

The page is framed by a decorative border consisting of numerous small, stylized line drawings of the parasite Trypanosoma cruzi. These drawings are arranged in a repeating pattern around the perimeter of the page, with some appearing to be in motion, swimming or crawling.

Anna Cláudia Guimarães Freire

Expressão heteróloga de catalase e resistência
ao estresse oxidativo em *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Dr. Carlos Renato Machado

Coorientadora: Dra. Ceres Luciana Alves

Belo Horizonte

2016

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Laboratório de Genética Bioquímica

TESE DE DOUTORADO

Expressão heteróloga de catalase e resistência
ao estresse oxidativo em *Trypanosoma cruzi*

Anna Cláudia Guimarães Freire

Orientador: Dr. Carlos Renato Machado
Coorientadora: Dra. Ceres Luciana Alves

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção da titulação de Doutor em Biologia Molecular.

Belo Horizonte

2016

*Quando penso que já cheguei ao
meu limite, descubro que tenho
forças para ir além.
(Ayrton Senna)*

A pequena Alice, que me despertou

em mim o maior amor do mundo...

...Dedico.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia pela oportunidade.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro e por possibilitar a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Renato Machado por ter prontamente aceitado me orientar e por ter me recebido tão bem no laboratório. Por toda paciência, educação, atenção e incentivo. Por acreditar em mim, algumas vezes, mais do que eu mesma.

Agradeço à Dra. Ceres Luciana Alves, coorientadora deste trabalho, pelas sugestões, críticas e ensinamentos. Agradeço também pela paciência, atenção e apoio ao longo destes anos.

Agradeço aos demais professores do Laboratório de Genética e Bioquímica, Dra. Glória Regina Franco, Dra. Andréa Mara Macedo, Dr. Sérgio Danilo Junho Pena e Dr. Erich Birelli Tahara, pelas sugestões, críticas e ensinamentos.

Agradeço à Dra. Leda Quércia Vieira e à Dra. Grazielle Alves Ribeiro pela colaboração com os experimentos de infecção em macrófagos e camundongos.

Agradeço à Dra. Alessandra Guarneri, por nos receber prontamente no Centro de Pesquisa René Rachou e possibilitar a realização dos experimentos de infecção de triatomíneos.

Agradeço à Neuza, não apenas pelo apoio técnico, mas também por toda a atenção e carinho. Agradeço também à Pollyana pelos momentos de descontração.

Agradeço aos colegas do Grupo de Reparo, com os quais convivi em algum momento dos últimos quatro anos: Bruno Repolês, Bruno Rezende, Ceres, Christiane, Egídio, Héllida, Hugo, Isabela, Jarbas, João Pedro, Karla, Marianna, Paula, Pedro, Raíssa, Sabrina e Selma, pelos momentos de ajuda e descontração. Em especial, agradeço à Héllida pela amizade, ajuda na bancada, bate-papos divertidos, conselhos e desabafos. Agradeço

também com muito carinho à Karla, pela amizade e pelas conversas agradáveis, e ao Bruno Repolês, pelos momentos de descontração e pela ajuda.

Agradeço aos demais colegas e amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica, os quais, de alguma forma, auxiliaram na realização deste trabalho. Em especial, gostaria de agradecer à Priscilla Almeida e à Prícila Cunha, pessoas de uma simpatia infinita e uma educação admirável. Destaco também a Fernanda Soardi e a Natália Linhares, pela ajuda com o *Western Blotting* e os bate-papos sempre agradáveis.

Agradeço à Mirele, grande amiga com quem posso contar tanto nos momentos de desespero como nas horas de alegria. Obrigada pelo carinho, pelas conversas sempre prazerosas e pela preocupação. À Andrea, que desde o início foi muito mais do que uma professora de inglês, sempre preocupada comigo, me ouvindo e me dando bons conselhos. À Luzia, não só pela ajuda com as tarefas da casa, mas também pelo carinho tão grande comigo, por estar sempre com um sorriso no rosto e por toda a preocupação.

Agradeço aos meus pais, os melhores do mundo, que desde o início me apoiaram nesta jornada. Pelo amor incondicional, pelas orações, pela força. Por terem compartilhado todos os momentos comigo, sejam tristes ou felizes, mesmo que muitas vezes à distância. Pelas horas no telefone me ouvindo sobre os experimentos que pareciam não ter fim e a vontade de voltar para casa. Pelo carinho, pelas preocupações e pelo zelo. Por serem a razão de tudo.

Agradeço ao meu irmão pelo amor, pelas preocupações e pela torcida. Por acreditar em mim e pelas palavras de incentivo. Pelos momentos de descontração e por me fazer querer ser um bom exemplo sempre. Agradeço também à Fernanda por todo carinho, amizade e consideração. Obrigada por ser uma pessoa com a qual eu sempre quero estar e pelos bate-papos sempre divertidos.

Agradeço aos meus queridos avós por todas as orações, preocupações e conselhos. Por todo carinho, amor e afeto. Por me acharem muito “importante” por ter chegado onde eles não puderam, mesmo sem entenderem exatamente com o que trabalhei durante o doutorado. Por enxergarem em mim alguém muito melhor do que eu sou.

Agradeço imensamente ao Anderson, por todo amor, carinho e paciência. Por entender as minhas ausências e as minhas limitações. Por comemorar as minhas vitórias como se fossem suas. Pela ajuda nos momentos de desespero e de vontade de jogar tudo para o alto. Pelas horas no telefone para matar a saudade e sobreviver à distância. Pelo bom humor, otimismo e leveza de sempre. Por ser minha grande inspiração e meu porto seguro. Por me fazer a pessoa mais feliz do mundo.

Agradeço, acima de tudo, a Deus, que me permitiu chegar até aqui, levantando a cada queda e me tornando mais forte. A Ele, que me deu forças para conseguir suportar a saudade de ficar longe das pessoas que eu mais amo. A Ele, que me fez chegar onde eu jamais achei que seria capaz.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, apesar de não terem sido mencionados, contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

Sumário

Lista de Siglas e Abreviaturas	10
Lista de Figuras	13
Resumo	15
Abstract	16
Introdução	18
1.1 A Doença de Chagas.....	18
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e suas peculiaridades.....	20
1.3 Diversidade genética em <i>T. cruzi</i>	23
1.4 A busca pelo tratamento da Doença de Chagas	24
1.5 O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	26
1.6 <i>T. cruzi</i> e o estresse oxidativo	31
1.7 <i>T. cruzi</i> e a resposta ao dano oxidativo no DNA	34
1.8 O sistema antioxidante do <i>T. cruzi</i>	38
1.9 <i>T. cruzi</i> e a ausência de catalase.....	43
1.10 Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e sinalização de estresse oxidativo.....	46
Objetivos.....	50
2.1 Objetivo Geral	50
2.2 Objetivos específicos	50
Metodologia.....	52
3.1 Amplificação, clonagem e subclonagem do gene <i>katE</i>	52
3.1.1 Amplificação do gene <i>katE</i> de <i>Escherichia coli</i>	52
3.1.2 Clonagem do gene <i>katE</i> no vetor pGEM [®] -T Easy.....	53
3.1.3 Clonagem do gene <i>katE</i> no vetor pROCK_GFP_HIGRO	56
3.2 Sequenciamento para confirmação da clonagem do gene <i>katE</i>	57
3.3 Cultivo e transfecção de <i>T. cruzi</i> com o gene <i>katE</i>	58
3.3.1 Cultivo de <i>T. cruzi</i> na forma epimastigota.....	58
3.3.2 Transfecção dos parasitos com o vetor pROCK_kaE_HIGRO	58
3.4 Extração de RNA e RT-PCR.....	59
3.5 Clonagem dos parasitos.....	61
3.6 Confirmação da expressão de catalase nos parasitos transfectados e análise da expressão de enzimas antioxidantes do <i>T. cruzi</i>	61

3.6.1	Preparo dos extratos celulares.....	61
3.6.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	62
3.6.3	Ensaio de <i>Western Blotting</i>	63
3.7	Dosagem da atividade de peroxidase.....	64
3.8	Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase no crescimento e na sobrevivência do <i>T. cruzi</i> ao H ₂ O ₂	64
3.8.1	Curva de crescimento.....	64
3.8.2	Curva de sobrevivência ao H ₂ O ₂	65
3.8.3	Curva de sobrevivência ao H ₂ O ₂ com pré-tratamento	65
3.9	Avaliação dos níveis de H ₂ O ₂	66
3.10	Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase na susceptibilidade do <i>T. cruzi</i> ao Benzonidazol.....	66
3.11	Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> no processo de infecção in vitro	67
3.11.1	Obtenção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	67
3.11.2	Ensaio de infecção de macrófagos in vitro	68
3.12	Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> no processo de infecção in vivo.....	69
3.12.1	Ensaio de infecção de camundongos	69
3.12.2	Ensaio de infecção de triatomíneos.....	70
3.13	Análise estatística.....	71
	Resultados e Discussão	73
4.1	Obtenção de uma linhagem de <i>T. cruzi</i> que expressa catalase.....	74
4.2	A expressão heteróloga de catalase não altera o crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> , mas aumenta a sobrevivência ao H ₂ O ₂	78
4.3	A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> não promove alteração na susceptibilidade do parasito ao Benzonidazol.....	80
4.4	A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> reduz a adaptação do parasito ao pré-tratamento com H ₂ O ₂	81
4.5	A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> promove um aumento nos níveis de H ₂ O ₂ após a exposição dos parasitos a esta substância.....	85
4.6	A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> modifica os níveis de enzimas antioxidantes do parasito.....	86

4.7	O tratamento de macrófagos com o antioxidante catalase reduz o parasitismo de <i>T. cruzi</i> modificado com MutT.....	90
4.8	A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> promove um aumento na parasitemia de camundongos.....	91
4.9	A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> promove um aumento na proliferação do parasito no hospedeiro invertebrado	94
4.10	Tripanossomatídeos e a enzima catalase.....	95
	Conclusão	102
	Referências Bibliográficas	104
	ANEXO.....	122

Lista de Siglas e Abreviaturas

8-oxoG	8-oxoguanina ou 7,8-dihidro-8-oxoguanina
8-oxo-dGMP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato
8-oxo-dGTP	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
AP	Apurínico/apirimidínico
APX	Ascorbato peroxidase
ASC	Ascorbato
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BZ	Benzonidazol
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CAT	<i>Catalase-polyethylene glycol</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
cTXNPx	Triparedoxina peroxidásica citosólica
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
DEPC	Dietil pirocarbonato
DHA	Dehidroascorbato
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2 α</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FEN1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>
Fe-SOD	Ferro-superóxido dismutase

GSH	Glutathiona
GSSG	Glutathiona dissulfídica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPI	Hidroperoxidase I
HPII	Hidroperoxidase II
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIG1	Ligase 1
LIG3	Ligase 3
LIT	<i>Liver infusion tryptone</i>
LIT1	<i>Leishmania Iron Transporter 1</i>
LOOH	Hidroperóxido orgânico
mRNA	RNA mensageiro
mTXNPx	Triparedoxina peroxidásica mitocondrial
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NADPHox	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>
NFX	Nifurtimox
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OGG	8-oxoguanina DNA glicosilase
ONOO ⁻	Peroxinitrito
•OH	Radical hidroxila
PAR	<i>Poly ADP-ribose</i>
PARP	<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

PBS-T	<i>Phosphate buffered saline with Tween 0,05%</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pol β	DNA polimerase beta
Pol δ	DNA polimerase delta
Pol ϵ	DNA polimerase épsilon
pré-mRNA	Pré-RNA-mensageiro
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RBPs	<i>RNA-binding proteins</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFBi	Soro fetal bovino inativado
SL	<i>Splice leader</i>
TcOYE	<i>Old Yellow Enzyme</i>
T(S) ₂	Tripanotiona dissulfídica
T(SH) ₂	Tripanotiona ditiol
TR	Tripanotiona redutase
TS	Tripanotiona sintetase
TXN	Triparedoxina
UTRs	<i>UnTranslated Regions</i>
WT	<i>Wild type</i>

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição dos casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> no mundo	18
Figura 2: Descoberta e sintomas da doença de Chagas.....	20
Figura 3: <i>T. cruzi</i> e suas principais formas ao longo do ciclo de vida	28
Figura 4: Desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> no hospedeiro invertebrado	29
Figura 5: Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	32
Figura 6: Sistema antioxidante do <i>T. cruzi</i>	40
Figura 7: Amplificação da sequência correspondente ao gene <i>katE</i> por PCR.....	75
Figura 8: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos correspondentes ao gene <i>katE</i> e ao vetor pROCK_ <i>katE</i> _HIGRO	75
Figura 9: Amplificação da sequência do mRNA correspondente ao gene <i>katE</i> por RT-PCR..	76
Figura 10: Expressão heteróloga de <i>katE</i> em <i>T. cruzi</i>	77
Figura 11: A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> não modifica o padrão de crescimento dos parasitos	78
Figura 12: A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> aumenta a resistência dos parasitos ao estresse oxidativo causado pelo H ₂ O ₂	79
Figura 13: A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> não altera a susceptibilidade deste parasito ao Benzonidazol.....	81
Figura 14: A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> reduz a adaptação ao estresse oxidativo causado pelo H ₂ O ₂	82
Figura 15: O efeito sinalizador do pré-tratamento com H ₂ O ₂ é transitório.....	84
Figura 16: Níveis de H ₂ O ₂ em <i>T. cruzi</i> selvagem e modificado com o gene da catalase	86
Figura 17: A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> aumenta os níveis de Fe-SOD B e reduz os níveis de TR.....	89
Figura 18: Infecção de macrófagos na presença ou ausência de catalase	92
Figura 19: A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> promove um aumento na parasitemia de camundongos.....	93
Figura 20: A expressão heteróloga de catalase em <i>T. cruzi</i> aumenta a proliferação deste parasito no hospedeiro invertebrado.....	95

Figura 21: Árvore filogenética esquemática mostrando a distribuição de catalase nos tripanossomatídeos 97

Resumo

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, é exposto a várias situações de estresse oxidativo durante o seu complexo ciclo de vida. Para lidar com este tipo de estresse, uma das estratégias utilizadas pelo parasito para detoxificar hidroperóxidos é um peculiar sistema de defesa antioxidante dependente de tripanotiona. Entretanto, o repertório antioxidante do *T. cruzi* não inclui a enzima catalase, a qual decompõe peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e é encontrada na maioria dos organismos aeróbicos. Para investigar a razão pela qual o *T. cruzi* não possui a enzima catalase, geramos uma linhagem do parasito capaz de expressar o gene desta enzima. Parasitos que expressam catalase apresentam uma resistência aumentada ao tratamento com H_2O_2 em relação aos selvagens (WT). O pré-tratamento de parasitos WT com uma baixa concentração de H_2O_2 antes do tratamento com a mesma substância faz com que os mesmos sejam tão resistentes ao H_2O_2 quanto àqueles que expressam catalase. Porém, esta adaptação ao pré-tratamento não foi observada com a mesma intensidade nos parasitos mutantes. A expressão de catalase em *T. cruzi* aumentou o nível da enzima ferro-superóxido dismutase B e diminuiu o nível de tripanotiona redutase, resultando em níveis aumentados de H_2O_2 após a exposição a esta substância. Embora a expressão heteróloga de catalase contribua para o aumento da proliferação do parasito no inseto vetor, a mesma não induziu um grande aumento na virulência em camundongos. Nossos resultados, associados às informações de que a catalase está presente em tripanossomatídeos monoxênicos e que o H_2O_2 é capaz de atuar como segundo mensageiro, indicam que a ausência de catalase em *T. cruzi* seja importante para que o parasito possa sinalizar melhor o estresse oxidativo.

Abstract

Trypanosoma cruzi, the causal agent of Chagas disease, is exposed to oxidative stress situations during its complex life cycle. To deal with these stresses, one of the strategies employed by this parasite for hydroperoxides detoxification is a peculiar trypanothione-dependent antioxidant system. However, *T. cruzi*'s antioxidant repertoire does not include catalase, an enzyme that decomposes H₂O₂ and is found in most aerobic organisms. In order to investigate the reason why *T. cruzi* does not have the catalase gene, a *T. cruzi* cell line which expresses this enzyme was generated. Parasites expressing catalase have an increased resistance to H₂O₂ in relation to wild type cells (WT). Moreover, pretreatment of parasites with a low concentration of H₂O₂ before treatment with higher concentrations makes the WT cells as resistant to H₂O₂ as cells expressing catalase. However, improvement in resistance to H₂O₂ after pretreatment was not observed with the same intensity in cells expressing catalase. Catalase expression in *T. cruzi* decreased the trypanothione reductase and increased superoxide dismutase levels, which resulted in higher levels of H₂O₂ after H₂O₂ treatment. More important, although the heterologous expression of catalase contributed to higher proliferation rates in the insect vector, expression of catalase does not induce a large increase in virulence of mice. These results, associated with the facts that catalase is present in monoxenous trypanosomatids and that H₂O₂ can act as second messenger, indicate that the absence of the catalase gene in *T. cruzi* was important in order to allow cells with a better capacity in sensing oxidative stress.



INTRODUÇÃO

Introdução

1.1 A Doença de Chagas

Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas, a tripanossomíase americana tem sido um problema desde a antiguidade e continua uma questão social e econômica relevante em muitos países latino-americanos. Dados epidemiológicos estimam que haja cerca de 10 milhões de pessoas vivendo com esta doença na América Latina e no Caribe, além de mais de 300.000 casos terem sido relatados na América do Norte recentemente. A tripanossomíase americana causa, aproximadamente, 14.000 mortes por ano, sendo que 80 milhões de pessoas vivem em condição de alto risco de infecção (HOTEZ *et al.*, 2012) (Figura 1).

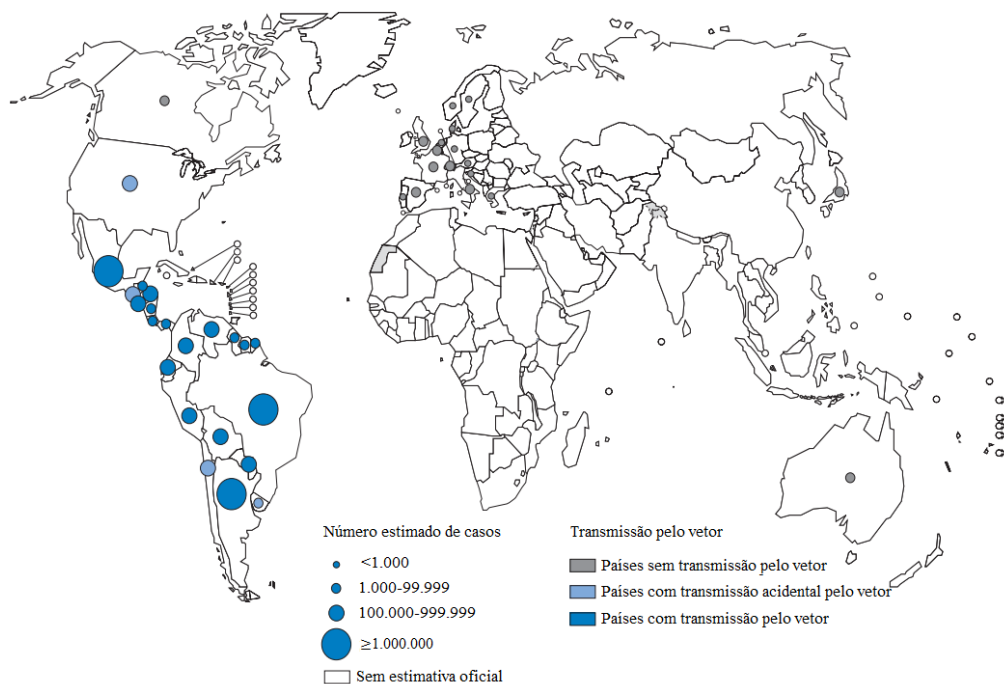


Figura 1: Distribuição dos casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* no mundo. Adaptado de Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010.

A tripanossomíase americana tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, descoberto pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1907 (**Figura 2A**). Tal descoberta ocorreu a partir da observação da presença deste parasito em insetos hematófagos que se escondiam nas paredes das habitações da cidade de Lassance, localizada no interior de Minas Gerais (**Figura 2B**). Posteriormente, Chagas verificou que o *T. cruzi* era capaz de infectar macacos e gatos, o que o levou a fazer exames sistemáticos no sangue dos moradores de Lassance em busca de contaminações por este parasito (KROPF; SÁ, 2009). Em 14 de Abril de 1909, Chagas encontrou o parasito no sangue de uma criança de dois anos de idade em estado febril, fazendo assim a descoberta da enfermidade que levaria o seu nome (CHAGAS, 1909).

A transmissão do *T. cruzi* para humanos ocorre, principalmente, por meio do contato com as fezes contaminadas dos hospedeiros invertebrados, popularmente conhecido como barbeiros. A infecção também pode ser congênita ou causada por transfusão de sangue contaminado, transplante de órgãos de doadores infectados, ingestão de alimentos e bebidas contaminados pelo parasito ou por exposição acidental, como acidentes de laboratório (BONNEY, 2014).

Clinicamente, a doença de Chagas possui duas fases distintas. No início, ocorre uma fase aguda, geralmente assintomática e caracterizada por alta parasitemia e sintomas brandos e inespecíficos, dificultando o reconhecimento. Neste momento, pode ocorrer um inchaço da pálpebra no lado da face próximo à picada do inseto, conhecido como sinal de Romana (**Figura 2C**). Entretanto, este sintoma não se manifesta na maioria dos indivíduos infectados. Neste momento, casos raros de inflamação do músculo cardíaco ou do cérebro podem levar à morte. Após as primeiras semanas da doença, a persistência da infecção leva à fase crônica. Nesta fase, 70 a 80% dos casos podem permanecer assintomáticos por toda a vida. Entretanto, em torno de 20 a 30% dos indivíduos

infectados podem apresentar manifestações cardíacas, digestivas ou ambas (BERN, 2011; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010) (**Figura 2D e 2E**).

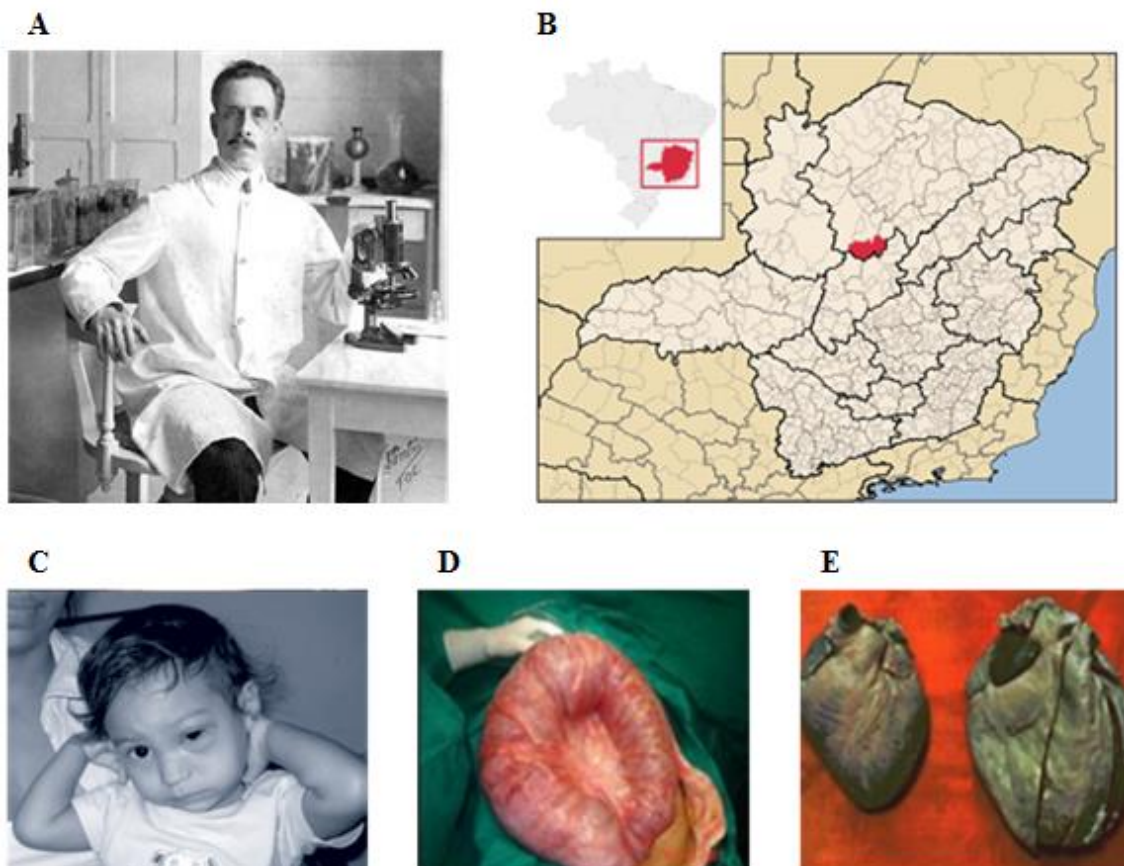


Figura 2: Descoberta e sintomas da doença de Chagas. (A) O médico brasileiro Carlos Chagas, responsável pela descoberta da tripanossomíase americana. (B) Mapa do estado de Minas Gerais, evidenciando a região da cidade de Lassance, onde a tripanossomíase americana foi descoberta. (C) Sinal de Romãnia em uma criança, o qual pode ser observado em alguns pacientes chagásicos durante a fase aguda. (D) Ocorrência de megacólon em um paciente chagásico durante a fase crônica. (E) Comparação entre o coração de um doente chagásico na fase crônica (maior) e o de uma pessoa normal (menor). Adaptado de Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010.

1.2 O *Trypanosoma cruzi* e suas peculiaridades

O *T. cruzi* é um protozoário parasito que pertence à família Tripanossomatidae, da qual também fazem parte o *Trypanosoma brucei* e espécies de *Leishmania*. Além de

sua relevância médica, estes parasitos têm atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa devido à presença de várias características biológicas interessantes.

Em 2005, o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* possibilitou o início de novos estudos em busca do tratamento da doença de Chagas, além da observação de diversos aspectos interessantes sobre a genética deste parasito. Foi verificado que CL Brener (TcVI), a cepa de *T. cruzi* utilizada como referência no projeto genoma, apresenta um genoma diploide cujo tamanho é estimado entre 106,4 e 110,7 megabases (Mb). Uma característica marcante deste genoma é a presença de cerca de 50% de sequências repetitivas, as quais correspondem às grandes famílias de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (DE FREITAS *et al.*, 2006; EL-SAYED *et al.*, 2005).

