanto a mais resistente é a Santo Inácio 3. Os valores podem ser vistos na tabela 3.

Tabela.3: Avaliação da suscetibilidade das diferentes cepas ao benzonidazol		
Cepa	IC₅₀ (µg/mL)	IC₅₀ (µM)
Santo Inácio 1	7,10	27,28
Y	9,01	34,62
Santo Inácio 8	15,20	58,40
Quaraí II	16,60	63,78
Bolívia	25,00	96,06
Santo Inácio 3	27,40	105,28

4.2) Amplificação e purificação da ORF de Prx, OYE e SOD

Visando a obtenção do produto de PCR, para a clonagem utilizou-se DNA genômico de *T.cruzi*, sendo utilizada a cepa Y como padrão. Sendo esperada a formação de banda em torno de 680 pb (pares de base) referente à Prx. Verificada a amplificação da sequência de Prx (figura 9A), que foi posteriormente purificada, como demonstrada na figura 9B. O mesmo procedimento utilizado para a obtenção do produto de PCR de Prx foi empregado para OYE, figura 9C. Sendo esperada a formação de banda em torno de 1200 pb. Após a amplificação da sequência de OYE, esta foi posteriormente purificada, figura 9D. O controle negativo era esperado a não formação de banda, provavelmente pode ter ocorrido amplificação do primer. Os mesmos procedimentos para a obtenção do produto de PCR foram realizados para SOD. A obtenção do produto de PCR de SOD pode ser visualizado na figura 9E. Sendo esperado a formação de banda em torno de 640 pb , uma vez confirmada a amplificação, o produto de PCR de interesse foi purificado, como demonstrado na figura 9F.

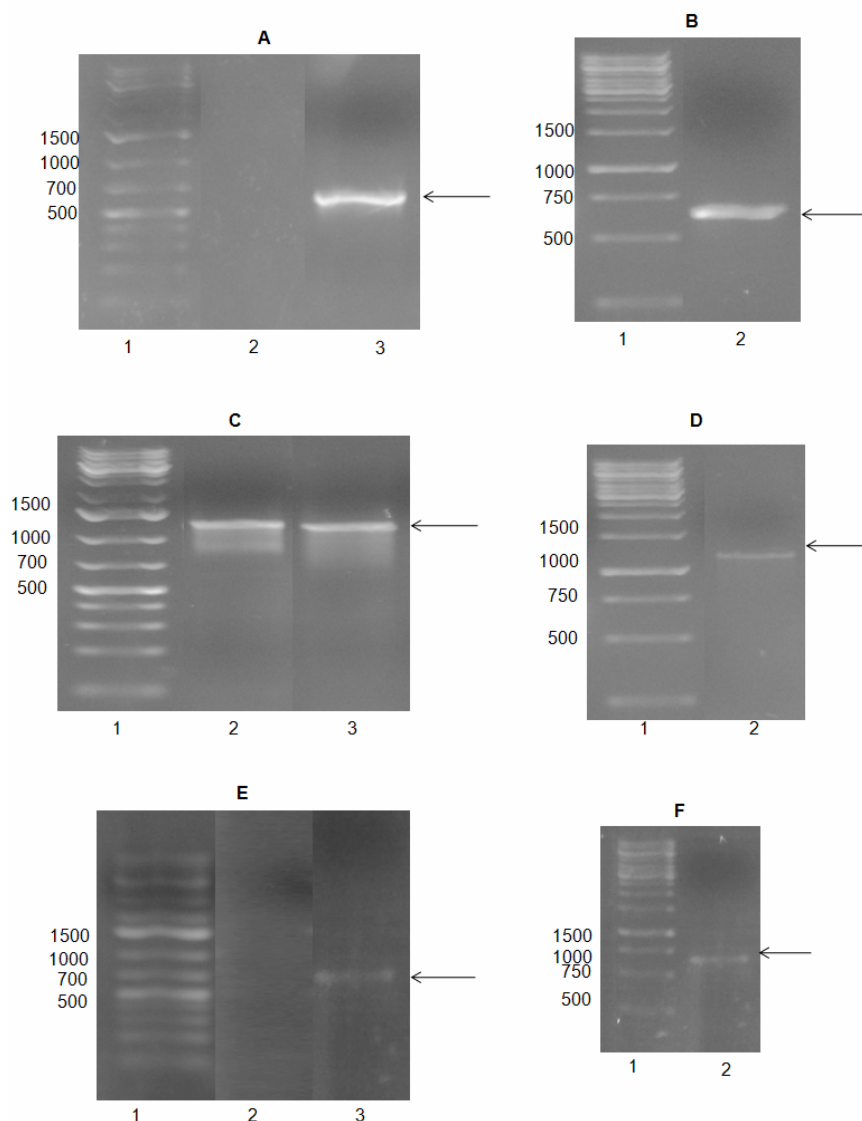


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. **Painel A:** Produtos de PCR amplificado com iniciadores específicos de Prx. 1 - peso molecular em pb (1 kb DNA *ladder plus* - Fermentas); 2 - controle negativo; 3 - sequência amplificada de Prx (em torno de 680 pb). **Painel B:** Produto de PCR purificado. 1 - peso molecular em pb (1 kb DNA *ladder* - Fermentas); 2 - seta indica o produto de Prx purificado. **Painel C:** Produtos de PCR amplificado com iniciadores específicos de OYE. 1 - peso molecular em pb; 2 - controle negativo; 3 - sequência amplificada de OYE (em torno de 1200 pb). **Painel D:** Produto de PCR purificado. 1 - peso molecular em pb; 2 - seta indica o produto de OYE purificado. **Painel E:** Produtos de PCR amplificado com iniciadores específicos de SOD. 1 - peso molecular em pb; 2 - controle negativo; 3 - sequência amplificada de SOD (em torno de 640 pb). **Painel F:** Produto de PCR purificado. 1 - peso molecular em pb; 2 - seta indica o produto de SOD purificado.

4.3) Clonagem em vetor pGEM - T *Easy System* e extração de DNA plasmidial

A partir do produto de PCR purificado referente à Prx, SOD e OYE realizou-se a reação de ligação no vetor de clonagem pGEM – T *Easy System* (Promega), cuja confirmação dos clones foi feita utilizando os iniciadores universais M13 Forward e M13 Reverse, o que pode ser visto na figura 10A. Após a reação de PCR para confirmar quais eram as colônias positivas, realizou-se a extração de DNA plasmidial, figura 10B, sendo que alguns clones foram selecionados para realização da reação de sequenciamento. Após esta etapa pequenas alterações entre Y e a CL Brener utilizada no sequenciamento, foram observadas. O mesmo procedimento utilizado para Prx foi empregado para a confirmação da clonagem e obtenção de DNA plasmidial de OYE, figuras 10C e 10D respectivamente. Idem para para a confirmação da clonagem e obtenção de DNA plasmidial de SOD, figuras 10E e 10F, respectivamente.

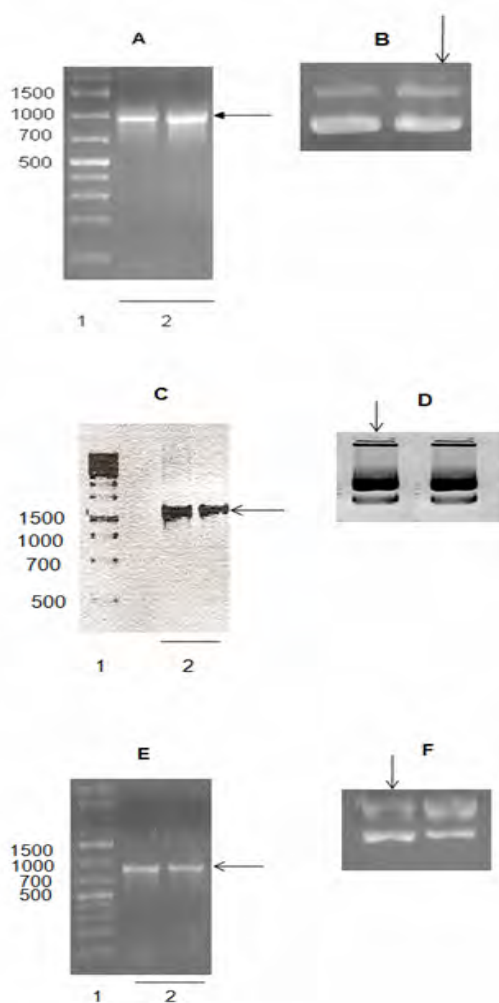


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. **Painel A:** Confirmação da clonagem de Prx. 1 - peso molecular em pb (1 kb DNA *ladder plus* - Fermentas), 2 - produtos de PCR após a clonagem de Prx em vetor pGEM-T Easy System, clones positivos. **Painel B:** Obtenção de DNAs plasmidiais, vetor pGEM-T Easy System (aproximadamente 3000 pb) contendo a sequência de Prx (em torno de 680 pb). **Painel C:** Confirmação da clonagem de OYE. 1 - peso molecular em pb, 2 - produto de PCR após a clonagem de OYE em vetor pGEM-T Easy System, clones positivos. **Painel D:** Obtenção de DNAs plasmidiais, vetor pGEM-T Easy System contendo a sequência de OYE (em torno de 1200 pb). **Painel E:** Confirmação da clonagem de SOD. 1 - peso molecular em pb, 2 - produtos de PCR após a clonagem de SOD em vetor pGEM-T Easy System, clones positivos. **Painel F:** Obtenção de DNAs plasmidiais, vetor pGEM-T Easy System contendo a sequência de SOD (em torno de 640 pb). As setas verticais indicam o clone escolhido que foi utilizado nos experimentos posteriores.