A organização da cromatina dos tripanossomatídeos difere em vários aspectos daquela observada nos eucariotos superiores. Nestes parasitos, os cromossomos não se condensam durante a divisão celular, dificultando o estudo por meio de técnicas convencionais de citogenética. Estudos mostraram que a histona H1 de *T. cruzi* difere em vários aspectos daquela encontrada em eucariotos superiores, o que possivelmente poderia impossibilitar a condensação dos cromossomos (ÅSLUND *et al.*, 1994; TORO; GALANTI, 1988).

Nos eucariotos superiores, a RNA polimerase II reconhece promotores específicos dos genes que codificam proteínas e os transcreve. Entretanto, não foram identificadas regiões com características de promotores específicos para a RNA Polimerase II em nenhum gene codificador de proteínas nos tripanossomatídeos (SIEGEL *et al.*, 2011; TEIXEIRA; DAROCHA, 2003).

Os tripanossomatídeos também apresentam várias características peculiares envolvendo os mecanismos de controle da expressão gênica. Diferente dos outros

eucariotos, cuja regulação gênica ocorre principalmente ao nível transcricional, a maior parte da regulação nestes parasitos ocorre ao nível pós-transcricional. Sendo assim, a regulação pode ocorrer durante o *trans-splicing*, a poliadenilação do pré-RNA mensageiro (pré-mRNA), a tradução ou a degradação do RNA mensageiro (mRNA) maduro (CLAYTON, 2002; TEIXEIRA; DAROCHA, 2003).

Os transcritos primários de *T. cruzi* são policistrônicos, entretanto, são clivados no núcleo para produzir mRNAs monocistrônicos. Este processo envolve dois eventos acoplados de processamento. Um destes eventos é o *trans-splicing*, anteriormente mencionado, que consiste na adição de uma sequência de 39 a 41 nucleotídeos, chamada *splice leader* (SL), na extremidade 5' de cada RNA que codifica proteína. Além disso, na região 3' do mRNA, ocorre a adição da cauda poli (A), processo denominado poliadenilação. Ambos os eventos são dependentes dos motivos ricos em polipirimidina (poli(Y)) contidos nas regiões intergênicas (CAMPOS *et al.*, 2008).

As regiões 3' e 5' não traduzidas (UTRs, do inglês *UnTranslated Regions*.) estão envolvidas nos mecanismos de regulação dos níveis de mRNA em *T. cruzi* (KRAMER; CARRINGTON, 2011). Por meio da interação com proteínas de ligação ao RNA (*RNA-binding proteins*, RBPs), elementos regulatórios presentes nestas regiões controlam a estabilidade e a tradução do mRNA alvo (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011).

Dentre as peculiaridades observadas no tripanossomatídeos, também está o fato de possuírem apenas uma mitocôndria, a qual apresenta uma forma tubular que se estende por toda a célula (PAULIN, 1975; SIMPSON, L. *et al.*, 1980). O kDNA, como é conhecido o DNA mitocondrial dos tripanossomatídeos, está concentrado em uma organela denominada cinetoplasto, da qual deriva o nome da ordem à qual estes parasitos pertencem: Kinetoplastida. A arquitetura do kDNA é formada por uma rede de minicírculos e maxicírculos. Os genes presentes nos maxicírculos, assim como os genes

do DNA mitocondrial de outros eucariotos, codificam RNAs ribossomais e proteínas da cadeia respiratória. Os genes localizados nos minicírculos codificam RNAs guias, os quais atuam na edição dos transcritos dos maxicírculos (SOUZA, 2009).

O RNA mitocondrial dos tripanossomatídeos é extensivamente editado, de forma que resíduos de uridina (U) sejam inseridos ou deletados em regiões codificadoras deste RNA para que a fase de leitura seja corrigida (SHAPIRO, 1993; SIMPSON *et al.*, 2000; SIMPSON *et al.*, 2004).

1.3 Diversidade genética em *T. cruzi*

A reprodução do *T. cruzi* ocorre, principalmente, de forma assexuada, por meio de fissão binária. Sendo a recombinação um evento raro, este parasito pode ser definido como uma espécie clonal. Entretanto, modelos mais recentes incorporam eventos de hibridização para explicar a estrutura das populações híbridas de *T. cruzi* (WESTENBERGER *et al.*, 2005).

O *T. cruzi* apresenta uma estrutura populacional bastante heterogênea, a qual tem sido relacionada à diversidade de sintomas dos pacientes com doença de Chagas (MACEDO *et al.*, 2004). A heterogeneidade populacional de *T. cruzi* consiste na existência de um grande número de cepas com características distintas relacionadas à morfologia, taxa de crescimento, parasitemia, virulência, patogenicidade, sensibilidade às drogas, perfil antigênico, metaciclogênese e tropismo tecidual (BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003).

O termo Unidade Discreta de Tipagem (*Discrete Typing Unit*, DTU) foi proposto para descrever conjuntos de unidades populacionais que são geneticamente mais semelhantes entre si do que com outras populações e que podem ser identificadas por

meio de marcadores moleculares (ZINGALES *et al.*, 2012). Inicialmente, estudos genéticos sugeriram a existência de duas principais linhagens em *T. cruzi*: TcI e TcII (MOMEN, 1999). Trabalhos posteriores, utilizando marcadores moleculares presentes no DNA mitocondrial e nuclear, indicaram a existência de uma terceira linhagem, denominada TcIII (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2003; DE FREITAS *et al.*, 2006; MACHADO; AYALA, 2001; ROBELLO *et al.*, 2000).

Na tentativa de unificar a nomenclatura do *T. cruzi*, foi definido que as linhagens do parasito seriam divididas em seis DTUs, designadas de TcI a TcVI. As DTUs TcI, TcII, TcIII e TcIV apresentam uma homozigosidade alélica substancial. Entretanto, TcV e TcVI exibem uma heterozigosidade pronunciada, tendo sido sugerido que sejam derivadas de eventos de hibridização de TcII e TcIII (DE FREITAS *et al.*, 2006; STURM; CAMPBELL, 2010; STURM *et al.*, 2003).

1.4 A busca pelo tratamento da Doença de Chagas

Embora descrita há mais de um século, a doença de Chagas ainda não possui vacina. Sendo assim, o controle e o tratamento da doença dependem dos quimioterápicos disponíveis. Os fármacos empregados no tratamento da doença de Chagas são dois nitroaromáticos heterocíclicos, o Nifurtimox (NFX) e o Benzonidazol (BZ). O NFX, um derivado 5-nitrofurano, começou a ser usado em 1967, comercializado pela Bayer com o nome Lampit[®]. O BZ, um derivado 2-nitroimidazólico, foi lançado pela Roche como Rochagan[®], em 1972, sendo atualmente fornecido pelo Ministério da Saúde no Brasil. Ambas as drogas não são consideradas ideais para o tratamento da doença, uma vez que possuem graves efeitos colaterais e não são eficazes na fase crônica da doença. Além

disso, cepas diferentes podem apresentar diferentes susceptibilidades aos fármacos (APT, 2010; COURA; DE CASTRO, 2002).

Compostos nitroheterocíclicos, como o BZ e NFX, são pró-drogas e, assim, necessitam ser ativados para mediar a atividade citotóxica. Estudos mostraram que NTRI, uma nitrorredutase dependente de NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*), atua na ativação da droga. Os autores sugerem que o mecanismo de resistência do *T. cruzi* ao BZ e NFX pode ocorrer pela redução nos níveis de NTRI nos parasitos resistentes, ao passo que a sua superexpressão pode resultar em parasitos mais sensíveis (WILKINSON *et al.*, 2008). Neste sentido, foi verificado que a deleção de cópias do gene que codifica outra nitrorredutase, denominada TcOYE (*Old Yellow Enzyme*, também chamada Prostaglandina Sintetase), está associada ao fenótipo de resistência do *T. cruzi* ao BZ (MURTA *et al.*, 2006).

Quanto ao mecanismo de atuação, BZ e NFX agem de formas distintas. Entretanto, sabe-se que ambas as drogas levam à produção de estresse oxidativo por meio da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos, os quais podem afetar proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos do parasito (APT, 2010; RAJÃO *et al.*, 2014). Diferente do NFX, o efeito tripanocida do BZ parece não depender da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A geração de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em concentrações capazes de inibir o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* não foi observada (MORENO *et al.*, 1982). Desta forma, é provável que os metabólitos reduzidos do BZ estejam envolvidos no efeito tripanocida por meio da ligação covalente a macromoléculas do parasito (DÍAZ DE TORANZO *et al.*, 1988; MAYA *et al.*, 2004).

Neste sentido, um estudo metabolômico mostrou que o BZ é extensivamente metabolizado em um número de moléculas no *T. cruzi*, as quais incluem produtos de redução e aductos covalentes com tióis de baixo peso molecular e outras pequenas

moléculas. Os autores sugerem que a ligação covalente do BZ com tais tióis, assim como com outros subtipos, seria a causa primária da toxicidade desta droga em *T. cruzi* (TROCHINE *et al.*, 2014). Além disso, um estudo recente do nosso grupo mostrou que o BZ oxida preferencialmente o *pool* de nucleotídeos e que a incorporação extensiva de nucleotídeos oxidados durante a replicação do DNA conduz a quebras duplas potencialmente letais no DNA do *T. cruzi* (RAJÃO *et al.*, 2014).

As linhagens de *T. cruzi* apresentam diferentes susceptibilidades ao BZ e ao NFX (FILARDI; BRENER, 1987; MURTA; ROMANHA, 1998). Uma abordagem proteômica mostrou um aumento na expressão de duas enzimas envolvidas no sistema antioxidante de algumas linhagens de *T. cruzi* resistentes ao BZ: triparedoxina peroxidase e ferro superóxido dismutase (Fe-SOD) (ANDRADE *et al.*, 2008). Outros estudos mostraram que a deleção da enzima ferro superóxido dismutase B1 (Fe-SOD B1) torna o *T. brucei* mais sensível ao NFX e ao BZ (PRATHALINGHAM *et al.*, 2007).

Atualmente, vários tipos de drogas estão sendo estudados visando combater o *T. cruzi*. Dentre elas, estão inibidores do metabolismo de tripanotiona, inibidores de cisteína protease, inibidores de fosfolipídeos, inibidores do metabolismo de pirofosfato, inibidores da síntese de purinas e inibidores de ergosterol (APT, 2010; COURA; DE CASTRO, 2002; MAYA *et al.*, 2010).

1.5 O ciclo de vida do *T. cruzi*

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, no qual formas com diferentes características biológicas alternam-se entre invertebrados (insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae) e vertebrados mamíferos. Dentre as formas que o parasito pode apresentar, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos são encontradas nos hospedeiros

vertebrados. Nos invertebrados, são observados epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Epimastigotas e amastigotas são replicativos e não infectantes, ao passo que tripomastigotas metacíclicos e sanguíneos são infectantes, mas não são capazes de proliferar (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010) (**Figura 3**).

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, formas tripomastigotas do *T. cruzi* podem ser ingeridas pelo triatomíneo. Neste momento, os triatomíneos podem ingerir 6 a 12 vezes o seu peso corporal original. O sangue ingerido é estocado praticamente não digerido em uma ampla porção denominada intestino médio anterior. O mesmo é conservado não coagulado por anticoagulantes produzidos nas glândulas salivares e intestino médio anterior, sendo passado em pequenas porções para a parte posterior do intestino médio, a região absorptiva do mesmo (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

Inicialmente, foi proposto que o desenvolvimento do *T. cruzi* no vetor tinha início no intestino médio anterior, onde a maior parte das tripomastigotas sanguíneas iria se diferenciar em epimastigotas (GARCIA *et al.*, 2010) (**Figura 4**). Entretanto, dados recentes indicam que os parasitos passam para a porção posterior do intestino médio nas primeiras 24 horas de infecção, sendo a diferenciação iniciada apenas nesta região (FERREIRA *et al.*, 2016).

Na porção posterior do intestino médio e reto, os epimastigotas se aderem à parede intestinal e se multiplicam por mitose. As formas epimastigotas sofrem metaciclogênese e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos na região do reto, podendo ser liberadas nas fezes dos hospedeiros invertebrados (GARCIA *et al.*, 2010).

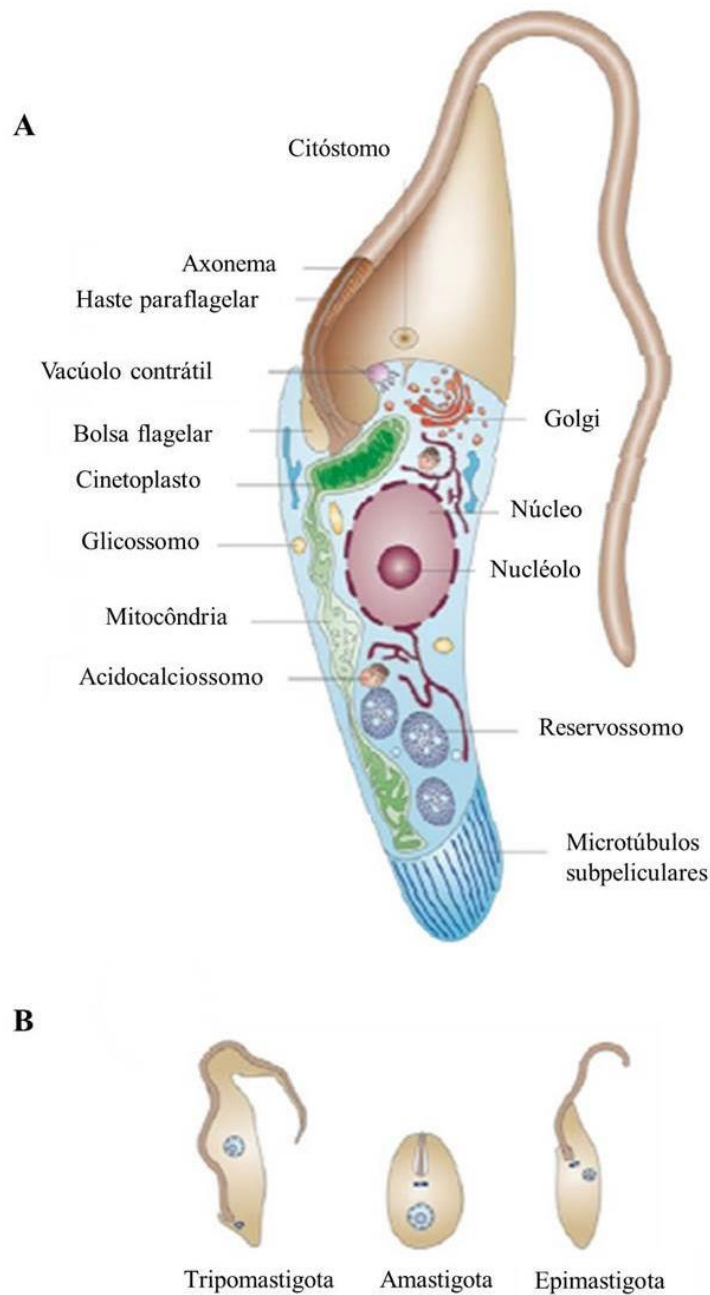


Figura 3: *T. cruzi* e suas principais formas ao longo do ciclo de vida. (A) Representação esquemática de uma seção longitudinal da forma epimastigota de *T. cruzi*. (B) As principais formas do parasito são definidas pelo seu formato, pela presença e adesão do flagelo e pela posição do corpo basal, do cinetoplasto e do núcleo. As formas epimastigota e tripomastigota metacíclica são encontradas no hospedeiro invertebrado, e as formas amastigota e tripomastigota, no vertebrado. Adaptado de DOCAMPO *et al.*, 2005.

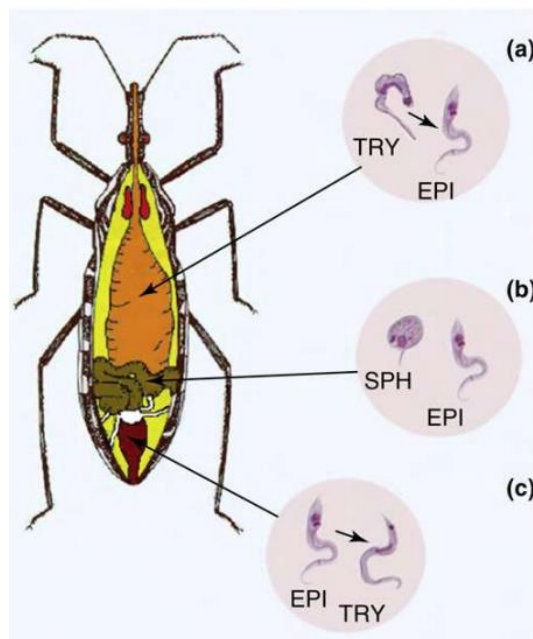


Figura 4: Desenvolvimento do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. As formas tripomastigotas (TRY) são ingeridas durante repasto sanguíneo e, no intestino médio anterior (a), se transformam em epimastigotas (EPI). No intestino médio posterior (b), os parasitos aderem a parede e se multiplicam. Algumas formas esferomastigotas podem ser encontradas (SPH). Nas paredes do reto (c), os epimastigotas se replicam intensamente e se transformam em tripomastigotas metacíclicas. Ambas as formas podem ser eliminadas na urina e fezes do inseto (GARCIA *et al.*, 2010).

Ao longo dos anos, vários trabalhos têm sugerido fatores que influenciam a metaciclogênese, tais como o tipo de linhagem ou clone (GARCIA; DVORAK, 1982; KRASSNER *et al.*, 1990), osmolaridade (ADROHER; LUPIAÑEZ; OSUNA, 1988; OSUNA; ADROHER; LUPIAÑEZ, 1990), pH inicial do meio (UCRÓS GUZMAN; GRANGER; KRASSNER, 1983), utilização de L-prolina como única fonte de carbono e estresse nutricional (CONTRERAS *et al.*, 1988; CONTRERAS *et al.*, 1985), o qual já foi associado à inibição do fator eucariótico de iniciação 2 α (eIF2 α) (TONELLI *et al.*, 2011).

No hospedeiro vertebrado, a infecção é iniciada no momento do repasto sanguíneo, quando as fezes do hospedeiro invertebrado contendo tripomastigotas metacíclicos

entram em contato com a mucosa dos olhos, nariz, boca ou pele lesionada, possibilitando que estas formas atinjam a corrente sanguínea. Diferente de outros agentes infecciosos que dependem de fagócitos profissionais para o sucesso da infecção, os tripomastigotas são capazes de invadir ativamente tanto células fagocíticas quanto células não fagocíticas. Os macrófagos residentes dos tecidos periféricos seriam o primeiro alvo do parasito no local da infecção inicial (MUÑOZ-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; FRESNO, 1992).

A entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira é um evento dependente da indução de uma sinalização intracelular desencadeada pelo parasito, a qual culmina com o recrutamento de lisossomos para a formação do vacúolo parasitóforo. O recrutamento e fusão de lisossomos levam à liberação de uma esfingomielinase ácida lisossomal que induz um processo de endocitose compensatória. Tal processo culmina na internalização do parasito em um vacúolo contendo uma membrana lisossomal e porções de membrana plasmática. O vacúolo endocítico em formação continua a adquirir membrana lisossomal até que todo o parasito seja envolvido por esta membrana (SIBLEY, 2011; EPTING; COATES; ENGMAN, 2010; FERNANDES *et al.*, 2011). A fusão lisossomal no ponto de adesão do parasito ou após a invaginação da membrana plasmática é um evento essencial para o processo de infecção celular, uma vez que funciona como âncora para a retenção do *T. cruzi* no meio intracelular (ANDRADE; ANDREWS, 2004).

O mecanismo de escape do vacúolo parasitóforo é dependente do lisossomo e seu pH ácido, sendo este considerado um ambiente favorável para a expressão e atuação de fatores do parasito importantes no processo de lise da membrana vacuolar (ANDREWS, 1994; ANDREWS *et al.*, 1990). Estudos mostram que o baixo pH encontrado no vacúolo parasitóforo é essencial para o desencadeamento do processo diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, formas capazes de se multiplicar por divisão binária (TOMLINSON *et al.*, 1995).

Após a diferenciação dos tripomastigotas em amastigotas, estas passam por um período de quiescência e, em seguida, retornam ao ciclo celular e passam por novas rodadas de replicação antes de se diferenciarem novamente em tripomastigotas sanguíneos e serem capazes de romper as células e iniciarem um novo ciclo de infecção celular (ANDRADE; ANDREWS, 2005). O ciclo de vida do *T. cruzi* continua quando o hospedeiro invertebrado ingere tripomastigotas sanguíneos durante o repasto sanguíneo (Figura 5).

1.6 *T. cruzi* e o estresse oxidativo

O estresse oxidativo é comumente definido como a situação em que o balanço entre oxidantes e antioxidantes é perdido. Sendo a maioria dos protozoários parasitos constituída por organismos aeróbios, a principal fonte de estresse oxidativo à qual estão expostos são os subprodutos da redução parcial do O₂, denominados espécies reativas de oxigênio (EROs). Nestes organismos, as EROs podem ser produzidas pelo próprio metabolismo, sendo a mitocôndria a sua principal fonte (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014), ou por agentes externos, como o sistema imune do hospedeiro e o metabolismo de drogas (IRIGOÍN *et al.*, 2008; TURRENS, 2003; WINTERBOURN, 2008).

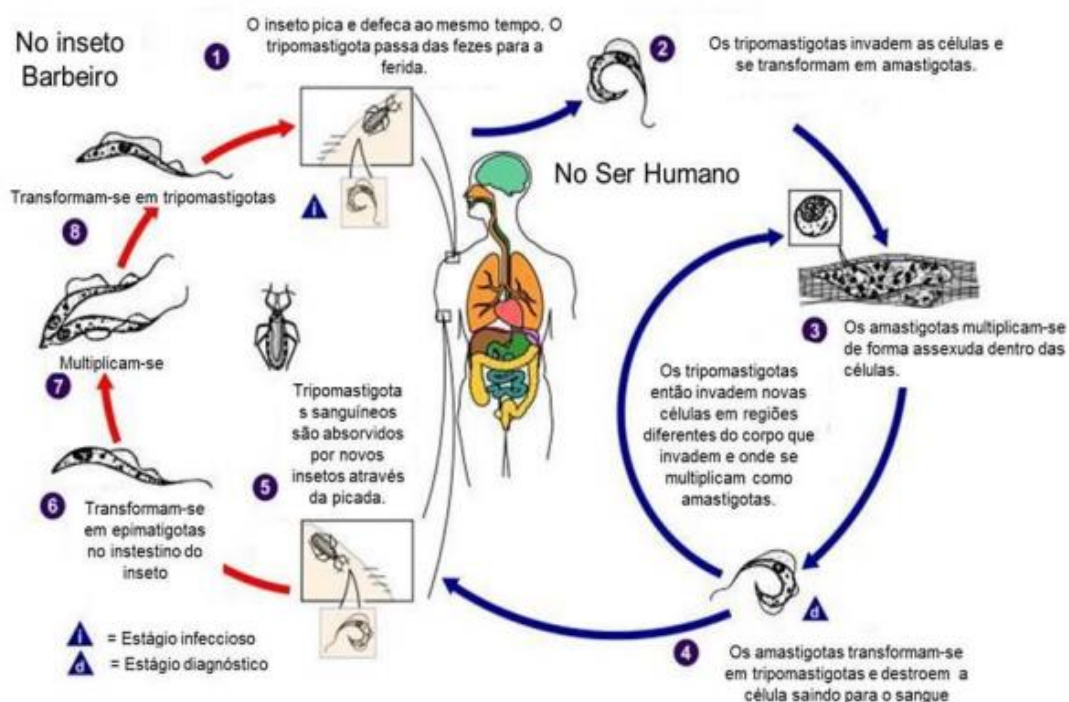


Figura 5: Ciclo de vida do *T. cruzi*. (1) Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor libera os tripomastigotas metacíclicos por meio das fezes no local próximo à picada. (2) No hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células próximas ao local de inoculação e se diferenciam em amastigotas. (3) Os amastigotas se diferenciam por fissão binária, (4) se diferenciam e são liberados na corrente sanguínea como tripomastigotas sanguíneos. (5) Os tripomastigotas infectam células de vários tecidos e se diferenciam em amastigotas em um novo sítio de infecção. (6) Dando continuidade ao ciclo, os tripomastigotas sanguíneos são ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo e se diferenciam em epimastigotas no seu intestino. (7) Os epimastigotas se multiplicam, (8) se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos e o ciclo se reinicia. Adaptado do CDC (do inglês *Center for Disease Control and Prevention* – www.dpd.cdc.gov/dpdx).

As EROs de maior relevância fisiológica são o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 e o radical hidroxila ($\cdot OH$). $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$ são classificados como radicais livres verdadeiros, pois apresentam elétrons não pareados na camada de valência. Estas moléculas são altamente reativas e podem sofrer reações redox interagindo com moléculas ao redor para retornarem a uma condição mais estável. O H_2O_2 , por sua vez, é definido como um agente pró-oxidante não-radical. Apesar de sua baixa reatividade, possui um papel importante na geração de dano oxidativo, uma vez que é capaz de se difundir através de membranas biológicas e

gerar o radical $\cdot\text{OH}$ por meio das reações de Haber-Weiss (participação do $\text{O}_2^{\cdot-}$) ou Fenton (catalisada por Fe^{2+}). O $\cdot\text{OH}$ não se difunde do local gerado e, embora apresente meia-vida curta (10^{-9} s), pode causar vários danos a biomoléculas ao seu redor, como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos (NOVO; PAROLA, 2008; WINTERBOURN, 2008).

No hospedeiro vertebrado, os macrófagos residentes estão entre as primeiras células a serem invadidas pelo *T. cruzi* e, para que a infecção seja estabelecida, o parasito precisa lidar com o ataque destas células. Os macrófagos respondem à invasão do parasito com a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela NADPH oxidase (NADPHox, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), podendo resultar na formação de H_2O_2 . Se ocorrer a ativação do macrófago por citocinas pró-inflamatórias, todo o poder oxidante citotóxico dos macrófagos será liberado, culminando com a morte do parasito (KIERSZENBAUM; KNECHT; BUDZKO, 1974; MUÑOZ-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; FRESNO, 1992).