4.4.) Análise de sequências de tripanosomatídeos

4.4.1) Análise de sequências de Prx de tripanosomatídeos

A comparação entre as sequências de Prx nos tripanosomatídeos pode ser vista na figura 11, que apresenta o alinhamento múltiplo das sequência de aminoácidos de Prx. A partir de dados do GenBank database (CAA06923) e do programa Target P (www.sbs.dtu.dk/services/TargetP/), confirmou-se o compartimento mitocondrial da proteína de interesse. Futuramente pretende-se analisar a proteína citosólica, comparando os efeitos observados em relação a enzima mitocondrial. A sequência obtida alinhou-se com sequências mitocondriais de Prx de outros tripanosomatídeos. A identidade entre Prx da cepa Y (utilizada nos experimentos) e CL Brener é de 95%, pois existem pequenas diferenças entre cepas. Em comparação com outros tripanosomatídeos, observou-se que *T. cruzi* apresenta maior identidade com *T. brucei*, 71% de identidade, *Leishmania major* e *L. amazonensis* identidade de 68%, enquanto com *Crithidia fasciculata* foi de 43% (Tabela 4).

Confirmada a clonagem pelo sequenciamento, o DNA plasmidial positivo contendo a ORF de interesse foi utilizado para a sub-clonagem em vetor de expressão, pET28a (Novagen).

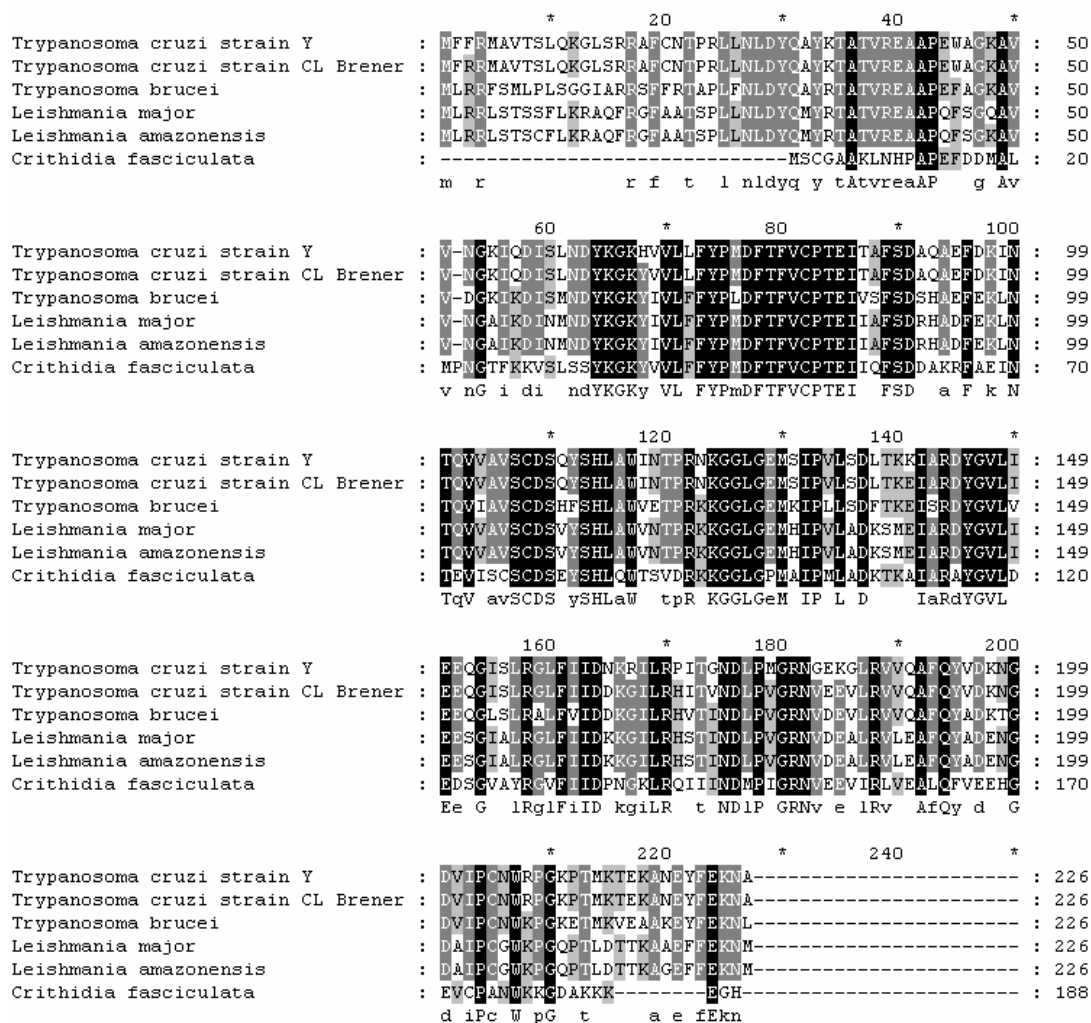


Figura 11: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de Prx entre os tripanosomatídeos. Em preto estão os aminoácidos com 100% de identidade, em cinza escuro, com 80% (existe um aminoácido não alinhado) e em cinza claro, 60% (existem dois aminoácidos não alinhados).

Tabela 4: Porcentagem de identidade de aminoácidos de Prx da cepa Y de <i>T.cruzi</i> com outros tripanosomatídeos		
Espécie	% Identidade	Código de acesso (GenBank)
Cepa CL Brener (<i>T.cruzi</i>)	95	XP_806739.1
<i>T. brucei</i>	71	XP_847032.1
<i>Leishmania major</i>	68	XP_001683326.1
<i>L. amazonensis</i>	68	AAX47429.1
<i>Crithidia fasciculata</i>	43	AAC15095.1

4.4.2) Análise de sequências de OYE de tripanosomatídeos

A ORF de OYE alinhou-se apenas com a sequência de NAD(P)H flavina oxidoreductase de *L. major*, fato que indica que a enzima em estudo pode não estar presente em vários tripanosomatídeos, e, portanto, deve possuir pápeis bastante específicos na fisiologia dos organismos onde este é encontrada. Ferramentas de bioinformática confirmaram a presença da proteína em questão no citoplasma do parasito. A identidade observada entre a sequência de Y e CL Brener foi de 99%, enquanto que com *L. major* foi de 41% (Figura 12, Tabela 5).

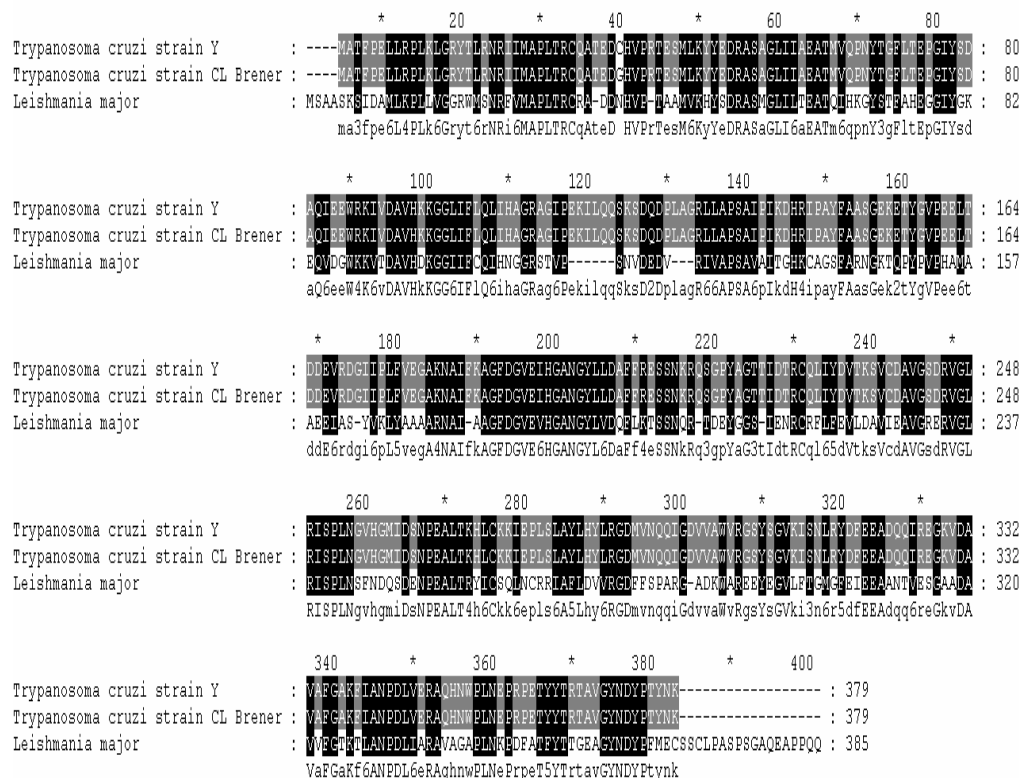


Figura 12: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de OYE entre os tripanosomatídeos. Em preto estão os aminoácidos com 100% de identidade, em cinza escuro, com 80% (existe um aminoácido não alinhado) e em cinza claro, 60% (existem dois aminoácidos não alinhados).