Além do ataque dos macrófagos, estudos mostram que o *T. cruzi* também pode ser exposto ao estresse oxidativo gerado pelos cardiomiócitos infectados. Verificou-se que, durante o processo de invasão e replicação do *T. cruzi* em cardiomiócitos de ratos adultos, ocorre um aumento substancial de EROs no citoplasma das células infectadas. Tal aumento seria provocado por uma série de eventos celulares, os quais causariam um distúrbio no potencial de membrana mitocondrial, comprometendo a atividade dos complexos respiratórios e culminando com a formação de espécies reativas (GUPTA; WEN; GARG, 2009).

O sangue ingerido pelo hospedeiro invertebrado durante o repasto também constitui uma fonte de estresse oxidativo durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. O sangue contém altas concentrações de hemoglobina, cuja degradação resulta na liberação de altas concentrações de heme (GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2006). O heme, composto por um átomo

de ferro contido no centro de um largo anel orgânico heterocíclico, denominado porfirina, pode gerar EROs por meio da reação do tipo Fenton e promover a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (AFT; MUELLER, 1983; GUTTERIDGE; SMITH, 1988). O estresse oxidativo também está presente no intestino do inseto na forma de intermediários de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), os quais podem ser produzidos pelo mesmo em resposta à invasão pelo parasito (WHITTEN *et al.*, 2007).

Para lidar com o estresse oxidativo, o *T. cruzi* apresenta uma série de defesas bioquímicas. Por um lado, enzimas do sistema antioxidante são capazes de converter as espécies reativas em moléculas mais estáveis e menos prejudiciais. Por outro, este parasito também possui um eficiente sistema de reparo de DNA para conter os danos provocados pelas espécies reativas que não foram neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante.

1.7 *T. cruzi* e a resposta ao dano oxidativo no DNA

A oxidação, no que diz respeito à modificação de bases, representa o principal fator endógeno de danos ao DNA. Estima-se que 10.000 bases sejam oxidadas por dia por célula de mamífero. Mais de cem tipos diferentes de modificações causadas por EROs no DNA já foram identificadas, incluindo lesões de bases, sítios AP (apurínicos ou apirimidínicos), lesões de desoxirribose, quebras de fita simples, quebras de fita dupla e *crosslinks*. Destas, muitas apresentam propriedades citotóxicas e/ou mutagênicas (CADET *et al.*, 1997).

O reparo por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*) é a principal via de reparo de DNA para o processamento de lesões que modificam bases individuais, mas não causam grandes modificações na estrutura da dupla hélice. Estas modificações

seriam resultantes de processos de oxidação, alquilação e desaminação de bases, sendo a oxidação o principal fator endógeno de danos ao DNA (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016; ROBERTSON *et al.*, 2009).

A via do BER pode ser resumida nos seguintes passos: reconhecimento e remoção da base modificada ou mal pareada, excisão do AP, preenchimento do *gap* de DNA e religamento da fita reparada. O passo de reconhecimento e remoção da base danificada é catalisado por uma DNA glicosilase, a qual deve ser específica para a base modificada a ser reparada. O sítio AP gerado pela DNA glicosilase pode ser processado de duas maneiras diferentes: no caso do envolvimento de uma DNA glicosilase bifuncional, a atividade 3' AP liase intrínseca da enzima cliva o esqueleto de DNA a 3' do sítio AP. Se a DNA glicosilase for monofuncional, uma enzima AP endonuclease catalisa a incisão da fita lesionada, deixando um terminal 3'-OH e um grupo desoxirribose-fosfato (5'-dRP) na outra extremidade (BAUTE; DEPICKER, 2008).

A extremidade não convencional criada em ambos os casos precisa ser processada para formar uma extremidade 3'OH convencional e permitir a posterior síntese de DNA por uma DNA polimerase. A extremidade 3' criada por glicosilases bifuncionais é removida pela atividade diesterase 3' de AP endonucleases (IZUMI *et al.*, 2000) e a extremidade 5'-dRP, gerada pela AP endonuclease após a ação de glicosilases monofuncionais, é removida pela atividade 5'dRPase da DNA polimerase beta (Pol β) (MATSUMOTO; KIM, 1995).

Após o processamento da extremidade 3' não convencional, a via pode seguir com o preenchimento do *gap* e religamento por meio de duas diferentes formas: a via curta (*short-patch* BER), mecanismo mais comum, onde apenas um nucleotídeo é substituído, ou a via longa (*long-patch* BER), quando 2 a 13 nucleotídeos são substituídos. A via

curta, coordenada pela XRCC1, consiste na incorporação de nucleotídeos no DNA pela Pol β e ligação pela Ligase 3 (LIG3) (KUBOTA *et al.*, 1996).

Na via longa, foi relatado que a Pol β também incorpora o primeiro nucleotídeo (PODLUTSKY *et al.*, 2001), mas o alongamento e deslocamento da fita são catalisados pelas polimerases delta (Pol δ) ou épsilon (Pol ϵ) (FROSINA *et al.*, 1996). Tal processo cria um fragmento deslocado de 2 a 13 bases da fita anterior (denominado *flap*). A estrutura *flap* criada precisa ser removida pela enzima endonuclease FEN1 (do inglês *Flap structure-specific endonuclease 1*) para o posterior ligamento da fita recém-sintetizada pela ligase 1 (LIG1) (KIM; BIADE; MATSUMOTO, 1998). A via longa do BER também tem o envolvimento das proteínas PCNA (do inglês *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que interage e coordena as DNA polimerases e FEN1 (GARY *et al.*, 1999), além de PARP (do inglês *poly ADP-ribose polimerase*), que reconhece lesões no DNA, se liga a elas e estimula o deslocamento da fita, sintetizando PAR (do inglês *poly ADP-ribose*) e facilitando o acesso da maquinaria de reparo ao local (D'AMOURS *et al.*, 1999).

Os principais componentes do BER foram identificados no genoma do *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005; PASSOS-SILVA *et al.*, 2010). Dentre aqueles já caracterizados, estão a uracil-DNA glicosilase (FÁREZ-VIDAL *et al.*, 2001), a 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (FURTADO *et al.*, 2012) e a AP endonuclease 1 (PÉREZ *et al.*, 1999). A TcPol β também foi caracterizada e localizada na mitocôndria do parasito (LOPES *et al.*, 2008).

Dentre os quase 50 tipos identificados de lesões de base causadas por estresse oxidativo, a lesão 8-oxoG (8-oxoguanina ou 7,8-dihidro-8-oxoguanina) é uma das mais abundantes e melhor caracterizadas (DIZDAROGLU *et al.*, 2002). A 8-oxoG é formada em altas quantidades pela reação de diferentes moléculas oxidantes, principalmente o

radical $\cdot\text{OH}$, com o DNA (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991). Esta base oxidada apresenta propriedades mutagênicas devido à capacidade de realizar pareamento com a adenina durante a replicação, podendo resultar no aumento da frequência de transversões GC→TA (WOOD *et al.*, 1992).

Em bactérias, a via de reparo a 8-oxoG (também conhecida como Sistema GO) é composta pelas enzimas MutM (também conhecida como Fpg), MutY e MutT, as quais correspondem às enzimas 8-oxoguanina glicosilase (OGG1), MUTYH e MTH1 (BARNES; LINDAHL, 2004; DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007; MICHAELS; MILLER, 1992). A enzima MutM de bactérias, ou OGG1 em eucariotos, é uma DNA glicosilase bifuncional que reconhece e remove especificamente a lesão 8-oxoG quando pareada com citosina (C). Após a remoção da base oxidada, o sítio AP formado será processado por outras enzimas da via do BER e o par G:C será reestabelecido (BOITEUX; O'CONNOR; LAVAL, 1987; VAN DER KEMP *et al.*, 1996).

No entanto, se a remoção da 8-oxoG pela MutM (OGG1) não ocorrer e a replicação acontecer, um par incorreto 8-oxoG:A poderá ser formado, considerando que DNA polimerases replicativas incorporam adenina preferencialmente à 8-oxoG (HSU *et al.*, 2004). Se isto ocorrer, a glicosilase MutY (MUTYH) poderá reconhecer o par 8-oxoG:A e remover a adenina pareada erroneamente (MICHAELS *et al.*, 1990). O processamento subsequente do sítio apurínico por outras enzimas de reparo de DNA poderá criar um par 8-oxoG:C, o que possibilitará uma nova oportunidade para a retirada de 8-oxoG por MutM (OGG1) (SHIBUTANI; TAKESHITA; GROLLMAN, 1991). Neste sistema, a enzima MutT (MTH1) atua na hidrólise de 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP no *pool* de nucleotídeos, impedindo sua incorporação no DNA pelas DNA polimerases (MAKI; SEKIGUCHI, 1992; NAKABEPPU *et al.*, 2006; SAKUMI *et al.*, 1993).

Recentemente, nosso grupo mostrou que a expressão heteróloga de MutT em *T. cruzi* aumenta a resistência do parasito ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂. Além disso, foi observado que os parasitos recombinantes exibiram um aumento significativo na proliferação em fibroblastos e macrófagos em relação aos selvagens. Neste estudo, também foi verificado que há um aumento na parasitemia de camundongos infectados com parasitos que expressam MutT e que a expressão heteróloga desta enzima influencia os níveis de importantes enzimas antioxidantes do parasito. Adicionalmente, foi mostrado que a superexpressão de MTH, homólogo de MutT em *T. cruzi*, torna o parasito mais resistente ao estresse oxidativo causado por H₂O₂ (AGUIAR *et al.*, 2013).

1.8 O sistema antioxidante do *T. cruzi*

O sistema antioxidante do *T. cruzi* é formado por uma rede de enzimas e moléculas não enzimáticas com atividade de oxirredução distribuídas no retículo endoplasmático, glicossomos, mitocôndria e citosol. Neste sofisticado sistema de vias interligadas, equivalentes redutores do NADPH, derivados principalmente da via pentose fosfato, são transferidos para diversas peroxidases através da tripanotiona [T(SH)₂; N1,N8-bisglutathionilspemidina] e da triparedoxina (TXN) ou glutathiona (GSH). Cinco peroxidases distintas já foram identificadas em *T. cruzi*: duas glutathiona peroxidases, uma heme-peroxidase dependente de ascorbato e duas triparedoxina peroxidases (mitocondrial e citosólica). Além destas peroxidases, o sistema de defesa antioxidante do *T. cruzi* apresenta quatro enzimas ferro superóxido dismutases (Fe-SOD A, Fe-SOD B1, Fe-SOD B2 e Fe-SOD C) (PIACENZA; PELUFFO; ALVAREZ; MARTÍNEZ; *et al.*, 2012) (**Figura 6**).

A T(SH)₂, um ditiol de baixo peso molecular, foi descoberta em 1985 em vários tripanossomatídeos (FAIRLAMB; CERAMI, 1985). Esta molécula é sintetizada em duas etapas sequenciais, quando duas moléculas de GSH são covalentemente ligadas ao terminal NH₂ de uma molécula de espermidina pela enzima tripanotiona sintetase (TS) (OZA *et al.*, 2002). Sendo a T(SH)₂ exclusiva de tripanossomatídeos, uma série de trabalhos têm visado criar drogas que atuem no metabolismo das enzimas envolvidas na síntese de tripanotiona como alvo terapêutico (FLOHÉ, 2012; GONZÁLEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2015; KUMAR; ALI; BAWA, 2014).

As defesas antioxidantes dos tripanossomatídeos também incluem a enzima tripanotiona redutase (TR). A TR mantém o ambiente intracelular redutor pela reciclagem da tripanotiona dissulfídica [T(S)₂] em sua forma ditiol T(SH)₂ (SULLIVAN; SHAMES; WALSH, 1989). Por manter um alto nível de T(SH)₂ intracelular, a função redox da TR faz parte da linha primária de defesa dos tripanossomatídeos contra o ambiente oxidativo do hospedeiro (KUMAR; ALI; BAWA, 2014). Dada sua importância no sistema de defesa antioxidante do *T. cruzi*, várias moléculas têm sido exploradas como inibidoras desta enzima (BONNET *et al.*, 2000; CHIBALE; MUSONDA, 2003; HAMILTON *et al.*, 2003; PONASIK *et al.*, 1995).

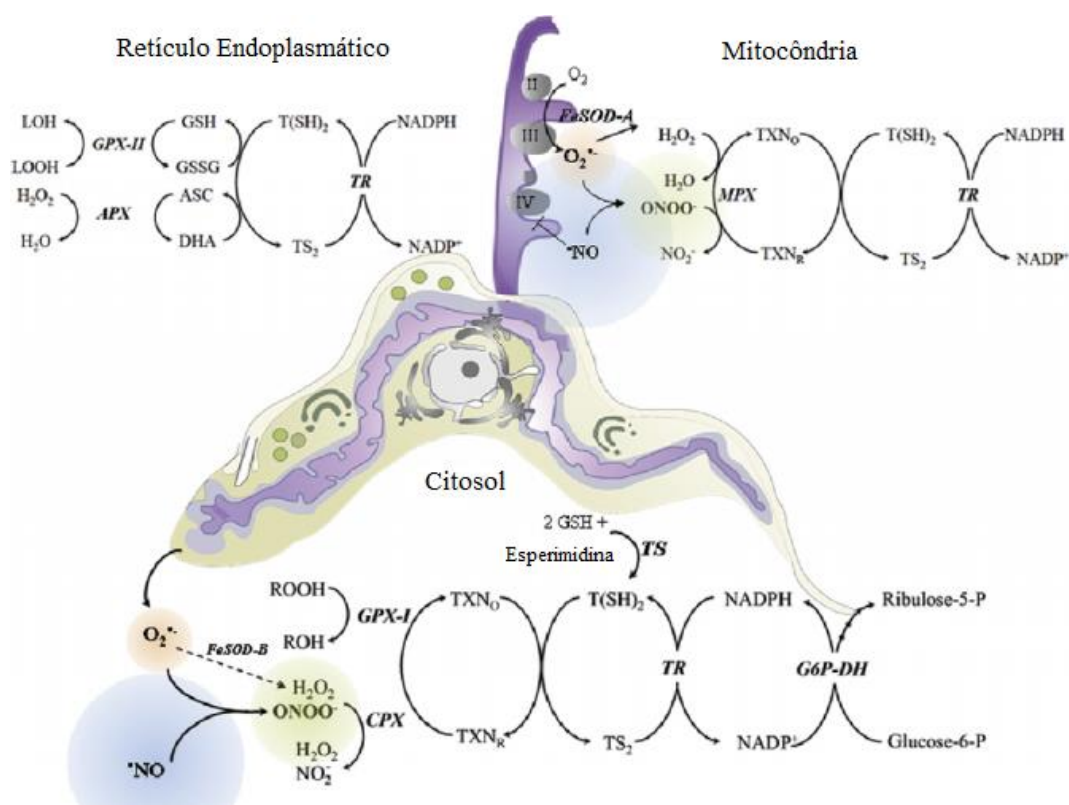


Figura 6: Sistema antioxidante do *T. cruzi*. A rede antioxidante de *T. cruzi* é formada por diversas enzimas distribuídas no retículo endoplasmático, glicossomos, mitocôndria e citoplasma. O doador final de elétrons para todos os sistemas enzimáticos é o NADPH e seus redutores equivalentes são transferidos através da tripanotona [T(SH)₂], glutathiona (GSH), ascorbato (ASC) e triparedoxina (TXN). **Retículo endoplasmático:** O H₂O₂ é metabolizado por uma hemo-peroxidase dependente de ASC (APX), que utiliza o ASC como doador final de elétrons. O dehidroascorbato (DHA) resultante é reduzido pela T(SH)₂. Na presença de metais de transição, o H₂O₂ pode iniciar reações de lipoperoxidação, resultando na formação de hidroperóxidos orgânicos (LOOH). Os LOOH são substratos da peroxidase dependente de glutathiona II (GPX-II) que utiliza a GSH. A T(SH)₂ é responsável pela redução da glutathiona oxidada (GSSG) para GSH, enquanto que a tripanotona redutase (TR) é responsável pela redução da tripanotona oxidada (TS₂). **Mitocôndria:** A cadeia transportadora de elétrons é o principal local de formação de superóxido (O₂^{•-}), principalmente através do Complexo III. A superóxido dismutase mitocondrial (Fe-SOD A) catalisa a dismutação do O₂^{•-} em H₂O₂. Uma vez na mitocôndria, o óxido nítrico (NO) pode inibir a respiração mitocondrial no Complexo IV, induzindo um aumento na formação de O₂^{•-} pelo Complexo III. O NO compete com a Fe-SOD A pelo O₂^{•-} para formar peroxinitrito (ONOO⁻). A peroxirredoxina mitocondrial (MPX) decompõe o H₂O₂ e o ONOO⁻ – utilizando a TXN reduzida (TXN_R) como substrato redutor. **Citoplasma:** As enzimas antioxidantes no citoplasma são: peroxirredoxina citosólica (CPX), Fe-SOD B, e GPX-I. A T(SH)₂ é sintetizada a partir de duas moléculas de GSH e uma espermidina em uma reação catalisada pela enzima

tripanotiona sintetase (TS). A via das pentoses fosfato (PPP) é responsável pelo fornecimento dos equivalentes redutores do NADPH (adaptado de PIACENZA; ALVAREZ; *et al.*, 2009).

Na mitocôndria dos tripanossomatídeos, a cadeia de transporte de elétrons é o principal sítio de formação de $O_2^{\bullet-}$. Nesta organela, as enzimas Fe-SOD A e Fe-SOD C atuam na conversão de $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 . Além destas, os tripanossomatídeos possuem as isoformas Fe-SOD B1, localizada principalmente no citoplasma, e Fe-SOD B2, no glicossomo. Nos hospedeiros mamíferos, as SODs têm como cofatores o cobre, o zinco ou o manganês. Nos tripanossomatídeos, estas enzimas apresentam o ferro como cofator (DUFERNEZ *et al.*, 2006).

Estudos demonstraram um aumento no nível de expressão de Fe-SOD A em uma população de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) em relação ao seu par sensível (NOGUEIRA *et al.*, 2006). Além disso, a superexpressão de Fe-SOD A protege o *T. cruzi* da morte celular programada induzida por soro humano fresco, indicando a participação do $O_2^{\bullet-}$ neste processo (PIACENZA *et al.*, 2007).

A mitocôndria dos tripanossomatídeos também possui a enzima triparedoxina peroxidase (mTXNPx), cuja função é detoxificar H_2O_2 , peroxinitrito e hidroperóxidos de cadeia curta. O gene mTXNPx, presente em cópia única no genoma, possui uma região codificante de 681 pb, a qual é traduzida em um peptídeo de, aproximadamente, 25 kDa. Além desta isoforma, os tripanossomatídeos possuem a triparedoxina peroxidásica citosólica (cTXNPx). A caracterização do gene da cTXNPx em *T. cruzi* mostrou uma região codificante de 600 pb, cujo produto apresenta cerca de 20 kDa (WILKINSON *et al.*, 2000). Recentemente, foi demonstrado que a mTXNPx está localizada também no citosol, permitindo que esta enzima utilize a via dependente de tripanotiona para exercer sua função. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual esta enzima atua na mitocôndria ainda está sendo discutido (PELOSO *et al.*, 2016).

As enzimas cTXNPx e mTXNPx apresentam domínios que tem em comum o subgrupo 2-Cys, o qual está presente em enzimas antioxidantes da Família de Peroxirredoxinas e é responsável pela atividade de peroxidase. Estas peroxirredoxinas diferem daquelas presentes nos mamíferos porque são dependentes de T(SH)₂ (PIÑEYRO *et al.*, 2005). Estudos mostraram que, em oposição aos outros tripanossomatídeos estudados, cTXNPx e mTXNPx estão presentes em baixas concentrações em *T. cruzi* (PIÑEYRO *et al.*, 2008).

De forma interessante, os níveis de mRNA de cTXNPx e mTXNPx em populações de *T. cruzi* que apresentam resistência induzida *in vitro* ao BZ (17LER) são aumentados duas vezes em relação ao seu par sensível (17WTS) (NOGUEIRA *et al.*, 2009). Além disso, estudos envolvendo a superexpressão de cTXNPx e mTXNPx em epimastigotas de *T. cruzi* mostraram um aumento na proteção ao peroxinitrito. Entretanto, este efeito é perdido quando o resíduo de cisteína no sítio catalítico é mutado (PIACENZA *et al.*, 2008). Outro trabalho demonstrou que a superexpressão de cTXNPx em *T. cruzi* aumenta a infecção em macrófagos e camundongos (IRIGOÍN *et al.*, 2008).

No retículo endoplasmático dos tripanossomatídeos, o H₂O₂ é metabolizado pela hemoperoxidase dependente de ascorbato (APX), a qual utiliza ascorbato como doador de elétrons. O dehidroascorbato formado é reduzido diretamente pela T(SH)₂. O gene TcAPX apresenta uma única cópia no genoma do parasito e seu transcrito possui 1,9 kb em epimastigotas. Testes de especificidade mostraram que a atividade desta enzima foi restrita ao H₂O₂ (WILKINSON *et al.*, 2002a).

Estudos demonstraram que há um aumento na expressão de TcAPX em populações de *T. cruzi* resistentes ao BZ, os quais também apresentaram maior tolerância ao H₂O₂ (NOGUEIRA *et al.*, 2012). Sendo a APX ausente no hospedeiro humano, esta

enzima deve ser considerada um alvo potencial para a quimioterapia contra a doença de Chagas (TURRENS, 2004; WILKINSON *et al.*, 2002a).

Na presença de metais com atividade de oxirredução, o H_2O_2 pode passar pelo processo de lipoperoxidação e gerar peróxidos inorgânicos, os quais são substratos para a glutathiona peroxidase. No genoma do *T. cruzi*, foram identificados quatro genes que codificam enzimas do tipo glutathiona peroxidase (GPx). Dois destes genes codificam a glutathiona peroxidase I (TcGPxI), localizada no citosol e em glicossomos (WILKINSON *et al.*, 2002b). Os outros dois genes codificam a glutathiona peroxidase II (TcGPxII), presente no retículo endoplasmático (WILKINSON *et al.*, 2002c). As glutathionas de mamíferos são dependentes de selênio, entretanto, nos tripanossomatídeos, estas enzimas dependem de cisteína. A glutathiona oxidada é reduzida pela $T(SH)_2$ (PIACENZA *et al.*, 2012).

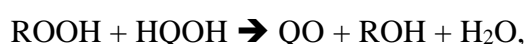
É interessante ressaltar que a transformação do *T. cruzi* da forma epimastigota para a tripomastigota é acompanhada pelo aumento da expressão das enzimas Fe-SOD, mTXNPx, cTXNPx, APX, e TS. Tal fato pode ser interpretado como uma pré-adaptação do parasito para sobreviver aos altos níveis de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) produzidos pelo sistema imune do hospedeiro mamífero (ATWOOD *et al.*, 2005; IRIGOÍN *et al.*, 2008; PIACENZA; ZAGO; *et al.*, 2009).

Embora o sistema antioxidante do *T. cruzi* possua as enzimas TXNPx e APX, capazes de metabolizar H_2O_2 , estes parasitos são desprovidos de glutathiona peroxidase dependente de selênio e catalase, as quais são capazes de dismutar rapidamente altos níveis destas moléculas (EL-SAYED *et al.*, 2005; FLOHÉ *et al.*, 1999).

1.9 *T. cruzi* e a ausência de catalase

A catalase ou hidropoxidase (EC 1.11.1.6), uma das mais eficientes enzimas conhecidas, faz parte do sistema de defesa antioxidante da maioria dos organismos aeróbios. A evolução desta enzima provavelmente ocorreu quando o planeta Terra passou a ter uma atmosfera oxigenada e os organismos necessitaram neutralizar os subprodutos tóxicos do O₂ (BRAVO *et al.*, 1995). A primeira descrição desta enzima ocorreu em 1900, durante um estudo envolvendo folhas de tabaco, quando a capacidade de metabolizar H₂O₂ foi associada a uma enzima específica, a qual foi denominada catalase (LOEW, 1900).

A reação geral catalisada pela catalase pode ser definida por:



onde o R é um hidrogênio ou um grupo alquil ou acil e HQOH é um doador de dois elétrons. Inicialmente nesta reação, ocorre a oxidação da enzima por um peróxido (ROOH). Após, ocorre a oxidação do substrato HQOH para recuperar a enzima livre. A oxidação do substrato é classificada como catalítica, quando Q é um O₂, e peroxidásica, quando Q é outro componente (BRAVO *et al.*, 1995).

Apesar de sua ampla distribuição na natureza, vários eucariotos não possuem um homólogo identificável do gene da catalase em seu genoma. A ausência desta enzima foi observada em espécies que habitam ambientes anóxicos e com pouca exposição ao estresse oxidativo, tais como aquelas pertencentes aos gêneros *Giardia*, *Trichomonas*, *Entamoeba* e *Cryptosporidium* (MEHLOTRA, 1996). Inesperadamente, a mesma está ausente em eucariotos fotossintéticos que possuem plastídios secundários, incluindo Euglenoidea, Chlorarachnea, Haptophyta, Cryptophyta e alguns Stramenopiles (KRAEVA *et al.*, 2016).

Outro padrão marcante na distribuição de catalase na natureza é que a mesma foi especificamente perdida em algumas linhagens parasitárias do sangue de vertebrados. Entretanto, os parasitos do filo Apicomplexa representam um exemplo conspícuo. Dentre aquelas espécies que tiveram o genoma sequenciado, dois representantes da subclasse Gregarinasina e sete da subclasse Coccidiasina possuem o gene da catalase. Entretanto, este gene está ausente no genoma dos hematozoos dos gêneros *Theileria*, *Babesia* e *Plasmodium*. Além disso, a catalase está presente em cinco espécies de platelmintos de vida livre, mas ausente em espécies de *Schistosoma* (KRAEVA *et al.*, 2016).