Tabela 5: Porcentagem de identidade de aminoácidos de OYE da cepa Y de <i>T. cruzi</i> com outros tripanosomatídeos		
Espécie	% Identidade	Código de acesso (GenBank)
Cepa CL Brener (<i>T. cruzi</i>)	99%	Tc00.1047053508461.80
<i>Leishmania major</i>	41%	LmjF12.1130

4.4.3) Análise de sequências de SOD de tripanosomatídeos

Comparações de sequências feitas a partir de SOD sequenciada neste projeto com aquela depositada em bancos de dados públicos, confirmou se tratar de um FeSOD com compartimentalização mitocondrial, como previsto. A identidade de SOD da cepa Y e CL Brener é de 99%, com *T. brucei*, 69% de identidade, *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum* a identidade foi de 56%, 55% e 54%, respectivamente (Figura 13, tabela 6).

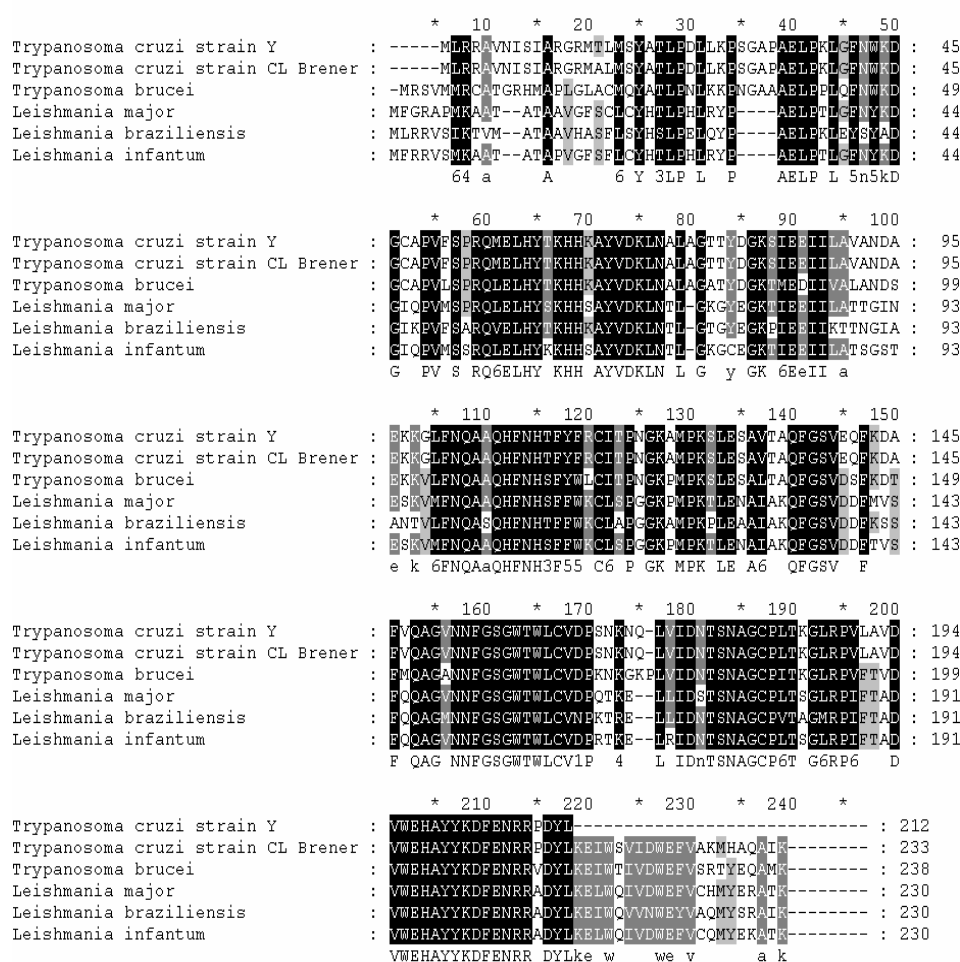


Figura 13: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de SOD entre os tripanosomatídeos. Em preto estão os aminoácidos com 100% de identidade, em cinza escuro, com 80% (existe um aminoácido não alinhado) e em cinza claro, 60% (existem dois aminoácidos não alinhados).

Tabela 6: Porcentagem de identidade de aminoácidos de SOD da cepa Y de <i>T.cruzi</i> com outros tripanosomatídeos		
Espécie	% Identidade	Código de acesso (GenBank)
Cepa CL Brener (<i>T.cruzi</i>)	99%	XP_812157.1
<i>T. brucei</i>	69%	AAX77683.1
<i>Leishmania major</i>	56%	XP001680058.1
<i>L. braziliensis</i>	55%	XP001463371.1
<i>L. infantum</i>	54%	XP001562094.1

4.5.) Linerização do vetor pET28a, digestão de Prx, OYE e SOD e purificação do DNA digerido

Confirmada a clonagem e sequenciamento das ORF de Prx, OYE e SOD, o DNA plasmidial positivo foi digerido com enzimas específicas para a sub-clonagem em vetor de expressão, pET28a (Novagen). O clone escolhido em cada caso, apresentado na figuras , foi digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Hind* III, cujos sítios de clivagem foram inseridos nos iniciadores específicos. O vetor de expressão pET28a foi linearizado (figura 14A) com as mesmas enzimas, e posteriormente purificado (figura 14B), sendo, então, realizada a reação de ligação de cada produto de digestão.

Em relação a Prx observou-se a liberação de um fragmento em torno de 680 pb, figura 14A, para OYE de 1140 pb, (figura 14C) e SOD de aproximadamente 640 pb (figura 14E) . Em seguida, os produtos de digestão foram purificados (figuras 14B, 14D e 14F) a partir do gel de agarose, quantificados e empregados na reação de ligação em pET28a.

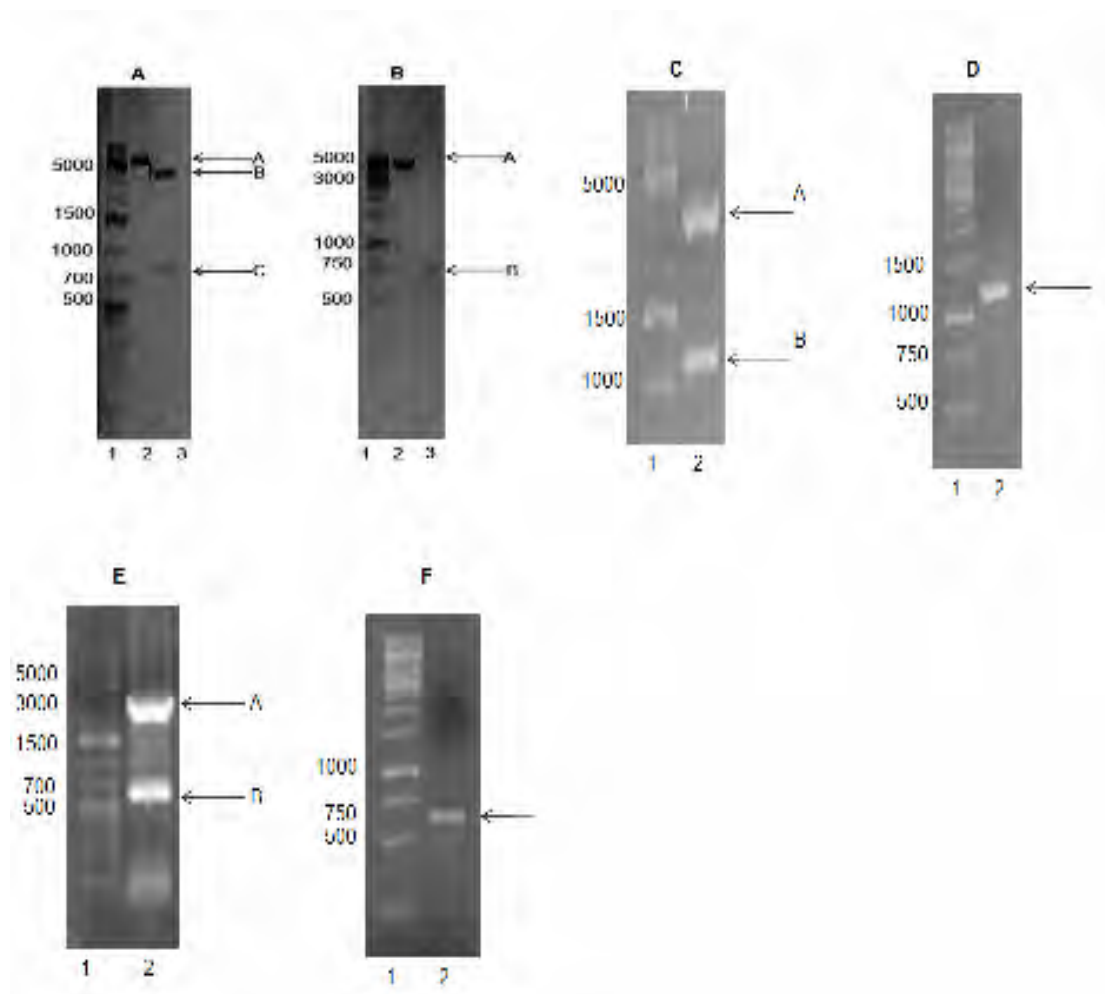


Figura 14: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **Painel A:** Linearização do vetor de expressão e digestão de Prx.1 - peso molecular em pb (1 kb DNA *ladder plus* -Fermentas); 2 - linearização do vetor pET28a (em torno de 5000 pb, seta A); 3 - digestão de Prx (em torno de 680 pb, seta C) e liberação do vetor pGEM-T Easy (em torno de 3000 pb, seta B). **Painel B:** Purificação a partir do gel de agarose 1%. 1 - peso molecular em pb (1 kb DNA *ladder* - Fermentas); 2 - vetor pET28a (seta A); 3 - Prx purificada após a digestão (seta B). **Painel C:** Digestão de OYE.1 - peso molecular em pb; 2 - digestão de OYE (em torno de 1200 pb, seta B), a liberação do vetor pGEM-T Easy (em torno de 3000 pb, seta A). **Painel D:** Purificação a partir do gel de agarose 1%. 1 - peso molecular em pb; 2 - OYE purificada após a digestão (seta). **Painel E:** Digestão de SOD.1 - peso molecular em pb; 2 - digestão de SOD (em torno de 640, seta B), a liberação do vetor pGEM-T Easy (em torno de 3000 pb, seta A). **Painel F:** Purificação a partir do gel de agarose 1%. 1 - peso molecular em pb; 2 - SOD purificada após a digestão (seta).

4.6) Subclonagem em vetor pET28a e extração de DNA plasmidial

A partir do produto da digestão purificado realizou-se a reação de ligação no vetor de expressão pET28a, e a sub-clonagem foi confirmada por PCR utilizando os primers específicos de Prx (figura 15A), OYE (figura 15C) e SOD (figura 15E). O DNA plasmidial de interesse foi extraído a partir de alguns clones selecionados de Prx, OYE e SOD (figuras 15B, D e F).

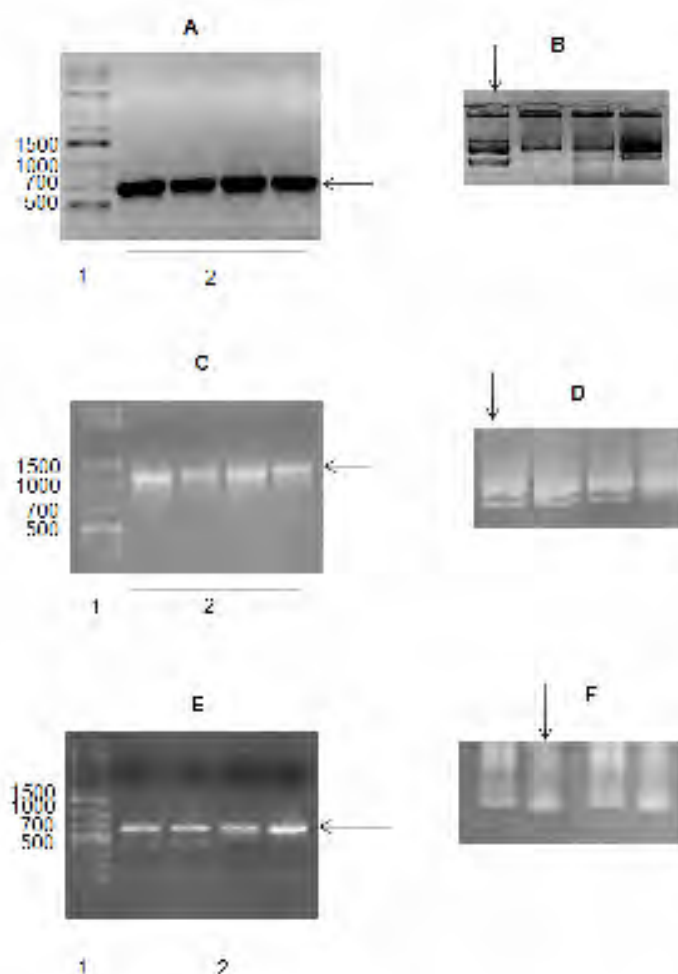


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **Painel A:** Confirmação da subclonagem de Prx realizada em *E.coli* DH5 α competente. 1 - peso molecular em pb (1 kb DNA *ladder plus* - Fermentas), 2 - produtos de PCR após a clonagem de Prx em vetor pET28a, clones positivos (seta horizontal). **Painel B:** Extração de DNAs plasmidiais, vetor pET28a (aproximadamente 5000 pb) contendo a sequência de Prx (em torno de 680 pb). **Painel C:** Confirmação da subclonagem de OYE. 1 - peso molecular em pb, 2 - produtos de PCR após a clonagem de OYE em vetor pET28a, clones positivos. **Painel D:** Extração de DNAs plasmidiais, vetor pET28a contendo a sequência de OYE (em torno de 1200 pb). **Painel E:** Confirmação da subclonagem de SOD. 1 - peso molecular em pb, 2 - produtos de PCR após a clonagem de SOD em vetor pET28a, clones positivos (seta horizontal). **Painel F:** Extração de DNAs plasmidiais, vetor pET28a contendo a sequência de SOD (em torno de 640 pb). As setas verticais indicam o clone escolhido utilizado na indução da expressão de proteína das citadas enzimas.

4.7) Indução da produção de proteína recombinante de Prx, OYE e SOD

Os clones confirmados foram transformados em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS competentes. Colônias selecionadas foram crescidas *overnight*, diluídas para D.O.= 0,1 e incubadas até o crescimento atingir a D.O. de 0,6. Adicionou-se IPTG (0,4mM) e a cultura foi incubada por 4 ou 16 horas. Na figura 16A observa-se aumento da intensidade de uma banda entre 21,5 e 31,0 kDa, correspondente à superexpressão do gene Prx nas duas condições experimentais analisadas. A ORF clonada desta enzima possui 681 nucleotídeos, sendo responsável por codificar uma proteína de 227 aminoácidos, com pI predito de 7,74 e peso molecular estimado de 25.525 Da, cuja expressão foi confirmada por *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal direcionado para cauda de histidina codificada pelo vetor pET28a (figura 16B).

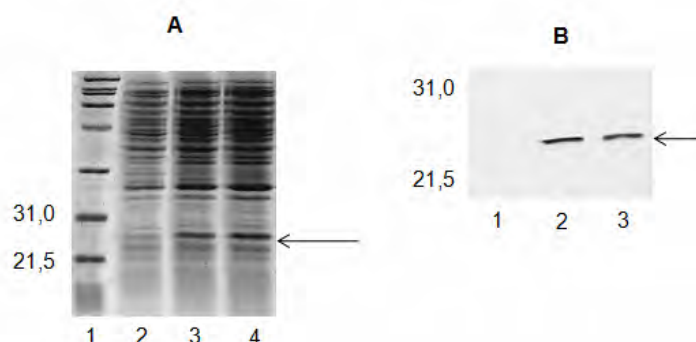


Figura 16: Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue* R-250. **Painel A:** Teste de indução da expressão de Prx recombinante. 1- peso molecular em kDa (BioRad); 1 - controle não induzido (sem IPTG); 3 - indução por 4 horas com 0,4 mM IPTG; 4 - indução *overnight* com 0,4 mM IPTG. **Painel B:** *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His. A seta indica a reação de anti-His com Prx.

Para OYE e SOD foi realizado o mesmo procedimento empregado na indução da expressão de Prx recombinante, entretanto nenhuma banda demonstrou aumento de intensidade, indicativo da superexpressão das enzimas de interesse (dados não mostrados). Sendo assim, a expressão de SOD e OYE foi confirmada com auxílio da técnica de *Western Blotting*, onde o anticorpo anti-histidina identificou

a expressão das proteínas recombinantes, nos tempos de indução de 4 e 16 horas. Embora improvável, é possível que a baixa concentração das proteínas recombinantes no extrato de total de *E. coli* possa afetar a purificação das mesmas. Portanto, novos experimentos deverão ser realizados, onde se observará a influência da alteração da temperatura e concentração de IPTG no nível de expressão das proteínas recombinantes. OYE recombinante foi identificada como uma proteínas de aproximadamente 46 kDa (figura 17A), enquanto SOD possui algo em torno de 23 kDa (figura 17B).