Ainda sobre a distribuição de catalase na natureza, os parasitas da família Trypanosomatidae merecem uma atenção especial. Em adição ao sistema de defesa antioxidante baseado em T(SH)₂, vários tripanossomatídeos adquiriram uma catalase similar à de bactérias. A presença da atividade desta enzima foi inicialmente reportada em vários representantes monoxênicos, ou seja, que parasitam apenas um hospedeiro, no caso, invertebrado. Dentre eles estão espécies das subfamílias Leishmaniinae (*Crithidia fasciculata* e *C. luciliae*) e Strigomonadinae (*Strigomonas oncopelti* and *S. culicis*) (WERTLIEB; GUTTMAN, 1963). Diferente de outros eucariotos, nos quais a catalase é predominantemente peroxissomal, nos tripanossomatídeos em que está presente esta enzima é citoplasmática (EDWARDS; LLOYD, 1977; SOUTO-PADRON; DE SOUZA, 1982). Entretanto, sobre os genomas já sequenciados de tripanossomatídeos heteroxênicos, ou seja, que parasitam diferentes hospedeiros, os mesmos não possuem nenhuma sequência similar à do gene da catalase. É o caso dos parasitos *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005), *T. brucei* (BERRIMAN *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (IVENS *et al.*, 2005).

A bactéria *Escherichia coli* possui duas catalases bem caracterizadas, denominadas hidroperoxidase I (HPI) e hidroperoxidase II (HP II). HPI é uma catalase-

peroxidase que contém dois grupos protoheme IX em um tetrâmero formado por subunidades idênticas (CLAIBORNE; FRIDOVICH, 1979). HPII é uma catalase monofuncional que possui um elevado Km para o H₂O₂ e um isômero *cis*-heme *d* por subunidade em uma estrutura aparentemente hexamérica (LOEWEN; SWITALA, 1986).

O gene que codifica HPI, *katG*, foi identificado pela primeira vez em 1983, sendo posteriormente caracterizado e sequenciado (TRIGGS-RAINE; LOEWEN, 1987; TRIGGS-RAINE *et al.*, 1988). Subsequentemente, foi verificado que o gene *katE* codifica HPII, cuja sequência é muito semelhante à dos genes que codificam outras catalases que contêm heme (TRIGGS-RAINE *et al.*, 1988; VON OSSOWSKI; HAUSNER; LOEWEN, 1993; VON OSSOWSKI *et al.*, 1991).

A expressão de *katE* é controlada pelo regulon σ^s , codificado pelo gene *rpoS*, o qual também controla um grande número de genes de resposta a diversos tipos de situações de estresse (LOEWEN *et al.*, 1998). Estudos mostraram que a síntese de HPII não responde ao nível de H₂O₂ e se mantém baixa durante toda a fase exponencial. Entretanto, a síntese desta enzima aumenta de seis a nove vezes quando ocorre a transição para a fase estacionária (LOEWEN; SWITALA; TRIGGS-RAINE, 1985; VON OSSOWSKI; HAUSNER; LOEWEN, 1993).

1.10 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e sinalização de estresse oxidativo

Uma das primeiras características reconhecidas e relacionadas ao H₂O₂ foi a geração de estresse oxidativo. Apesar disso, uma das surpresas da biologia redox foi o reconhecimento desta molécula como sinalizadora (SIES, 2014). Estudos realizados na década de 70 mostraram que, quando adicionado exogenamente, o H₂O₂ poderia mimetizar a atividade de fatores de crescimento (CZECH, 1976). No final da década de

80, foi mostrado que a adição de H₂O₂ em baixas concentrações é capaz de aumentar a proliferação celular (BURDON; GILL; RICE-EVANS, 1989). Em relação à capacidade de sinalização, características como a estabilidade e a capacidade de difusão através da membrana fornecem vantagens ao H₂O₂. O mecanismo melhor caracterizado pelo qual o H₂O₂ atuaria como molécula sinalizadora seria por meio da oxidação de resíduos críticos de cisteína de proteínas que respondem às alterações no balanço redox (D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007).

Neste sentido, sugere-se que as EROs não sejam simplesmente um produto metabólico indesejado. Ao invés disso, estas moléculas teriam sido selecionadas pela natureza devido à sua capacidade de sinalização (RECZEK; CHANDEL, 2015). Há hipóteses que sugerem que, no início da evolução, as EROs foram selecionadas como mecanismo de transdução de sinais para possibilitar a adaptação às alterações na disponibilidade de nutrientes e ao ambiente oxidativo (WOOD; POOLE; KARPLUS, 2003).

A exposição prévia de epimastigotas de *T. cruzi* a baixas concentrações de H₂O₂ é capaz de fazer com que estes parasitos resistam mais ao tratamento com concentrações mais altas desta substância (FINZI *et al.*, 2004). Além disso, foi observado que o grupo prostético heme induz a proliferação do *T. cruzi* (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Neste sentido, foi mostrado que, durante a infecção de *T. cruzi* em macrófagos, o estresse oxidativo gerado pela explosão respiratória poderia estimular a infecção (PAIVA *et al.*, 2012). O papel das EROs como moléculas sinalizadoras também foi descrito em *Leishmania*, sugerindo que estas moléculas atuem como um importante sinal celular que regularia a diferenciação e proliferação por modular a atividade de alvos celulares por oxidação (MITTRA; ANDREWS, 2013).

Uma vez que o *T. cruzi* está exposto a várias situações de estresse oxidativo durante o seu ciclo de vida, torna-se interessante estudar porque este parasito não possui a enzima catalase, a qual está presente no sistema antioxidante da maioria dos organismos aeróbios. Para entender melhor os mecanismos de defesa antioxidante do *T. cruzi*, geramos uma linhagem deste parasito capaz de expressar estavelmente a enzima catalase HPII, de *Escherichia coli*, e verificamos o seu comportamento em situações de estresse oxidativo. Nossa hipótese é que a ausência desta enzima em *T. cruzi* contribua para que o parasito possa sinalizar melhor o estresse oxidativo.

A decorative border consisting of a repeating pattern of stylized, black-and-white line drawings of fish or aquatic creatures, arranged in a grid-like fashion around the central text.

OBJETIVOS

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Verificar se a expressão heteróloga de catalase interfere na resposta ao estresse oxidativo em *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter uma linhagem de *T. cruzi* capaz de expressar de forma heteróloga a enzima catalase HPII de *Escherichia coli*
- Verificar se a expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* altera a sua resistência e adaptação ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂.
- Avaliar se a expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* modifica a susceptibilidade deste parasito ao benzonidazol.
- Observar se a expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* modifica os níveis de expressão de enzimas antioxidantes próprias do parasito
- Averiguar se a expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* altera a proliferação deste parasito no intestino de triatomíneos.



METODOLOGIA

Metodologia

3.1 Amplificação, clonagem e subclonagem do gene *katE*

3.1.1 Amplificação do gene *katE* de *Escherichia coli*

O gene *katE*, codificador da catalase HPII em *Escherichia coli*, foi amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os iniciadores *katEXBA-F* e *katEXHO-R* (**Tabela 1**). Tais iniciadores foram desenhados de acordo com a sequência de *katE* (GenBank: M55161.1) disponível no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). À sequência de cada iniciador, foram adicionados sítios de restrição para que o inserto pudesse ser digerido após a clonagem. A síntese dos iniciadores foi realizada pela *IDT Technologies*, tendo os mesmos sido posteriormente diluídos em água deionizada para a concentração de 200 mM e estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na amplificação do gene da catalase monofuncional de *Escherichia coli* (*katE*).

Iniciador	Sequência (5'→3') ¹
katEXBA-F	<u>TCT AGA</u> ATG TCG CAA CAT AAC GAA AAG AAC C
katEXHO-R	<u>CTC GAG</u> TCA GGC AGG AAT TTT GTC AAT CTT AG

¹ Os sítios de restrição estão sublinhados.

Para amplificar o gene alvo, colônias de *E. coli* DH5 α foram isoladas da placa utilizando um palito estéril e inoculadas em tubos contendo o *mix* de PCR. Este *mix* foi preparado com 0,25 μM de cada um dos iniciadores (**Tabela 1**), 2 μL de tampão de amplificação 10X, 1,25 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de cada dNTP e 1U de *Platinum Taq*

DNA polimerase (Invitrogen). O volume obtido foi completado com H₂O para 20 µL. As reações foram realizadas em termociclador, utilizando-se o seguinte programa:

Passo 1: Desnaturação inicial (94 °C por 1 minuto);

Passo 2: Desnaturação (94 °C por 30 segundos);

Passo 3: Anelamento (55 °C por 1 minuto);

Passo 4: Extensão (72 °C por 1 minuto);

Passo 5: Repetição dos passos 2-4 (30 vezes);

Passo 6: Extensão final (72 °C por 10 minutos);

Passo 7: 4 °C (indefinidamente).

O produto da reação de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) feito em TAE (Tris base 40 mM pH 7,2, acetato de sódio 20 mM, sal tetrassódico de etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM). A eletroforese foi realizada a 100 V por 40 minutos. Os fragmentos amplificados foram corados por exposição do gel a uma solução de brometo de etídio (10 µg.mL⁻¹) por 15 minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta. A amplificação do fragmento de interesse foi verificada mediante a comparação com o padrão de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Life Technologies). A banda relativa ao fragmento de interesse foi purificada utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*[®] (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

3.1.2 Clonagem do gene *katE* no vetor *pGEM*[®]-*T Easy*

O fragmento purificado no item anterior foi ligado ao vetor de clonagem *pGEM*[®]-*T Easy* (Promega) (**Anexo I**). Para tanto, foi preparada uma reação contendo 5 µL do tampão de ligação 2X, 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL do vetor pGEM e 3 µL do produto de PCR. A reação foi mantida a 4°C durante a noite.

A próxima etapa foi transformar bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes [F-Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*] com o produto de ligação obtido anteriormente. Para o crescimento desta linhagem, foi utilizado o meio 2xYT (1,6 % bactotripton, 1,0 % extrato de levedura, 0,5 % NaCl; pH 7,0) líquido ou sólido (acrécimo de ágar a 1,5%), preparado segundo protocolo padrão (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A transformação foi realizada incubando-se alíquotas de 40 µL destas bactérias com 3 µL da reação de ligação por 5 minutos em gelo. Em seguida, a alíquota foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm (Bio-Rad) e eletroporada a 2,5 kV em um eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad).

Após a eletroporação, as bactérias foram transferidas para microtubos de ensaio contendo 500 µL de meio 2xYT e incubadas por 45 minutos a 37 °C sob agitação constante (180 rpm). Em seguida, 100 µL da cultura foram plaqueados em placas contendo meio 2xYT sólido suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas.

Posteriormente, algumas colônias foram escolhidas ao acaso para a verificação da presença do inserto por meio de PCR de colônias, conforme descrito anteriormente. Em conjunto com os iniciadores descritos na **Tabela 1**, também foram utilizados os iniciadores M-13F e M-13R (**Tabela 2**), os quais amplificam regiões próximas ao sítio múltiplo de clonagem do vetor pGEM. Em uma reação, o iniciador M13-F foi conjugado com o katEXHO-R. Em outra, o iniciador M13-R foi utilizado junto ao katEXBA-F. Após

a PCR, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados na confirmação da transformação das bactérias com o plasmídeo *pGEM-katE*.

Iniciador	Sequência (5'→3')
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	GGAAACAGCTATGACCATG

Para a obtenção do DNA plasmidial, as colônias positivas foram inoculadas em 5 mL de meio líquido 2xYT suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e incubadas a 37° C por 16 horas sob agitação de 180 rpm. As bactérias foram centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme instruções do fabricante, e quantificado em espectrofotômetro (A_{260 nm}). A qualidade da amostra obtida foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE, o qual foi posteriormente corado com brometo de etídio.

Em seguida, o plasmídeo recombinante *pGEM-katE* foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI* (Promega) para liberar o inserto. A digestão foi feita em tampão de digestão apropriado para cada enzima, na concentração especificada pelo fabricante, com 1 U de cada enzima e BSA 1 µg/µL. As reações foram incubadas a 37° C durante a noite.

Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose seguindo as condições mencionadas anteriormente. O fragmento de interesse liberado do plasmídeo foi puncionado do gel e purificado utilizando o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, conforme especificações do fabricante. O fragmento purificado foi

ressuspendido em um volume final de 40 µL de água Milli-Q® autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop™ NP-1000 (Thermo-Scientific) por meio da leitura da absorbância a 260 nm. O grau de pureza das amostras foi estimado pela razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm.

3.1.3 Clonagem do gene *katE* no vetor pROCK_GFP_HIGRO

O vetor pROCK_GFP_HIGRO (**Anexo II**) foi utilizado neste trabalho com o objetivo de obter parasitos *T. cruzi* capazes de expressar de forma heteróloga o gene *katE* de *E. coli*. Para tanto, este vetor foi previamente digerido com *Xba*I e *Xho*I para liberar o fragmento GFP. O procedimento foi realizado utilizando 1 U de cada enzima, BSA 1 µg/µL e tampão apropriado. As reações foram incubadas a 37° C por 2 horas. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio e comparado com padrão de peso molecular.

O vetor pROCK digerido (8000 pb) foi puncionado do gel e purificado utilizando-se o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, conforme especificações do fabricante. O fragmento purificado foi ressuspendido em um volume final de 40 µL de água Milli-Q® autoclavada. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop™ NP-1000 (Thermo-Scientific).

A ligação do vetor pROCK_HIGRO ao gene *katE* foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase e tampão de ligação 2x (Fermentas) em um volume final de 10 µL. A incubação ocorreu por 16 horas a 4° C. A reação de ligação foi preparada seguindo a seguinte proporção:

$$\text{Quantidade do inserto (ng)} = \frac{\text{Quantidade do vetor (ng)} \times \text{Tamanho do inserto (kb)}}{\text{Tamanho do vetor (kb)}}$$

O plasmídeo obtido (pROCK_ *katE*_HIGRO) foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Os protocolos para a transformação, a PCR de colônias e a purificação foram realizados conforme descrito anteriormente. A confirmação da clonagem do gene *katE* no vetor de expressão pROCK_HIGRO foi realizada por meio da digestão do vetor com *Xba*I e *Xho*I e visualização em gel de agarose 1%, seguindo o protocolo previamente descrito.

Após a confirmação da clonagem, a extração em larga escala do plasmídeo recombinante pROCK_ *katE*_HIGRO foi realizada utilizando o *GenElute*TM *HP Plasmid Maxiprep Kit* (Sigma-Aldrich), seguindo as determinações do fabricante. Aproximadamente 1 mg do plasmídeo em questão foi obtido em alto grau de pureza a partir de 500 mL de cultura de bactérias em fase estacionária.

3.2 Sequenciamento para confirmação da clonagem do gene *katE*

O sequenciamento do vetor de pROCK_ *katE*_HIGRO foi realizado em ambas as direções, seguindo o método de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs) (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) e utilizando a plataforma ABI 3130 (Life Technologies). Para cada reação de sequenciamento, foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial purificado e 10 pmol de apenas um dos iniciadores identificados na **Tabela 1** de cada vez. Também foi utilizado um iniciador extra (5'–GCTTCGGTATTCACACCTTCC–3') para amplificar a região interna do gene, dado que se trata de uma sequência relativamente grande. As amostras foram encaminhadas a empresa Myleus Biotecnologia, a qual procedeu com o sequenciamento e nos retornou as sequências obtidas.

A qualidade das sequências obtidas foi analisada utilizando-se o *software* DNA Baser v4 (disponível em <<http://www.dnabaser.com>>), tendo sido as mesmas alinhadas utilizando o MultAlin (CORPET, 2014) e analisadas utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

3.3 Cultivo e transfecção de *T. cruzi* com o gene *katE*

3.3.1 Cultivo de *T. cruzi* na forma epimastigota

Neste estudo, foram utilizadas culturas de *T. cruzi* do clone CL Brener. Os parasitos na forma epimastigota foram mantidos a 28 °C por passagens regulares em meio LIT (do inglês *liver infusion-tryptose*: 0,5%, bactotriptose 0,5%, dextrose 0,2%, NaCl 0,4%, KCl 0,04%, Na₂HPO₄ 0,8%, hemina 0,2% em NaOH 0,05M; pH 7,4) autoclavado, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) inativado (SFBi) e 200 µg.mL⁻¹ de penicilina/estreptomicina. Às culturas transfectadas, também foi adicionado 200 µg.mL⁻¹ de higromicina (Sigma-Aldrich). As passagens foram realizadas semanalmente, exceto quando os parasitos iriam ser submetidos aos experimentos, quando o repique ocorria a cada 48 horas para mantê-los na fase exponencial.

3.3.2 Transfecção dos parasitos com o vetor pROCK_*katE*_HIGRO

A transfecção de epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada por eletroporação (DAROCHA *et al.*, 2004). Como preparo para esta etapa, 100 µg do vetor pROCK_*katE*_HIGRO foram linearizados com a enzima *NotI*, precipitados com isopropanol e solubilizados em 50 µL de água Milli-Q[®] estéril.

Culturas de epimastigotas de *T. cruzi* na fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos (4 °C), lavadas em PBS (*Phosphate buffered saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4) e ressuspendidas em de tampão de eletroporação (KCl 120 mM, CaCl₂ 0,15 mM, K₂HPO₄ 10 mM, Hepes 25 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM; pH 7.6), na concentração final de 10⁸ células.mL⁻¹.

Em uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser System* de 0,2 cm (Bio-Rad), 400 µL da suspensão celular foram misturados aos 50 µL da solução contendo o vetor pROCK_*katE*_HIGRO, com o vetor pROCK vazio ou com 50 µL de água Milli-Q®, para controle da eletroporação. Em seguida, foi aplicado o choque elétrico de dois pulsos de 0,3 kV de voltagem e 500 µF de capacitância, com um intervalo de 30 segundos entre eles. Após a eletroporação, as cubetas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, os parasitos transfectados foram transferidos para garrafas de cultura estéreis contendo 5 mL de meio de cultura e incubados a 28 °C. As culturas foram selecionadas por cerca de seis semanas na presença de higromicina (200 µg.mL⁻¹), a qual foi adicionada apenas 24 horas após a transfecção. Os parasitos transfectados com água Milli-Q® morreram durante a seleção.

3.4 Extração de RNA e RT-PCR

O RNA total foi extraído a partir de 10⁸ epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen). Os parasitos foram coletados por centrifugação a 2.500 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de TRIzol® e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após 5 minutos, foram adicionados 200 µL de clorofórmio ao

lisado, o qual foi homogeneizado e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao lisado, o qual foi misturado por inversão e incubado por três minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi separada por centrifugação a 12.000 g por 15 minutos (4 °C), sendo posteriormente transferida para um novo tubo, ao qual também foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico. Após a homogeneização, a mistura foi incubada por, no mínimo, 1 hora a -20 °C.

O RNA foi precipitado por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos (4 °C). O sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (7.500 g, 5 minutos, 4 °C), seco e ressuspendido em 60 µL de H₂O tratada com DEPC (dietil pirocarbonato). As amostras obtidas foram quantificadas a 260 nm no espectrofotômetro *NanoDrop™ NP-1000* (Thermo-Scientific). A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% contendo formaldeído e corado com brometo de etídio.

Antes da síntese de DNA complementar (cDNA), o RNA foi tratado com DNase para remover as contaminações por DNA genômico. Para tanto, 10 µg de cada amostra de RNA foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente com 1U de DNase fornecida no *DNA-free Kit* (Ambion), conforme recomendação do fabricante. A reação foi interrompida pela adição de 1 µL de EDTA 0,25 mM e pelo aquecimento a 65 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram quantificadas e submetidas à reação de PCR descrita no item 3.1.1 para conferir a eficiência do tratamento.

Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg do RNA anteriormente obtido e utilizando 500 ng de oligo (dT)₁₂₋₁₈. Para tanto, foi utilizado o *Super Script III® First – Strand Synthesis System for RT-PCR Kit* (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Posteriormente, foi realizada uma PCR utilizando os iniciadores que amplificam *katE* para confirmar a sua amplificação a partir do cDNA dos

parasitos transfectados com o vetor pROCK_ *katE*_HIGRO. Para confirmar se o material amplificado nesta PCR não provinha de DNA genômico, foi realizado um controle por meio de uma reação com o RNA que não passou pela transcrição reversa. O produto da RT-PCR foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e comparado com um padrão de peso molecular.

3.5 Clonagem dos parasitos

A população de parasitos transfectada com o vetor pROCK_ *katE*_HIGRO foi cultivada em meio sólido ágar sangue (48,4% de LIT, 0,75% de agarose *low melting* e 2,5% de sangue de coelho desfibrinado e com o complemento inativado) (GOMES; ARAUJO; CHIARI, 1991), ao qual foi adicionada higromicina (200 µg.mL⁻¹ de higromicina). Neste procedimento, foram plaqueadas 10² células em um volume de 100 µL por placa, totalizando seis placas. Após 30 dias de seleção (28°C), as placas foram examinadas e seis clones foram selecionados e cultivados em meio líquido.

3.6 Confirmação da expressão de catalase nos parasitos transfectados e análise da expressão de enzimas antioxidantes do *T. cruzi*

3.6.1 Preparo dos extratos celulares

Culturas de *T. cruzi* do tipo selvagem ou transfectadas com o gene da catalase foram coletadas por centrifugação (2.500 g, 10 minutos) e ressuspendidas em 80 µL de PBS/1mM MgCl₂ e 80 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, Tween 20 1%, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, PMSF 0,1 mM, aprotinina 1 µg.mL⁻¹,

leupeptina 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; pH 7,4). Algumas culturas passaram pelo mesmo processo após terem sido tratadas com H_2O_2 (100 μM) por 20 minutos em PBS (AGUIAR, 2013).

As suspensões foram sonicadas no aparelho *Sonopuls Ultrasonic Homogenizer* (Bandelin), utilizando um programa de 10 ciclos de 1 segundo (intervalo de 1 segundo) e 30% da amperagem máxima. Os extratos foram incubados por duas horas no gelo e centrifugados (2.500 g, 15 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi coletado e estocado a -80 °C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Os extratos de proteína obtidos no item anterior foram submetidos à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% [Tris-HCl 1,5 M, dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,1%, persulfato de amônio 0,05% v/v e TEMED 0,01% v/v; pH 8,8]. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante, mas utilizando o tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8).

Ao volume de amostra correspondente a 30 μg de proteína, foi adicionado tampão de amostra (Tris-HCl 100mM, SDS 4%, azul de bromofenol 2%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 200mM; pH 6,8), obedecendo a mesma quantidade entre as amostras. O volume final das amostras contendo tampão foi completado com água. As amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel para separação eletroforética.

A eletroforese foi realizada a 100 V por duas horas utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,01%; pH 8,3) e o padrão de peso molecular *Rainbow* (GE Healthcare). Após a corrida, os géis em espelho foram corados em *Coomassie Blue* (*Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,25%, metanol 50% e ácido acético

10%) por duas horas e, em seguida, descorados em solução descorante (metanol 30% e ácido acético 10%). Estes géis foram utilizados para avaliar a qualidade dos extratos utilizados.

As proteínas do extrato foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês *polyvinylidene difluoride*) por meio do sistema de transferência semi-seco *Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) a 200 mA em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037%, metanol 20%) por 30 minutos. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio [PBS acrescido de *Tween* 0,05% (PBS-T) e leite em pó desnatado 5%] sob agitação por duas horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos em PBS-T.

3.6.3 Ensaio de *Western Blotting*

Os ensaios de *Western Blotting* foram realizados incubando a membrana obtida no item anterior com o anticorpo primário sob agitação por 2 horas. Nestas incubações, foram utilizados anticorpos anti-catalase (Sigma) (1:3.000), anti-Fe-SOD B (1:2.000) e anti-TR (1:2.000). Para a normalização da concentração proteica, as membranas foram incubadas com anti- α -tubulina [Código T9026, Sigma (1:3.000)]. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS-T e 5% de leite em pó desnatado. Os anticorpos anti-Fe-SOD B e anti-TR de *T. cruzi* foram cedidos pela Prof.^a Dr.^a Fernanda Ramos Gadelha (Laboratório de Bioenergética e Defesas Antioxidantes em Tripanossomatídeos – UNICAMP). Após o período de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos em PBS-T.

Na próxima etapa, as membranas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase em PBS-T (1:3000) por 1 hora sob

agitação. O anticorpo secundário *anti-mouse* IgG (Sigma) foi utilizado nas membranas incubadas inicialmente com anti-catalase e anti- α -tubulina. O anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG (Sigma) foi utilizado nas membranas incubadas com anti-SOD-B e anti-TR. Após esta incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos em PBS-T e reveladas usando o *ECL™ Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare). A quantificação das bandas foi realizada por meio do *software* ImageJ (ABRAMOFF *et al.*, 2004). Três experimentos independentes foram realizados.

3.7 Dosagem da atividade de peroxidase

A atividade total de peroxidase dos parasitos estudados foi medida no sobrenadante do lisado de 2×10^7 células.mL⁻¹ em 50 μ l tampão específico [50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1% Triton X-100]. A atividade foi quantificada após 30 minutos de incubação a 25°C, depois da adição de 2 μ M *Amplex Red* (Invitrogen) e 2 mM H₂O₂. Três experimentos independentes foram realizados.

3.8 Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase no crescimento e na sobrevivência do *T. cruzi* ao H₂O₂

3.8.1 Curva de crescimento

Culturas de epimastigotas de *T. cruzi* do tipo selvagem ou transfectadas com o gene da catalase na fase exponencial foram incubadas a 28 °C e tiveram o crescimento monitorado a cada 24 horas até as células atingirem a fase estacionária. O procedimento foi realizado em placas de 24 poços, sendo que cada cultura foi aplicada em triplicata técnica na concentração inicial de 10⁷ células.mL⁻¹. A contagem das células foi realizada

em câmaras de Neubauer utilizando o corante vital eritrosina (0,4% em PBS). Três experimentos independentes foram realizados.

3.8.2 Curva de sobrevivência ao H₂O₂

Culturas de *T. cruzi* do tipo selvagem ou transfectadas com o gene da catalase na fase exponencial foram submetidas ao tratamento com H₂O₂. Inicialmente, 10⁷ células.mL⁻¹ foram centrifugadas (2.500 g por 10 minutos) e tratadas com H₂O₂ (75, 100 ou 125 µM) diluído em PBS por 20 minutos a 28 °C. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas, ressuspensas em meio LIT novo e distribuídas em placas de 24 poços em triplicata técnica. As células que não receberam o tratamento com H₂O₂ também foram centrifugadas e permaneceram por 20 minutos em PBS.

Após 72 horas de incubação a 28 °C, a taxa de sobrevivência das culturas foi determinada pela contagem do número de parasitos vivos usando a mesma metodologia da curva de crescimento. A densidade celular das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à densidade das culturas não tratadas. Três experimentos independentes foram realizados.