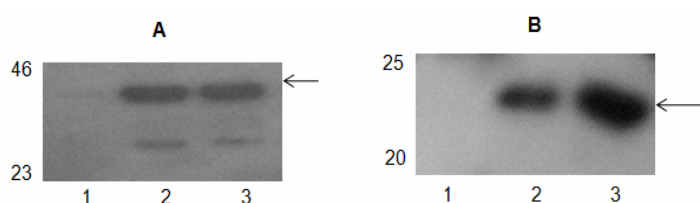


Figura 17: *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His demonstrando o teste da indução de expressão de OYE e SOD recombinante. **Painel A:** Teste de indução da expressão de OYE recombinante. 1 - controle negativo não induzido (sem IPTG); 2 - indução por 4 horas com 0,4 mM IPTG; 3 - indução *overnight* com 0,4 mM IPTG. **Painel B:** Teste de indução da expressão de SOD recombinante. 1 - controle negativo não induzido (sem IPTG); 2 - indução por 4 horas com 0,4 mM IPTG; 3 - indução *overnight* com 0,4 mM IPTG.

4.8) Teste de solubilidade da proteína recombinante Prx

Após a lise celular, por sonicação pulsada, realizou-se eletroforese em SDS-PAGE 15% com o intuito de localizar em qual fração a proteína recombinante localizava-se, figura 18A. Com as condições empregadas, ou seja, expressão a 37°C, por 16 horas com 0,4 mM de IPTG, obteve-se a proteína recombinante Prx na forma insolúvel, sendo este dado confirmado por *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina (figura 18B).

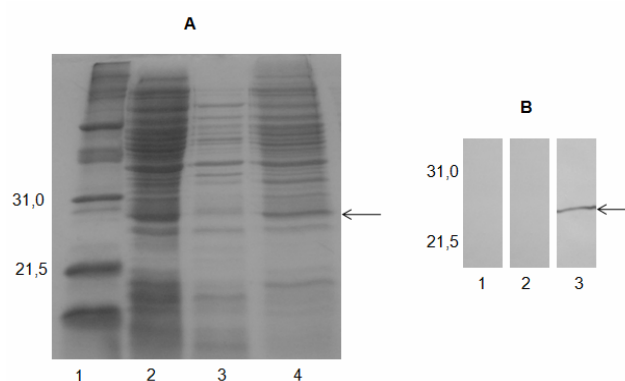


Figura 18: Teste de solubilidade da proteína recombinante Prx. **Painel A:** Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. 1- peso molecular em kDa (BioRad); 2- controle não induzido; 3- fração solúvel; 4 - fração insolúvel. **Painel B:** *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-His. 1- controle não induzido; 2 - fração solúvel; 3 - fração insolúvel.

4.9) Expressão e purificação de Prx recombinante e produção de anticorpos policlonais anti-Prx

Para a solubilização de Prx recombinante foi utilizado tampão contendo uréia 6 M. A confirmação da purificação, figura 19A, demonstrou excelente grau de pureza, pois não foram observadas bandas contaminantes. A proteína purificada foi quantificada, dializada e inoculada em coelho; após a segunda injeção de proteína, sangue da orelha do animal foi retirado e o soro obtido foi testado para observar a produção de anticorpo policlonal anti-Prx. Observou-se que o soro coletado apresentou reatividade até o título de 1:12.500, como demonstrado na figura 19B.

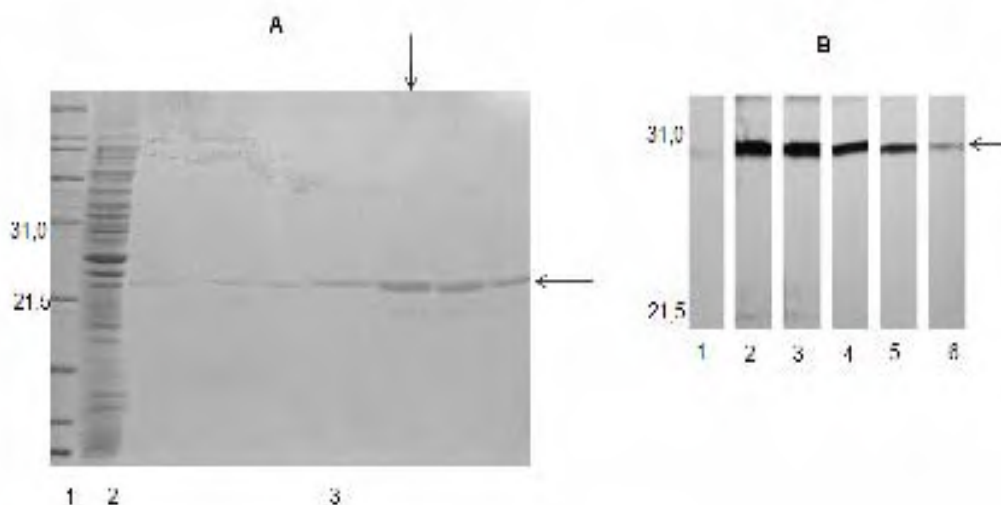


Figura 19: Verificação da expressão e purificação de Prx recombinante e produção de anticorpos policlonais anti-Prx. **Painel A:** SDS-PAGE 15% corado pelo *Coomassie Brilliant Blue R-250*. 1- peso molecular (BioRad); 2 - fração de proteína não purificada; 3 - frações contendo a proteína purificada, aproximadamente 25,5 kDa (seta horizontal). A seta vertical indica a amostra escolhida utilizada para a produção de anticorpo anti-Prx. **Painel B:** *Western Blotting* para confirmar a produção de anticorpos policlonais anti-Prx. 1: controle pré-imune (soro diluído 1/20). Soro com as seguintes diluições - 2: 1/20; 3: 1/100; 4: 1/500; 5: 1/2.500; 6: 1/12.500. A seta indica a reação entre a proteína recombinante Prx e o anticorpo anti-Prx.

4.10) Reação dos anticorpos policlonais com a proteína Prx nativa

A verificação da reação dos anticorpos policlonais anti-Prx com a proteína Prx nativa, presente no extrato total, foi realizada por *Western Blotting*. Para tanto, utilizou-se extrato total obtido a partir da cepa Y e observou-se reatividade até a diluição 1:500 (figura 20). O aparecimento de bandas inespecíficas em menores diluições, talvez possa ser explicado pela presença da outra isoforma de Prx, com compartimento citoplasmático, que apresenta tamanho de aproximadamente de 23 kDa (NOGUEIRA et al., 2009).

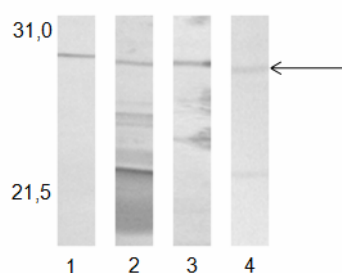


Figura 20: *Western Blotting* para confirmar a reação entre o anticorpo policlonal anti-Prx com a proteína nativa Prx (extrato total de *T.cruzi*). 1: Controle positivo com a proteína recombinante Prx (1/500). Soro com as seguintes diluições - 2: 1/20; 3: 1/100; 4: 1/500. A reação entre a proteína Prx nativa com o anticorpo está representada pela seta.

4.11) Testes da indução dos parasitos com benzonidazol

Para avaliar o efeito de diferentes tempos de exposição ao fármaco os parasitos foram quantificados por meio da câmara de Neubauer. Para tanto foram utilizadas as formas epimastigotas das cepas Y (tabela 7) e Bolívia (tabela 8), elas foram contadas após 24, 48 e 72 horas de exposição ao benzonidazol.

Experimentos similares serão realizados para avaliar a curva de crescimento das demais na presença de fármaco.

Tabela 7: Quantificação de parasitos, cepa Y, durante a indução com benzonidazol								
Hora	Não Tratado (10⁷ parasitos/mL)			Média	Tratado (10⁷ parasitos/mL)			Média
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
24	0,77	0,68	1,00	0,82	0,66	0,92	0,62	0,74
48	2,27	1,73	1,95	1,99	0,99	1,21	1,34	1,18
72	3,61	2,65	2,85	3,04	1,34	1,04	1,00	1,12

Tabela 8: Quantificação de parasitos, cepa Bolívia, durante a indução com benzonidazol								
Hora	Não Tratado (10⁷ parasitos/mL)			Média	Tratado (10⁷ parasitos/mL)			Média
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
24	0,82	2,01	1,41	1,42	0,50	0,94	0,97	0,80
48	1,34	3,50	2,89	2,57	0,49	1,85	0,66	1,00
72	2,47	3,86	2,34	2,90	1,09	1,04	0,95	1,02

A partir das médias foram construídas as curvas de crescimento das formas epimastigotas da cepa Y tratadas e não tratadas com benzonidazol (gráfico 1A) e da Bolívia (gráfico 1B). Observou-se que exposições por 72 horas reduzem acentuadamente a viabilidade dos parasitos e, portanto, os experimentos de análise de expressão serão conduzidos com crescimentos de até 48 horas.