3.8.3 Curva de sobrevivência ao H₂O₂ com pré-tratamento

Culturas de *T. cruzi* do tipo selvagem ou transfectadas com o gene da catalase na fase exponencial foram submetidas a um pré-tratamento com H₂O₂ (25 µM) por 20 minutos a 28 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio LIT novo. Após 24 horas de incubação a 28 °C, as células foram novamente centrifugadas e tratadas com H₂O₂ (75 ou 100 µM). Em seguida, outra rodada de centrifugação, as culturas foram ressuspensas em meio LIT novo e distribuídas em placas de 24 poços

em triplicata técnica, conforme descrito anteriormente. Após 72 horas de incubação a 28 °C, a taxa de sobrevivência das culturas foi determinada pela contagem do número de parasitos vivos, conforme descrito anteriormente.

Em seguida, foi realizado um ensaio no qual as culturas foram pré-tratadas 96 horas antes do tratamento. Como controle, algumas culturas foram pré-tratadas 24 horas antes do tratamento. Três experimentos independentes foram realizados.

3.9 Avaliação dos níveis de H₂O₂

Os níveis de H₂O₂ dos parasitos estudados foram medidos incubando 2×10^7 células.mL⁻¹ em PBS (pH 7,4) na presença de 1 U/mL de peroxidase e 2 µM de *Amplex Red* (Invitrogen). Alternativamente, algumas culturas foram tratadas com H₂O₂. Após 30 minutos, os parasitos foram centrifugados e a fluorescência resultante do sobrenadante foi lida em fluorímetro (530 nm de excitação/590 nm de emissão) utilizando o *SpectraMax M3[®] Microplate Reader* (Molecular Devices). Três experimentos independentes foram realizados.

3.10 Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase na susceptibilidade do *T. cruzi* ao Benzonidazol

Culturas de *T. cruzi* do tipo selvagem ou transfectadas com o gene da catalase na fase exponencial foram submetidas ao tratamento com 60, 120 ou 240 µM de Benzonidazol em LIT. O procedimento foi realizado em placas de 24 poços e cada cultura foi aplicada em triplicata técnica na concentração inicial de 10^7 células.ml⁻¹.

Após 48 horas de incubação a 28 °C, a taxa de sobrevivência das culturas foi determinada pela contagem do número de parasitos vivos usando a mesma metodologia da curva de crescimento. A densidade celular das culturas tratadas foi comparada, em termos percentuais, à das culturas não tratadas. Três experimentos independentes foram realizados.

3.11 Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* no processo de infecção *in vitro*

3.11.1 Obtenção de tripomastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas do sobrenadante de culturas de células LLC-MK2 (células epiteliais de rim de macaco Rhesus) infectadas pelos parasitos estudados. As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecido de 75cm² em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com 2% de SFBi, 1% de penicilina/streptomicina, 3,7mg/L de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich) e 2,0mg/L de Hepes (Sigma-Aldrich).

Após adesão das células e formação de uma monocamada com, aproximadamente, 80% de confluência, frascos para cultivo das células LLC-MK2 foram lavados com PBS e submetidos à dissociação química por tripsina/EDTA (0,25%; Gibco). As células obtidas a partir desta dissociação foram ressuspensas em meio de cultivo e repassadas para novos frascos. Após uma semana, quando a confluência de 80% foi novamente alcançada, estes frascos foram utilizados para manutenção semanal desse cultivo e para a obtenção dos parasitos.

Para a obtenção dos parasitos, as células LLC-MK2 foram infectadas com 5×10^6 tripomastigotas e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após 48 horas, as células foram lavadas para a remoção dos parasitos extracelulares e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após sete dias de infecção, as formas tripomastigotas liberadas das células infectadas foram coletadas no sobrenadante e purificadas.

Para a purificação das formas tripomastigotas, os sobrenadantes coletados dos frascos infectados foram transferidos para tubos, centrifugados a $447,6 \text{ g}$ (10 minutos, 4°C) e mantidos em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 por 3 horas. Este processo possibilita a migração das tripomastigotas para o sobrenadante do tubo, separando-as dos restos celulares e eventuais amastigotas, os quais se mantêm nos sedimentos. Após 3 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados e, os parasitos, quantificados em câmara de Neubauer.

3.11.2 Ensaio de infecção de macrófagos *in vitro*

Os macrófagos utilizados neste estudo foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos, quatro dias após a injeção de 2 ml de tioglicolato 3% (BD), como previamente descrito (REZENDE *et al.*, 2005). As células foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos (4°C) e ressuspendidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFBi, 1% de penicilina-estreptomicina e 2mM de glutamina. Após serem contadas em câmara de Neubauer, 5×10^5 células foram plaqueadas em cada poço de placas de 24 poços e incubadas a 37°C , em atmosfera contendo 5% de CO_2 por 2 horas. Alternativamente, macrófagos foram tratados com CAT-PEG (*catalase-polyethylene glycol*, 40 U/well, Sigma-Aldrich) 2 horas antes do processo de infecção.

Em seguida, os tripomastigotas foram adicionados na proporção 5:1 (parasito/macrófago) e, as culturas, incubadas por mais duas horas. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com PBS para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas ou incubadas novamente em meio DMEM por 72 horas. As lamínulas foram coradas utilizando-se o sistema de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin).

O número de amastigotas e macrófagos infectados foi determinado pela contagem de pelo menos 300 células por amostra. Os resultados foram expressos como índice de infecção (% de células infectadas x n^o de amastigotas/n^o total de células). Três experimentos independentes foram realizados. Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Grazielle Alves Ribeiro, do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (UFMG).

3.12 Avaliação da interferência da expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* no processo de infecção *in vivo*

3.12.1 Ensaio de infecção de camundongos

Camundongos C57BL/6 fêmeas ou machos, entre 4 e 8 semanas de idade foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Os animais foram mantidos em biotério convencional, sem restrição de água e comida, tendo ciclos controlados de claro-escuro com intervalos de 12 horas. Estes experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, cujo protocolo é 214/11.

Os experimentos de infecção *in vivo* foram realizados com tripomastigotas sanguíneos, os quais foram mantidos por passagens simultâneas em camundongos a cada sete dias. Os parasitos foram obtidos de sangue heparinizado, contados e utilizados para

infecção dos grupos experimentais. A infecção experimental foi realizada em grupos de cinco camundongos através de injeção intraperitoneal de 1×10^6 de parasitos.

A parasitemia dos camundongos infectados foi avaliada por meio da contagem de tripomastigotas em 5 μ L de sangue da veia caudal dos animais infectados. As contagens foram realizadas a partir do 3º dia de infecção, todos os dias, até a parasitemia se tornar indetectável. O número de parasitos por mL de sangue foi calculado conforme descrito previamente (BRENER, 1962). Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Grazielle Alves Ribeiro, do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (UFMG).

3.12.2 Ensaio de infecção de triatomíneos

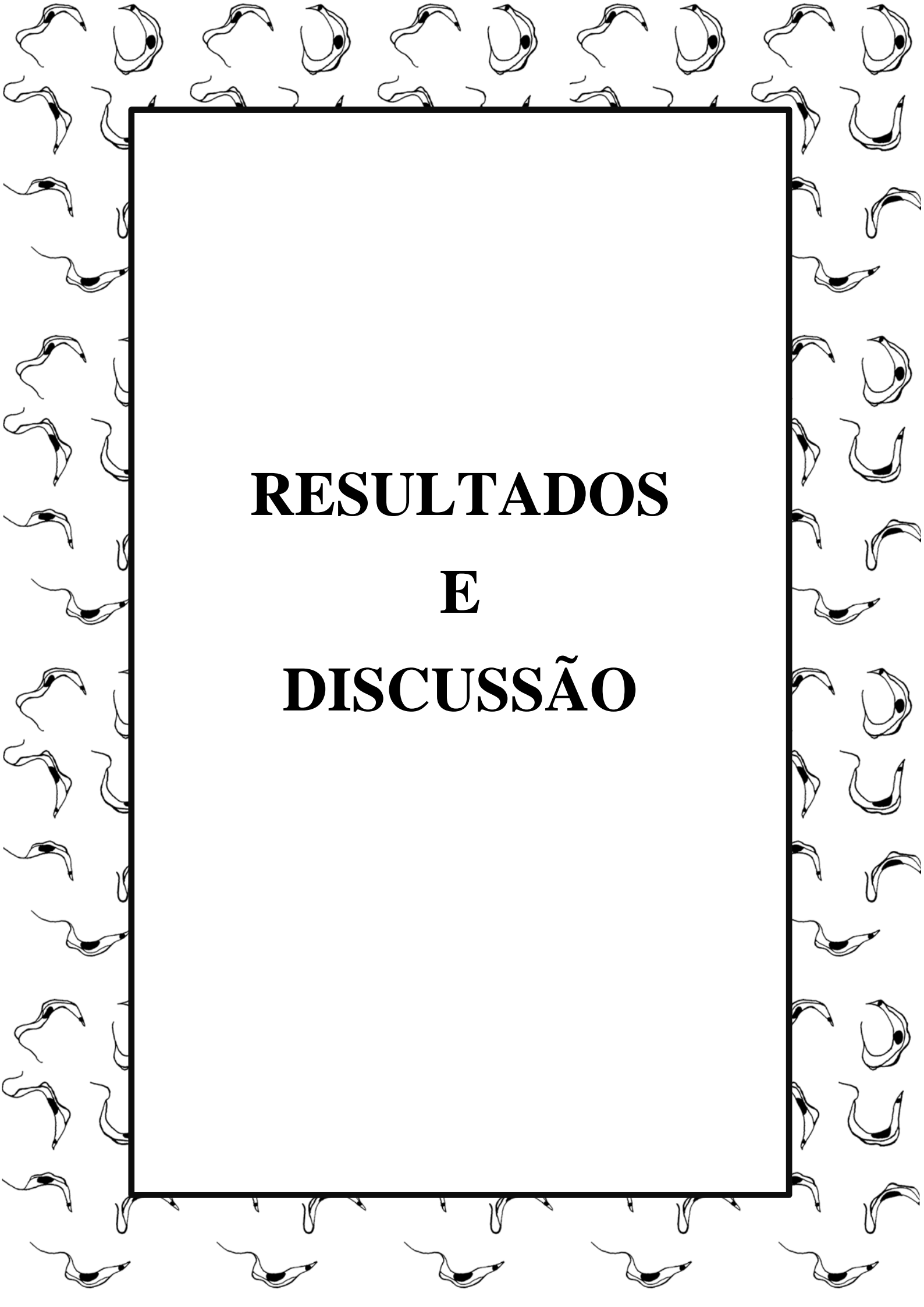
As ninfas de *Rhodnius prolixus* (5º estágio) utilizadas neste ensaio foram mantidas pelo Grupo de Comportamento de Artrópodes Vetores e Interação com Patógenos do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) a 26 ± 1 °C, 65 ± 5 % de umidade relativa e iluminação natural. Estes insetos foram alimentados em galinhas e camundongos anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de ketamina (150 mg/kg, Cristália) e xilazina (10 mg/kg, Bayer). As infecções foram realizadas utilizando insetos não infectados com jejum entre 8-10 dias após a ecdise. Estes insetos foram alimentados em um alimentador artificial com sangue de coelho (previamente citratado e inativado a 56° C por 30 minutos) contendo 10^7 epimastigotas.mL⁻¹. Insetos controle foram alimentados com sangue nas mesmas condições, exceto pela presença de parasitos (ELLIOT *et al.*, 2015).

Os insetos foram dissecados 30 dias após a infecção para obter o intestino. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de um pistilo e diluídas em PBS (pH 7,4) na proporção de 1:10. A contagem do número de parasitos foi realizada em câmaras de

Neubauer utilizando microscópio óptico. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica. Estes procedimentos foram realizados em colaboração com a Dra. Alessandra Aparecida Guarneri, no Laboratório de Comportamento de Artrópodes Vetores e Interação com Patógenos do Centro de Pesquisas René Rachou. Três experimentos independentes foram realizados.

3.13 Análise estatística

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Os resultados foram analisados utilizando ANOVA ou teste *t* de Student, conforme indicado na figura de cada legenda. Os experimentos foram realizados, no mínimo, três vezes.

A decorative border surrounds the central text, consisting of numerous small, stylized illustrations of fish or aquatic organisms, possibly loaches, arranged in a repeating pattern.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados e Discussão

Durante seu complexo ciclo de vida, o *T. cruzi* é exposto a diversos tipos de ambientes, nos quais o estresse oxidativo é uma das principais ameaças à sua viabilidade (GARCIA *et al.*, 2010; GUPTA; WEN; GARG, 2009; PIACENZA *et al.*, 2009). No hospedeiro mamífero, as formas tripomastigotas estão susceptíveis ao ataque de macrófagos residentes, os quais podem produzir EROs a partir da NADPH oxidase (CARDONI *et al.*, 1997; MUÑOZ-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; FRESNO, 1992). No tecido cardíaco, a invasão de cardiomiócitos pelo *T. cruzi* pode causar disfunção mitocondrial, o que também provoca a geração de EROs (GUPTA *et al.*, 2009). Além do ambiente oxidativo encontrado no interior da célula infectada, os amastigotas precisam enfrentar as EROs e as ERNs produzidas por células do infiltrado do sistema imune inato (GUPTA; WEN; GARG, 2009; MACHADO *et al.*, 2000; ZACKS *et al.*, 2005). No hospedeiro invertebrado, por sua vez, o *T. cruzi* necessita enfrentar as EROs, produzidas pela degradação da hemoglobina (PAES; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2001), e as ERNs, geradas por mecanismos de defesa do hospedeiro (WHITTEN *et al.*, 2007).

Para lidar com o estresse oxidativo ao qual é exposto durante o seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta um complexo sistema de defesa antioxidante, o qual é composto por enzimas e moléculas não enzimáticas distribuídas pelo retículo endoplasmático, mitocôndria e citosol (PIACENZA *et al.*, 2012). A ausência de catalase neste sistema (EL-SAYED *et al.*, 2005) é intrigante, dado que a mesma está presente em praticamente todos os organismos aeróbios, o que sugere a sua grande importância no combate ao estresse oxidativo (VON; HAUSNER; LOEWEN, 1993).

4.1 Obtenção de uma linhagem de *T. cruzi* que expressa catalase

Para entender melhor o sistema antioxidante do *T. cruzi* e a razão pela qual este parasito não apresenta catalase, geramos uma linhagem do parasito capaz de expressar a catalase HPII de *E. coli*. Esta enzima é codificada pelo gene *katE*, o qual é bem descrito na literatura (VON OSSOWSKI *et al.*, 1991). Inicialmente, o fragmento de 2.262 pb correspondente ao gene *katE* foi amplificado por PCR (**Figura 7A**). Após o produto de PCR ter sido separado por eletroforese, o fragmento de interesse foi excisado do gel, purificado e ligado ao vetor de clonagem *pGEM[®]-T Easy* (Promega).

Em seguida, bactérias *E. coli* DH5 α eletrocompetentes foram transformadas com o produto da ligação anteriormente realizada. A transformação das bactérias foi confirmada por PCR (**Figura 7B**). Os vetores presentes nos clones positivos foram extraídos e digeridos para liberar o fragmento de interesse. Após a purificação deste fragmento, o mesmo foi ligado ao vetor pROCK_HIGRO. O vetor obtido (pROCK_*katE*_HIGRO) foi utilizado para transformar bactérias, cuja transformação foi confirmada por PCR (**Figura 7C**).

O plasmídeo recombinante pROCK_*katE*_HIGRO foi extraído em larga escala e sequenciado para confirmar se o fragmento de interesse havia sido corretamente clonado. As sequências obtidas foram alinhadas para gerar uma sequência consenso, a qual foi comparada à sequência do gene *katE*, após as mesmas serem traduzidas *in silico* para as sequências de aminoácidos correspondentes. Os resultados obtidos mostram a correspondência entre estas sequências (**Figura 8**).

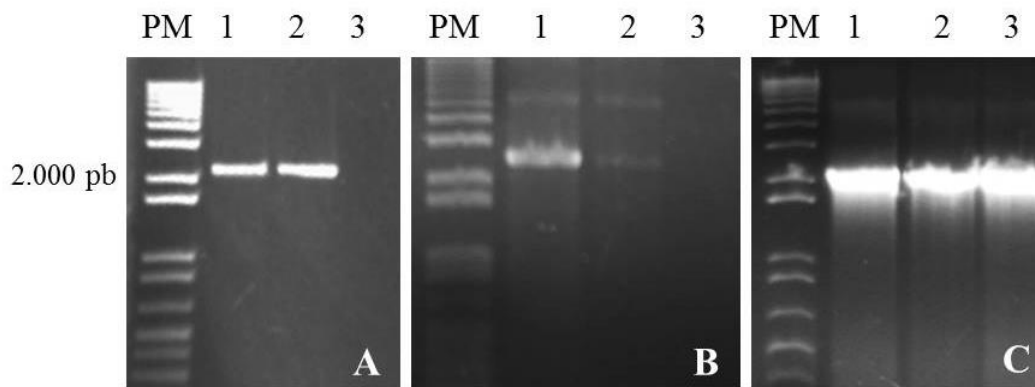


Figura 7: Amplificação da sequência correspondente ao gene *katE* por PCR. (A) Os iniciadores desenhados para amplificar o gene *katE* foram testados para verificar a sua especificidade. 1 e 2: Bandas relativas à sequência de *katE*. 3: Controle negativo da reação, na ausência de DNA. (B) 1 e 2: Amplificação do gene *katE* a partir de culturas de *E. coli* transformadas com o vetor *pGEM[®]-T Easy* contendo a sequência de *katE*. 3: Controle negativo da reação, na ausência de DNA. (C) Amplificação do gene *katE* a partir de culturas de *E. coli* transformadas com o vetor *pROCK_katE_HIGRO*. PM: Padrão Molecular (*1 Kb Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

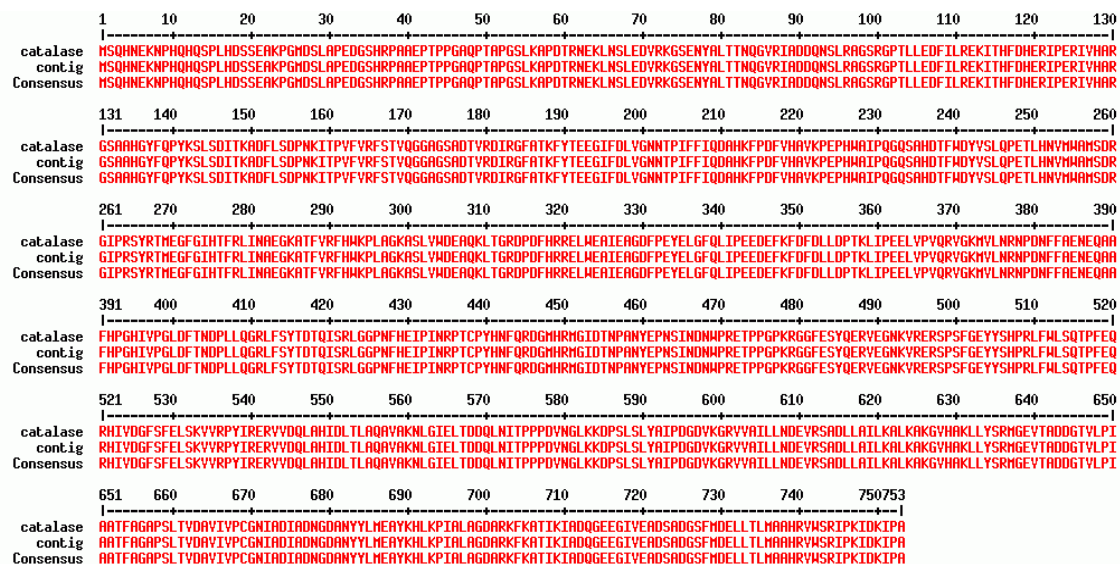


Figura 8: Alinhamento entre a sequência de aminoácidos correspondente ao gene *katE* (GenBank: M55161.1) e ao vetor *pROCK_katE_HIGRO*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa MultiAlin (CORPET, 2014).

Epimastigotas de *T. cruzi* na fase exponencial de crescimento foram transfectadas com o vetor pROCK_ *katE*_HIGRO. Após a seleção dos parasitos transfectados na presença de higromicina, o RNA dos mesmos foi extraído, tratado com DNase e utilizado na síntese cDNA. Posteriormente, foi realizada uma PCR utilizando os iniciadores descritos na **Tabela 1** e, como molde, o cDNA obtido. Os resultados obtidos mostraram que os parasitos transfectados com o vetor pROCK_ *katE*_HIGRO são capazes de produzir o mRNA correspondente ao gene da catalase. O mesmo não foi observado para os parasitos do tipo selvagem (**Figura 9**).

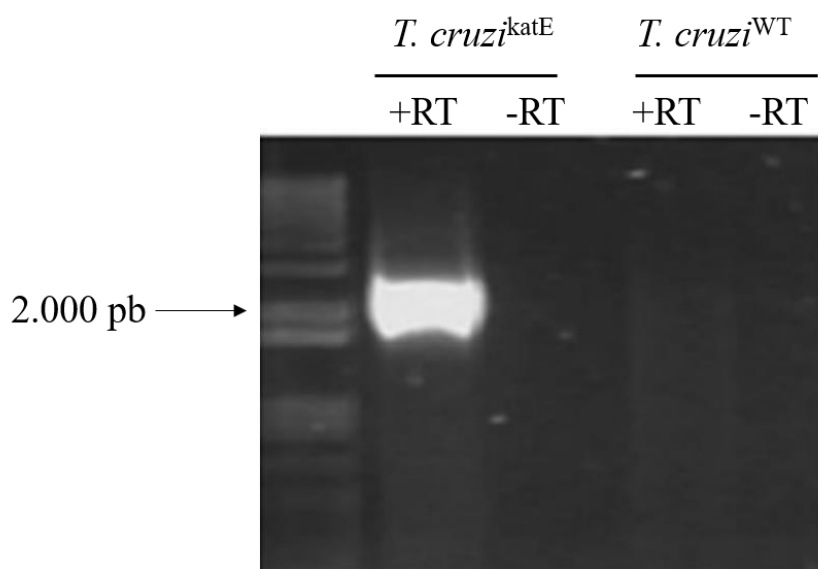


Figura 9: Amplificação da sequência do mRNA correspondente ao gene *katE* por RT-PCR. O RNA total dos parasitos transfectados com o vetor pROCK_ *katE*_HIGRO foi extraído e utilizado em uma reação de RT-PCR. O fragmento de interesse (2.262 pb) foi amplificado a partir do cDNA dos parasitos transfectados com o vetor (*T. cruzi*^{katE}; RT+), mas não dos parasitos selvagens (*T. cruzi*^{WT}; RT+). Para ambos os parasitos, foram realizados controles negativos utilizando a reação de extração de RNA (sem passar pela RT-PCR) para confirmar a ausência de contaminação por DNA genômico (*T. cruzi*^{katE} e *T. cruzi*^{WT}; RT-). O padrão molecular utilizado foi o *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Após a clonagem da população de parasitos modificados, a confirmação da expressão de catalase nestas células foi realizada por meio do ensaio de *Western Blotting*,

utilizando um anticorpo anti-catalase. Os resultados obtidos confirmaram a expressão da enzima nestes parasitos. O mesmo não foi observado para os parasitos selvagens (**Figura 10A**). Não foi observada diferença estatística em relação aos níveis de expressão de catalase na população e nos clones, sugerindo que a regulação da expressão de *katE* esteja ocorrendo apenas pelas porções 3' e 5' UTR do vetor utilizado (**Figura 10B**). Em seguida, foi realizado um ensaio de atividade total de peroxidase, o qual mostrou que esta é maior em parasitos que expressam catalase, fornecendo mais evidências da expressão desta enzima (**Figura 10C**).

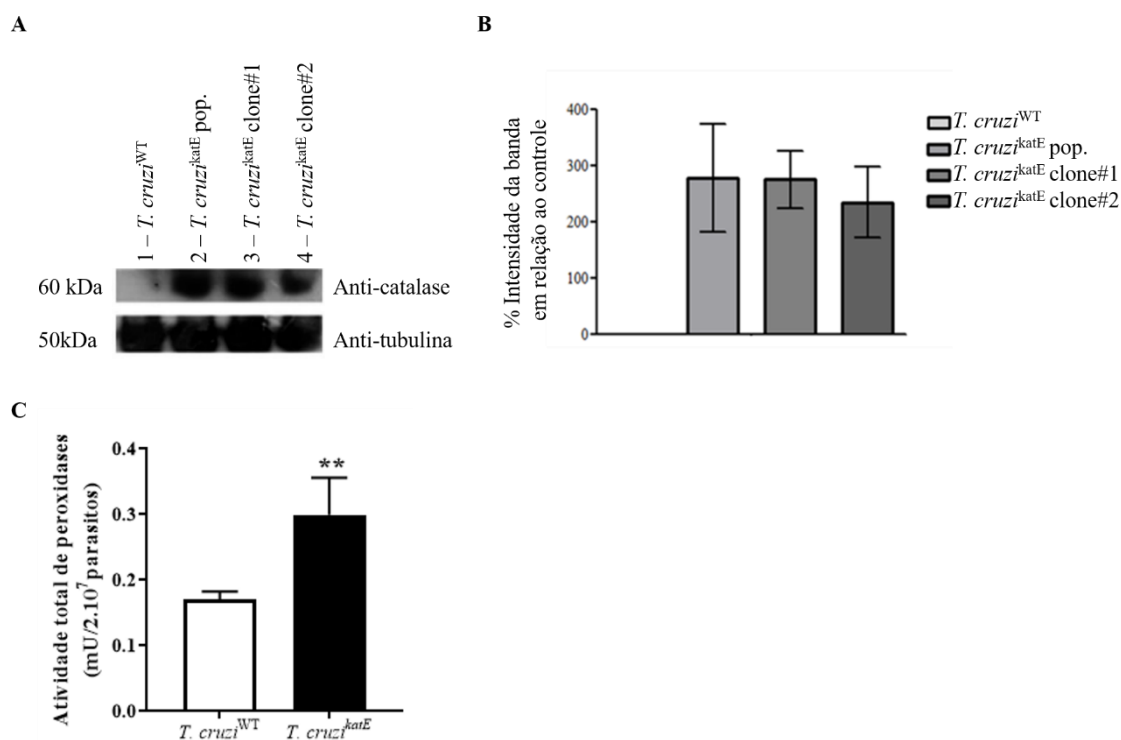


Figura 10: Expressão heteróloga de *katE* em *T. cruzi*. (A) Extratos proteicos de epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}) ou modificados com o gene *katE* (*T. cruzi*^{katE}: População, Clone 1 e Clone 2) na fase exponencial de crescimento foram preparados, quantificados e submetidos à eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE). A enzima catalase foi detectada por *Western Blotting* utilizando um anticorpo anti-catalase. (B) Gráfico representando a densidade das bandas obtidas a partir do *Western Blotting*, após as mesmas serem normalizadas pelas bandas marcadas pelo anticorpo anti- α -tubulina. (C) A atividade total de peroxidase dos parasitos estudados foi medida no sobrenadante do lisado de 2×10^7 células em tampão específico. O símbolo asterisco

(*) refere-se às diferenças estatísticas significativas em relação ao WT (** $p < 0,01$, teste t de Student, $n=3$).

4.2 A expressão heteróloga de catalase não altera o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*, mas aumenta a sobrevivência ao H_2O_2

A próxima etapa foi verificar se a expressão de catalase altera a proliferação do *T. cruzi*. Foi verificado que os parasitos modificados com o gene da catalase apresentam uma taxa de crescimento similar à de parasitos selvagens e transfectados com o vetor pROCK vazio, indicando que a expressão deste gene exógeno não influencia a replicação do *T. cruzi* nestas condições. Além disso, todas as culturas chegaram à fase estacionária com, aproximadamente, o mesmo número de células, sugerindo que o estresse oxidativo não seja a principal razão para que os parasitos cheguem nesta fase (**Figura 11**).

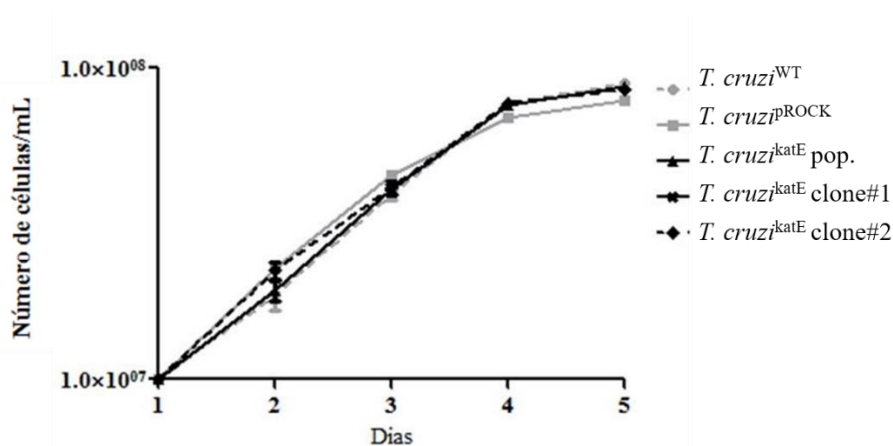


Figura 11: A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* não modifica o padrão de crescimento dos parasitos. Epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}), transfectados com o vetor pROCK vazio (*T. cruzi*^{pROCK}) e transfectados com o vetor pROCK ligado ao gene *katE* (*T. cruzi*^{katE}: População, Clone 1 e Clone 2) tiveram o crescimento monitorado diariamente até atingirem a fase estacionária. As culturas apresentavam inicialmente 10^7 células.mL⁻¹. Três experimentos independentes foram realizados.

Este tipo de comportamento também foi observado por nosso grupo de pesquisa em outras cepas de *T. cruzi* modificadas. Por exemplo, parasitos modificados com a enzima MutT de *E. coli* apresentaram um padrão de crescimento similar aos selvagens nas mesmas condições de cultivo. Porém, quando expostos ao H₂O₂, estes parasitos exibiram uma taxa de sobrevivência maior (AGUIAR *et al.*, 2013). Como mencionado anteriormente, a enzima MutT atua na hidrólise de 8-oxo-dGTP no *pool* de nucleotídeos, evitando que esta base oxidada seja incorporada ao DNA por DNA polimerases (MAKI; SEKIGUCHI, 1992; NAKABEPPU *et al.*, 2006; SAKUMI *et al.*, 1993).

Sendo a catalase uma enzima que reduz o H₂O₂, o próximo objetivo foi verificar se a sua expressão em *T. cruzi* iria modificar a resistência ao estresse oxidativo. Para tanto, os parasitos estudados foram tratados com H₂O₂ e tiveram a sobrevivência avaliada. Foi verificado que os parasitos que expressam catalase exibem um aumento significativo na taxa de sobrevivência, o que indica que sejam mais resistentes ao estresse oxidativo gerado pelo H₂O₂ do que os parasitos selvagens (**Figura 12**).

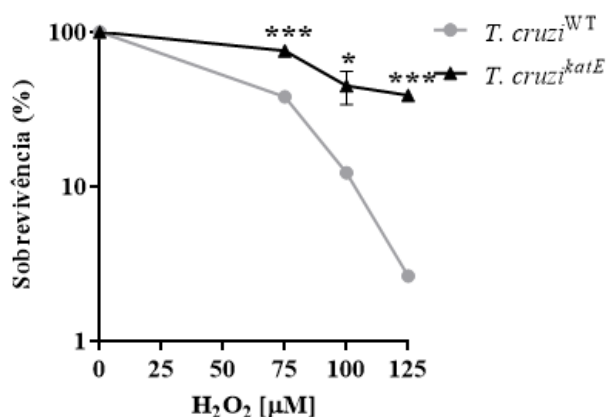


Figura 12: A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* aumenta a resistência dos parasitos ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂. Epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}) e transfectados com o gene da catalase (*T. cruzi*^{katE}) foram tratados com várias concentrações de H₂O₂ por 20 minutos em PBS (pH 7,4) e ressuspendidos em meio LIT. Após 72

horas de incubação a 28 °C, a porcentagem de sobrevivência dos parasitos foi medida em relação à dos parasitos não tratados. O símbolo asterisco (*) refere-se às diferenças estatísticas significativas em relação ao controle WT (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$: teste t de Student, $n=3$).

4.3 A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* não promove alteração na susceptibilidade do parasito ao benzonidazol

Recentemente, sugeriu-se que a ligação covalente do BZ a tióis de baixo peso molecular e outras pequenas moléculas seria a causa primária da toxicidade desta droga em *T. cruzi* (TROCHINE *et al.*, 2014). Um trabalho do nosso grupo mostrou que o BZ oxida preferencialmente o *pool* de nucleotídeos e que a incorporação extensiva de nucleotídeos oxidados durante a replicação do DNA seria capaz de gerar quebras duplas potencialmente letais no DNA do *T. cruzi* (RAJÃO *et al.*, 2014).

Para verificar se a expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* seria capaz de influenciar a susceptibilidade do parasito ao benzonidazol, tratamos as células estudadas com a droga em questão e avaliamos a sobrevivência das mesmas. Neste ensaio, não foi observada diferença significativa entre a susceptibilidade ao BZ de parasitos selvagens e modificados com o gene da catalase (**Figura 13**).

Como sugerido anteriormente, o efeito tripanocida do BZ parece não depender da geração de EROs, uma vez que a geração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em concentrações capazes de inibir o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* não foi observada (MORENO *et al.*, 1982). O fato de a expressão de catalase em *T. cruzi* não ter alterado a susceptibilidade do parasito ao BZ fornece mais evidências de que o H_2O_2 não estaria envolvido no mecanismo de ação desta droga, ou ocorreria em quantidades muito pequenas.

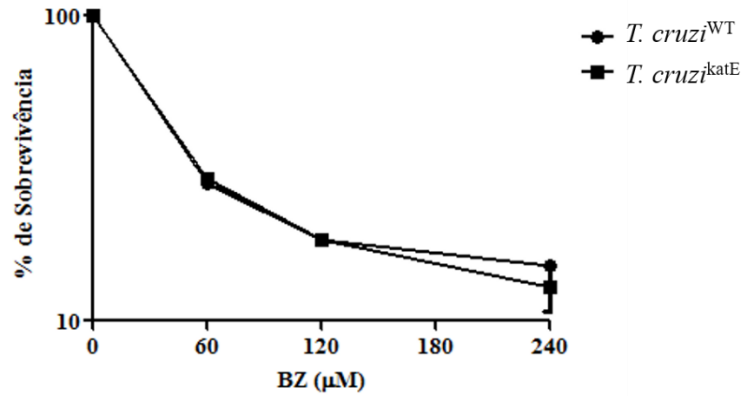


Figura 13: A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* não altera a susceptibilidade deste parasito ao benzonidazol. Epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}) e transfectados com o gene da catalase (*T. cruzi*^{katE}) foram incubados a 28 °C com várias concentrações de benzonidazol em meio LIT. Após 48 horas, a porcentagem de sobrevivência dos parasitos que receberam a droga foi medida em relação à dos parasitos não tratados (n=3).

4.4 A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* reduz a adaptação do parasito ao pré-tratamento com H₂O₂

Embora altas concentrações de H₂O₂ sejam prejudiciais ao *T. cruzi*, já foi demonstrado que a exposição de epimastigotas a baixas concentrações desta substância é capaz de estimular a proliferação dos parasitos. Além disso, foi observado que a realização de um pré-tratamento com concentrações subletais de H₂O₂ faz com que estes parasitos tornem-se mais resistentes ao tratamento com concentrações mais altas desta substância. Os autores sugeriram que tal comportamento estaria relacionado a uma resposta adaptativa do parasito às condições de estresse oxidativo (FINZI *et al.*, 2004).

Baseando-se nestes dados, a próxima etapa deste trabalho foi verificar se a expressão heteróloga de catalase poderia influenciar a adaptação dos parasitos ao pré-tratamento com H₂O₂. Para tanto, os parasitos estudados foram submetidos a um pré-tratamento com uma baixa concentração de H₂O₂ (25 μM) 24 horas antes do tratamento

com a mesma substância (75 ou 100 μM). Após 72 horas, a taxa de sobrevivência dos parasitos foi avaliada e comparada com a de parasitos que não foram pré-tratados.

Neste ensaio, a exposição dos parasitos selvagens a uma baixa concentração de H_2O_2 foi relacionada a um aumento significativo na sobrevivência ao tratamento, a qual se tornou similar à dos parasitos modificados com o gene da catalase. Este resultado sugere, mais uma vez, que o tratamento prévio com H_2O_2 seja capaz de ativar o sistema antioxidante do *T. cruzi* selvagem, tornando-o mais resistente ao tratamento com H_2O_2 (FINZI *et al.*, 2004). Entretanto, este aumento não foi observado com a mesma intensidade nos parasitos que expressam catalase. Tal fato sugere que a ação desta enzima possa ter reduzido a adaptação ao pré-tratamento com H_2O_2 (**Figura 14**).

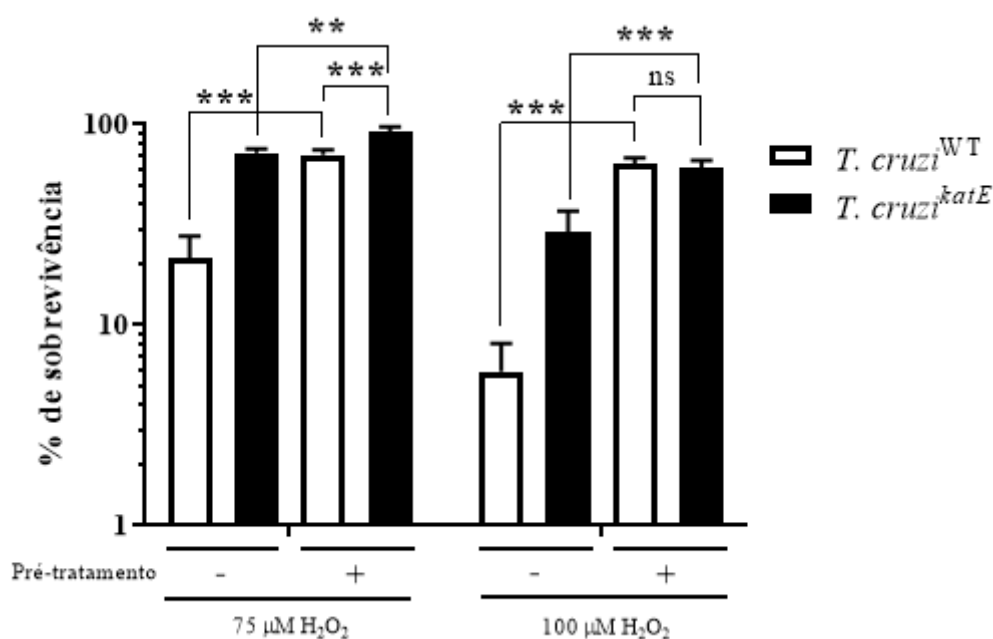


Figura 14: A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* reduz a adaptação ao estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 . Epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}) e transfectados com o gene da catalase (*T. cruzi*^{katE}) foram pré-tratados com 25 μM de H_2O_2 por 20 minutos em PBS (pH 7,4) e ressuspensos em meio LIT. Após 24 horas de incubação a 28 °C, as culturas foram tratadas com H_2O_2 (75 ou 100 μM) por 20 minutos em PBS (pH 7,4) e ressuspensos em meio LIT. Depois de 72 horas de incubação a 28 °C, a porcentagem de sobrevivência dos parasitos pré-tratados foi medida em relação à dos parasitos não pré-tratados. O símbolo asterisco (*)

refere-se às diferenças estatísticas significativas em relação ao controle WT não pré-tratado (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: teste *One-way* ANOVA, pós-teste Bonferroni, $n=3$).

A realização de curvas com concentrações mais elevadas de H_2O_2 poderia indicar se haveria algum processo adaptativo mais significativo ocorrendo com as células que expressam catalase. Porém, como observado, a concentração de $100 \mu M$ de H_2O_2 reduziu a sobrevivência dos parasitos selvagens em, aproximadamente, 90%, impossibilitando a comparação de ambos os parasitos estudados em termos de resistência a concentrações mais altas de H_2O_2 .

O efeito do pré-tratamento com H_2O_2 também foi estudado em *Leishmania chagasi*. Parasitos previamente incubados com concentrações subletais de H_2O_2 apresentaram uma resistência aumentada aos efeitos tóxicos do H_2O_2 e um aumento da virulência em camundongos BALB/c (WILSON; ANDERSEN; BRITIGAN, 1994). Da mesma forma, em bactérias (DEMPLE; HALBROOK, 1983), leveduras (DAVIES; LOWRY; DAVIES, 1995) e mamíferos (WIESE; PACIFICI; DAVIES, 1995), há uma adaptação ao estresse oxidativo quando as células são previamente submetidas a baixas concentrações de H_2O_2 e depois expostas a concentrações mais elevadas.

Embora a exposição prévia do *T. cruzi* a uma baixa concentração de H_2O_2 seja capaz de promover o aumento da resistência ao tratamento com a mesma substância, já foi sugerido que este efeito seja perdido ao longo do tempo (FINZI *et al.*, 2004). Uma vez que os parasitos selvagens resistiram mais ao tratamento com H_2O_2 após serem pré-tratados, o próximo objetivo foi verificar se o pré-tratamento teria apenas pré-selecionado os parasitos mais resistentes ou se estaria relacionado a um processo adaptativo. Prosseguimos com curvas de sobrevivência aumentando o tempo entre o pré-tratamento e o tratamento. Diferente do observado para o tratamento realizado com intervalo de 24

horas, pré-tratar os parasitos 96 horas antes do tratamento não os torna mais resistentes ao estresse oxidativo (**Figura 15**).

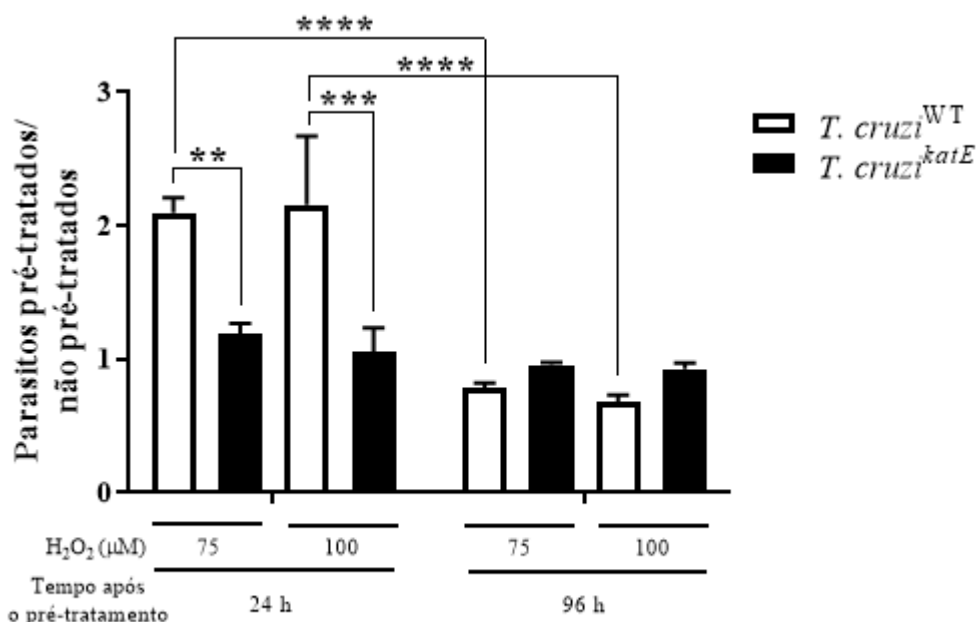


Figura 15: O efeito sinalizador do pré-tratamento com H₂O₂ é transitório. Epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}) e transfectados com o gene da catalase (*T. cruzi*^{katE}) pré-tratados ou não com 25 μM de H₂O₂ por 20 minutos em PBS (pH 7,4) e ressuspensos em meio LIT. Após 24 ou 96 horas de incubação a 28 °C, as culturas foram tratadas com 75 ou 100 μM de H₂O₂ por 20 minutos em PBS (pH 7,4) e ressuspensos em meio LIT. Depois de 72 horas de incubação a 28 °C, a relação entre a porcentagem de sobrevivência de parasitos pré-tratados e não pré-tratados foi analisada. O símbolo asterisco (*) refere-se às diferenças estatísticas significativas em relação aos parasitos selvagens no tempo de 24 horas (**p<0,01, *** p<0,001 e ****p<0,0001: teste *One-way* ANOVA, pós-teste Bonferroni, n=3).

Neste ensaio, caso o aumento da resistência ao tratamento se mantivesse ao longo do tempo, poderíamos sugerir que o pré-tratamento teria selecionado os parasitos mais resistentes, o que justificaria a sua resistência aumentada. Porém, o fato deste aumento não ter sido observado 96 horas após o pré-tratamento indica que o efeito sinalizador do

mesmo seja temporário. Tais dados sugerem que há uma perda da adaptabilidade ao longo do tempo, sugerindo que este processo seja transiente. De fato, como observado em *Saccharomyces cerevisiae*, o aumento da resistência ao H₂O₂ após o pré-tratamento com a mesma substância foi transitório, tendo sido revertido em até 90 minutos após o crescimento da levedura na ausência do H₂O₂ (DAVIES; LOWRY; DAVIES, 1995). Em mamíferos, a resposta adaptativa a baixas concentrações de H₂O₂ foi máxima no tempo de 18 horas após o pré-tratamento, declinando para valores próximos aos basais após este período (WIESE; PACIFICI; DAVIES, 1995).

4.5 A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* promove um aumento nos níveis de H₂O₂ após a exposição dos parasitos a esta substância

Uma vez verificado que os parasitos estudados neste trabalho divergem em sua capacidade de adaptação e resistência ao estresse oxidativo, decidiu-se avaliar se tais diferenças seriam decorridas de variações dos níveis de H₂O₂. As análises mostraram que os parasitos que expressam catalase apresentam níveis de H₂O₂ similares aos dos parasitos selvagens. Entretanto, quando os parasitos modificados com catalase foram expostos ao H₂O₂ antes do ensaio de atividade, houve um aumento significativo dos níveis desta substância. O mesmo não foi observado para os parasitos selvagens, sugerindo que estas células sejam mais eficientes em lidar com o estresse oxidativo (**Figura 16**).

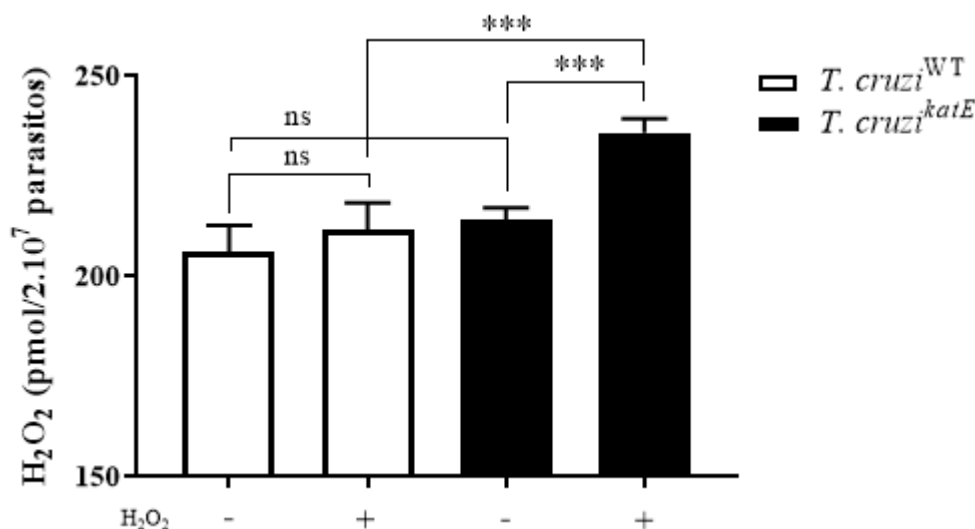


Figura 16: Níveis de H₂O₂ em *T. cruzi* selvagem e modificado com o gene da catalase. Os níveis de H₂O₂ foram avaliados incubando 2 x 10⁷ epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}) ou transfectados com o gene da catalase (*T. cruzi*^{katE}) por ml de PBS (pH 7,4) na presença de 1 U.mL⁻¹ de *horseradish peroxidase* and 2 μM de *Amplex Red* (Invitrogen) por 30 minutos. Alternativamente, os parasitos foram incubados em H₂O₂ (100 μM) por 20 minutos em PBS (pH 7,4) antes da medição. Em seguida, os parasitos foram centrifugados e a fluorescência resultante foi medida no sobrenadante (excitação de 530 nm e emissão de 590 nm). O símbolo asterisco (*) refere-se às diferenças estatísticas significativas entre os grupos (***p<0,001: teste *One-way* ANOVA, pós-teste Bonferroni, n=3).

4.6 A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* modifica os níveis de enzimas antioxidantes do parasito

Após observarmos que os parasitos estudados neste trabalho exibem diferentes níveis de H₂O₂ após o tratamento com esta substância, a próxima etapa foi verificar se tais diferenças estariam relacionadas a variações nos níveis de expressão de enzimas antioxidantes do parasito. Para tanto, realizamos ensaios de *Western Blotting* com anticorpos que reconhecem as enzimas Fe-SOD B e TR (**Figura 17A**).

A densitometria das bandas obtidas no ensaio de *Western Blotting* mostrou que os parasitos que expressam catalase apresentam um aumento significativo na expressão de

Fe-SOD B em relação aos selvagens. Levando-se em conta o fato de que esta enzima produz H_2O_2 , faz sentido que parasitos que expressam catalase tenham a expressão de Fe-SOD B aumentada como uma tentativa de reestabelecer os níveis fisiológicos de H_2O_2 . Adicionalmente, foi verificado que o tratamento com H_2O_2 induz a expressão desta enzima apenas nos parasitos selvagens (**Figura 17B**). Variações na expressão de enzimas antioxidantes após o tratamento com H_2O_2 também foram observadas em epimastigotas de *T. cruzi* modificados com a enzima MutT de *E. coli*, os quais exibiram um aumento dos níveis de cTXNPx e mTXNPx após a exposição a esta substância (AGUIAR *et al.*, 2013).

Modulações nos níveis de atividade de enzimas antioxidantes também têm sido descritas para células cancerosas. Pode-se dizer que estas células, assim como o *T. cruzi*, estabelecem uma relação parasitária com o organismo no qual estão se desenvolvendo, uma vez que o seu genoma exhibe alterações marcantes que permitem designá-las como outro organismo (PAWELETZ; BOXBERGER, 1994). Além disso, a célula cancerosa também enfrenta estresse oxidativo durante o crescimento desordenado do tumor (CUI, 2012).

Neste sentido, há trabalhos mostrando que células de melanoma apresentam níveis de atividade de SOD aumentados, ao passo que os níveis de atividade de catalase estão reduzidos (PICARDO *et al.*, 1996). Além disso, a superexpressão de catalase em um modelo murino de câncer de mama reduziu consideravelmente a invasividade do tumor. Neste modelo, foi sugerido que a superexpressão desta enzima poderia diminuir a sinalização dependente de EROs necessária para o aumento da invasividade do tumor (GOH *et al.*, 2011).

Em conjunto, estes resultados podem sugerir que, em resposta à maior produção de $O_2^{\cdot-}$, a expressão de SOD seja maior em tumores. Além disso, é provável que a célula

tumoral tenha a expressão de catalase reduzida para que o H₂O₂ possa atuar como sinalizador da situação de estresse oxidativo existente. De fato, foi relatado que este mecanismo está relacionado com a resistência do tumor à hipóxia, o que estaria ligado à invasividade do mesmo (ENNS; LADIGES, 2012). Em condições de hipóxia, a mitocôndria da célula tumoral aumenta a produção de O₂⁻, sendo o mesmo rapidamente convertido em H₂O₂. Este, por sua vez, pode facilmente atravessar membranas celulares e atuar como um sinalizador para outros compartimentos e células. Neste sentido, sabe-se que o H₂O₂ estabiliza um fator que leva à transcrição de genes que promovem o crescimento do tumor nestas condições inóspitas (CHI *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi verificado que os parasitos modificados com catalase apresentam uma redução significativa nos níveis de TR em relação aos selvagens (**Figura 17C**). Uma vez que a enzima TR está envolvida indiretamente no metabolismo de H₂O₂, faz sentido que os parasitos que expressam catalase tenham a expressão desta enzima diminuída, para evitar que todo o H₂O₂ seja dismutado. Como já demonstrado, níveis basais de H₂O₂ estão relacionados a um aumento na proliferação de *T. cruzi* (FINZI *et al.*, 2004).

Neste sentido, já foi demonstrado que a exposição de epimastigotas de *T. cruzi* ao H₂O₂ induz um aumento nos níveis de cTXNPx, o que possivelmente reflete uma tentativa de promover a detoxificação celular (FINZI *et al.*, 2004). Outro trabalho do mesmo grupo mostrou que o tratamento de tripomastigotas de *T. cruzi* com concentrações crescentes de H₂O₂ está relacionado a modulações nos níveis de cTXNPx e mTXNPx de maneira dose-dependente (GADELHA *et al.*, 2013). Verificamos que o tratamento com H₂O₂ aumentou significativamente os níveis de TR dos parasitos selvagens, mas não dos parasitos modificados com catalase. Tal fato sugere, mais uma vez, que a expressão heteróloga de

catalase em *T. cruzi* modifica a capacidade do parasito em sinalizar o estresse oxidativo ao qual é exposto.

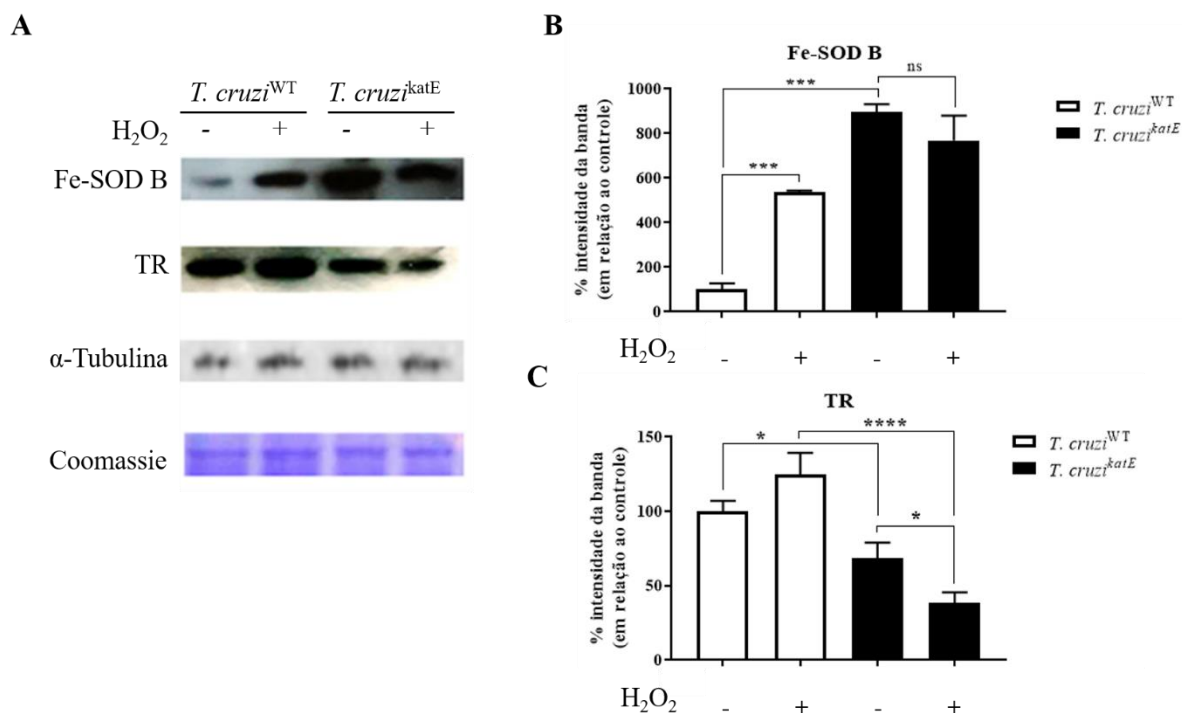


Figura 17: A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* aumenta os níveis de Fe-SOD B e reduz os níveis de TR. (A) Extratos proteicos de epimastigotas de *T. cruzi* selvagens (*T. cruzi*^{WT}) e transfectados com o gene da catalase (*T. cruzi*^{katE}) na fase exponencial foram preparados, quantificados e submetidos à eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE). Alternativamente, os parasitos foram incubados ou não com 100 μM de H₂O₂ por 20 minutos em PBS. As enzimas antioxidantes Fe-SOD B e TR foram reconhecidas nestes extratos por *Western Blotting* usando anticorpos específicos. As bandas obtidas foram normalizadas de acordo com as bandas marcadas pelo anticorpo anti-α-tubulina. O gel de Coomassie foi utilizado para avaliar a qualidade do extrato. A plotagem dos gráficos com a densitometria das bandas foi feita padronizando o valor obtido para o WT como 100%. Os resultados foram expressos em gráficos para cada enzima: Fe-SOD (B) e TR (C). O símbolo asterisco (*) refere-se às diferenças estatísticas significativas em relação ao WT (*p<0,05, ***p<0,001 e ****p<0,0001: teste *One-way* ANOVA, pós-teste Bonferroni, n=3).

4.7 O tratamento de macrófagos com o antioxidante catalase reduz o parasitismo de *T. cruzi* modificado com MutT

A internalização de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por macrófagos resulta na ativação da NADPH oxidase e na consequente produção de EROs (ALVAREZ *et al.*, 2011; BERGERON *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2012). Indo ao encontro deste resultado, a produção de tais espécies reativas não foi detectada em macrófagos Phox KO ou tratados com apocinina, um inibidor de NOX2 (GOES *et al.*, 2016).

Diversos autores têm demonstrado que a geração de estresse oxidativo resultante da infecção de macrófagos por *T. cruzi* poderia estimular o processo de infecção pelo parasito. Neste sentido, a habilidade dos macrófagos ativados em controlar o crescimento de *T. cruzi* *in vitro* (NOGUEIRA; COHN, 1978; REED *et al.*, 1987) e *in vivo* (NATHAN; NOGUEIRA; JUANGBHANICH, 1979) foi relacionada à produção de H₂O₂. Além disso, Paiva e colaboradores sugeriram que o estresse oxidativo gerado em resposta a infecção com a cepa Y de *T. cruzi* contribua para a manutenção da alta carga parasitária em macrófagos (PAIVA *et al.*, 2012). Evidências recentes mostram que o peroxinitrito, produto de reações do NO com EROs, é um mediador de morte deste parasito (ALVAREZ *et al.*, 2011).

Dada a relação da produção de EROs com o processo de infecção de macrófagos por *T. cruzi*, realizamos ensaios de infecção de macrófagos após os mesmos serem tratados com o antioxidante catalase. Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Grazielle Alves Ribeiro, do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (UFMG). Além da infecção com parasitos selvagens e modificados com o gene da catalase, os macrófagos foram infectados com parasitos que expressam a enzima MutT de *E. coli*.

Como sugerido por um trabalho prévio do nosso grupo, parasitos modificados com esta enzima sinalizam melhor o estresse oxidativo (AGUIAR *et al.*, 2013).

Neste ensaio, foi observado que a expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* aumenta a proliferação do parasito em macrófagos. Além disso, foi verificado que o tratamento dos macrófagos com catalase reduz a proliferação de parasitos modificados com MutT (**Figura 18**). Como verificado por Nogueira *et al.* (2015), o tratamento com antioxidantes reduziu o número de parasitos, ao passo que os tratamentos com os oxidantes H₂O₂ e paraquat (gerador de O₂^{•-}) aumentaram este número (NOGUEIRA *et al.*, 2015). Em conjunto, tais dados reforçam a hipótese de que um sinal oxidante é necessário para a proliferação do *T. cruzi*.

4.8 A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* promove um aumento na parasitemia de camundongos

Linhagens diferentes de *T. cruzi* apresentam níveis variados de virulência, o que seria refletido na parasitemia desenvolvida em animais infectados. Estudos sugerem que haja uma correlação direta entre o nível de expressão das enzimas antioxidantes mTXNPx, cTXNPx e TS e a parasitemia desenvolvida nos camundongos infectados com diferentes linhagens (PIACENZA *et al.*, 2009).

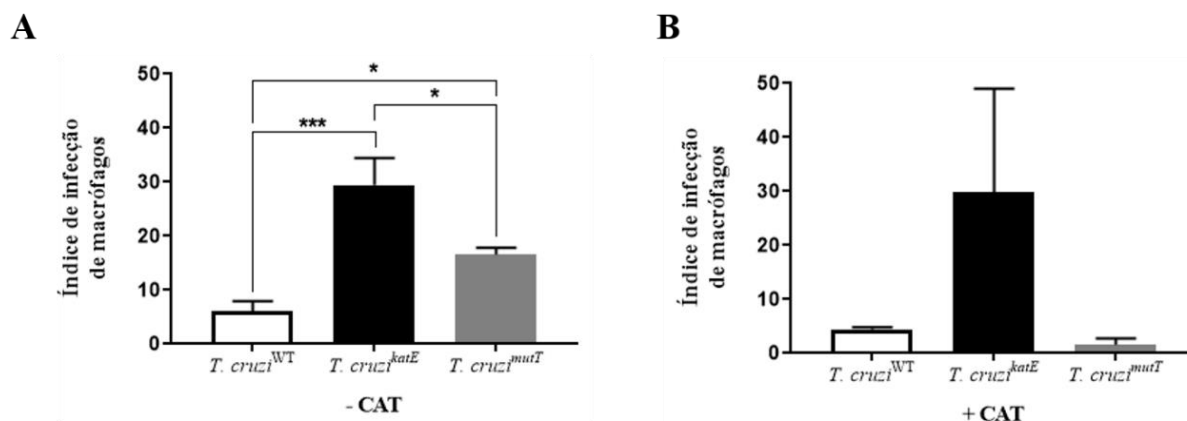


Figura 18: Infecção de macrófagos na presença ou ausência de catalase. Macrófagos inflamatórios foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 WT quatro dias após a injeção de tioglicolato e infectados com parasitos selvagens (*T. cruzi*^{WT}), modificados com catalase (*T. cruzi*^{katE}) e com MutT (*T. cruzi*^{MutT}). Alternativamente, os macrófagos foram tratados com o antioxidante catalase (CAT) antes da infecção (B). Após a infecção, as células foram lavadas para remover os parasitos não internalizados e incubadas novamente em meio de cultivo por 72 horas. As lâminas foram fixadas, coradas e quantificadas para a determinação do índice de infecção, o qual é uma relação entre o número de macrófagos infectados (MI) e amastigotas (A) pelo número total de macrófagos (MT) [(A x MI/MT)]. O símbolo asterisco (*) refere-se às diferenças estatísticas significativas entre os grupos (*p<0,01 e ***p<0,001: teste *t* de Student, n=3).

Após termos verificado que os parasitos modificados com catalase exibiram variações nos níveis de importantes enzimas antioxidantes, decidimos averiguar se a expressão de catalase estaria relacionada a variações na parasitemia de camundongos infectados com estas células. Para tanto, camundongos foram infectados com parasitos selvagens, modificados com o gene da catalase ou superexpressores de MTH (homólogo de MutT em *T. cruzi*). Os ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Grazielle Alves Ribeiro, do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (UFMG).

Foi observado que camundongos infectados com parasitos que expressam catalase apresentam um aumento significativo na parasitemia em relação àqueles infectados com

parasitos selvagens. Porém, este aumento foi menor do que o observado em camundongos infectados com parasitos superexpressores de MTH. Esta diferença foi mais proeminente no 5º dia de infecção, quando os camundongos infectados por parasitos modificados com catalase tiveram uma parasitemia 4,11 vezes maior do que aqueles infectados com parasitos selvagens. Sobre os animais infectados com parasitos superexpressores de MTH, a parasitemia observada foi 10,02 vezes maior em relação aos parasitos selvagens (Figura 19).

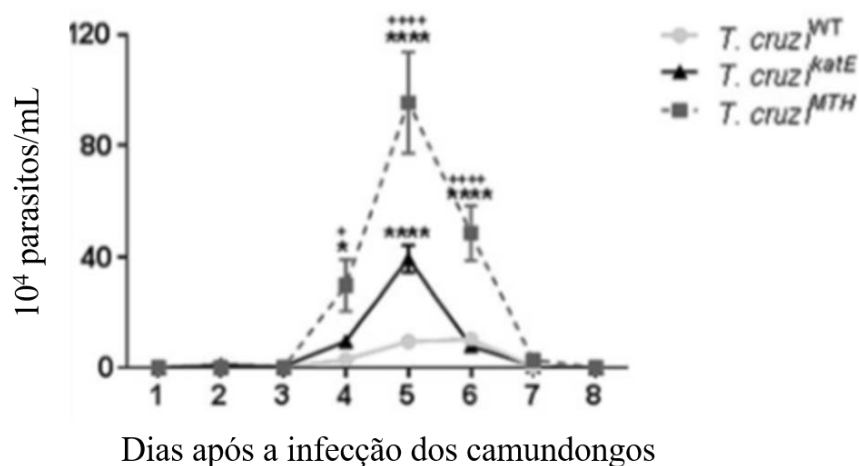


Figura 19: A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* promove um aumento na parasitemia de camundongos. Tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* modificados com *katE* (Catalase), superexpressores de MTH (MTH) e selvagens (WT) foram utilizados em um ensaio de infecção de camundongos C57BL/6 (n=5). A parasitemia dos animais foi avaliada por meio da contagem de tripomastigotas no sangue da veia caudal. O símbolo asterisco (*) refere-se às diferenças estatísticas significativas em relação ao controle WT (* p<0,05, ****p<0,0001: teste *Two-way* ANOVA, pós-teste Bonferroni, n=5).

De acordo com Aguiar *et al.* 2013, o comportamento diferencial da cepa superexpressora de MTH estaria relacionado ao aumento na geração de 8-oxo-dGMP, o qual poderia servir como um sinal para uma resposta adaptativa do parasito ao estresse oxidativo (AGUIAR *et al.*, 2013). A parasitemia aumentada em animais infectados com parasitos superexpressores de MTH em relação aos infectados com parasitos modificados

com catalase sugere que, para o *T. cruzi*, é mais importante ser eficiente em sinalizar o estresse oxidativo do que ser propriamente mais resistente ao estresse, como os parasitos modificados com catalase. Mais uma vez, nossos dados sugerem a importância da sinalização do estresse oxidativo durante o ciclo de vida do *T. cruzi*.

4.9 A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* promove um aumento na proliferação do parasito no hospedeiro invertebrado

O primeiro ambiente encontrado pelo *T. cruzi* após a sua ingestão pelo hospedeiro invertebrado é o intestino médio do inseto. Neste local, grandes quantidades de hemoglobina são degradadas, o que resulta em uma alta liberação de heme, uma molécula conhecida por aumentar a formação de EROs (RYTER; TYRRELL, 2000). Uma vez que o *T. cruzi* também está exposto ao estresse oxidativo no hospedeiro invertebrado, iniciamos estudos para averiguar como os parasitos que expressam catalase se comportariam neste meio.

Para tanto, ninfas de *R. prolixus* foram alimentadas com sangue contendo parasitos selvagens ou modificados com o gene da catalase. Trinta dias após a infecção, os insetos tiveram o intestino dissecado para a contagem do número de parasitos. Neste ensaio, foi verificado que os insetos infectados com parasitos que expressam catalase apresentaram 5,46 vezes mais parasitos no intestino do que aqueles infectados com parasitos selvagens (**Figura 20**). O fato de *T. cruzi* modificado com catalase proliferar significativamente mais no intestino do hospedeiro invertebrado, aliado a presença de catalase em tripanossomatídeos monoxênicos, como *C. fasciculata*, sugere que, neste ambiente, a resistência ao estresse oxidativo seja mais importante do que a capacidade de sinalizá-lo.

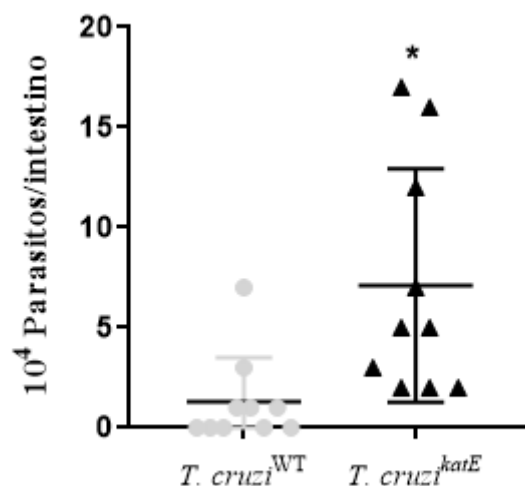


Figura 20: A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* aumenta a proliferação deste parasito no hospedeiro invertebrado. Epimastigotas de *T. cruzi* modificados selvagens (*T. cruzi*^{WT}) e modificados com o gene da catalase (*T. cruzi*^{katE}) foram utilizados em um ensaio de infecção de ninfas do 5º estágio de *Rhodnius prolixus* (n=30). Trinta dias após a infecção, os insetos tiveram o intestino dissecado para a contagem do número de parasitos. O símbolo asterisco (*) refere-se à diferença estatística significativa (** p<0,01: teste *t* de Student, n=3).

4.10 Tripanossomatídeos e a enzima catalase

A família Trypanosomatidae é taxonomicamente distribuída em 10 gêneros: seis que abrigam parasitos monoxênicos de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Wallaceina* e *Sergeia*), um que abriga parasitos heteroxênicos de insetos e plantas (*Phytomonas*) e os gêneros heteroxênicos *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*, os quais abrigam espécies de importância médica e veterinária e que parasitam insetos e vertebrados (MERZLYAK *et al.*, 2001; SVOBODOVÁ *et al.*, 2007; WALLACE, 1966).

A fronteira entre as espécies monoxênicas e heteroxênicas não é impenetrável. Neste sentido, sabe-se que alguns tripanossomatídeos monoxênicos podem resistir às altas temperaturas encontradas nos vertebrados de sangue quente (KRAEVA *et al.*, 2015;

ROITMAN *et al.*, 1976). Além disso, foi proposto recentemente que algumas espécies monoxênicas são heteroxênicas facultativas quando as condições são favoráveis a esta alteração no seu ciclo de vida (DEDET; PRATLONG, 2000; FERREIRA; BORGES, 2002). De fato, várias espécies monoxênicas já foram encontradas coinfectando vertebrados ao mesmo tempo em que o HIV, o *T. cruzi* e espécies de *Leishmania* (DEDET; PRATLONG, 2000; FERREIRA; BORGES, 2002; ROSENTHAL *et al.*, 2000).

Hipóteses filogenéticas baseadas em marcadores moleculares, dados biogeográficos e paleontológicos tentam explicar se os tripanossomatídeos tiveram insetos ou vertebrados como primeiros hospedeiros. Diferentes estudos sugerem que a adoção do ciclo de vida heteroxênico surgiu independentemente várias vezes ao longo da evolução destes parasitos. Análises filogenéticas recentes de dois diferentes grupos de tripanossomatídeos têm gerado hipóteses que permitiram sugerir que um kinetoplastídeo ancestral de vida livre possa ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao *habitat* intestinal, originando os tripanossomatídeos monoxênicos. Com a aquisição da hematofagia, insetos passaram a inocular estes parasitas em vertebrados e, os que se adaptaram ao parasitismo passaram, então, a circular entre insetos hematófagos e vertebrados terrestres, originando as espécies heteroxênicas (HAMILTON, PATRICK B. *et al.*, 2004; SIMPSON, ALASTAIR G B; STEVENS; LUKEŠ, 2006; SIMPSON, L. *et al.*, 1980; STEVENS, 2008).

O gene de catalase é um componente virtualmente ubíquo dos genomas eucarióticos. Isto inclui os tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae, os quais provavelmente adquiriram a enzima por meio de uma transferência horizontal de genes de bactéria. Entretanto, como proposto recentemente, o gene da catalase foi secundariamente perdido do genoma de todas as espécies de *Leishmania* sequenciadas até o momento (FLEGONTOV *et al.*, 2016) (**Figura 21**).

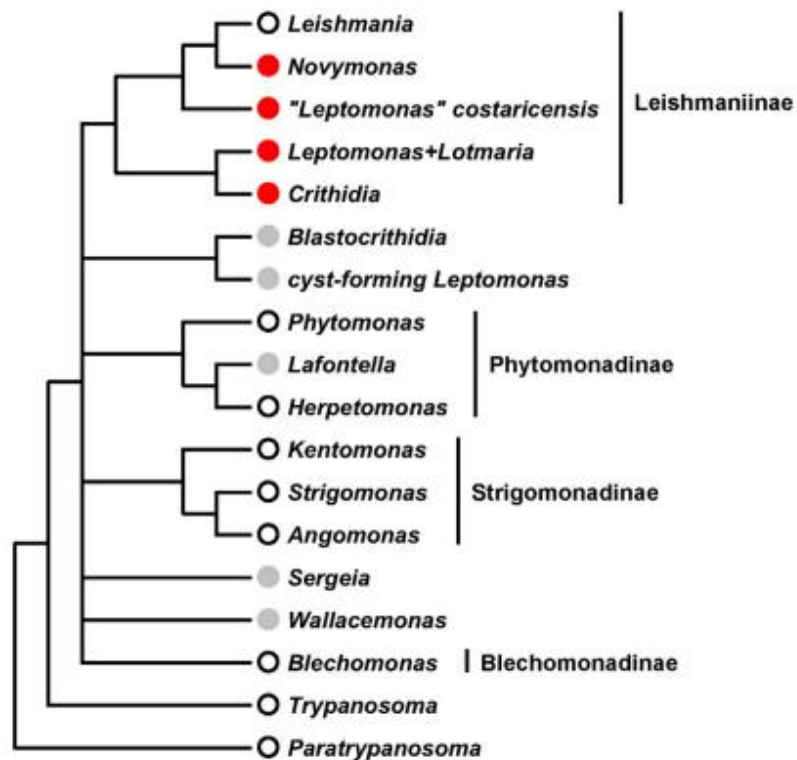


Figura 21: Árvore filogenética esquemática mostrando a distribuição de catalase nos tripanossomatídeos. Círculos vermelhos: catalase presente. Círculos vazios: catalase ausente. Círculos cinzas: não considerado (KRAEVA *et al.*, 2016).

Devido ao potencial regulatório do H_2O_2 no ciclo das espécies de *Leishmania*, tal perda parece ter sido um pré-requisito necessário para o surgimento do complexo ciclo de vida deste importante patógeno humano (KRAEVA *et al.*, 2016). Estudos realizados com *L. amazonensis* demonstraram que, em condições de baixa disponibilidade de ferro, promastigotas ativam a expressão do transportador de ferro LIT1 (do inglês *Leishmania iron transporter 1*) e aumentam a captação de ferro, condição necessária para o processo de diferenciação. O aumento na expressão de LIT1 resulta em um aumento na atividade da enzima Fe-SOD, acúmulo de H_2O_2 , parada do crescimento e início da diferenciação de promastigotas em amastigotas (MITTRA *et al.*, 2013). Além disso, parasitos *L. chagasi*, incubados previamente com concentrações subletais de menadiona e H_2O_2 ,

apresentaram posteriormente uma resposta mais efetiva ao estresse oxidativo, tornando-se mais resistentes aos efeitos tóxicos do H₂O₂ e mais virulentos em camundongos BALB/c (WILSON; ANDERSEN; BRITIGAN, 1994).

Corroborando estes resultados, um trabalho realizado com *L. amazonensis* demonstrou que a inibição da produção de EROs pelo tratamento com o antioxidante NAC reduziu a carga parasitária da pata e de linfonodos de camundongos BALB/c infectados. Os autores, entretanto, associaram a morte dos parasitos com o aumento dos níveis de GSH, que poderiam induzir a produção de NO em macrófagos, culminando com a morte dos parasitos (MONTEIRO *et al.*, 2008). Juntos, estes dados sugerem que o H₂O₂ poderia atuar diretamente como uma molécula sinalizadora na diferenciação de *Leishmania*.

Uma função importante do H₂O₂ como molécula sinalizadora também foi recentemente demonstrada em *T. cruzi*. A exposição prévia de epimastigotas a baixas concentrações de H₂O₂ é capaz de fazer com que estes parasitos sejam mais resistentes ao tratamento com concentrações mais altas de H₂O₂ (FINZI *et al.*, 2004). Além disso, estudos sugerem que o grupo prostético heme induza uma condição transitória de estresse oxidativo, a qual estimula o crescimento de epimastigotas por meio de um mecanismo associado à quinase dependente cálcio/calmodulina II CaMKII (NOGUEIRA *et al.*, 2011; LARA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2009). Neste sentido, foi verificado que, durante a infecção de *T. cruzi* em macrófagos, o estresse oxidativo gerado pela explosão respiratória poderia estimular a infecção (PAIVA *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi mostrado que inibidores de EROs diminuem a proliferação do *T. cruzi* em macrófagos, mas, por outro lado, o tratamento dos macrófagos com H₂O₂ é capaz de aumentar a replicação dos parasitos nestas células (GOES *et al.*, 2016).

Assim como observado em *T. cruzi*, o sistema antioxidante dos tripanossomatídeos *T. brucei* e de espécies de leishmanias também não inclui a enzima catalase (BERRIMAN *et al.*, 2005; EL-SAYED *et al.*, 2005; IVENS *et al.*, 2005). Tais parasitos, além de infectarem hospedeiros invertebrados, são conhecidos por infectarem vertebrados, inclusive o homem. Porém, *C. fasciculata*, um parasito que infecta apenas o hospedeiro invertebrado, está entre as exceções de tripanossomatídeos que apresentam um sistema antioxidante do qual a enzima catalase faz parte (ALCOLEA *et al.*, 2014).

O fato de *T. cruzi* modificado com catalase proliferar mais no intestino do hospedeiro invertebrado em relação aos parasitos selvagens, aliado a presença de catalase em tripanossomatídeos monoxênicos e aos estudos anteriormente mencionados sugere que, no hospedeiro invertebrado, a enzima catalase seria importante no processo de combate ao estresse oxidativo. Porém, no hospedeiro vertebrado, a enzima catalase poderia dificultar a atuação do H₂O₂ como uma molécula sinalizadora, uma vez que já tendo sido sugerido que esta molécula já se encontra em níveis reduzidos neste ambiente (MUELLER; RIEDEL; STREMMEL, 1997).

Neste trabalho, mostramos que parasitos modificados com a enzima catalase são mais resistentes ao estresse oxidativo. Porém, estas células apresentam uma capacidade reduzida de adaptação a esta condição. Nossa hipótese é que a expressão de catalase reduza a capacidade do parasito de sinalizar o estresse oxidativo ao evitar que o H₂O₂ atue como uma molécula sinalizadora desta condição.

Existem mecanismos bem descritos em bactérias nos quais as EROs ativam diretamente fatores de transcrição para a adaptação ao estresse (KILEY; STORZ, 2004). Um destes exemplos é o do fator de transcrição OxyR, o qual está relacionado ao aumento da proteção contra peróxidos em *E. coli* e em várias outras bactérias. OxyR contém dois resíduos críticos de cisteína que, ao serem oxidados, formam uma ligação dissulfídica

intramolecular quando as células são expostas a peróxidos (ZHENG; ASLUND; STORZ, 1998). A formação desta ligação dissulfídica promove mudanças conformacionais que alteram a ligação de OxyR ao DNA e permite a ativação da transcrição de genes que codificam enzimas que metabolizam H₂O₂, como a catalase. Uma vez que a concentração de H₂O₂ está diminuída, OxyR é reduzido e o sistema é reestabelecido (HAUSLADEN *et al.*, 1996).

Nos parasitos que expressam catalase, os níveis aumentados de H₂O₂ após a exposição a esta substância estão provavelmente relacionados a alterações nos níveis de enzimas antioxidantes, como Fe-SOD B e TR. Além disso, verificamos que o tratamento de macrófagos com o antioxidante catalase resultou na redução da proliferação de parasitos superexpressores de MutT, sugerindo mais uma vez a importância do H₂O₂ no processo de sinalização do estresse oxidativo.

Posteriormente, verificamos que camundongos infectados com parasitos que expressam catalase exibem uma parasitemia aumentada em relação àqueles infectados com parasitos selvagens. Porém, ambos os valores de parasitemia obtidos foram menores do que àquele apresentado por parasitos superexpressores de MutT, evidenciando a importância da sinalização do estresse oxidativo neste meio. Por fim, mostramos que a expressão de catalase em *T. cruzi* aumenta a capacidade deste parasito em proliferar no intestino do hospedeiro invertebrado, sugerindo uma grande importância em resistir ao estresse oxidativo neste ambiente.

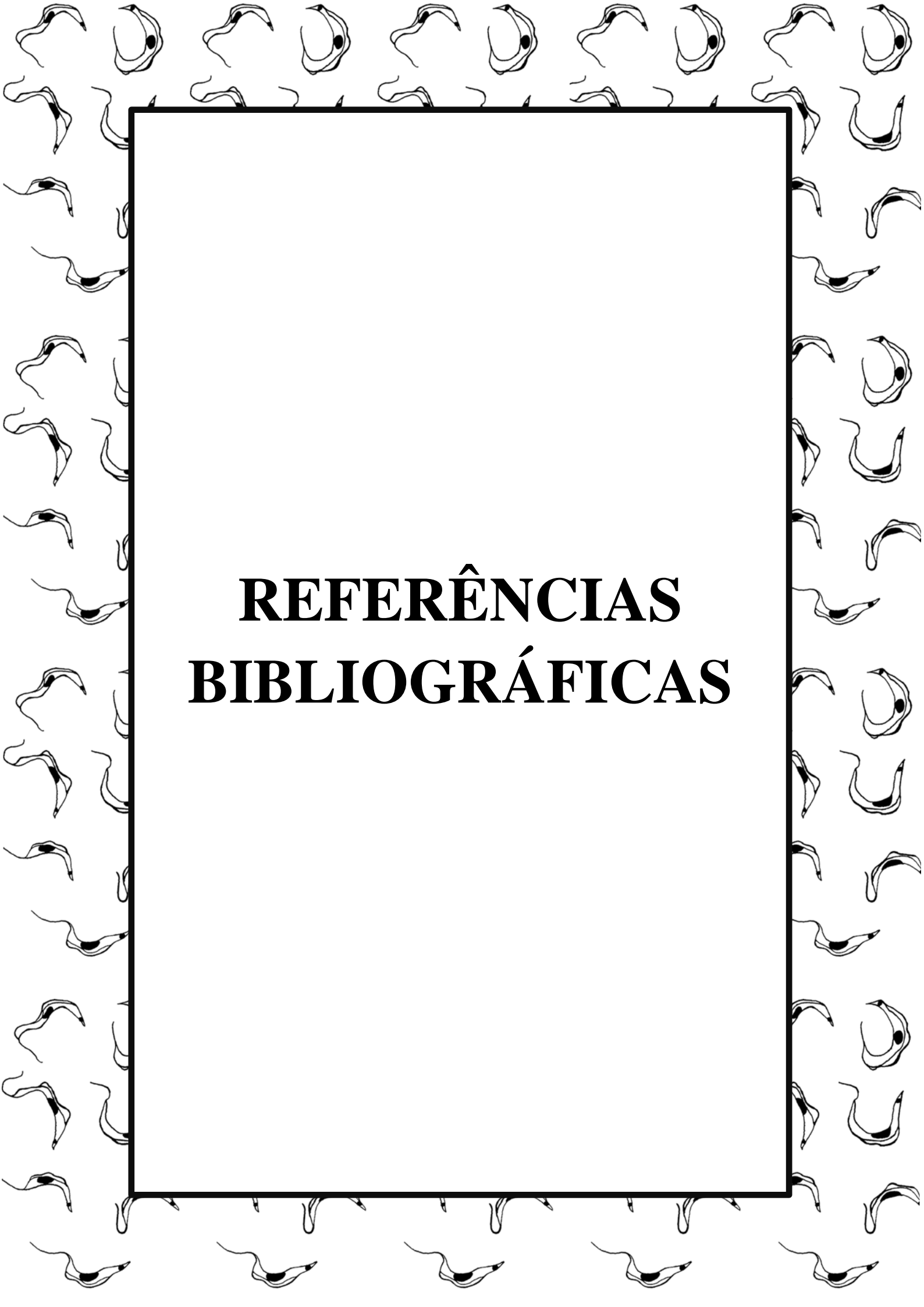
Em conjunto, nossos dados reforçam a hipótese de que o H₂O₂ apresenta um papel importante no processo de sinalização do estresse oxidativo em *T. cruzi*. Neste sentido, sugerimos que, embora a expressão heteróloga de catalase aumente a resistência do parasito ao estresse oxidativo, a ausência desta enzima em *T. cruzi* seria importante para que o mesmo possa sinalizá-lo de forma mais eficiente.



CONCLUSÃO

Conclusão

- A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* aumentou a resistência do parasito ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂, porém, reduziu a sua capacidade de adaptação a uma baixa concentração desta substância.
- A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* foi relacionada a um aumento nos níveis extracelulares de H₂O₂ após exposição a esta substância, o qual poderia estar relacionado ao aumento dos níveis de expressão de Fe-SOD B e redução dos níveis de TR.
- Camundongos infectados com parasitos que expressam catalase exibiram uma parasitemia reduzida em relação àqueles infectados com parasitos superexpressores de MutT, evidenciando a importância da sinalização do estresse oxidativo neste meio.
- A expressão heteróloga de catalase em *T. cruzi* aumentou a proliferação destes parasitos no intestino do hospedeiro invertebrado, sugerindo a importância da resistência ao estresse oxidativo neste ambiente.

A decorative border of stylized fish or aquatic creatures, possibly loaches, surrounds the central text. The fish are drawn in a simple, line-art style with some black shading on their bodies. They are arranged in a repeating pattern along the top, bottom, and sides of the page.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

ABRAMOFF, M.D., MAGALHAES, P.J., RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, n. 11, v. 7, p. 36-42, 2004.

ADROHER, F. J.; LUPINEZ, J. A.; OSUNA, A. Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differentiation*, v. 22, n. 2, p. 165–170, 1988.

AFT, R. L.; MUELLER, G. C. Hemin-mediated DNA strand scission. *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 12069–12072, 1983.

AGUIAR, P. H. N. *et al.* Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 6, p. :e2279, 2013.

ANDRADE, H. M. *et al.* Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *Journal of Proteome Research*, v. 7, p. 2357–2367, 2008.

ANDRADE, O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 200, p. 1135–1143, 2004.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature reviews. Microbiology*, v. 3, p. 819–823, 2005.

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 4, p. 243-253, 2010.

ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 3, p. 257–266, 2011.

ÅSLUND, L. *et al.* A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 65, p. 317–330, 1994.

ATWOOD, J. A. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, v. 309, p. 473–476, 2005.

AUGUSTO-PINTO, L. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. *Genetics*, v. 164, n. 1, p. 117–126, 2003.

BANNISTER, J.; BANNISTER, W.; ROTILIO, G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem*, v. 22, n. 2, p. 111–180, 1987.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *The New England journal of medicine*, v. 364, p. 2527–2534, 2011.

BERRIMAN, M. *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, v. 309, p. 416–422, 2005.

BONNET, B. E. *et al.* Trypanothione reductase inhibition/trypanocidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine series. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 95–103, 2000.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*, v. 21, p. 11, 2014.

BRADFORD, M. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAVO, J. *et al.* Crystal structure of catalase HPII from *Escherichia coli*. *Structure*, v. 3, p. 491–502, 1995.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*, v. 4, p. 389-96, 1962.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 1, p. 35–44, 2000.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111, n. 1, p. 95–105, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 11, p. 1218–1226, 2001.

BURDON; GILL; RICE-EVANS. Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun.*, v. 7, n. 3-6, p. 149–59, 1989.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 5, p. 419-427, 2003.

CAMPOS, P. C. *et al.* Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, v. 38, p. 1383–1389, 2008.

CHAGAS, C.. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, n.2, 1909.

CHI, J. *et al.* Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS medicine*, v. 3, n. 3, p. 47, 2006.

CHIBALE, K.; MUSONDA, C. C. The synthesis of parasitic cysteine protease and trypanothione reductase inhibitors. *Current medicinal chemistry*, v. 10, p. 1863–1889, 2003.

CLAIBORNE, A.; FRIDOVICH, I. Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalytic and peroxidatic activities. *Journal of Biological Chemistry*, v. 254, p. 4245–4252, 1979.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO Journal*, v. 15, n. 21, p. 1881–1888, 2002.

CONTRERAS, V. T. *et al.* Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, n. 1, p. 123–133, 1988.

CONTRERAS, V. T. *et al.* *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 16, n. 3, p. 315–327, 1985.

CORPET. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 2014.

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

CZECH, M. P. Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and deactivation of the fat cell hexose transport system. *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 1164–1170, 1976.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews*, v. 8, p. 813–824, 2007.

DAROCHA, W. D. *et al.* Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: Improving vectors and electroporation protocols. *Parasitology Research*, v. 92, p. 113–120, 2004.

DAVIES, J. M.; LOWRY, C. V.; DAVIES, K. J. Transient adaptation to oxidative stress

in yeast. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 317, p. 1-6, 1995.

DE FREITAS, J. M. *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, v. 2, p. 226–235, 2006.

DEMPLE, B.; HALBROOK, J. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*, v. 304, n. 5925, p. 466–468, 1983.

DÍAZ DE TORANZO, E. G. *et al.* Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, v. 44, p. 880–881, 1988.

DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature reviews. Microbiology*, v. 3, p. 251–261, 2005.

DUFERNEZ, F. *et al.* The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 40, p. 210–225, 2006.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v. 309, p. 409–415, 2005.

ENNS, L.; LADIGES, W. Mitochondrial redox signaling and cancer invasiveness. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, v. 44, n. 6, p. 635-638, 2012.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 126, p. 283–291, 2010.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 14, p. 187–198, 1985.

FÁREZ-VIDAL, M. E *et al.* Characterization of uracil-DNA glycosylase activity from

Trypanosoma cruzi and its stimulation by AP endonuclease. *Nucleic acids research*, v. 29, p. 1549–1555, 2001.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, p. 755–759, 1987.

FINZI, J. K *et al.* *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 133, n. 1, p. 37–43, 2004.

FLOHÉ, L.; HECHT, H. J.; STEINERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, n. 9, p. 966-984, 1999.

FLOHÉ, L.. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 302, v. 4, p. 216-220, 2012.

FURTADO, C. *et al.* Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, e42484, 2012.

GARCIA, E.S. *et al.* Feeding of *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *Academia Brasileira de Ciências*, v. 47, n. 3-4, p. 537-45, 1975.

GARCIA, E. S. *et al.* Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 10, p. 499-505, 2010.

GOMES; ARAUJO; CHIARI. *Trypanosoma cruzi*: growth of clones on solid medium using culture and blood forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 86, n. 1, p. 131–132, 1991.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Z. *et al.* Metabolic control analysis of the *Trypanosoma cruzi* peroxide detoxification pathway identifies tryparedoxin as a suitable drug target. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1850, n. 2, p. 263–273, 2015.

GRAÇA-SOUZA, A. V. *et al.* Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 36, n. 10, p. 322-335, 2006.

GRISARD, E. C. *et al.* Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: An Overview. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 203–209, 1999.

GUPTA, S.; WEN, J; GARG, N. J. Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. Interdiscip Perspect Infect Dis*, v. 2009:190354, 2009.

GUTTERIDGE, J. M.; SMITH, A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *The Biochemical journal*, v. 256, p. 861–865, 1988.

HAMILTON, C. J. *et al.* Benzofuranyl 3,5-bis-polyamine derivatives as time-dependent inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 3683–3693, 2003.

HAUSLADEN, A. *et al.* Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell*, v. 86, n. 5, p. 719–29, 1996.

HOTEZ, P. J. *et al.* Chagas disease: “The new HIV/AIDS of the Americas”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, 2012.

IRIGOÍN, F. *et al.* Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, n. 6, p. 733-742, 2008.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, v. 309, p. 436–442, 2005.

KIERSZENBAUM; KNECHT; BUDZKO. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.*, v. 112, n. 5, p. 1839–44., 1974.

KILEY, P. J.; STORZ, G. Exploiting thiol modifications. *PLoS Biology*, v. 16, n. 11, e400, 2004.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today*, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 1, p. 23-30, 2011.

KRASSNER, S. M. *et al.* Further studies on substrates inducing metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of protozoology*, v. 37, n. 2, p. 128–132, 1990.

KROPF, S. P.; SÁ, M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *História, ciências, saúde-Manguinhos*, v. 16 n. 1, p. 13–34, 2009.

KUMAR; ALI; BAWA. Mini review on tricyclic compounds as an inhibitor of trypanothione reductase. *J Pharm Bioallied Sci.*, v. 6, n. 4, p. 222–228, 2014.

LARA, F. A. *et al.* Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 355, n. 1, p. 16–22, 2007.

LOEW. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*, v. 11, n. 279, p. 701–702, 1900.

LOEWEN, P. C *et al.* Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology*, v. 44, n. 8, p. 707–17, 1998.

LOEWEN, P. C; SWITALA, J. Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry and cell biology*, v. 64, p. 638–646, 1986.

LOEWEN, P. C.; SWITALA, J; TRIGGS-RAINE, B. L. Catalases HPI and HPII in

Escherichia coli are induced independently. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 243, p. 144–149, 1985.

LOPES, D. O. *et al.* Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. *DNA repair*, v. 7, p. 1882–1892, 2008.

MACEDO, A. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 14, n. 13, p. 119-124, 2004.

MACHADO, C. A; AYALA, F. J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 7396–7401, 2001.

MAYA, J. D. *et al.* Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biological Research*, v. 43, p. 323–331, 2010.

MAYA, J. D. *et al.* Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Biological Research*, v. 37, p. 61–69, 2004.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *BioMed Research International*, v. 2014: 614014, 2014.

MITTRA, B.; ANDREWS, N. W. IRONY OF FATE: Role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation. *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 10, p. 489-496, 2013.

MORENO, S. N. *et al.* Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 218, p. 585–591, 1982.

NOGUEIRA, N. P. A. *et al.* Heme-Induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CamkII-Like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, 2011.

MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology*, v. 116, p. 165–171, 1998.

MURTA, S. M. F. *et al.* Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 146, p. 151–162, 2006.

NOGUEIRA, F. B. *et al.* Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Tropica*, v. 100, p. 119–132, 2006.

NOGUEIRA, F. B. *et al.* 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.

NOGUEIRA, F. B. *et al.* The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of *Trypanosoma cruzi* and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 494–502, 2012.

NOGUEIRA, N. P. *et al.* Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: Redox status. *PLoS ONE*, v. 10, n. 2, 2015.

NOVO, E.; PAROLA, M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair*, v. 1, n. 1, p. 5, 2008.

OSUNA, A.; ADROHER, F. J.; LUPINEZ, J. A. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differentiation and Development*, v. 30, n. 2, p. 89–95, 1990.

OZA, S. L. *et al.* A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 35853–35861, 2002.

PAIVA, C, N. *et al.* Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of clinical investigation*, v. 122, p. 2531–42, 2012.

PASSOS-SILVA, D. G. *et al.* Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *Journal of Nucleic Acids*, v. 2010: 840768, 2010.

PAULIN, J. J. The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 66, p. 404–413, 1975.

PÉREZ, J. *et al.* Apurinic/aprimidinic endonuclease genes from the trypanosomatidae *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* confer resistance to oxidizing agents in DNA repair-deficient *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 3, p. 771–777, 1999.

PIACENZA, L. *et al.* *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, n. 7, p. 723-34, 2012.

PIACENZA, L. *et al.* Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 415-421, 2009.

PIACENZA, L. *et al.* Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *The Biochemical journal*, v. 403, p. 323–334, 2007.

PIACENZA, L. *et al.* Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical journal*, v. 410, p. 359–368, 2008.

PICARDO, M. *et al.* Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal

melanocytes from patients with melanoma. *The Journal of investigative dermatology*, v. 107, n. 3, p. 322–6, set. 1996.

PIÑEYRO, M. D. *et al.* Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Structural Biology*, v. 150, p. 11–22, 2005.

PIÑEYRO, M. D. *et al.* Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene*, v. 408, p. 45–50, 2008.

PONASIK, J. A. *et al.* Kukoamine A and other hydrophobic acylpolyamines: potent and selective inhibitors of *Crithidia fasciculata* trypanothione reductase. *The Biochemical journal*, v. 311, n. 2, p. 371–375, 1995.

PRATHALINGHAM, S. R. *et al.* Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodB1* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 755–758, 2007.

RAJÃO, M. A. *et al.* Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 55, p. 309–321, 2014.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388–402, 2010.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 33, p. 8–13, 2015.

REZENDE, T. M. B. *et al.* Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. *International Endodontic Journal*, v. 38, n. 12, p. 896–903, 2005.

ROBELLO, C. *et al.* Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: Molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. *Gene*, v. 246, n. 1-2, p. 331–338, 2000.

ROBERTSON, A. B. *et al.* DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, v. 66, p. 981–993, 2009.

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 28, n. 2, p. 289–309, 2000.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.*, v. 24, p. 104–108, 1977.

SHAPIRO, T. A. Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p. 7809–7813, 1993.

SIBLEY, D. L. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunological Reviews*, n. 240, v. 1, p. 72-91, 2011.

SIEGEL, T. N. *et al.* Gene expression in *Trypanosoma brucei*: Lessons from high-throughput RNA sequencing. *Trends in Parasitology*, v. 27., n. 10, p. 434-441, 2011.

SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 13, p. 8735-8741, 2014.

SIMPSON, L. *et al.* Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 6986–6993, 2000.

SIMPSON, L. *et al.* The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 29, p. 1053–1063, 1980.

SIMPSON, L. *et al.* Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA*, v. 10, p. 159–170, 2004.

SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 89–100, 2009.

SOUZA, C. F. *et al.* Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 390, n. 3, p. 541–546, 2009.

STOCO, P. H. *et al.* Genome of the Avirulent Human-Infective Trypanosome—*Trypanosoma rangeli*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 9, p. e3176, 2014.

STURM, N. R. *et al.* Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, v. 33, p. 269–279, 2003.

STURM, N. R.; CAMPBELL, D. A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v. 115, p. 35–43, 2010.

SULLIVAN, F. X.; SHAMES, S. L.; WALSH, C. T. Expression of *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase in *Escherichia coli*: overproduction, purification, and characterization. *Biochemistry*, v. 28, p. 4986–4992, 1989.

SULLIVAN, F. X.; WALSH, C. T. Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 44, p. 145–147, 1991.

TEIXEIRA, S. M.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res*, v. 2, p. 148–158, 2003.

TOMLINSON, S. *et al.* The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*, v. 110, p. 547–554, 1995.

TONELLI, R. R. *et al.* Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2 α is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, 2011.

TORO, G. C.; GALANTI, N. H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental cell research*, v. 174, p. 16–24, 1988.

TRIGGS-RAINE, B. L.; LOEWEN, P. C. Physical characterization of katG, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *Gene*, v. 52, p. 121–128, 1987.

TRIGGS-RAINE, B. L. *et al.* Nucleotide sequence of katG, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 170, p. 4415–4419, 1988.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, v. 552, p. 335–344, 2003.

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, n. 1, p. 211–220, 2004.

UCRÓS GUZMAN, H.; GRANGER, B.; KRASSNER, S. M. *Trypanosoma cruzi*: effect of pH on in vitro formation of metacyclic trypomastigotes. *Acta Tropica.*, v. 40, n. 2, p. 105–112, 1983.

VON OSSOWSKI, I.; HAUSNER, G.; LOEWEN, P. C. Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *Journal of molecular evolution*, v. 37, p. 71–76, 1993.

VON OSSOWSKI, I. *et al.* Nucleotide sequence of *Escherichia coli* katE, which encodes catalase HPII. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 514–520, 1991.

WESTENBERGER, S. J. *et al.* Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, v. 171, p. 527–543, 2005.

WHITTEN, M. M. A. *et al.* Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 37, n. 5, p. 440–452, 2007.

WIESE, A. G.; PACIFICI, R. E.; DAVIES, K. J. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 318, n. 1, p. 231-40, 1995.

WILKINSON, S. R. *et al.* Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione- dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 8220–8225, 2000.

WILKINSON, S. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 13453–13458, 2002 (a).

WILKINSON, S. R.; MEYER, DAVID J.; *et al.* The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 17062–17071, 2002 (b).

WILKINSON, S. R. *et al.* TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal*, v. 364, p. 787–794, 2002 (c).

WILKINSON, S. R. *et al.* A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, p. 5022–5027, 2008.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology*, v. 4, p. 278–286, 2008.

WOOD, R. D. *et al.* Human DNA repair genes. *Science*, v. 291, p. 1284–1289, 2001.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A.. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, v. 300, p. 650–653, 2003.

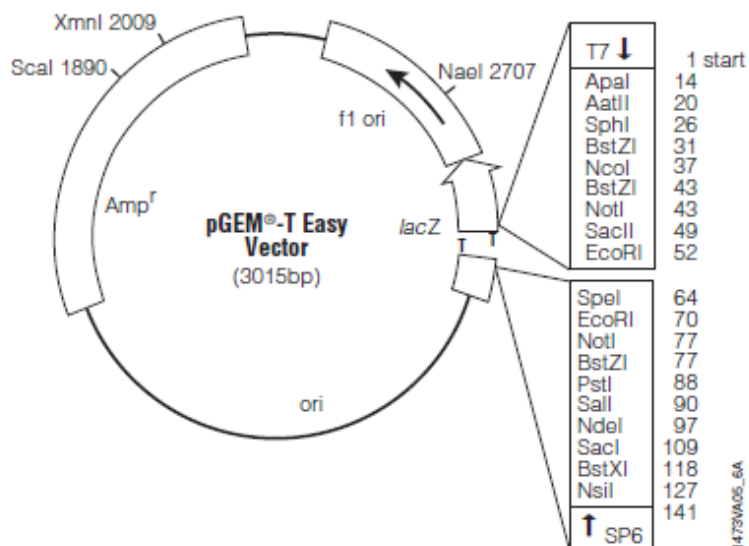
ZHENG, M.; ASLUND, F.; STORZ, G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, v. 279, p. 1718–1721, 1998.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genetics Evol.*, v. 12, n. 2., p. 240-253, 2012.

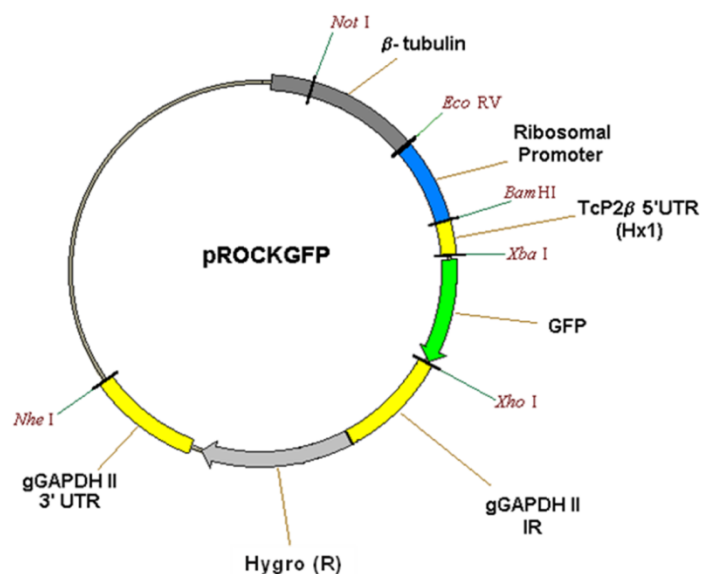


ANEXO

ANEXO



Anexo I: Mapa circular do vetor pGEM®-T Easy (Promega). Desenho esquemático do vetor pGEM-T Easy destacando características do vetor como a presença da origem de replicação (f1 ori), o gene de resistência a ampicilina (Amp^R), os promotores T7 e SP6 e os sítios de restrição flanqueando o sítio múltiplo de clonagem que localiza-se na região codificadora da enzima galactosidase. Disponível em: <http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>.



Anexo II: Mapa circular do vetor pROCK. Desenho esquemático do vetor pROCK, o qual foi utilizado neste trabalho para expressar em *T. cruzi* o um gene de interesse. O vetor possui o promotor de rRNA, que assegura um alto nível de transcrição do gene repórter e a sequência de Hx1 (derivada da região 5'UTR de TcP2 β), um sinal altamente eficiente para o processamento do mRNA por *trans-splicing*. Além disso, possui as regiões intergênicas e 3'UTR do gene GAPDH, sinais para *trans-splicing* e poliadenilação do transcrito de Hygro-R, que confere resistência a higromicina. A linearização do vetor com *NotI* permite a integração do vetor, através de recombinação homóloga, no *locus* de β -tubulina do DNA genômico do parasito. (DAROCHA *et al.*, 2004).