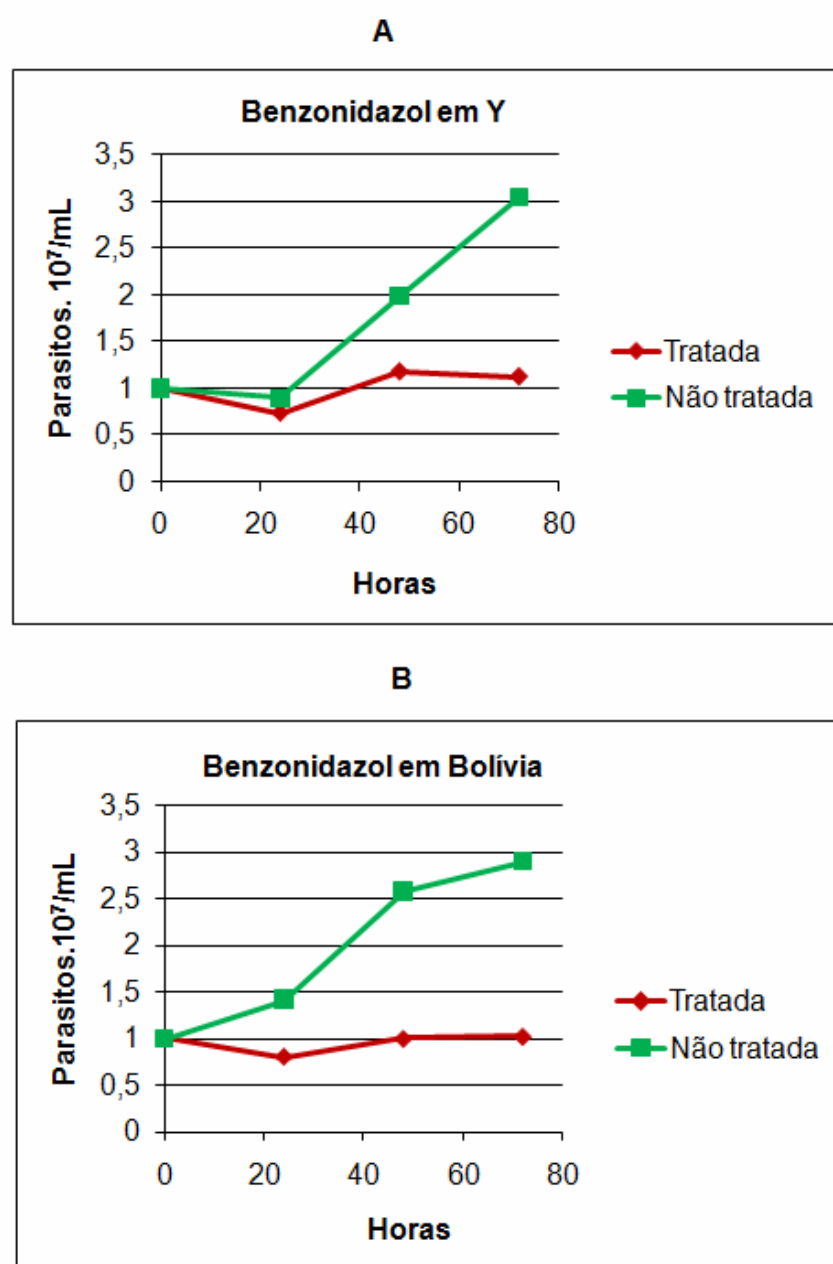


Gráfico 1: Curva de crescimento dos parasitos expostos ao benzonidazol com indução por até 72 horas. Painel A: cepa Y. Painel B: cepa Bolívia.

4.12) Avaliação do nível de expressão de Prx

A padronização do *Western Blotting* com anticorpos contra proteínas envolvidas no estresse oxidativo ainda está em andamento. Inicialmente pensou-se em aplicar no gel de SDS-PAGE uma concentração de proteína extraída de 10^7 parasitos. No entanto, após a verificação do *Western Blotting* percebeu-se que os resultados obtidos não eram confiáveis, pois cada cepa e condição experimental apresentavam diferentes níveis de expressão das diversas proteínas. Com isso, tentou-se realizar os experimentos utilizando-se a concentração de 15 µg de proteínas, mas não se observou bandas provavelmente devido a baixa concentração de proteínas. Novos esforços estão focados para aumentar a quantidade de proteínas empregada no *Western Blotting*, para aproximadamente 50 µg de extrato protéico, empregando se diálise e concentração a vácuo. Pretende-se em breve, avaliar se incremento de concentração protéica causará alterações positivas nos resultados do *Western Blotting*.

4.13) Mensuração das formas epimastigotas de *T. cruzi*

As alterações morfológicas indicam que se o parasito não conseguir contornar a situação provocada pelo benzonidazol, molécula que ocasiona alterações estruturais no DNA, ao ligar-se covalentemente a ele (COURA e CASTRO, 2002), além de gerar radicais livres (MAYA et al., 2007), causarão a morte do parasito.

Avaliou-se até o momento a cepa Y, referente aos tempos 0 (figura 21) e 48 (figura 22) horas após a indução com o benzonidazol. Para as avaliações morfológicas foram escolhidas 30 imagens de parasitos dos referidos tempos. As análises foram realizadas no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Depto. Ciências Biológicas, UNESP, Araraquara em colaboração com o Prof. Dr. João Aristeu da Rosa. Após a exposição ao benzonidazol foram evidenciadas mudanças na morfologia do parasito. O que indica a atuação da substância no *T. cruzi* numa concentração de 9,01 µg/mL.

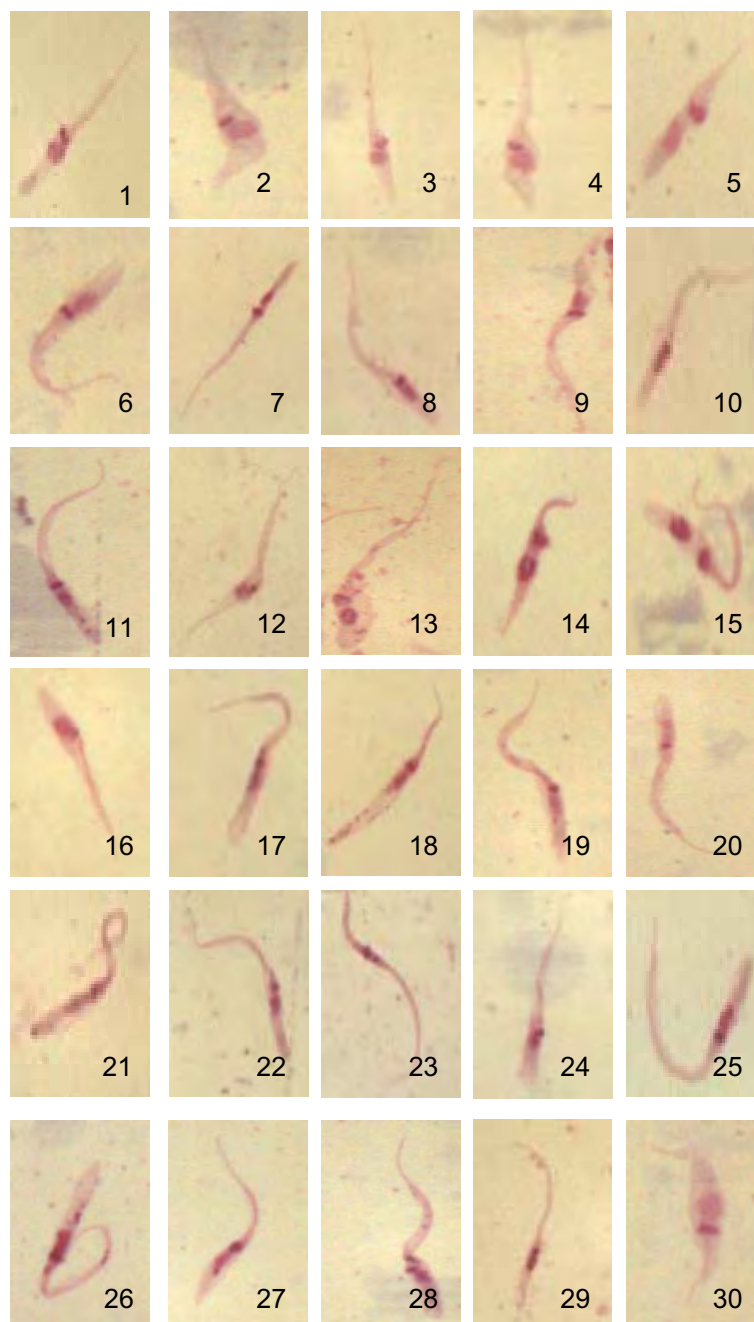


Figura 21: Fotomicrografias referentes às formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (100x) no tempo 0, sem exposição ao benzonidazol.

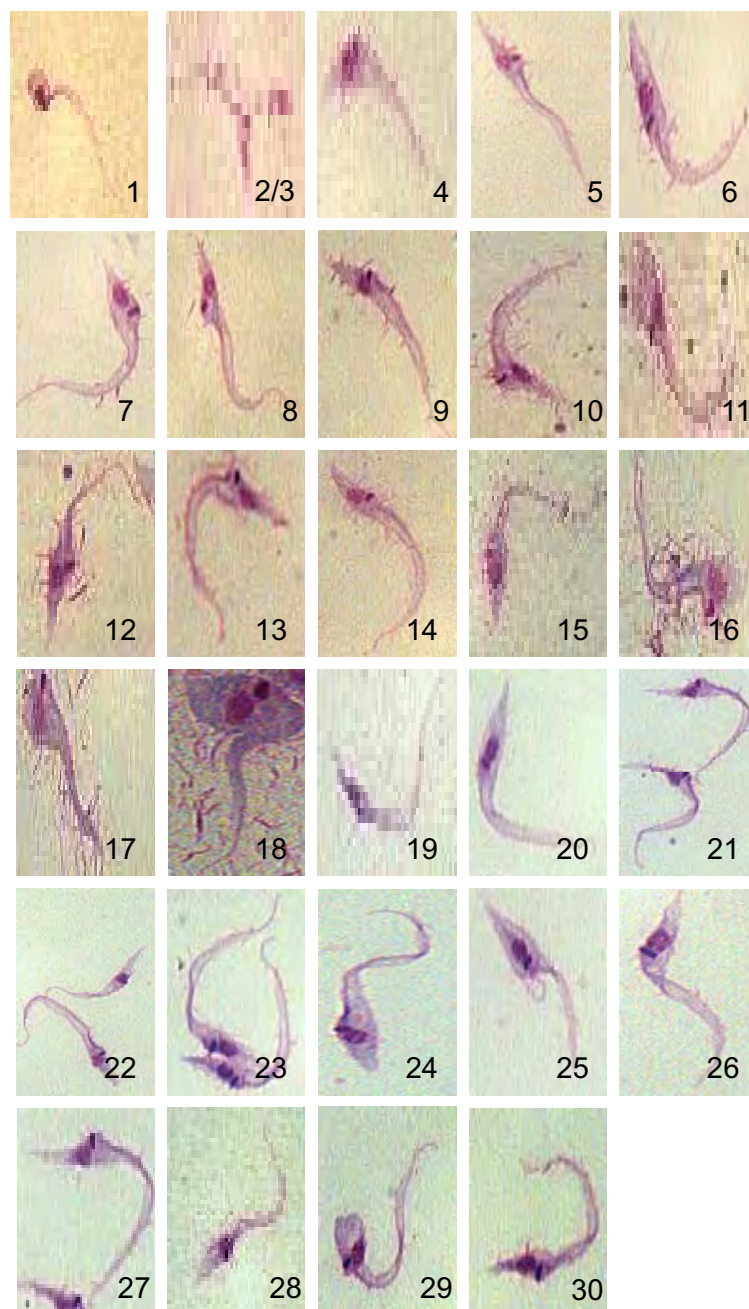


Figura 22: Fotomicrografias referentes às formas epimastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (1000x), após 48 horas de indução com benzonidazol

Os parâmetros morfométricos avaliados indicaram que houve mudança no tamanho após 48 horas de indução com benzonidazol. O comprimento total (CT) e a largura do corpo (LC) aumentaram, a área do cinetoplasto (AC), do núcleo (NA) e o índice nuclear (IN) diminuíram. Tais resultados podem ser vistos no gráfico 2.

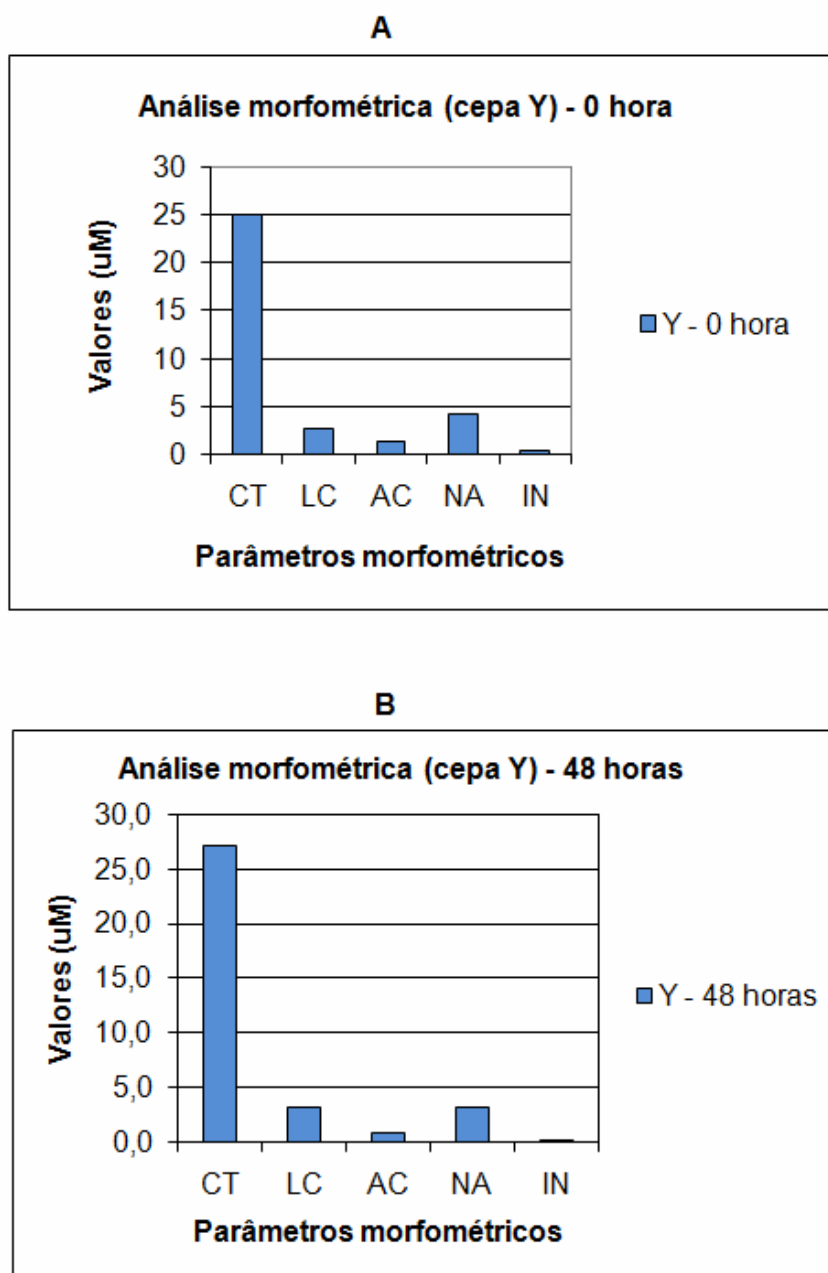


Gráfico 2: Análise morfométrica da cepa epimastigota Y. Painei A: Avaliação do tempo 0, sem exposição ao benzonidazol. Painei B: Avaliação após 48 horas de exposição ao benzonidazol. Os parâmetros indicam - comprimento total (CT), largura do corpo (LC), área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (NA) e índice nuclear (IN = DPN/DNA), sendo DPN a distância da extremidade posterior ao núcleo e DNA a distância da extremidade anterior ao núcleo

A alteração no tamanho do parasito é provavelmente indício de que o benzonidazol alterou inicialmente o DNA do parasito, como observado pela diminuição da área nuclear. Este fato pode ter colaborado nas alterações das estruturas da membrana celular, o que pode ser evidenciado pela aumento no comprimento total e largura do corpo do parasito. A redução da área do cinetoplasto pode ser outro indício de que a fármaco pode ter afetado o DNA do parasito. Os resultados podem ser vistos no gráfico 3.

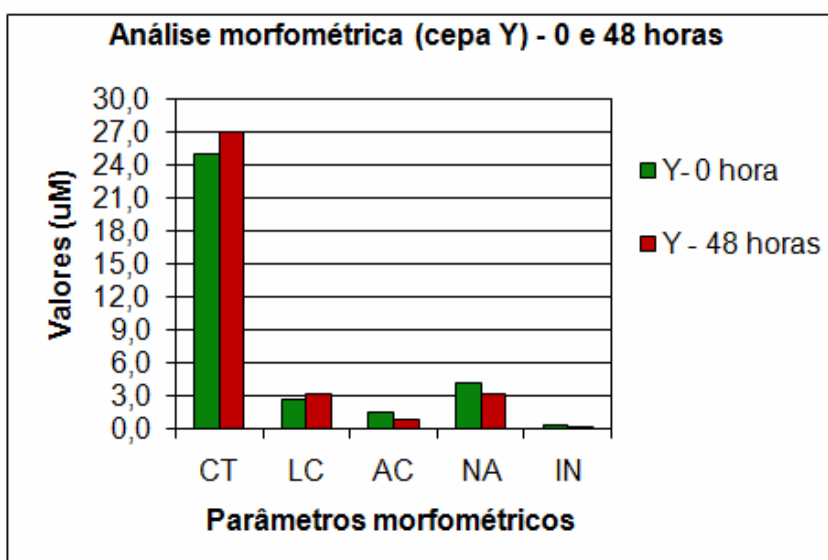


Gráfico 3: Análise morfométrica da cepa epimastigota Y, avaliação do tempo 0, sem exposição ao benzonidazol e após 48 horas de exposição ao benzonidazol. Os parâmetros indicam - comprimento total (CT), largura do corpo (LC), área do cinetoplasto (AC), área do núcleo (NA) e índice nuclear (IN = DPN/DNA), sendo DPN a distância da extremidade posterior ao núcleo e DNA a distância da extremidade anterior ao núcleo.

5) CONCLUSÕES

1) Os testes de suscetibilidade ao benzonidazol demonstraram que a cepa Santo Inácio 1 (27,28 μM) é a mais suscetível, enquanto Santo Inácio 3 é a mais resistente (105,28 μM);

2) A proteína Prx foi adequadamente clonada em vetor de expressão pET28a obtendo-se a proteína recombinante a partir da fração insolúvel, solubilizada com tampão contendo uréia, os anticorpos policlonais anti-Prx reconheceram a proteína nativa de aproximadamente 25 kDa em extratos totais de *T. cruzi*;

3) A construção adequada do primer demonstrou ser essencial para a obtenção da amplificação específica bem como os sítios de restrição e a escolha da enzima apropriada é de extrema importância para a obtenção da ORF correta, apesar da existência de isoenzimas, como ocorreu com SOD-A;

4) A clonagem no vetor pGEM-T *Easy System* demonstrou ser um tanto dificultosa para sequências maiores que 1000 pares de base, como ocorreu com OYE;

5) As alterações morfológicas indicam que o benzonidazol deve ter afetado de algum modo o DNA e organelas de *T. cruzi*.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, H. M.; MURTA, S. M. F.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; NIRDÉ, P.; ROMANHA, A. J. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 2357-2367, 2008.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008. 1 CD-Rom.

BARRETO, M. P. Tripanossomos semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo**, v. 7, n. 5, p. 305-315, 1965.

CERQUEIRA, R. L.; KAWARABAYASHI, M.; GUIMARÃES, A. C. S.; NAKAMURA, P. M.; FERRAZ, S. N.; PINTO, P. L. S.; ANDRADE, H. F. Jr. Santo Inácio revisited: protozoan diseases in na isolated village in northeastern Brazil after twenty years. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 5, p. 736-740, 1998.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potencial anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002. Supplementum 1.

DIAS, E.; FREITAS FILHO. L. de. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotripanum*. I – Introdução, material e técnica, problema e métodos estatísticos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 38, n. 3, p. 427-436, 1943.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas disease (american trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-121, 1999. Supplementum 1.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. In: Cimerman, B.; Cimerman, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Cap. 11, p. 81-94.

DOST, C. K.; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO, J. C. Jr. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitology Research**, v. 88, p. 609-616, 2002.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C.; NILSSON, D.; GAUTAM, A. TRAN, A-N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E. A.; DELCHER, A. L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S. J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G. C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ÅSLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D. A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; SILVEIRA, J. F.; JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P. T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A. C.; GULL, K.; HORN, D.; LIHUA, H.; YITING, H.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; HEAN, K.; LACERDA, D.; LEVIN, M. J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C. R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J. C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J. L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S. L.; SANCHEZ, D. O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A. J.; SISK, E.; TAMMI, M. T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; VAN AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P. N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; STUART, K. D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, p. 409-415, 2005.

FERNANDES J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FINZI, J. K.; CHIAVEGATTO, C. W. M.; CORAT, K. F.; LOPEZ, J. A.; CABRERA, O. G.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, p. 37-43, 2004.

FUNAYAMA, G. K.; PRADO, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *T. cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 8, p. 75-81, 1974.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program Version 7.0 for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARDER, S.; BENTE, M.; ISERMANN, K.; BRUCHHAUS, I. Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 5, p. 861-870, 2006.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 733-742, 2008.

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

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 95-97, 2007. Supplementum 1.

KUBATA, B. K.; KABUTUTU, Z.; NOZAKI, T.; MUNDAY, C. J.; FUKUZUMI, S.; OHKUBO, K.; LAZARUS, M.; MARUYAMA, T.; MARTIN, S. K.; DUSZENKO, M.; URADE, Y. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 9, p. 1241-1251, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005p. 73-96.

MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A.; ESCARIO, J. A.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 53-59, 2001. Supplementum 1.

MARTINS, L. P.; MARCILI, A.; CASTANHO, R. E.; THEREZO, A. L.; OLIVEIRA, J. C.; SUZUKI, R. B.; TEIXEIRA, M. M.; ROSA, J. A.; SPERANÇA, M. A. Rural *Triatoma rubrovaria* from Southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 427-434, 2008.

MATEO, H.; MARÍN, C.; PÉREZ-CORDÓN, G.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in

Trypanosoma cruzi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 271-276, 2008. Supplementum 3.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K. ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, part A, p. 601-620, 2007.

MORELO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry Physiology Pharmacology Toxicology Endocrinology**, v. 107, n. 3, p. 367-371, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.

MURTA, S. M. F.; KRIEGER, M. A.; MONTENEGRO, L. R.; CAMPOS, F. F. M.; PROBST, C. M.; ÁVILA, A. R.; MUTO, N. H.; OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; NIRDÉ, P.; BRUNA-ROMERO, O.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P) flavin oxidoreductase, associates with *in vitro*-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 146, p. 151-162, 2006.

MURTA, S. M. F.; NOGUEIRA, F. B.; SANTOS, P. F.; CAMPOS, F. M. F.; VOLPE, C.; LIARTE, D. B.; NIRDÉ, P.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Acta Tropica**, v. 107, p. 59-65, 2008.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. Jr. Gene Doc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments Version 2.6.002, 1997.

NOGUEIRA, F. B.; KRIEGER, M. A.; NIRDÉ, P.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J.; MURTA, S. M. F. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benznidazole. **Acta Tropica**, v. 100, p. 119-132, 2006.

NOGUEIRA, F. B.; RUIZ, J. C.; ROBELLO, C.; ROMANHA, A. J.; MURTA, S. M. F. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitology Research**, v. 104, p. 835-844, 2009.

PARODI-TALICE, A.; DURÁN, R.; ARRAMBIDE, N.; PRIETO, V.; PIÑEYRO, M. D.; PRITSCH, O.; CAYOTA, A.; CERVENANSKY, C.; ROBELLO, C. Proteome analysis

of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 881-886, 2004.

PASSERINI, G. D. **Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da Família Piperaceae em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 2, p. 323-334, 2007.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. **Biochemical Journal**, v. 410, n. 2, p. 359-368, 2008.

PIÑEYRO, M. D.; PARODI-TALICE, A.; ARCARI, T.; ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? **Gene**, v. 408, p. 45-50, 2008.

RASSI, A. Jr.; DIAS, J. C. P.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v. 95, p. 524-534, 2009.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e África**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 128-161.

RIBEIRO, R. D.; RISSATO e GARCIA, T. A.; BONOMO, W. C. Contribuição para o estudo dos mecanismos de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 51-54, 1987.

RIBEIRO, I.; SEVCSIK, A-M.; ALVES, F.; DIAP, G.; DON, R.; HARHAY, M. O.; SHING, C.; PECOUL, B. New, improved treatments for Chagas disease: from the R and D pipeline to the patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, 2009. e484

ROSSI, L. R. L. **Estudo biométrico de formas epimastigotas e tripomastigotas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909 (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae)**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007. Supplementum 1.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clín. Biol.**, v. 20, p. 191-208, 1953.

SPRUYT, M.; BUQUICCHIO, F. Gene Runner Version 3.05, 1994.

TEIXEIRA A. R. L.; NITZ N.; GUIMARO M. C.; GOMES C.; SANTOS-BUCH C. A. Chagas disease. Post Graduate **Medical Journal**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TEMPERTON, N. J.; WILKINSON, S. R.; MEYER, D. J.; KELLY, J. M. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 96, p. 167-176, 1998.

TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 211-220, 2004.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 311-318, 2009. Supplmentum

**Avaliação do metabolismo oxidativo em cepas de *Trypanosoma cruzi*
naturalmente resistentes ao benzonidazol**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel.



Aluna: Andréa Akiko Nakaima Kohatsu



Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.



Co-orientador: Dr. Marco Túlio Alves da Silva
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara.



Supervisor: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro