



**Análise proteômica da forma tripomatigota de  
uma população de *Trypanosoma cruzi*  
susceptível e outra resistente ao benzonidazol**

por

**Sara Lopes dos Santos**

Belo Horizonte

Fevereiro de 2008

---

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO RENÉ RACHOU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA FORMA TRIPOMASTIGOTA  
DE UMA POPULAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*  
SUSCEPTÍVEL E OUTRA RESISTENTE AO BENZONIDAZOL**

por

**Sara Lopes dos Santos**

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do  
Título de Mestre em Ciências na área de  
concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dr. Alvaro José Romanha

Co-orientação: Dra. Rosiane da Silva Pereira

Belo Horizonte

15 de fevereiro de 2008

“ If you look for truth, you may find comfort in the end:

if you look for comfort you will not get either comfort or truth

- only soft soap and wishful thinking to begin with and, in the end, despair”

C. S. Lewis

Dedicado aos meus pais e à memória do meu avô Francisco Lopes,  
que acreditaram que dias como esse chegariam  
mesmo antes de eu dar os primeiros passos.

Suporte financeiro:

PDTIS/Fundação Oswaldo Cruz

Instituto René Rachou/FIOCRUZ

Apoio financeiro:

FAPEMIG| Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

## AGRADECIMENTOS

Três anos atrás terminei meu trabalho de Iniciação Científica com uma lição aprendida. Agora, a mesma lição enraizou-se no meu coração, ganhou mais significado através das experiências com este trabalho: a pesquisa científica só é possível através do trabalho em equipe. À todos que participaram de alguma forma deste trabalho, minha gratidão.

Ao Deus Criador, que guardou a minha vida, e moldou meu caráter também através deste trabalho.

Ao Dr. Alvaro J. Romanha pela orientação não só neste trabalho, mas nos 6 últimos anos em que participei da pesquisa no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, por ter acreditado mais uma vez na minha capacidade, pelas eficientes doses de motivação.

À Dra. Rosiane da Silva Pereira pela orientação, amizade, paciência e dedicação, pela presença nos momentos mais difíceis.

À todos os amigos do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular pela colaboração e dedicação. Em especial à Rosana, Flávio, Fernanda B., Paula, Mairinha, Marcela e Daniel, mais que amigos se tornaram, hoje também são minha família.

À minha família, mãe, pai, Carlos e Mari, e Manú e Leandro, pelo apoio incondicional e carinho, por terem suportado minha ausência muitas vezes, por compartilharem comigo alegremente esta vitória.

Aos amigos, Fernanda F., Marcilene, Claiton e Vannessa, Éber e Fabrícia, Sandro e Chris, Marcel, Marina, Lirian, Thalita, Marielle e Elisa, pelo carinho, companhia, apoio e motivação.

À todos os amigos do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelos ótimos momentos e trocas de idéias.

Ao Dr. Guilherme Oliveira, chefe do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular e aos funcionários, Maureen, Sílvia, Dra. Ângela Volpini, Kênia e Gabriela, pela amizade e viabilização deste trabalho.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais, na pessoa do Dr. Carlos Zani, em especial à Dra. Tânia, pela colaboração.

À todos os funcionários do Instituto René Rachou pela colaboração e agradável convivência.

Ào Instituto René Rachou, na pessoa do senhor diretor Dr. Alvaro J. Romanha

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, na pessoa do senhor diretor Dr. José Geraldo de Freitas Drummond .

À Fundação Oswaldo Cruz, na pessoa do senhor diretor Dr. Paulo M. Buss.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. A Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2. Quimioterapia da Doença de Chagas	5
1.3 Resistência do <i>Trypanosoma cruzi</i> a drogas	6
1.4. Mecanismo(s) de resistência do <i>Trypanosoma cruzi</i> a drogas	7
1.5. Estudo do(s) mecanismo(s) de resistência a drogas de formas tripomastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.6. Análise proteômica de parasitos	9
1.7. Análise proteômica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Obejtivos específicos	17
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>18</b>
4.1. Populações de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19



4.2. Benzonidazol	19
4.3. Cultura das células hospedeiras das populações do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
4.4. Obtenção de tripomastigotas sanguíneos para infecção das células	20
4.5. Cultura das formas tripomastigotas <i>in vitro</i>	20
4.6. Purificação, concentração e lavagem de tripomastigotas para extração de proteínas	21
4.7. Monitoramento da contaminação de culturas de células Vero e parasitos por <i>Mycoplasma sp</i>	22
4.8. Ensaio para determinar a atividade <i>in vitro</i> do benzonidazol sobre a liberação das formas tripomastigotas das populações BZR e BZS	23
4.9. Ensaio para determinar a diferença de susceptibilidade <i>in vitro</i> ao benzonidazol de formas tripomastigotas das populações BZR e BZS utilizando o corante Alamar Blue®	24
4.9.1. Otimização do ensaio de susceptibilidade para formas tripomastigotas utilizando o corante Alamar Blue	24
4.9. Extração de proteína total de formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
4.10. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)	26
4.11. Análise das imagens dos géis bidimensionais	28
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
5.1. Atividade <i>in vitro</i> do benzonidazol sobre as formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
5.2. Monitoramento da contaminação das culturas de células e parasitos por <i>Mycoplasma</i>	37

5.3. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE) de proteínas totais de formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: albumina sérica bovina

Bz: benzonidazol

BZR: população de *T. cruzi* derivada da cepa Y selecionada *in vivo* com resistência ao benzonidazol (Murta & Romanha, 1998).

BZS: população de *T. cruzi* susceptível ao benzonidazol derivada da cepa Y (Murta & Romanha, 1998).

CHAPS: “3-[ (3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane Sulfonate”

DMSO: dimetil sulfóxido

DTT: ditioneitol

EDTA: Etilenodiamino tetraacetato

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*

IPG: gradiente de pH imobilizado.

MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*

MS: espectrometria de massa.

Nf : nifurtimox

PBS: *Phosphate buffered saline*

SBF: Soro Bovino Fetal

2D: bidimensional

SDS: duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

2D-PAGE: eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

WHO/OMS: World Health Organization/ Organização Mundial de Saúde.

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

ToF: *Time of Flight*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de <i>spots</i> identificados nos géis 2D com diferença quantitativa acima de 2 vezes entre formas tripomastigotas das populações BZR e BZS.	52
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da Doença de Chagas (WHO, 1996).	2
Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> (CUP, 2002).	3
Figura 3: Atividade do benzonidazol sobre a liberação de tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	33
Figura 4: Efeito da concentração do Alamar Blue® sobre a percentagem da redução do corante.	34
Figura 5: Efeito do número de parasitos sobre a percentagem de redução do Alamar Blue®.	35
Figura 6: Atividade do benzonidazol diretamente sobre formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizando o corante Alamar Blue®.	36
Figura 7: Detecção de <i>Mycoplasma</i> através da observação de cultura de células Vero coradas por Hoechst.	39
Figura 8: Detecção de DNA de <i>Mycoplasma</i> em preparações de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> através de PCR.	40
Figura 9: Preparação de formas tripomastigotas da população BZR de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	44
Figura 10: Relação entre a quantidade de proteína total extraída e o número de tripomastigotas utilizadas.	45

Figura 11: Gel unidimensional das proteínas extraídas de tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	46
Figura 12: Mini-géis bidimensionais de proteínas das formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	47
Figura 13: Gel bidimensional de proteínas das formas tripomastigotas representativo da população BZR.	48
Figura 14: Gel bidimensional de proteínas das formas tripomastigotas representativo da população BZS.	49
Figura 15: Gel <i>master</i> dos <i>spots</i> das populações BZR e BZS analisados pelo <i>software</i> PDQuest.	50
Figura 16: Representação da análise quantitativa realizada entre <i>spots</i> pareados das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	51

## RESUMO

A Doença de Chagas é um grande problema de saúde pública na América Latina. Atualmente nos países das Américas Central e do Sul há de 16 a 20 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* e 40 milhões sob risco da infecção. O tratamento da Doença de Chagas com os nitroderivados, benzonidazol e nifurtimox, apresenta consideráveis efeitos colaterais, além de baixa eficácia na fase crônica da doença e variações na eficácia em pacientes de diferentes origens geográficas. Este fato pode ser explicado pela resistência natural do *T. cruzi* aos nitroderivados. A resistência a drogas tem um grande impacto na quimioterapia da Doença de Chagas, aumentando a falha terapêutica e limitando as opções de tratamento. Através de estudos dos mecanismos de resistência do *T. cruzi* a drogas, novos alvos bioquímicos poderão ser identificados. O objetivo deste trabalho é identificar proteínas nas formas tripomastigotas do *T. cruzi* que possam estar envolvidas no mecanismo de resistência ao benzonidazol. Devido às diferenças entre as formas morfoevolutivas do parasito, é importante que o mecanismo de resistência seja estudado nas diferentes fases do seu ciclo de vida. Além disso, a análise proteômica é particularmente importante porque a regulação da expressão gênica nestes organismos ocorre por mecanismos de controle pós-transcricionais. As formas tripomastigotas foram obtidas através de infecção *in vitro* de células Vero com duas populações de *T. cruzi*: BZR, selecionada *in vivo* com resistência ao benzonidazol, e seu par susceptível, BZS (Murta & Romanha, 1998). Para garantir a qualidade das amostras de tripomastigotas, a contaminação da cultura de células e parasitos por *Mycoplasma* foi monitorada através da PCR gênero-específica e da observação de células ao microscópio óptico de fluorescência. A diferença de susceptibilidade determinada *in vitro* ao Bz entre as populações BZR e BZS de *T. cruzi* foi de aproximadamente 8 vezes quando avaliamos a atividade direta da droga sobre as formas tripomastigotas, e de 2 a 3 vezes sobre a liberação dos parasitos de células infectadas. Formas tripomastigotas das duas populações foram produzidas, purificadas e concentradas em quantidade suficiente para a análise por eletroforese bidimensional. Proteína total das duas populações foi analisada por eletroforese bidimensional e as imagens dos 6 géis bidimensionais de 17cm (triplicatas de cada população) foram analisadas pelo *software* PDQuest. As proteínas diferencialmente expressas entre as duas populações foram indicadas a partir de análise quantitativa da intensidade dos *spots* detectados e pareados entre os géis bidimensionais de

cada população. 244 spots foram analisados e 23 *spots* apresentaram intensidade diferencial entre as populações, sendo: 3 expressos somente na população BZR e 5 somente na população BZS, 5 mais expressos na população BZR e 10 mais expressos na população BZS. Estes *spots* serão localizados nos géis, excisados e digeridos por Tripsina para identificação por espectrometria de massa.



## ABSTRACT

Chagas' disease is a major public health problem in Central and South America, where 16-20 million people are infected with *Trypanosoma cruzi*. Nitroheterocyclic drugs, benznidazole (Bz) and nifurtimox (Nf), are currently used to treat Chagas' disease. Both drugs have frequent side-effects, very low anti-parasitic activity in long-term chronic forms of the disease and variable efficacy according to the geographical area. The existence of strains naturally resistant and susceptible to Bz and Nf drugs was previously described. Efforts are necessary to provide a better understanding of *T. cruzi* drug resistance mechanisms, which may result in the identification of new drug targets and new chemotherapeutic tools. These efforts must be directed to each stage of *T. cruzi* life cycle. Furthermore, proteomic analysis is particularly important because the regulation of gene expression in *T. cruzi* occurs by post-transcriptional mechanisms. The aim of this work is to identify trypomastigote proteins potentially involved in the Bz resistance mechanisms. Trypomastigote forms from two populations selected *in vivo*, Bz resistant (BZR) and Bz susceptible (BZS) (Murta & Romanha, 1998), were maintained in Vero cell monolayers and collected. In order to assure the quality of the trypomastigotes samples used, specific PCR was used to monitor the *Mycoplasma* contamination of the cell and parasite cultures. Cell observation on fluorescence microscope after specific coloration was also used to monitor the contamination. The resistance/susceptibility phenotype of the *T. cruzi* populations was determined by two *in vitro* assays. The colorimetric assay showed that trypomastigotes from population BZR are approximately 8-fold more resistant to benznidazole than BZS trypomastigotes. In a second assay, in which the benznidazole activity on parasite released from host cells was evaluated, the difference observed ranged from 2 to 3-fold between the BZR and BZS populations. Comparative proteomic analysis between BZR and BZS trypomastigote forms were carried out by bidimensional electrophoresis and image analysis of 17cm bidimensional gels (triplicates from each *T. cruzi* population) using the software PDQuest. 244 spots were analyzed and 23 correspond to differently expressed proteins between the BZR and BZS populations, as indicated after quantitative analysis of spot quantity between the gels of trypomastigotes total protein from BZR and BZS populations. From these 23 spots, 3 are only expressed in BZR population and 5 only in BZS, 5 are more expressed in BZR population and 10 more expressed

in BZR. The identification of the differentially expressed proteins will be performed by mass spectrometry and similarity searching against the *T. cruzi* protein databases.

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

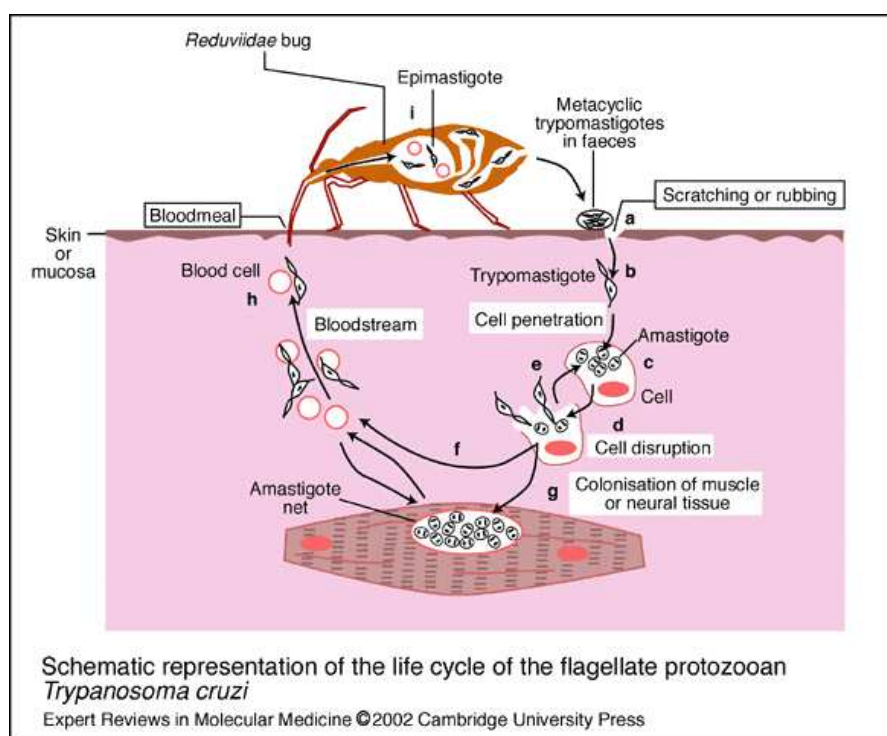
Carlos Chagas descreveu a Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana em 1909 e também sua transmissão por triatomíneos, hemípteros hematófagos da família Reduviidae. A doença ocorre no continente Americano, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, sendo endêmica em 21 países das Américas Central e do Sul (Figura 1). No início da década de 90 a estimativa era de que aproximadamente 100 milhões de pessoas estavam sob risco da infecção (WHO, 1991). Em consequência dos programas de controle dos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) o número de pessoas sob risco da infecção caiu para 40 milhões. Atualmente, há entre 16 a 20 milhões de pessoas infectadas nos países das Américas Central e do Sul, e a incidência anual da doença é de aproximadamente 200 mil casos. No entanto, a morbidade e a mortalidade associada à doença é uma ordem de magnitude maior que as associadas à malária, leishmanioses ou esquistossomose (WHO, 2002; Urbina & Docampo, 2003). A transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil, Uruguai e Paraguai está sob controle. Entretanto, espécies de triatomíneos como *Rhodnius prolixus*, *Pastrongylus megistus* e outras espécies domésticas e silvestres continuam transmitindo a doença na América Latina (Urbina & Docampo, 2003). Além da transmissão vetorial, a doença pode ser transmitida via transfusão sanguínea, verticalmente (Doença de Chagas congênita), via oral e em acidentes de trabalho. A transmissão oral do *T. cruzi* tem sido responsável por surtos da Doença de Chagas nos últimos anos no sul do Brasil.



**Figura 1: Distribuição geográfica da Doença de Chagas (WHO, 1996).**

O agente etiológico da Doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. O ciclo biológico deste parasito é bastante complexo, possui três principais formas morfoevolutivas distintas (Figura 2). O ciclo se inicia quando o hospedeiro invertebrado ingere formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo de um hospedeiro vertebrado. Estas formas se diferenciam em epimastigotas, que por sua vez se multiplicam por divisão binária no intestino do hospedeiro invertebrado. Após migrarem para a porção posterior do intestino do inseto, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, as formas infectantes que são transmitidas aos hospedeiros vertebrados. A transmissão do *T. cruzi* ao homem se dá principalmente quando há deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado no momento do repasto sanguíneo sobre a pele e mucosas danificadas. Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de invadir diferentes células: macrófagos, células musculares estriadas e lisas, fibroblastos e neurônios, exceto neutrófilos, eosinófilos e eritrócitos (Brenner *et al.* 2000; Coura & de Castro, 2002). Após a penetração na célula, as formas tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam no citoplasma celular. Após aproximadamente 5 dias, quando a célula hospedeira contém cerca de

500 amastigotas, inicia-se o processo de transformação das formas amastigotas em formas tripomastigotas. Com o rompimento da célula hospedeira, as formas tripomastigotas são liberadas para o espaço extracelular, juntamente com algumas formas de transição e formas amastigotas. Estas são capazes de infectar novas células ou caem na corrente sanguínea, fichando o ciclo de vida do parasito (Brener *et al.* 2000).



**Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (CUP, 2002);** a: presença de formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes do vetor; b: entrada de formas tripomastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado; c: multiplicação intracelular das formas amastigotas; d: diferenciação das formas amastigotas em formas tripomastigotas; e: liberação das formas tripomastigotas e infecção de novas células do hospedeiro; f: liberação das formas tripomastigotas para a corrente sanguínea do hospedeiro; g: infecção de tecidos musculares e/ou neuronais por formas tripomastigotas; h: ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas pelo vetor, reiniciando o ciclo de vida do parasito.

Em humanos, após a infecção e o período de incubação, inicia-se a fase aguda da Doença de Chagas e na ausência de tratamento específico, os sintomas persistem por aproximadamente 2 meses. Na fase aguda da doença, o índice de

mortalidade varia de 2 e 8%, principalmente entre crianças (Coura & de Castro, 2002). Nesta fase, o parasitismo sanguíneo é alto e a sintomatologia é bastante variável, podendo ser assintomática ou apresentar sintomas brandos. No entanto, crianças e, menos frequentemente, adultos podem apresentar severos sintomas após o período de incubação de 7 a 14 dias. Entre os sintomas estão conjuntivite e um edema ocular, indolor e unilateral, conhecido como sinal de Romaña. Outra manifestação no sítio de entrada da infecção é o chagoma de inoculação. Manifestações gerais e alterações sistêmicas incluem febre, mal-estar geral, cefaléia, astenia, hiporexia, aumento do volume dos linfonodos, hepato e esplenomegalia. Um pequeno número de pacientes com a doença aguda morre de complicações associadas à miocardite aguda ou meningoencefalite (Brener *et al.* 2000; Rassi *et al.* 2000).

A fase crônica da Doença de Chagas, que se segue após a fase aguda, possui parasitemia escassa e uma sintomatologia que vai desde a ausência de sintomas (indeterminada) até um severo comprometimento cardiovascular e/ou gastrointestinal (Prata, 2001). A cardiopatia da Doença de Chagas crônica é forma a clínica tardia da infecção pelo *T. cruzi* resultante de dano progressivo do miocárdio conseqüente à incessante miocardite fibrosante (Brener *et al.* 2000).

## **1.2. Quimioterapia da Doença de Chagas**

Segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde, a droga ideal para o tratamento da Doença de Chagas deve: (i) promover a cura parasitológica tanto na fase aguda quanto na fase crônica; (ii) ser efetiva com poucas doses; (iii) ser acessível aos pacientes, a baixo custo; (iv) não acarretar efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) não exigir hospitalização para o tratamento (vi) e não induzir resistência. Além dessas propriedades, é importante que a droga tenha boa estabilidade. As duas drogas utilizadas desde o final da década de 60 atendem parcialmente a essas exigências. São elas: o derivado 5-nitrofurano, nifurtimox (Nf), e um derivado 2-nitroimidazólico, o benzonidazol (Bz), conhecidos comercialmente como Lampit<sup>®</sup> (Bayer) e Rochagan<sup>®</sup> ou Radanil<sup>®</sup> (Roche) respectivamente. O modo de ação do Nf envolve a geração de radicais nitroânions instáveis, que na presença de oxigênio produzem metabólitos reduzidos altamente

tóxicos. Como o *T. cruzi* é deficiente em mecanismos de detoxificação para esses metabólitos, o parasito é mais susceptível à droga do que as células dos hospedeiros. Já o Bz parece agir por outro mecanismo, envolvendo a modificação covalente de macromoléculas por intermediários nitroreduzidos da droga (Coura & de Castro, 2002; Urbina & Docampo, 2003).

O tratamento com os nitroderivados cura cerca de 80% dos pacientes na fase aguda (Urbina & Docampo, 2003) e 8-9% na fase crônica (Cançado, 2002), variando, portanto, de acordo com a fase da doença, o período de tratamento, a dose, a idade e a cepa de contágio dos pacientes. O tratamento com esses nitroderivados possui sérias limitações, pois provocam severos efeitos colaterais, provavelmente devido aos danos causados pela oxidação e redução em tecidos do hospedeiro (Coura & de Castro, 2002; Urbina & Docampo, 2003). A variação na eficácia do tratamento da Doença de Chagas com o Nf e Bz em pacientes infectados por diferentes cepas do *T. cruzi*, que tem sido relatada desde 1949, aponta para diferenças na susceptibilidade a essas drogas (Hauschka, 1949; Brener *et al.* 1976, Andrade *et al.* 1985; Neal & Van Bueren, 1988).

### **1.3. Resistência do *Trypanosoma cruzi* a drogas**

A resistência a drogas é um dos problemas clínicos mais importantes que afeta não só doenças bacterianas como também doenças parasitárias causadas por protozoários patogênicos, tais como *Plasmodium falciparum*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania* ssp. e *Trypanosoma brucei*. A resistência natural do *T. cruzi* ao Bz e ao Nf já foi observada (Brener *et al.* 1976, Andrade *et al.* 1985; Filardi & Brener, 1987). Filardi e Brener (1987) fizeram a inoculação em camundongos com 47 cepas do parasito, inclusive com algumas que não tiveram contato prévio com o Bz e o Nf. A porcentagem de cura observada nos camundongos variou de 0 a 100%. A resistência natural a drogas foi observada em várias cepas. No entanto, não foi observada correlação entre a virulência ou patogênecidade e a susceptibilidade natural ao Bz ou ao Nf. Os estudos de susceptibilidade do *T. cruzi* a drogas mostraram ainda uma resistência cruzada entre o Bz e o Nf. Embora estas duas drogas possuam diferentes mecanismos de ação e diferentes grupos químicos, as cepas naturalmente resistentes a uma das drogas



também são resistentes à outra (Pontes & Andrade, 1984; Filardi & Brener, 1987; Neal & Van Bueren, 1988).

Através da análise de isoenzimas (zimodemas), foi demonstrado que três zimodemas de *T. cruzi* distintos circulam nos ciclos doméstico e silvestre de transmissão da doença (Miles *et al.*, 1978). Embora todas as cepas pertencentes ao zimodema B sejam susceptíveis aos nitroderivados, não há correlação entre o fenótipo de resistência e o zimodema (Murta *et al.*, 1998).

#### **1.4. Mecanismo(s) de resistência do *Trypanosoma cruzi* a drogas**

O(s) mecanismo(s) de resistência do *T. cruzi* a drogas têm sido estudado(s) desde a década de 90 quando Nozaki e cols. (1996) observaram que o aumento da resistência ao Nf de populações resistentes selecionadas *in vitro* foi acompanhado do aumento das massas do DNA nuclear e do DNA do cinetoplasto. Os estudos seguintes buscaram identificar o mecanismo de resistência aos nitroderivados e outras drogas, como por exemplo a um inibidor da cruzepaína, uma cisteíno-protease do *T. cruzi* (Engel *et al.*, 2000). Foi também estudada a resistência cruzada entre o fluconazol e outros compostos azole antifúngicos (miconazol, ketoconazol e itraconazol) (Buckner *et al.*, 1998).

Com o objetivo de estudar o mecanismo de resistência do *T. cruzi*, populações do parasito resistentes ao Bz ou ao Nf foram selecionadas *in vitro* (Abdo, 1991; Nirdé *et al.* 1995; Nozaki *et al.* 1996; Buckner *et al.*, 1998; Engel *et al.*, 2000). Entretanto, as populações selecionadas *in vitro* podem perder parte da identidade genética da cepa parental. Em nosso laboratório, Murta e Romanha (1998) fizeram a seleção *in vivo* de uma população resistente ao Bz. Utilizando a cepa Y do *T. cruzi*, cepa mediamente resistente aos nitroderivados, camundongos foram inoculados e tratados no pico da parasitemia com uma dose única e alta de Bz. Este processo foi repetido por 25 passagens sucessivas em camundongos. O fenótipo de resistência da população selecionada se manteve estável por 9 passagens em camundongos mesmo sem o tratamento com o Bz.

Ainda em nosso laboratório, têm sido estudados alvos de drogas que possam estar envolvidos no mecanismo de resistência ao Bz. Entre eles estão as

fosfoglicoproteínas de membrana (PGPs), “Old Yellow Enzyme” (OYE), a tirosina aminotransferase (TAT) e a ferro superóxido dismutase-A (FeSOD-A). O envolvimento de genes das PGPs na resistência a drogas foi observado em protozoários como *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania* ssp. A PGP possui de 170 a 180 kDa e atua como uma bomba de efluxo de drogas, dependente de ATP (Ullman, 1995). No entanto, Murta e cols. (2001) utilizando populações de *T. cruzi* resistentes ao Bz selecionadas *in vivo* e *in vitro* mostraram que o fenótipo de resistência aos nitroderivados não está relacionado à expressão da PGP.

A OYE é uma NAD(P)H flavina redutase, envolvida na síntese de prostaglandinas PGF<sub>2</sub>α e na redução de drogas anti-*T. cruzi*. A análise de microarranjos de DNA de *T. cruzi* (“DNA microarray”) mostrou que a expressão do gene da OYE (TcOYE) é 6 vezes menor em uma cepa com resistência induzida *in vitro* ao Bz (17LER) do que no seu par susceptível (17WTS). Murta e cols. (2006) observaram uma relação entre a deleção de cópias da TcOYE e a resistência induzida *in vitro* de populações do *T. cruzi*. Nogueira e cols. (2006) também observaram uma relação entre um aumento da expressão da FeSOD-A, enzima envolvida na remoção do excesso de radicais superóxido, e a resistência *in vitro*. Os autores também observaram que não há relação entre os níveis de FeSOD-A e a resistência natural e induzida *in vivo* ao Bz, sugerindo que mecanismos diferentes estejam envolvidos na resistência do *T. cruzi* a drogas. Rego e cols. (2008) observaram que a TcTAT (tirosina aminotransferase de *T. cruzi*) não participa diretamente do mecanismo primário de resistência ao Bz. Estes autores não observaram diferenças no nível de expressão do mRNA e da proteína entre populações susceptíveis e seus pares com resistência selecionada *in vivo* ou induzida *in vitro* ao Bz. No entanto, esta enzima pode participar de um mecanismo secundário de compensação ou como fator de resposta ao estresse.

### **1.5. Estudo do(s) mecanismo(s) de resistência a drogas de formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi***

Tripomastigotas de cultura de células foram pouco utilizados no estudo do(s) mecanismo(s) de resistência do *T. cruzi* a drogas e potenciais alvos. Estas

formas foram utilizadas por Nozaki e cols. (1996) para a seleção *in vitro* de uma população resistente ao Nf, por Buckner e cols. (1998) para a seleção *in vitro* de uma população resistente ao fluconazol e por Choe e cols. (2005) para avaliar a inibição da cisteíno-protease (cruzeína) por compostos específicos. Considerando as diferenças marcantes entre as formas morfoevolutivas do *T. cruzi*, é importante que os estudos sejam direcionados também para as formas presentes no hospedeiro vertebrado (tripomastigotas e amastigotas).

Para fazer a infecção de células de cultura podem ser utilizados tripomastigotas metacíclicos obtidos a partir da cultura de epimastigotas em condições específicas (Bonaldo *et al.* 1988) ou purificados após lise de epimastigotas (Nogueira *et al.* 1975) e tripomastigotas sanguíneos (Bertelli & Brener, 1980). Ley e cols. (1988) utilizaram eficientemente amastigotas na infecção de macrófagos. Diversas linhagens de células podem ser utilizadas como hospedeiras, entre elas: células musculares bovinas, murinas e humanas, mioblastos de rato, células Vero (epitélio de rim de macaco verde, *Cercopithecus* sp.), Hela (câncer cervical humano) e fibroblastos humanos e murinos (Gutteridge *et al.*, 1969; Dvorak & Hyde, 1973; Luban & Dvorak, 1974; Dvorak & Howe, 1976; Sanderson *et al.* 1980; Bertelli & Brener, 1980). Nos estudos iniciais havia dificuldades principalmente no controle e reprodutibilidade da cultura, além da grande proporção de amastigotas liberadas junto às formas tripomastigotas. Não só as linhagens celulares hospedeiras e as diferentes cepas de *T. cruzi* foram estudadas, mas também a melhor temperatura para a infecção, desenvolvimento e liberação dos tripomastigotas (Dvorak & Poore, 1974; Sanderson *et al.* 1980) e a melhor concentração de Soro Bovino Fetal (SBF) no meio de cultura (Bertelli & Brener, 1980). Todos esses estudos permitiram o avanço da técnica de obtenção de formas tripomastigotas a partir de cultura de células e sua utilização nos diferentes estudos do *T. cruzi*.

### **1.6. Análise proteômica de parasitos**

O termo “proteoma” passou a ser utilizado desde 1995, para descrever as proteínas expressas a partir de um genoma, em um determinado momento e em condições específicas. Embora os estudos do perfil de expressão de mRNA total

(transcriptoma) forneça informações sobre a expressão diferencial de genes, sua correlação com a expressão de proteínas de um organismo não é sempre direta. A análise do proteoma, desta forma, é importante no estudo de expressão gênica de parasitos, tanto na análise comparativa entre cepas ou estágios evolutivos, quanto na identificação de proteínas relacionadas à patogenicidade e virulência, proteínas envolvidas na interação parasito-hospedeiro ou em mecanismos de ação e resistência a drogas. Como os alvos de drogas ou vacinas normalmente estão entre os produtos traduzidos, as proteínas de parasitos devem ser estudadas assim como os genes que as codificam (Ashton *et al.*, 2001).

A utilização da eletroforese bidimensional (2D-PAGE) para separação de proteínas, que tem como princípio a separação pelo ponto isoelétrico (pI) – primeira dimensão – e em seguida pelo peso molecular – segunda dimensão – foi primeiramente descrita por O’Farrell (1975). A reprodutibilidade nesta metodologia foi alcançada a partir da utilização das fitas de gradientes de pH imobilizados (IPGs). Apesar de ser uma metodologia reprodutível, a 2D-PAGE possui algumas limitações: proteínas hidrofóbicas, proteínas que possuem valores de pI extremos ( $pI < 3$  e  $pI > 10$ ) ou pouco abundantes no proteoma dificilmente são separadas. Para a identificação das proteínas, que correspondem aos *spots* no gel de poliacrilamida em que são separadas ou visualizadas no gel, a metodologia foi combinada à um segundo método, espectrometria de massa (Ashton *et al.*, 2001).

A espectrometria de massa (MS) é um método utilizado para determinar com grande precisão a massa de diferentes moléculas. No caso de proteínas analisadas no módulo MALDI-ToF, os peptídeos são ionizados por um *lazer* em uma matriz aplicada sobre uma placa e os íons formados são acelerados em um campo elétrico a vácuo. Como todas as moléculas possuem a mesma energia cinética, os peptídeos de menor massa terão um tempo de vôo (*Time of Flight* - ToF) menor que as moléculas maiores num espaço de campo livre. A medida do ToF é feita ao final do espaço, dada pela razão massa/carga ( $m/z$ ). Por esta metodologia, MALDI-ToF MS, a massa dos peptídeos de uma proteína fragmentada pela tripsina é identificada. As massas dos peptídeos resultantes desta digestão dependem exclusivamente da sequência primária da proteína e, portanto, caracterizam os peptídeos e a proteína. O perfil de massas dos peptídeos obtido é comparado com

perfis de peptídeos obtidos a partir da digestão “in silico” de proteínas (“mass fingerprint”) através de ferramentas de busca de bioinformática (ex. PeptIdent, ProFound, MASCOT, MS-Fit). Através desta busca de identidade é possível identificar as proteínas correspondentes aos *spots* nos géis obtidos pela 2D-PAGE (Ashton *et al.*, 2001). A identificação de proteínas também pode ser feita através de MS/MS, onde é feito o sequenciamento dos peptídeos gerados e busca por homologia com as sequências de proteínas preditas do organismo em estudo.

A 2D-PAGE combinada à MS (2D-PAGE/MS) vem sendo muito utilizada no estudo do perfil global de proteínas de parasitos desde 2002, quando Cohen e cols. (2002) utilizaram a técnica para caracterização do proteoma do *Toxoplasma gondii*. O proteoma de várias espécies de parasitos foi estudado, tais como: espécies de *Leishmania* (El Fakhry *et al.*, 2002; Gongora *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2006; Brobey *et al.*, 2006), *Fasciola hepatica* (Jefferies *et al.*, 2001), *Plasmodium* (Carucci *et al.*, 2002), *Schistosoma mansoni* (Curwen *et al.*, 2004), *Trypanosoma brucei* (Foucher *et al.*, 2006) e *T. cruzi* (Parodi-Talice *et al.* 2004; Paba *et al.*, 2004a; Paba *et al.*, 2004b). A 2D-PAGE-MS tem diversas aplicações, entre elas a identificação de proteínas características de estágios de vida (Curwen *et al.* 2004) ou formas morfoevolutivas (Paba *et al.*, 2004a) e a identificação de proteínas envolvidas em mecanismos biológicos específicos.

### **1.7. Análise proteômica do *Trypanosoma cruzi***

A análise proteômica de tripanossomatídeos é particularmente importante porque a regulação da expressão de genes nestes organismos ocorre pós-transcricionalmente (Teixeira, 1998; Clayton, 2002). Portanto, estudar os níveis de expressão das proteínas, determinados pela estabilidade das mesmas e pela localização e estabilidade dos mRNAs, torna-se uma estratégia ideal para o estudo de diferenças de expressão gênica entre as formas evolutivas de *T. cruzi* e para identificar proteínas que possam estar envolvidas no mecanismo de resistência a drogas.

O proteoma das diferentes formas do ciclo de vida do *T. cruzi* foram estudadas por 2D-PAGE/MS (Paba *et al.*, 2004a; Paba *et al.*, 2004b) e por

Cromatografia Líquida de Fase-Reversa combinada à Espectrometria de Massa em Tandem (LC/MS/MS) (Atwood *et al.*, 2005). Ambos os estudos utilizaram o *software* MASCOT para a busca de identidade das proteínas em bancos de dados do parasito. Foram observadas diferenças marcantes entre as principais formas do *T. cruzi*, embora a 2D-PAGE/MS separe e identifique um número bem menor de proteínas devido às limitações da metodologia. Os géis bidimensionais (2D) das diferentes formas do *T. cruzi* possuem em média 500 *spots* (pH entre 4 e 7; géis de 17 cm corados pela prata) (Paba *et al.*, 2004a) enquanto 2784 proteínas, no total, foram identificadas através de LC/MS/MS nas quatro formas estudadas. Após a separação das proteínas totais das formas evolutivas por 2D-PAGE, as proteínas diferencialmente expressas entre elas foram identificadas por MS. Foi observado que as diferenças são maiores entre as formas amastigotas e tripomastigotas, do que entre as formas tripomastigotas e epimastigotas. Comparando os géis 2D das formas tripomastigotas e amastigotas, as formas tripomastigotas apresentaram 48 *spots* exclusivos e as formas amastigotas 39. Vinte e sete proteínas foram mais expressas nas formas tripomastigotas e 29 nas formas amastigotas. Comparando os géis 2D das formas tripomastigotas e epimastigotas, as formas tripomastigotas apresentaram somente 10 *spots* exclusivos e as epimastigotas 20. Quarenta e quatro proteínas foram mais expressas nas tripomastigotas e 12 nas epimastigotas (Paba *et al.*, 2004a).

A partir dos experimentos de LC/MS/MS, características marcantes das formas tripomastigotas foram identificadas. Ao contrário das formas sanguíneas de tripanossomas africanos, tripomastigotas de *T. cruzi* não possuem mecanismo de variação antigênica, mas expressam em sua superfície múltiplos membros de famílias multigênicas, como as trans-sialidases, mucinas e uma nova família recém descoberta pelo sequenciamento e anotação do genoma do parasito, a família MASP (*mucin associated surface protein*) (El-Sayed *et al.*, 2005; Atwood *et al.*, 2005). Por circularem na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas estão expostas a moléculas efetoras do sistema imune do hospedeiro bem como à atividade direta do Bz durante o tratamento da Doença de Chagas, principalmente na fase aguda da doença.

A 2D-PAGE/MS foi utilizada para estudar o mecanismo de resistência a drogas em *Leishmania* por Drummel-Smith e cols. (2003). Os autores identificaram a pteridina redutase (PTR1) e mostraram a superexpressão desta proteína em uma população de *L. major* resistente ao metrotexato. Uma população de *T. brucei* resistente a drogas arsenicais (Cymelarsan) também foi estudada por 2D-PAGE/MS (Foucher *et al.*, 2006). A ausência de uma proteína entre os 2000 *spots* analisados foi associada ao fenótipo de resistência do *T. brucei* aos arsenicais.

Recentemente, o nosso grupo iniciou um estudo por 2D-PAGE/MS com o objetivo de elucidar o(s) mecanismo(s) de resistência ao Bz em populações de *T. cruzi* com resistência induzida *in vitro* e selecionada *in vivo* a esta droga utilizando inicialmente as formas epimastigotas do parasito (Monteiro *et al.*, submetido para publicação). Foram encontrados trezentos e quarenta e oito *spots* que apresentaram diferença de intensidade a partir da análise de 3 pares de amostras de *T. cruzi* susceptíveis e resistentes ao Bz (populações BZR, 17LER, e clone 27R resistentes e populações BZS, 17WT e clone 9S susceptíveis). Cento e dezessete *spots* foram submetidos à espectrometria de massa para identificação das proteínas diferencialmente expressas entre as amostras. Devido à facilidade de obtenção de grandes quantidades de proteínas, necessárias para utilização de técnicas proteômicas como eletroforese bidimensional, foram utilizadas as formas epimastigotas do parasito. Porém, devido às diferenças marcantes entre as formas do ciclo de vida do *T. cruzi*, é importante que o(s) mecanismo(s) de resistência a drogas seja(m) estudado(s) também nas formas tripomastigotas, uma vez que estas estão presentes no hospedeiro vertebrado e entram em contato direto com as drogas utilizadas no tratamento da Doença de Chagas. Este é o primeiro trabalho no qual foi feita a análise proteômica das formas tripomastigotas de populações de *T. cruzi* susceptíveis e resistentes ao Bz.

## JUSTIFICATIVA



## 2. JUSTIFICATIVA

O tratamento da Doença de Chagas com o Bz ou o Nf cura 80% dos pacientes na fase aguda e somente 8-9% dos pacientes na fase crônica (Urbina & Docampo, 2003; Cançado, 2002). Os efeitos colaterais consideráveis, as variações na eficácia do tratamento de pacientes de diferentes origens geográficas, a variabilidade genética do *T. cruzi* e a resistência natural de cepas do parasito às drogas têm um grande impacto na quimioterapia da Doença de Chagas. Essas limitações, aumentam a falha terapêutica e limitam as opções de tratamento da doença. Essas limitações apontam para a grande importância do estudo do(s) mecanismo(s) de resistência do *T. cruzi* a drogas. Devido às diferenças marcantes entre as formas morfoevolutivas do *T. cruzi*, é importante que o mecanismo de resistência a drogas seja estudado em cada uma das fases do ciclo de vida do parasito. Tais estudos poderão revelar alvos bioquímicos que permitam o desenvolvimento racional de novas drogas para o tratamento da Doença de Chagas.

A análise proteômica é uma estratégia adequada para o estudo de mudanças no perfil de expressão de genes no *T. cruzi*, pois a regulação da expressão gênica neste organismo ocorre principalmente em nível pós-transcricional. Neste trabalho, foi realizada a análise das proteínas diferencialmente expressas entre uma população susceptível e outra resistente ao Bz. A população resistente foi selecionada *in vivo* a partir da cepa Y do parasito. Para isso, as proteínas totais foram extraídas das formas tripomastigotas das duas populações, obtidas de cultura de células, e separadas por 2D-PAGE. Esta é a primeira análise proteômica de formas tripomastigotas na busca de proteínas que possam estar envolvidas no mecanismo de resistência do *T. cruzi* ao benzonidazol.

## OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas expressas na forma tripomastigota do parasito *Trypanosoma cruzi* que possam estar envolvidas no mecanismo de resistência ao benzonidazol.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Determinar a atividade *in vitro* do benzonidazol:

a) sobre a liberação de formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *T. cruzi*;

b) diretamente sobre tripomastigotas das populações BZR e BZS de *T. cruzi* purificadas de cultura de células;

3.2.2. Monitorar a contaminação das culturas de células e parasitos por *Mycoplasma*.

3.2.3. Indicar as proteínas diferencialmente expressas na forma tripomastigota entre as populações BZR e BZS de *T. cruzi*.

# METODOLOGIA

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Populações de *Trypanosoma cruzi*

As populações de *T. cruzi* utilizadas neste estudo, resistente ao Bz (BZR) e seu par susceptível (BZS), foram selecionadas *in vivo* por Murta e Romanha (1998). A partir da cepa Y (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953) a população resistente BZR foi obtida após 25 sucessivas passagens em camundongos infectados e tratados com uma única e alta dose de Bz no pico da parasitemia (500 mg/Kg/camundongo). A população BZS foi obtida paralelamente, após 25 sucessivas passagens em camundongos infectados, porém não submetidos ao tratamento com o Bz.

### 4.2. Benzonidazol

Nos ensaios biológicos *in vitro* foi utilizado Bz (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) purificado. A purificação foi feita através da maceração dos comprimidos do medicamento comercializado com o nome de Rochagan (Roche) e solubilização em acetato de etila. O Bz foi cristalizado a 4°C e os cristais foram dissolvidos em DMSO (Sigma) na concentração estoque de 10,4 mg/mL (40mM). A solução estoque foi mantida a -20°C protegida da luz.

### 4.3. Cultura das células hospedeiras das populações do *Trypanosoma cruzi*

As células da linhagem Vero, utilizadas como hospedeiras das populações de *T. cruzi*, foram mantidas a 37°C, em ambiente úmido contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em DMEM suplementando com SBF (Gibco®) 10% e GlutaMAX®-I (Gibco®) 2mM, contendo sulfato de gentamicina 50µg/mL. A monocamada de células foi despreendida da garrafa com 500µL de Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25% e EDTA 1mM - Gibco®) e agitação leve. Assim que as células se desprenderam totalmente da superfície da garrafa, foram ressuspendidas em 5 mL de meio DMEM suplementado. A contagem de células foi feita em Câmara de Neubauer utilizando o corante vital Azul de Tripán 0,04%. As células foram semeadas em garrafas e o meio de cultura foi trocado após 24h para retirada de células mortas e do resíduo da solução de

Tripsina-EDTA. A formação da monocamada foi observada em torno do 4º dia após o repique.

Para infecção com as populações de *T. cruzi*, foram semeadas aproximadamente  $1 \times 10^5$  células (garrafa de 25 cm<sup>2</sup>;  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>) em 4 mL de meio DMEM suplementado ou  $3 \times 10^5$  células (garrafa de 75 cm<sup>2</sup>) em 8 mL do meio de cultura. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C por um tempo mínimo de 12h para adesão das células ao substrato. Em seguida o meio de cultura é trocado logo antes da infecção para retirada de células mortas e de resíduo da solução de Tripsina-EDTA.

#### **4.4. Obtenção de tripomastigotas sanguíneos para infecção das células**

A infecção inicial das células Vero foi obtida a partir de formas tripomastigotas sanguíneas. Estas foram obtidas do sangue de camundongos infectados com a população BZR ou BZS, colhido em um tubo de fundo redondo contendo pérolas de vidro. O sangue foi desfibrinado através de agitação leve e adicionado de igual volume de DMEM suplementado com GlutaMAX®-I 2mM contendo sulfato de gentamicina 100µg/mL. Após homogeneização, o sangue diluído foi transferido para um novo tubo de fundo redondo e centrifugado a 1000 rpm, a 27°C por 10 min. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspendido em igual volume de DMEM. A centrifugação foi repetida e em seguida a amostra foi incubada por uma hora a 37°C para que as formas tripomastigotas sanguíneas ficassem concentradas no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado a 2000 rpm/5°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento contendo os parasitos foi homogeneizado e as tripomastigotas foram contadas em Câmara de Neubauer. Para infecção das células foi utilizada uma proporção de 20 parasitos/célula.

#### **4.5. Cultura das formas tripomastigotas *in vitro***

As garrafas contendo 20 tripomastigotas sanguíneos/célula foram mantidas em estufa a 37°C, em ambiente úmido contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por 24h para infecção das células. Em seguida, o meio de cultura foi trocado, descartando as tripomastigotas que não infectaram e os eritrócitos remanescentes. Nos dias 6 a 8

após a infecção, os tripomastigotas liberados das células foram coletados para serem utilizados na preparação de proteínas ou na infecção de novas garrafas de cultura de células.

Para dar continuidade à cultura das formas tripomastigotas *in vitro*, o meio de cultura da garrafa de células infectadas contendo as tripomastigotas liberadas foi centrifugado a 2500 rpm/5°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado, permanecendo um volume de 0,5 a 1 mL. O sedimento foi homogeneizado e os tripomastigotas foram contados em Câmara de Neubauer. O inóculo foi ajustado para nova infecção.

#### **4.6. Purificação, concentração e lavagem de tripomastigotas para extração de proteínas**

Para a purificação das formas tripomastigotas, o meio de cultura contendo os parasitos liberados do sexto ao oitavo dia após a infecção das células foi diariamente coletado e primeiramente centrifugado a 500 rpm/5°C por 10 min, em tubos de fundo cônico, para separação de células em suspensão dos parasitos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de fundo cônico e centrifugado a 2500 rpm/5°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado, os tripomastigotas presentes no sedimento foram contados em câmara de Neubauer e lavados 3X em RPMI 1640, não suplementado e sem vermelho de fenol (Gibco®), com centrifugações a 3000 rpm/5°C por 10 min. Após a última lavagem, os parasitos foram transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 3000 rpm/5°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras mergulhadas no nitrogênio líquido para congelamento imediato. As amostras foram mantidas a -70°C até a extração das proteínas totais. Foram utilizadas neste trabalho somente concentrados de tripomastigotas com menos de 5% de formas amastigotas. As proteínas totais foram obtidas em triplicata de cada população, de três cultivos diferentes, sempre utilizando parasitos obtidos na sexta passagem.

#### 4.7. Monitoramento da contaminação de culturas de células Vero e parasitos por *Mycoplasma sp*

Para monitorar a contaminação das células e das formas tripomastigotas, utilizamos dois métodos diagnósticos. O primeiro, foi pela observação de células coradas ao microscópio óptico de fluorescência. Células Vero foram cultivadas em sistemas de lâminas com câmara de 8 poços (LabTek®). Foram adicionadas entre  $8 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células por poço em 200  $\mu$ L de meio de cultura DMEM suplementado. As câmaras foram incubadas a 37°C por 24h para a adesão das células à lâmina. O meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados 3X com PBS 1X. A lâmina foi fixada e corada com Hoechst 33258 (SIGMA®) na concentração de 5  $\mu$ g/mL por 30 min. A câmara foi embrulhada em papel alumínio para proteção contra luz. Os poços foram lavados 1X com PBS e a câmara foi desmontada, seca, montada com lamínula e solução de montagem e preservada em papel alumínio. As células foram observadas ao microscópio óptico de fluorescência com aumento de 400X, com filtro azul BG12 Zeiss e filtro de barreira n°50.

O segundo método de detecção utilizado foi por PCR com os iniciadores descritos por Timenetsky e cols. (2006) para amplificar parte do gene da subunidade 16s do rRNA de qualquer espécie do gênero *Mycoplasma*. Aproximadamente 100  $\mu$ L da suspensão de células Vero e do concentrado de tripomastigotas das duas populações de *T. cruzi* foram coletados e aquecidos a 70°C por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 min, a temperatura ambiente, e o sobrenadante (preparação de DNA) foi mantido a -20°C. Para a reação de PCR foi utilizado 1  $\mu$ L da preparação de DNA das amostras, 200  $\mu$ M de cada dNTP (dTTP, dATP, dCTP e dGTP), 10 pmol dos iniciadores MGSO [TGACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC] e GPO3 [GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT] em solução contendo Tris-HCl 10mM pH 8,0, KCl 50mM e MgCl<sub>2</sub> 1,5mM para um volume final de 10  $\mu$ L. As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, anelamento dos iniciadores a 55°C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, e o último passo a 72°C por 5 min para extensão final. O produto da reação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pela prata. A contaminação da reação de PCR foi monitorada através da utilização de controles negativos da reação (sem DNA).



#### 4.8. Ensaio para determinar a atividade *in vitro* do benzonidazol sobre a liberação das formas tripomastigotas das populações BZR e BZS

Neste primeiro ensaio foi determinado o IC<sub>50</sub>, a concentração de Bz que inibe em 50% o desenvolvimento intracelular e a liberação *in vitro* de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Foram adicionadas a placas de 24 poços 1,2x10<sup>4</sup> células Vero/poço (2,4x10<sup>4</sup> células Vero/mL) em 450µL de meio de cultura DMEM suplementado, sem antibiótico. Após 12-18h de incubação a 37°C, em ambiente úmido contendo 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 24x10<sup>4</sup> tripomastigotas das populações BZR e BZS, separadamente, ressuspendidos em 50µL de meio de cultura. Células de 3 poços da placa não foram infectadas por *T. cruzi* (controle sem droga e sem parasitos). Após 24h de incubação para infecção das células, o meio de cultura foi trocado e foram adicionadas concentrações finais de Bz de 0,25 a 2µM. Cada concentração de Bz foi testada em triplicata. A uma triplicata de poços com células infectadas foi adicionado somente meio de cultura (500µL) sem droga. A concentração final de DMSO não foi significativa (<0,005%). As placas voltaram a ser incubadas e as formas tripomastigotas liberadas cumulativamente em cada poço foram contadas em Câmara de Neubauer no quinto dia de tratamento com o Bz, sexto dia após a infecção, quando as formas tripomastigotas começam a ser liberadas das células hospedeiras. Foram calculadas as médias de tripomastigotas liberadas nas triplicatas teste e controle, e a atividade anti-*T. cruzi* (AaTc%):

$$\text{AaTc\%} = 100 - \left( \frac{\text{Nt} \times 100}{\text{Ncp}} \right)$$

onde: Nt corresponde à média de tripomastigotas liberados na triplicata de cada concentração de Bz testada e Ncp, à média de tripomastigotas liberados na triplicata controle sem droga.

Os coeficientes de variância das médias de tripomastigotas liberados em cada triplicata [(desvio padrão/média)x100] também foram calculados. A partir deles foi calculado o coeficiente de variância médio do ensaio. O experimento foi repetido três vezes. As linhas de tendência, baseadas nas médias das triplicatas de cada concentração de Bz testada, foram obtidas por *fitting* sigmoidal dose resposta para

cada população, em cada um dos três ensaios, e o IC<sub>50</sub> do Bz foi determinado também para cada população, em cada um dos ensaios, utilizando o programa Microcal Origin 5.0.

#### **4.9. Ensaio para determinar a atividade *in vitro* direta do benzonidazol sobre as formas tripomastigotas das populações BZR e BZS utilizando o corante Alamar Blue®**

No segundo ensaio biológico *in vitro* foi avaliado o LC<sub>50</sub> do Bz, concentração da droga que é letal para 50% dos parasitos, diretamente sobre tripomastigotas das populações BZR e BZS purificados de cultura de células. Neste ensaio foi utilizado o corante de viabilidade Alamar Blue®.

##### **4.9.1. Otimização do ensaio de susceptibilidade para formas tripomastigotas utilizando o corante Alamar Blue**

A redução do Alamar Blue® por formas tripomastigotas liberadas de células de cultura e lavadas uma vez em meio RPMI suplementado, porém sem vermelho de fenol, foi avaliada através da diluição seriada e distribuição dos parasitos em placa de 96 poços e incubação com o corante a 10%. Os parasitos diluídos a partir das concentrações  $90 \times 10^5$  e  $9 \times 10^5$  tripomastigotas/poço foram incubados na presença do corante por 24 e 48h a 37°C, em ambiente úmido contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A absorbância foi medida em leitor de ELISA a 570 e 600nm. A medida de absorbância obtida em diferentes concentrações de Alamar Blue® (20, 10 e 5%) por  $9 \times 10^5$  tripomastigotas/poço também foi avaliada. Em cada teste, controles negativos foram incluídos (Alamar Blue® na ausência dos parasitos). Os experimentos foram repetidos duas vezes, em triplicata. A porcentagem do Alamar Blue® reduzido (AbR%) foi calculada com base na média das absorbâncias das triplicatas a partir de:

$$\text{AbR(\%)} = [A_{570} - (A_{600} \times R_o)] \times 100$$

nesta fórmula, A<sub>570</sub> e A<sub>600</sub> são os valores das médias das absorbâncias das triplicatas a 570 e 600nm, respectivamente, e R<sub>o</sub> representa o fator de correção [R<sub>o</sub> = (A<sub>570</sub>/A<sub>600</sub>) do controle negativo]. Os coeficientes de variância dos valores das absorbâncias de

cada triplicata [(desvio padrão/média)X100] também foram calculados e a partir deles foi calculado o coeficiente de variância médio do ensaio.

Para os ensaios de susceptibilidade ao benzonidazol das formas tripomastigotas das populações BZR e BZS, foram adicionados a placas de 96 poços,  $9 \times 10^5$  tripomastigotas/poço ( $562,5 \times 10^5$  tripomastigotas/mL) lavados 1X (1:10) em meio de cultura RPMI 1640 suplementado, sem vermelho de fenol (RPMISs/VF). As formas tripomastigotas foram ressuspensas em 160 $\mu$ L de RPMISs/VF sem antibiótico/poço. Em seguida foram adicionados 20 $\mu$ L de Bz para concentração final de 50 a 400 $\mu$ M para BZR e 2,5 a 400 $\mu$ M para BZS, diluído em meio de cultura. A concentração final de DMSO foi <1%. Nesta concentração de DMSO não são observados efeitos tóxicos sobre as formas tripomastigotas (condição pré-estabelecida no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular/IRR). As concentrações de Bz foram testadas em triplicata (triplicatas teste). A uma triplicata foi adicionado somente meio de cultura (controle negativo: sem droga e sem parasitos), a uma segunda triplicata foram adicionados tripomastigotas em RPMISs/VF sem adição de Bz (controle positivo: com parasitos, sem droga) e a outras triplicatas foi adicionado meio de cultura com as diferentes concentrações de Bz testadas (controles do Bz: sem parasitos, com droga). Somente os valores de absorbância do controle negativo foram utilizados no cálculo da atividade anti-tripomastigota do Bz. Os controles do Bz foram utilizados para verificar se a droga contribuiria para a redução do Alamar Blue. As placas foram incubadas a 37°C, nas condições padrão, por 48h. Em seguida foi adicionado Alamar Blue® (Gibco®) a 10% a todos os poços e as placas foram novamente incubadas por 24h a 37°C para redução do corante. A absorbância foi obtida em leitor de ELISA a 570 e 600nm. A atividade anti-tripomastigota foi calculada com base no valor da média das absorbâncias a partir de:

$$AaTri\% = 100 - \left[ \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_o) \text{ teste}}{A_{570} - (A_{600} \times R_o) \text{ controle positivo}} \times 100 \right]$$

onde:  $A_{570}$  e  $A_{600}$  são os valores das médias das absorbâncias das triplicatas a 570 e 600nm, respectivamente, e  $R_o$  representa o fator de correção [ $R_o = (A_{570} / A_{600})$ ] do

controle negativo (sem parasitos, sem droga)]. Os coeficientes de variância dos valores das absorvâncias de cada triplicata [(desvio padrão /média)X100] também foram calculados e a partir deles foi calculado o coeficiente de variância médio do ensaio. O experimento foi repetido três vezes. As linhas de tendência, baseadas nas médias das porcentagens de parasitos inviáveis obtidas para cada concentração de Bz testada nos 3 ensaios, foram obtidas por *fitting* sigmoidal dose resposta para cada população, e o LC<sub>50</sub> do Bz foi determinado para cada população utilizando o programa Microcal Origin 5.0.

#### **4.9. Extração de proteína total de formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi***

Proteína total de tripomastigotas purificados de cada uma das populações, em triplicata, foi extraída ressuspensão os parasitos diretamente em tampão de lise (Tris 20M, uréia 8M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, DTT 50mM e inibidor de proteases), na proporção de 100µL para 3,5x10<sup>8</sup> tripomastigotas. As amostras ficaram sob agitação durante 2h a temperatura ambiente, foram passadas 10 vezes em seringa de insulina, e centrifugadas a 16000g/20-25°C por 30 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, armazenado a -70°C e dosado pelo método de Bradford modificado (1976).

#### **4.10. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE)**

Depois de dosadas, as proteínas totais foram separadas primeiramente por eletroforese unidimensional para avaliar a qualidade dos extratos obtidos. Em seguida as mesmas foram separadas por 2D-PAGE. Na primeira dimensão foi feita a focalização isoelétrica das proteínas. As amostras de proteínas totais foram descongeladas e o volume equivalente a 100µg foi ressuspensionado em 125µL (para fitas de IPG de 7cm) ou 500µg em 350µL (para fitas de IPG de 17 cm) de tampão IEF (uréia 8M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, azul de bromofenol 0,5%, DTT 65mM e anfólitos 1X correspondente ao gradiente de pH da fita de IPG utilizada). As amostras ficaram sob agitação por 1h, foram centrifugadas a 16000g/20-25°C por 10 min, para retirada de material particulado, e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Os 125 µL (para fitas de IPG de 7 cm), ou 350 µL (para fitas de IPG de

17 cm), foram aplicados sobre fitas de IPG com um gradiente de separação não linear (NL) de pH 3-10 (BIO-RAD). Após 1h, 750 $\mu$ L (para fitas de IPG de 7 cm), ou 1,5mL (para fitas de IPG de 17 cm), de óleo mineral foram gotejados sobre as fitas. As fitas foram submetidas à rehidratação e focalização isoelétrica no equipamento Protean IEF Cell (BIO-RAD) a 50 $\mu$ A/gel a 20°C. Para as fitas de 7 cm as condições de rehidratação e focalização isoelétrica foram: rehidratação passiva por 4h, rehidratação ativa a 50V por 12h, focalização isoelétrica a 500V por 30 min, a 1000V por 30 min, a 4000V por 1h e a 4000V até acumular 16000 V/h. Para as fitas de 17 cm as condições de rehidratação e focalização isoelétrica foram: rehidratação passiva por 4h, rehidratação ativa a 50V por 12h, 500V por 1h, 1000V por 1h, 8000V por 2h, e a 8000V até acumular 40.000V/h. Ao término da focalização isoelétrica, as fitas foram retiradas do aparelho e congeladas a -70°C ou usadas em seguida na segunda dimensão.

Na segunda dimensão as proteínas foram separadas por peso molecular em gel de poliácridamida 12% (SDS-PAGE). As fitas foram equilibradas por 10 min sob lenta agitação em 2,5 mL (para fitas de IPG de 7 cm), ou 5 mL (para fitas de IPG de 17 cm), em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50mM pH 8,8, uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,5% e DTT 130mM). Em seguida a solução foi retirada e as fitas foram equilibradas no mesmo tampão de equilíbrio contendo iodocetamida 135mM por 15 min. O padrão de peso molecular (Broad Range, BIO-RAD) foi aplicado em um pedaço de papel de filtro e colocado sobre o gel. A fita e o padrão foram selados junto ao gel com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol para acompanhamento da corrida eletroforética. As fitas de 7cm foram lavadas em tampão de corrida (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%) e colocadas sobre os géis de poliácridamida 12% no sistema Mini-Protean II (BIO-RAD) não refrigerado. A eletroforese dos géis de 7 cm foi realizada a 50V por cerca de 10 min e a 100V até o final da corrida. As fitas de 17 cm foram lavadas em tampão de corrida e colocadas sobre géis de poliácridamida 12%. A corrida eletroforética foi realizada no sistema Protean II XL Cells (BIO-RAD) conectado a um banho refrigerado a 15°C (Multitemp II -Amersham Biosciences), a 50V por 30 min e a 200V até o corante atingir a porção inferior do gel.

Os géis foram corados pelo protocolo compatível com espectrometria de massa, utilizando o Azul de Coomassie Coloidal G-250 (Neuhoff *et al.*, 1988). Neste método, os géis são fixados em 3 soluções: ácido ortofosfórico 2% e etanol 30%; ácido ortofosfórico 2%; ácido ortofosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 12%. Em seguida, são corados em Azul de Coomassie G-250 0,02%. Os géis 2D corados foram digitalizados utilizando o densitômetro GS-800 (BIO-RAD) a uma resolução de 300dpi.

#### **4.11. Análise das imagens dos géis bidimensionais**

As imagens geradas a partir dos 6 géis 2D de 17 cm, 3 da população BZR e 3 da população BZS, foram analisadas pelo *software* PDQuest 7.3 (BIO-RAD). Os *spots* foram identificados e pareados automaticamente pelos mesmos parâmetros, e as triplicatas dos géis foram agrupadas por população (BZR e BZS). A autenticidade de cada *spot* foi validada por inspeção visual dos géis e foram editados manualmente quando necessário. A intensidade de cada *spot* foi determinada e normalizada com base no valor da intensidade total de todos os *spots*. Todos os *spots* de intensidade pelo menos 2 vezes maior ou menor entre as duas populações foram indicados como diferencialmente expressos. Essa análise inclui *spots* presentes somente em uma das populações, e ausente na outra.

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ATIVIDADE *IN VITRO* DO BENZONIDAZOL SOBRE AS FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DAS POPULAÇÕES BZR E BZS DE *Trypanosoma cruzi*

Para determinar a diferença de susceptibilidade *in vitro* ao Bz entre as populações BZR e BZS de *T. cruzi* foram utilizados dois tipos de ensaios. No primeiro ensaio, células Vero foram infectadas com formas tripomastigotas de cada população e mantidas sob concentrações de Bz de 0,25 a 2 $\mu$ M. Após 5 dias na presença da droga, foi feita a contagem do número de tripomastigotas liberadas. Este ensaio mostrou uma diferença de susceptibilidade entre as populações BZR e BZS que variou de 2 a 3 vezes de acordo com os valores de IC<sub>50</sub>, concentração de Bz que inibe em 50% o desenvolvimento intracelular e a liberação de formas tripomastigotas, encontrados para cada população em 3 experimentos realizados independentemente. O valor médio de IC<sub>50</sub> da população BZR foi 1,30 $\mu$ M e da população BZS foi 0,53 $\mu$ M. Os coeficientes de variação intra-específicos, ou seja, dos valores das triplicatas em cada concentração de Bz em um mesmo experimento, foram menores que 20%. Por outro lado, entre os 3 experimentos independentes os coeficientes de variação nas concentrações de Bz utilizadas foram superiores a 20%. Sendo assim, a figura 3 mostra o resultado de um dos três experimentos.

Com o objetivo de desenvolver um teste para avaliar a atividade do Bz diretamente sobre formas tripomastigotas que fosse mais simples de ser realizado, rápido, confiável e sensível, foi utilizado o corante Alamar Blue®. O Alamar Blue® é um indicador de viabilidade celular não tóxico, solúvel em água, estável no meio de cultura e que já foi utilizado em diversos tipos celulares. Resazurin é o componente oxidado do Alamar Blue que ao ser adicionado à cultura entra no citosol das células e é convertido à forma reduzida (resorufin) pela atividade de enzimas mitocondriais, através da captação de elétrons dos cofatores NADPH, FADH, FMNH e NADH, bem como de citocromos. Através desta reação de oxi-redução, o corante passa da cor azul (forma oxidada) para rosa (forma reduzida), mudança de cor esta que pode ser medida pela leitura colorimétrica ou fluorimétrica (Fields and Lancaster, 1993; Ahmed *et al.*, 1994; O'Brien *et al.*, 2000; Biosource Alamar Blue® Assay, Technical Bulletin). Este é o primeiro estudo em que o Alamar Blue foi utilizado como indicador de



viabilidade de formas tripomastigotas. Para isso, diferentes condições foram testadas para otimização do ensaio.

Inicialmente avaliamos a redução do Alamar Blue® em diferentes concentrações por um número fixo de tripomastigotas (Fig. 4). As médias das absorbâncias a 570 e 600nm foram diretamente proporcionais à concentração do corante utilizada. A concentração de escolha para os ensaios seguintes foi de 10%. Nesta concentração a redução do corante não foi completamente saturada após 24h de reação, uma vez que foi possível detectar a leitura de absorbância a 600nm, indicando que ainda havia corante na sua forma oxidada. Esta concentração também é a recomendada pelo fabricante. Este experimento foi realizado com formas tripomastigotas da população BZR. Resultados idênticos foram obtidos com o mesmo número de tripomastigotas da população BZS (resultado não mostrado). Os coeficientes de variação intra-específicos não ultrapassaram 3%.

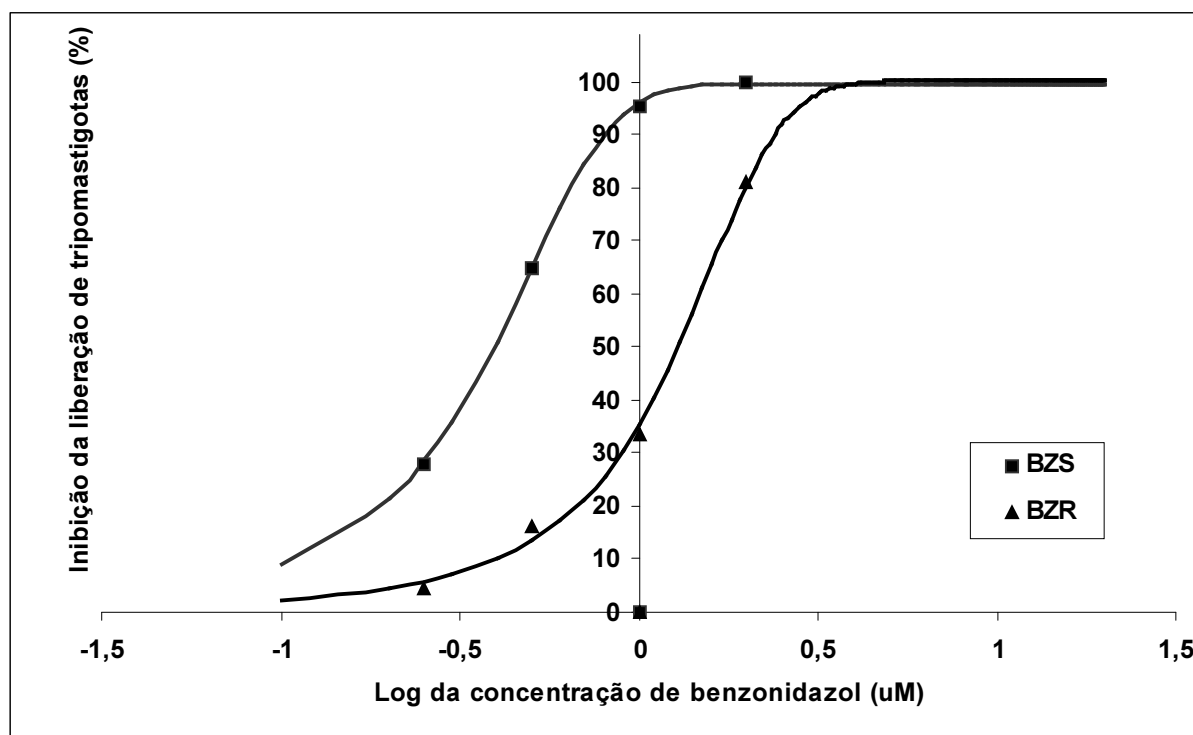
A porcentagem de redução do Alamar Blue® por um número variável de tripomastigotas é mostrada na figura 5. Ao analisarmos a porcentagem de redução do Alamar Blue por até  $90 \times 10^5$  tripomastigotas, mostramos que a reação satura com um número de tripomastigotas acima de  $20 \times 10^5$  (Fig. 5A). Uma correlação linear ( $r^2 = 0,99$ ) é observada entre a redução do Alamar Blue® e um número de tripomastigotas abaixo de  $9 \times 10^5$ /poço, após 24h e 48h de reação (Fig. 5B). Portanto, esse número de tripomastigotas foi selecionado para os testes de susceptibilidade ao Bz com um tempo de reação de 24h. Utilizando estas mesmas condições, o ensaio foi capaz de detectar até  $1 \times 10^4$  parasitos/poço ( $5 \times 10^4$  tripomastigotas/mL). Os coeficientes de variação intra-específicos não ultrapassaram 3%. Foram realizados dois experimentos em triplicata com formas tripomastigotas da população BZS, mas resultados idênticos foram obtidos com o mesmo número de tripomastigotas da população BZR, em 24h de reação (resultados não mostrados).

Ensaio *in vitro* de susceptibilidade ao Bz de formas tripomastigotas das populações BZR e BZS foram realizados utilizando o corante Alamar Blue nas condições padronizadas acima. Tripomastigotas purificadas ( $9 \times 10^5$ /poço) das duas populações foram distribuídas em placas de 96 poços e concentrações de Bz de 50

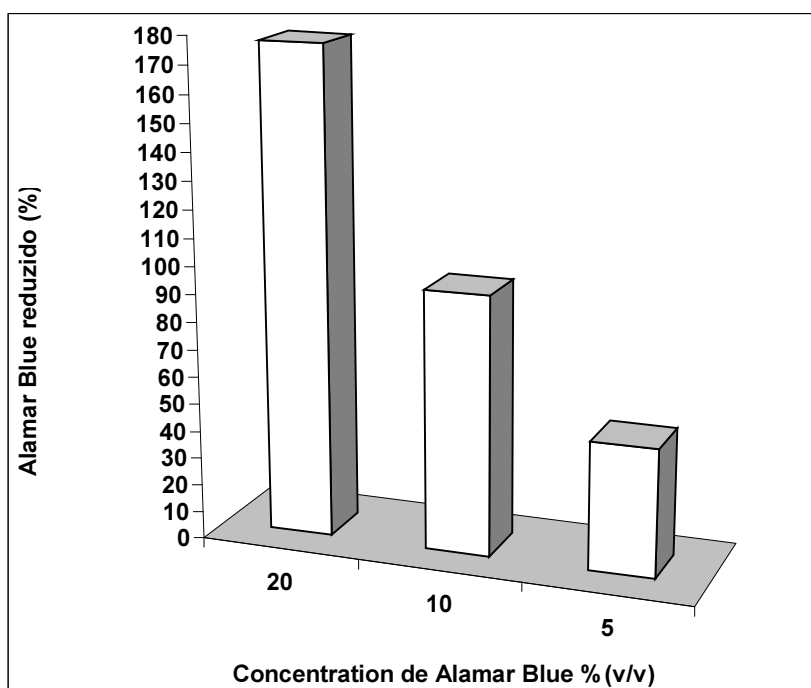
---

a 400 $\mu$ M para BZR e 2,5 a 400 $\mu$ M para BZS, foram adicionadas em triplicata. Após incubação de 48 horas com a droga, foi adicionado o Alamar Blue® 10%.

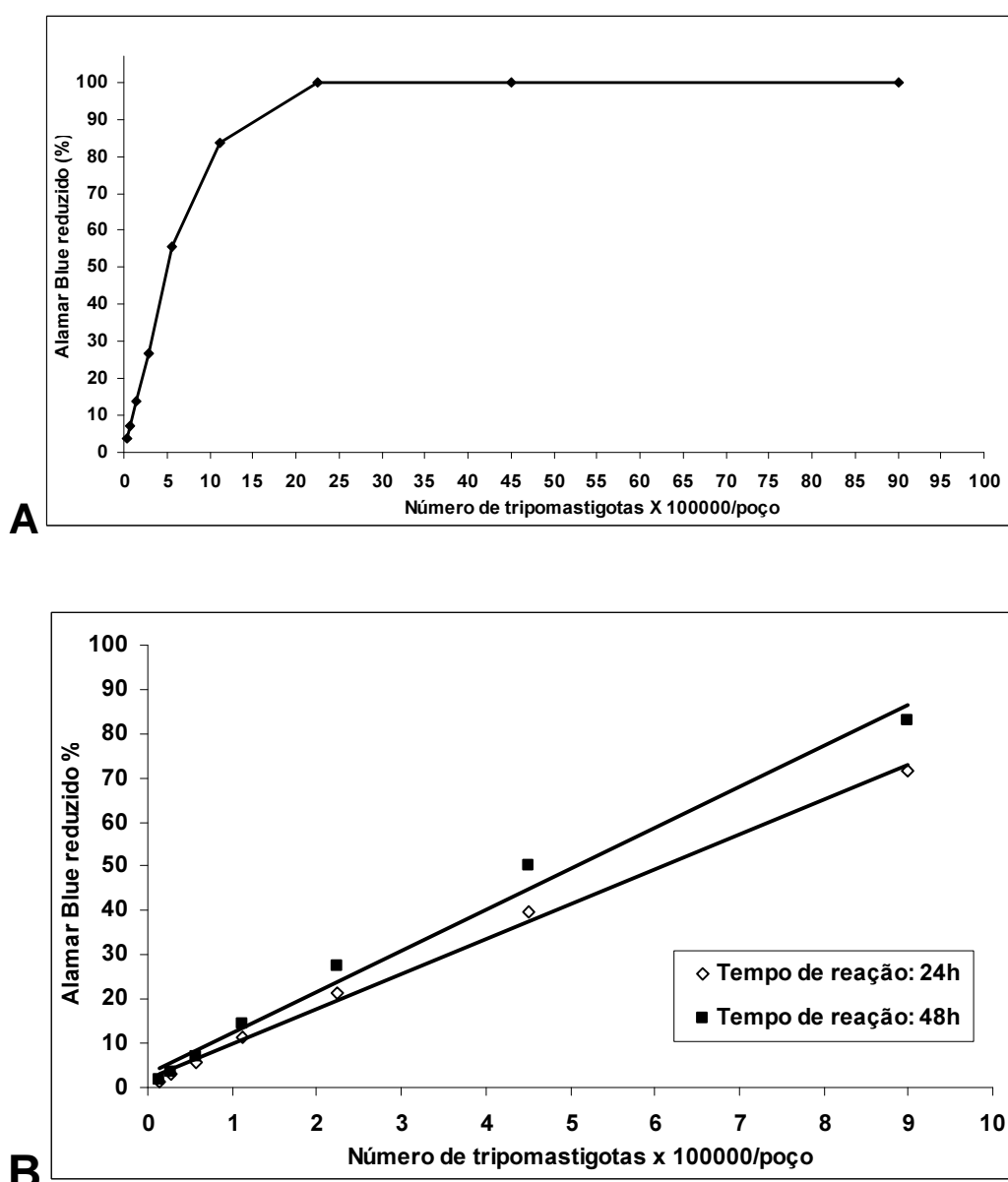
A diferença observada entre os valores médios de LC<sub>50</sub> (concentração do Bz letal para 50% dos parasitos), obtidos em três experimentos independentes, foi de aproximadamente 8 vezes, sendo 95.12 $\mu$ M para a BZR e 12.09 $\mu$ M para a BZS (Fig. 6). Os coeficientes de variação intra-específicos, entre os valores da triplicata de cada concentração de Bz, variaram de 1,5 a 4,2% e os coeficientes de variação inter-específicos, entre as médias dos ensaios em cada concentração de Bz, foram inferiores a 15,1%. Estes resultados demonstram a alta reprodutibilidade dos ensaios. Controles negativos, contendo somente meio de cultura e corante, adicionados de todas as concentrações de Bz testadas, foram incluídos nos ensaios. Não houve redução significativa do Alamar Blue® apenas pela droga durante o tempo de incubação de 24h.



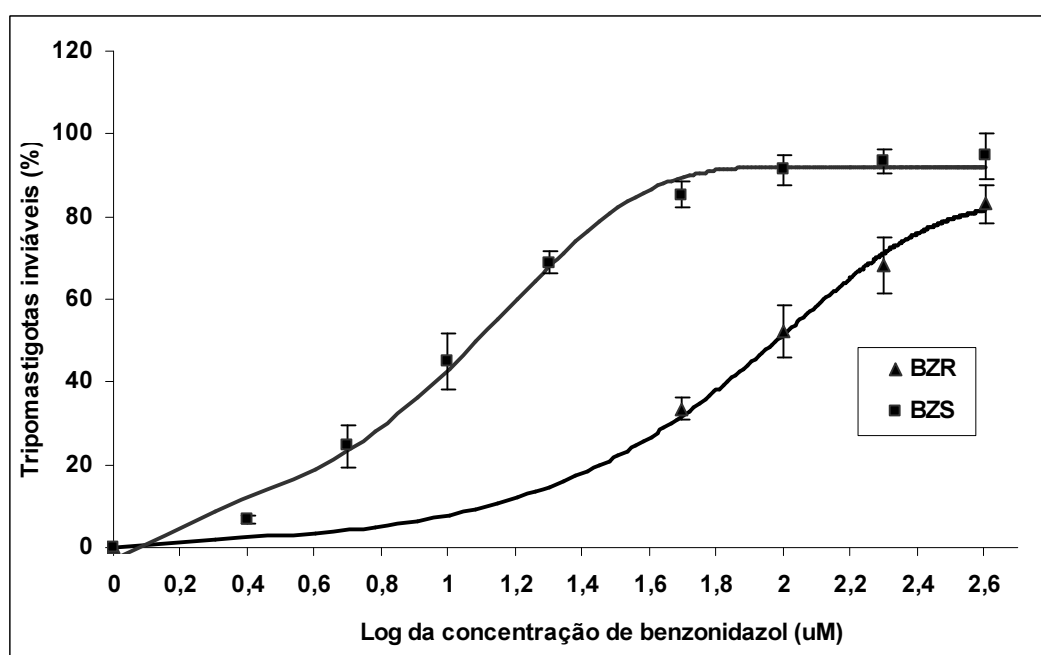
**Figura 3: Atividade do benzonidazol sobre a liberação de tripomastigotas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*.** Células Vero foram distribuídas em placas de 24 poços e infectadas com tripomastigotas por 24h. Os parasitos que não infectaram as células foram retirados e descartados, e diferentes concentrações de Bz foram adicionadas em triplicata (0,25, 0,5, 1,0, e 2 $\mu$ M). A contagem de formas tripomastigotas liberadas foi feita em Câmara de Neubauer após 5 dias de contato com a droga. Este resultado representa um dos três experimentos independentes que foram realizados. A linha de tendência baseada na média das triplicatas de cada concentração de Bz utilizada foi obtida por *fitting* sigmoidal dose resposta (Microcal Origin 5.0).



**Figura 4: Efeito da concentração do Alamar Blue® sobre a porcentagem da redução do corante.** Foi determinada a porcentagem da redução do Alamar Blue® para cada concentração do corante utilizada: 5, 10 e 20%. A absorbância foi medida em leitor de ELISA a 570 e 600nm e os valores usados no cálculo da redução do corante. Este experimento foi realizado duas vezes em triplicata utilizando  $9 \times 10^5$  tripomastigotas da população BZR/poço, em 24h de reação a 37°C.



**Figura 5: Efeito do número de parasitos sobre a porcentagem de redução do Alamar Blue®.** A porcentagem da redução do Alamar Blue® por formas tripomastigotas diluídos em série de  $90 \times 10^5$  a  $9 \times 10^5$  parasitos/poço foi determinada após 24h de reação (A). Em B, a porcentagem de redução do Alamar Blue® (%) por formas tripomastigotas diluídos em série de  $9 \times 10^5$  a  $0,07 \times 10^5$  parasitos/poço foi detectada após 24 e 48h de reação. A absorbância foi medida em leitor de ELISA a 570 e 600nm e os valores usados no cálculo da redução do corante. Este experimento é representativo de dois experimentos realizados em triplicata com formas tripomastigotas da população BZS.



**Figura 6: Atividade do benzonidazol diretamente sobre formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* utilizando o corante Alamar Blue®.** Formas tripomastigotas ( $9 \times 10^5$ /poço) das populações BZR e BZS foram distribuídas em placas de 96 poços e concentrações de Bz de 50 a 400 μM para BZR e 2,5 a 400 μM para BZS foram adicionadas em triplicata. Após 48 horas de atividade da droga, foi adicionado Alamar Blue® 10% aos poços. A absorbância a 570 e 600 nm foi medida em leitor de Elisa após 24h de reação e os valores foram usados no cálculo de redução do corante. Este experimento foi realizado 3 vezes. As linhas de tendência, baseadas nas médias de absorbância de cada concentração de Bz testada nos 3 ensaios, foram obtidas por *fitting* sigmoidal dose resposta (Microcal Origin 5.0).

## 5.2. MONITORAMENTO DA CONTAMINAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS E PARASITOS POR *Mycoplasma*

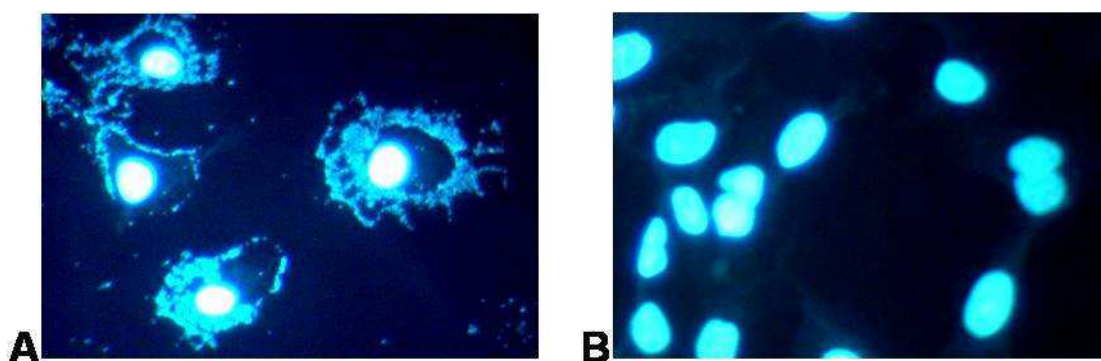
O gênero *Mycoplasma* é o maior grupo de uma classe de procariotos de tamanho pequeno, sem parede celular, que podem trazer grandes prejuízos para as culturas de células. Em um diagnóstico preliminar, foi observado que a cultura de células Vero estava contaminada por *Mycoplasma*. Era necessário, então, fazer o tratamento da cultura de células e monitorar a contaminação, impedindo a presença de *Mycoplasma* nos concentrados de tripomastigotas obtidos a partir destas culturas e, conseqüentemente, nos extratos de proteína. As células Vero infectadas por *Mycoplasma* não apresentam mudanças morfológicas visíveis ao microscópio óptico. Desta forma, outros métodos de diagnóstico foram utilizados.

A PCR e a observação de células coradas pelo corante Hoechst 33258 ao microscópio óptico de fluorescência foram ferramentas eficientes na detecção da contaminação da cultura de células e de parasitos por *Mycoplasma*. A figura 7 mostra culturas de células Vero infectadas (7A) e não infectadas por *Mycoplasma* (7B). Através deste método de coloração foram observados pontos em torno do núcleo das células infectadas que correspondem ao DNA de *Mycoplasma* corado. Estes estavam ausentes nas células não infectadas, onde foram observados apenas os núcleos corados de células Vero.

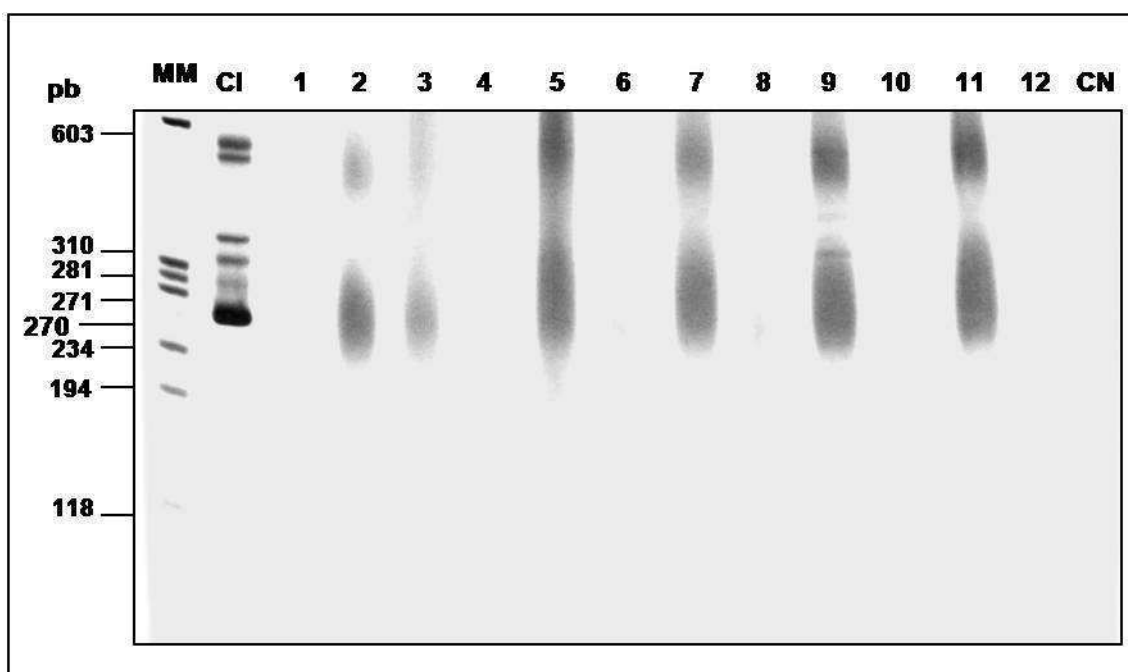
A PCR foi utilizada para monitoramento da contaminação de cultura de células e parasitos por *Mycoplasma*. A figura 8 apresenta um gel de poli-acrilamida da separação eletroforética dos produtos amplificados pela PCR para detecção de do DNA de *Mycoplasma* em preparações de tripomastigotas. Na canaleta CI foi aplicado o produto da PCR utilizando amostra de cultura de células Vero infectadas com *Mycoplasma* (controle positivo). Foi observada a presença da banda esperada de 270pb. Nas canaletas 1, 2, 3, 5, 7, 9 e 11 foram aplicados os produtos da PCR das amostras de tripomastigotas das populações BZR ou BZS. Nas canaletas 4, 6, 8, 10 e 12 foram aplicados os produtos da PCR das mesmas amostras de preparações de DNA diluídas 1:10. CN corresponde ao controle negativo da reação (sem DNA). Como não foi observada a banda de 270pb, as amostras foram consideradas não contaminadas por *Mycoplasma*. Os arrastes observados no gel

correspondem às proteínas carregadas da amostra para a reação de PCR, uma vez que o gel foi corado pela prata. Somente preparações de tripomastigotas que apresentaram resultado negativo por PCR foram utilizadas neste trabalho. As células Vero, quando infectadas, foram tratadas com antibiótico específico (ciprofloxacino ou enrofloxacino) e utilizadas como hospedeiras somente após confirmação de descontaminação da cultura pela PCR.





**Figura 7: Detecção de *Mycoplasma* através da observação de cultura de células Vero coradas por Hoechst. Células Vero infectadas (A) e não infectadas por *Mycoplasma* (B) foram coradas por Hoechst 33258 e observadas ao microscópio óptico de fluorescência (400X) com filtro azul BG12 Zeiss e o filtro de barreira nº50.**



**Figura 8: Detecção de DNA de *Mycoplasma* em preparações de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* através de PCR.** O produto da PCR foi separado em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata para detecção de contaminação com *Mycoplasma* nas preparações de tripomastigotas das populações BZR e BZS; MM: marcador de peso molecular  $\phi$ x; CI: produto da PCR de cultura de células Vero infectada com *Mycoplasma* (controle positivo); 1, 2, 3, 5, 7, 9 e 11: produtos da PCR de amostras de tripomastigotas das populações BZR ou BZS; 4, 6, 8, 10 e 12: produtos da PCR das mesmas amostras de preparação de DNA diluídas 1:10; CN: controle negativo da reação (sem DNA).

### 5.3. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE) DE PROTEÍNAS TOTAIS DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DAS POPULAÇÕES BZR E BZS DE *Trypanosoma cruzi*

A 2D-PAGE foi utilizada para separar as proteínas totais de formas tripomastigotas das populações de *T. cruzi*, BZR e BZS. Formas tripomastigotas foram produzidas a partir de cultura de células Vero em quantidade suficiente para a realização de no mínimo 3 experimentos independentes, a partir de um mesmo congelamento de parasitos, porém de 3 infecções diferentes. Foram coletadas tripomastigotas somente da sexta passagem em cultura de células, que em seguida foram purificadas e concentradas. Para a extração e separação de proteínas através de 2D-PAGE foram utilizadas somente preparações de tripomastigotas com menos de 5% de formas amastigotas (Fig. 9).

A extração de proteínas das 6 preparações de tripomastigotas (3 de cada população) foi realizada utilizando sempre a proporção de  $3,5 \times 10^8$  tripomastigotas para cada 100  $\mu$ L de solução de lise. Foi observada uma relação linear entre o número de tripomastigotas na faixa de 1 a  $20 \times 10^8$  e a quantidade de proteína total obtida (Fig. 10), indicando uma boa reprodutibilidade do método de extração utilizado. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na relação entre a quantidade de proteína total obtida e o número de tripomastigotas entre as populações BZR e BZS (dados não mostrados). São necessários aproximadamente  $4,5 \times 10^8$  tripomastigotas para obter 500  $\mu$ g de proteína, quantidade necessária para ser aplicada em cada gel 2D de 17 cm, utilizando a coloração pelo Coomassie Blue Coloidal G250.

Antes de realizar os experimentos de 2D-PAGE foi feita uma corrida eletroforética unidimensional de cada amostra extraída para avaliação da qualidade dos extratos obtidos. A figura 11 mostra o perfil eletroforético unidimensional de uma amostra representativa das preparações de proteína total de tripomastigotas das populações BZR e BZS. Observa-se uma maior concentração de bandas de médio e alto peso molecular, na faixa de 49 e 120 kDa. A presença de bandas bem definidas de médio e alto peso molecular e a ausência de arraste foram os critérios utilizados para dar prosseguimento ao experimento. A presença de arraste no perfil

eletroforético unidimensional seria um sinal de degradação protéica, o que não foi observado nas amostras analisadas.

Cada amostra de proteína total de tripomastigotas das populações BZR e BZS foi separada por 2D-PAGE. Inicialmente utilizamos géis e fitas de IPG de 7 cm. A 2D-PAGE em mini-géis foi realizada para verificar a eficiência de separação dos *spots* e a presença de arrastes, o que indicaria a presença de excesso de sal e/ou outros contaminantes, ou de material não solubilizado nas amostras de proteína. A figura 12 mostra os perfis de proteínas totais de tripomastigotas de uma das três amostras de proteínas das populações BZR (Fig. 12a) e BZS (Fig. 12b) obtidos em gradiente não linear (NL) de pH 3-10 e mini-géis de poliacrilamida 12%, corados pelo Azul de Coomassie Coloidal G250. Os géis apresentaram *spots* bem definidos e poucos arrastes, critérios utilizados para dar prosseguimento à metodologia.

Em seguida, as mesmas amostras foram separadas em géis de 17 cm para obter uma melhor separação das proteínas. Estes géis foram utilizados na análise comparativa entre *spots* encontrados nas populações estudadas. Os *spots* diferencialmente expressos serão retirados destes géis e as proteínas serão identificadas por espectrometria de massa. As figuras 13 e 14 mostram o perfil de um dos três géis 2D de 17 cm obtidos através da separação das proteínas de tripomastigotas das populações BZR e BZS, respectivamente, utilizando fitas de IPG com gradiente de pH 3-10 NL. Os géis foram corados pelo Azul de Coomassie Coloidal G250.

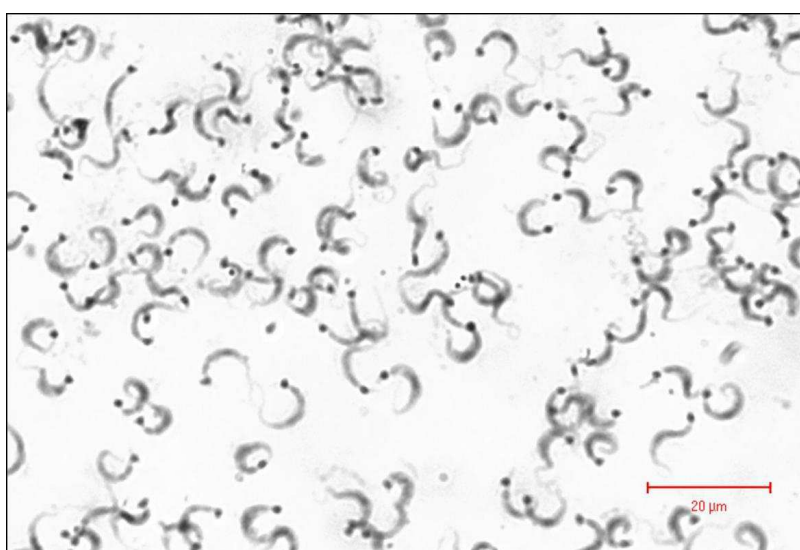
As imagens dos 6 géis 2D de 17cm (triplicatas de cada população) foram analisadas pelo *software* PDQuest 7.3 (BIO-RAD). Vale ressaltar que os *spots* que foram detectados pelo programa, mas que não foram visualizados nos géis, foram eliminados da análise durante o processo de edição manual dos *spots*. Foram encontrados 222 *spots* comuns a todos os 6 géis, 238 *spots* foram analisados nos géis da população BZR e 241 nos géis da população BZS. Ao todo, 244 *spots* diferentes foram analisados.

Foi feita uma análise quantitativa a partir da média de intensidade calculada para cada *spot* nos 3 géis 2D de cada uma das populações. Foram encontrados 23

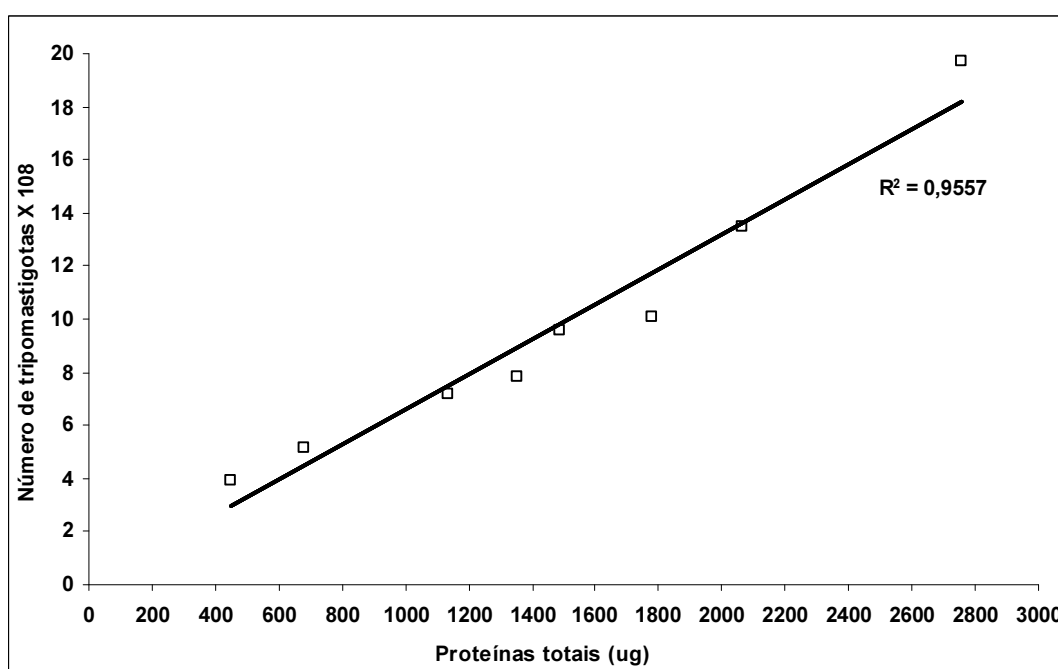
*spots* com diferença de intensidade de pelo menos 2 vezes entre as populações (Tabela 1). Destes, 5 (SSP 4716, SSP 7702, SSP 8607, SSP 4717, SSP 5821) foram encontrados somente na população BZR e 3 (SSP 8714, SSP 1216, SSP 1113) foram encontrados somente na BZR. Os 15 *spots* restantes foram encontrados em ambas as populações, sendo 5 mais expressos na população BZR e 10 mais expressos na população BZS. Dois *spots*, SSP 2601 e SSP 7407, são mais de 2,5 vezes diferencialmente expressos entre as populações, sendo o *spot* SSP7407 3,2 vezes mais expresso em BZR.

A figura 15 representa um gel *master*, uma imagem construída a partir da intensidade média de cada *spot* pareado, onde todos os *spots* analisados estão representados. Em verde estão marcados os *spots* com intensidades iguais entre as populações BZR e BZS. Em azul, os *spots* encontrados somente na população BZR e em amarelo, os *spots* encontrados somente na população BZS. Em vermelho, os *spots* com valores de intensidade diferenciais entre as populações BZR e BZS, sendo os marcados com um triângulo os mais expressos na população BZR e os marcados com um quadrado os mais expressos na população BZS.

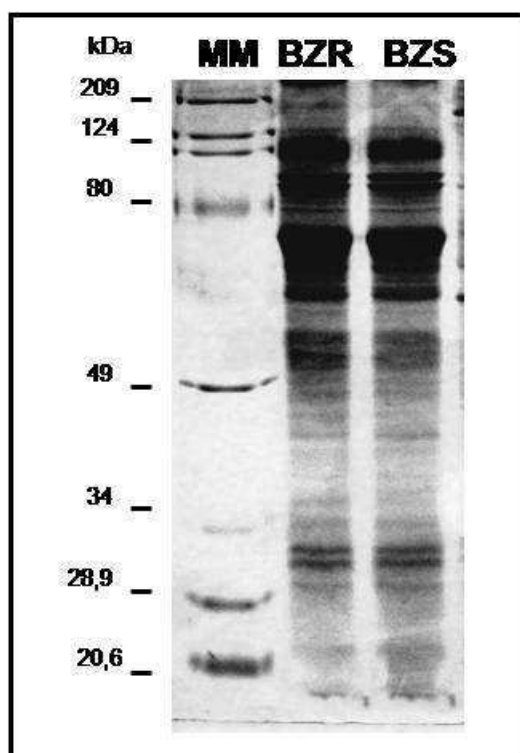
A figura 16 representa um gráfico de dispersão dos *spots* encontrados nas duas populações analisadas. A linha de corte separa os *spots* cuja expressão é no mínimo 2 vezes maior ou menor em uma das populações. Os *spots* localizados acima da linha de corte representam os *spots* de maior intensidade na população BZR, e os *spots* localizados abaixo da linha de corte representam os *spots* de maior intensidade na população BZS. A grande maioria dos *spots* analisados está localizada entre as linhas de corte. Estes *spots* não são diferencialmente expressos ou apresentam uma diferença de expressão menor que duas vezes entre as populações BZR e BZS.



**Figura 9: Preparação de formas tripomastigotas da população BZR de *Trypanosoma cruzi*.** Imagem de microscopia óptica de formas tripomastigotas da população BZR, purificadas, concentradas e coradas pelo Giemsa (40X). O grau de contaminação por formas amastigotas desta amostra foi de aproximadamente 1% (Foto: Sara Lopes dos Santos e Rafael Nacif Pimenta).

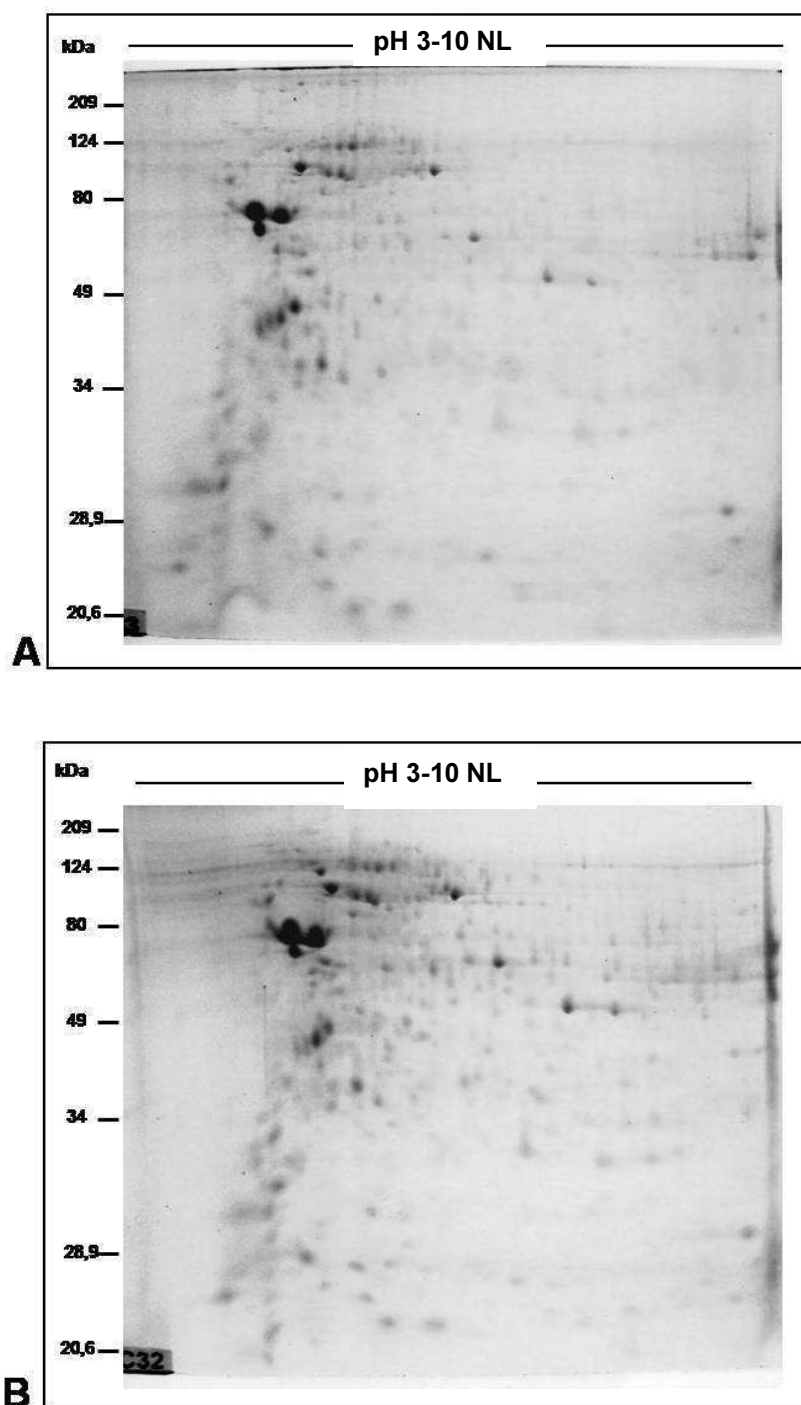


**Figura 10: Relação entre a quantidade de proteína total extraída e o número de tripomastigotas utilizadas.** Formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *T. cruzi* foram coletadas e contadas em Câmara de Neubauer. Proteínas totais das preparações de tripomastigotas purificadas e concentradas foram extraídas e dosadas pelo método de Bradford modificado (1976).

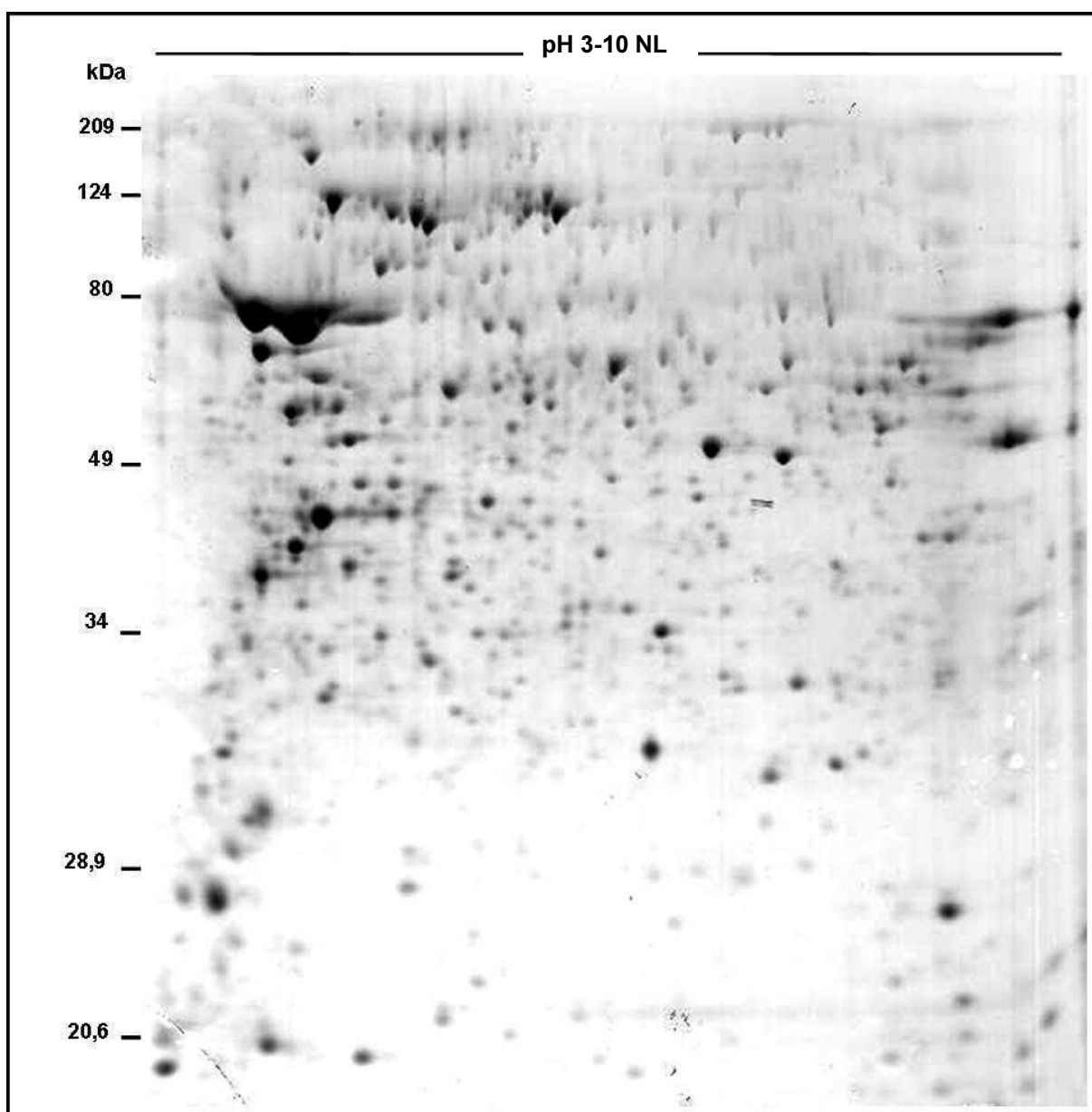


**Figura 11: Gel unidimensional das proteínas extraídas de tripomastigotas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*.** Gel de poliacrilamida 12%, corado pelo Azul de Coomassie. BZR: foram aplicados 25 $\mu$ g de proteínas das formas tripomastigotas da população BZR; BZS: foram aplicados 25 $\mu$ g de proteínas das formas tripomastigotas da população BZS. MM: marcador de peso molecular Broad Range (BIO-RAD).

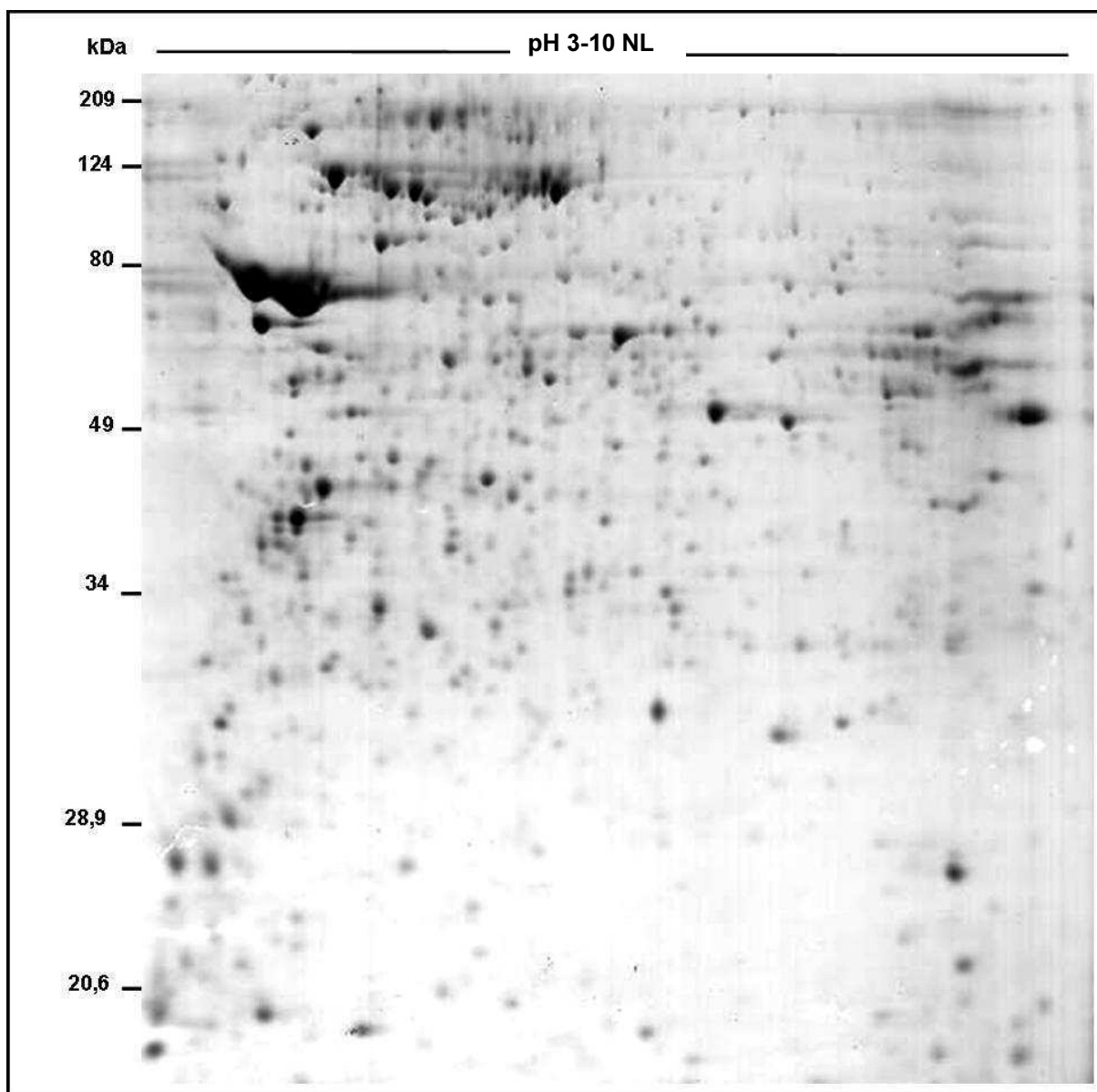




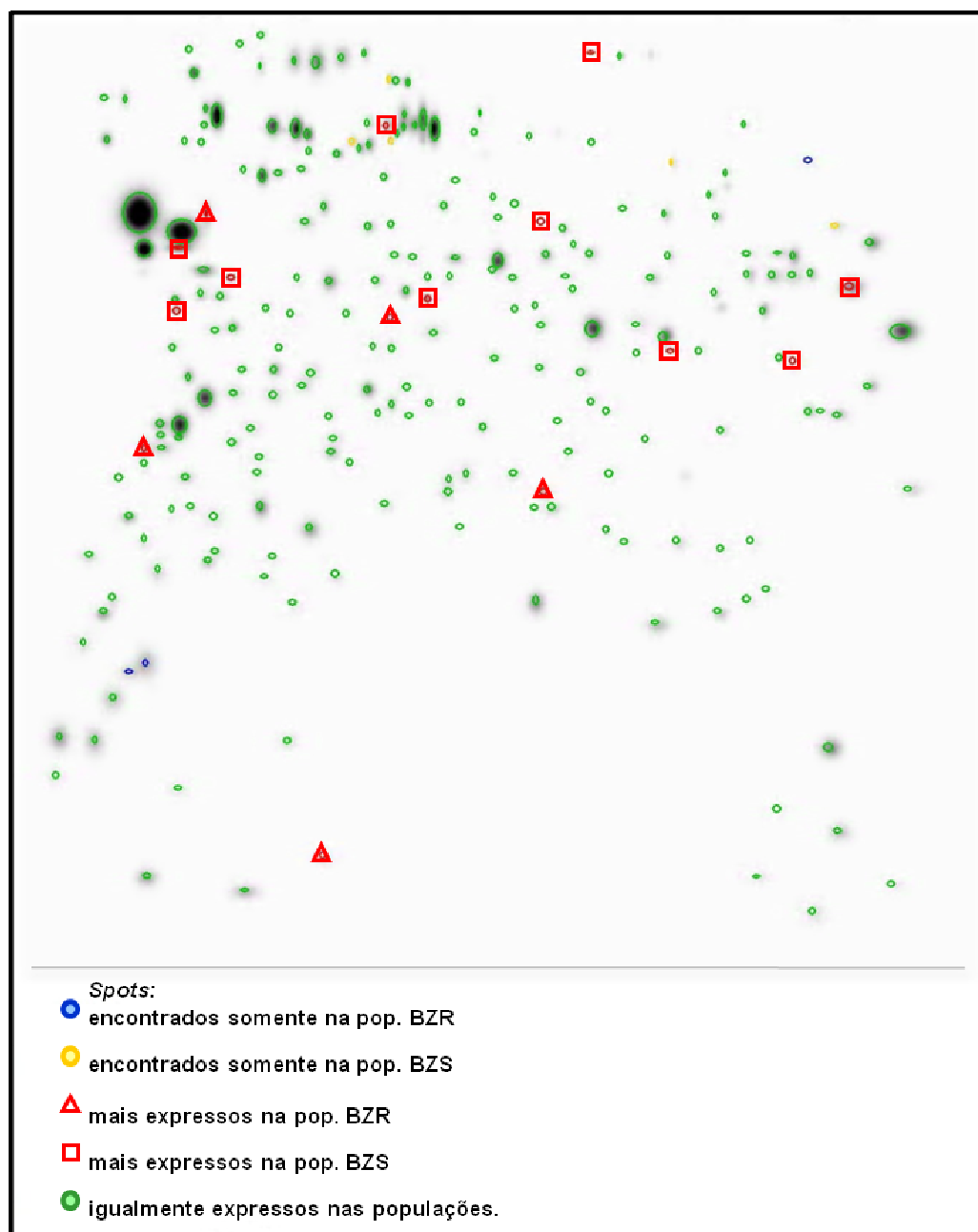
**Figura 12: Mini-géis bidimensionais de proteínas das formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*.** Foram aplicados 100µg de proteínas de tripomastigotas das populações BZR (A) e BZS (B) em fitas de IPG com gradiente de pH de 3-10 NL. Posteriormente as proteínas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% que foram corados pelo Azul de Coomassie Coloidal G250. Peso molecular em kDa (Broad Range BIO-RAD).



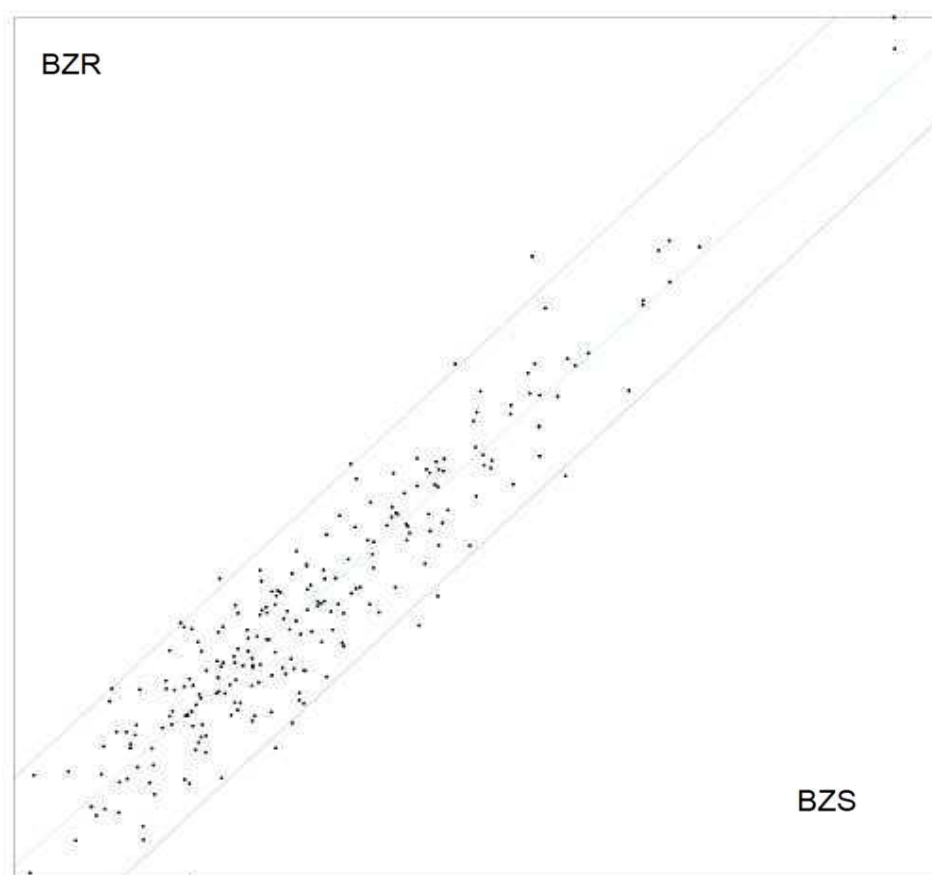
**Figura 13: Gel bidimensional de proteínas das formas tripomastigotas representativo da população BZR.** Foram aplicados 500 $\mu$ g de proteínas das formas tripomastigotas da população BZR em fita de IPG de 17 cm com gradiente de pH 3-10 NL. Posteriormente, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal G250. Peso molecular em kDa (Broad Range BIO-RAD). Imagem obtida no densitômetro GS 800 (BIO-RAD).



**Figura 14: Gel bidimensional de proteínas das formas tripomastigotas representativo da população BZS.** Foram aplicados 500 $\mu$ g de proteínas das formas tripomastigotas da população BZS em fita de IPG de 17 cm com gradiente de pH 3-10 NL. Posteriormente, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal G250. Peso molecular em kDa (Broad Range BIO-RAD). Imagem obtida no densitômetro GS 800 (BIO-RAD).



**Figura 15: Gel *master* dos *spots* das populações BZR e BZS analisados pelo software PDQuest.** Neste gel estão localizados todos os *spots* que foram utilizados na análise quantitativa dos géis bidimensionais das duas populações de parasitos. Em verde estão representados os *spots* com valores de intensidade iguais, ou menores que 2 vezes, entre as populações BZR e BZS. Em azul, os *spots* encontrados somente na população BZR. Em amarelo, *spots* encontrados somente na população BZS. Em vermelho, *spots* com valores de intensidade diferenciais ( $\geq 2x$ ) entre as populações BZR e BZS (com triângulo, mais expressos em BZR e com quadrado, mais expressos em BZS).



**Figura 16:** Representação da análise quantitativa realizada entre *spots* pareados das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*. Os *spots* foram analisados quantitativamente nos 3 géis de cada população e a média da intensidade de cada um foi distribuída no gráfico onde estão representadas as linhas de corte de 2 vezes. Eixo X: médias de intensidade dos *spots* da população BZS e eixo Y: médias de intensidade dos *spots* da população BZR.

**Tabela 1: Spots identificados nos géis 2D com diferença quantitativa acima de 2 vezes entre as formas tripomastigotas das populações BZR e BZS.**

Código do spot (SPP)	BZR <sup>a)</sup>	CV(BZR) <sup>b)</sup>	BZS <sup>c)</sup>	CV(BZS) <sup>d)</sup>	BZR/BZS <sup>e)</sup>
1306	11501.2	50.9%	5540.6	18.6%	2.08
1405	1660.5	81.5%	2335.8	19.6%	0.71
1508	3251.6	9.0%	4980.3	54.0%	0.65
2601	24326.2	49.5%	9107.4	44.4%	2.67
2503	944.1	56.8%	1933.1	80.3%	0.49
3108	2580.5	19.9%	1209.6	41.6%	2.13
4714	2284.8	24.7%	4945.0	77.7%	0.46
4404	1893.3	55.2%	937.7	8.1%	2.02
4716		0.0%	571.0	53.2%	
5407	1860.4	50.2%	4381.3	27.6%	0.42
6603	460.5	32.1%	735.9	28.7%	0.63
6203	5735.5	54.5%	2813.3	7.4%	2.04
6901	793.5	34.1%	1735.5	63.1%	0.46
7407	319.7	46.5%	1032.5	45.9%	0.31
7702		0.0%	909.6	29.6%	
8304	619.1	9.8%	994.5	53.7%	0.62
8607		0.0%	3066.1	94.3%	
8514	5269.4	10.0%	11273.4	32.1%	0.47
8714	962.0	54.5%		0.0%	
1216	5851.0	72.1%		0.0%	
1113	3597.4	22.9%		0.0%	
4717		0.0%	1068.6	103.0%	
5821		0.0%	585.4	73.3%	

a) BZR: média da intensidade do spot na população BZR

b) CV(BZR): coeficiente de variação dos valores de intensidade do spot entre os géis da população BZR

c) BZS: média da intensidade do spot na população BZS

d) CV(BZS): coeficiente de variação dos valores de intensidade do spot entre os géis da população BZS

e) Razão entre a média de intensidade do spot BZR/BZS

Linhas em amarelo: Spots presentes somente na população BZS

Linhas em azul: Spots presentes somente na população BZR

## DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, culturas de células Vero e formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foram largamente utilizadas. Para garantir a qualidade destas amostras, principalmente para não haver contaminação das amostras de proteínas de *T. cruzi* analisadas, o monitoramento da contaminação por *Mycoplasma* foi realizado por dois métodos diferentes. Embora esse monitoramento seja muito pouco utilizado como parte do controle de qualidade em estudos em biologia celular e molecular, a contaminação por *Mycoplasma* não só pode trazer grandes prejuízos para a cultura de células, como pode interferir nos resultados dos experimentos. A PCR utilizando iniciadores gênero específicos e a observação das células coradas ao microscópio de fluorescência mostraram-se eficientes no monitoramento da contaminação por *Mycoplasma*. Devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez, a PCR foi o método escolhido para o monitoramento de rotina da contaminação e confirmação de cura das culturas. Por garantir a qualidade das culturas de células e parasitos, este monitoramento foi adotado pelo sistema de controle de qualidade do Instituto René Rachou. O tratamento com antibióticos específicos, além de boas práticas na manipulação da cultura de células e parasitos, se mostrou eficiente no controle da contaminação. Todas as culturas contaminadas, tanto de células como de parasitos, foram curadas quando submetidas ao tratamento adequado, como confirmado pela PCR.



Uma vez que o objetivo deste trabalho é identificar proteínas envolvidas no mecanismo de resistência ao Bz de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, foram realizados testes *in vitro* de susceptibilidade à droga com as populações em estudo, BZR e BZS. Embora estas populações tenham sido selecionadas *in vivo*, por sucessivas passagens em camundongos tratados com Bz (Murta & Romanha, 1998), foi necessário verificar sua susceptibilidade à droga também no cultivo *in vitro* das formas tripomastigotas para garantir que estas populações mantêm o fenótipo de susceptibilidade e resistência. Muitos dos ensaios *in vitro* de susceptibilidade a drogas utilizam as formas epimastigotas pela simplicidade do cultivo sob condições axênicas. Embora o cultivo de epimastigotas seja simples, testes específicos para as



formas tripomastigotas tornaram-se necessários para uma melhor compreensão da resistência do parasito a drogas. Porém, não existiam até o momento testes *in vitro* de susceptibilidade a drogas descritos especificamente para formas tripomastigotas.

Os ensaios *in vitro* mais comuns para determinar a susceptibilidade do *T. cruzi* a drogas se baseiam na contagem de formas epimastigotas ou amastigotas intracelulares (Martínez-Díaz *et al.*, 2001; Muelas-Serrano *et al.*, 2002). Estes ensaios são laboriosos e demorados. Ensaio colorimétricos foram desenvolvidos como uma alternativa melhor devido à sua confiabilidade, sensibilidade, reprodutibilidade e simplicidade. O uso dos corantes MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] e Alamar Blue® em ensaios de susceptibilidade a drogas de formas epimastigotas já foram descritos anteriormente (Muelas-Serrano *et al.*, 2000; Villarreal *et al.*, 2004; Rolón *et al.*, 2006). Outra alternativa, é o ensaio que se baseia na atividade da  $\beta$ -galactosidase citoplasmática exógena para avaliar a susceptibilidade de parasitos transfectados a diferentes drogas (Buchner *et al.*, 1996; Vega *et al.*, 2005). Embora muito sensível, este ensaio não possibilita a comparação da susceptibilidade a drogas entre cepas/populações de *T. cruzi*. Neste trabalho, descrevemos um ensaio colorimétrico para testar *in vitro* a susceptibilidade de formas tripomastigotas utilizando o corante Alamar Blue®.

O Alamar Blue® é um indicador de viabilidade não tóxico, solúvel em água e estável no meio de cultura. A forma oxidada do Alamar Blue® é convertida à forma reduzida pela atividade de enzimas mitocondriais. Através de reação de oxi-redução, o corante passa de azul (forma oxidada) para rosa (forma reduzida). As cores intermediárias, entre a forma oxidada e completamente reduzida, indicam a porcentagem de células viáveis e, conseqüentemente, o nível de toxicidade da droga ou componente testado (O'Brien *et al.*, 2000; Biosource Alamar Blue® Assay, Technical Bulletin). A simplicidade de serem conduzidos e a sensibilidade dos ensaios que se baseiam na redução do Alamar Blue® já foram descrita em tripanosomatídeos africanos (Raz *et al.*, 1997), formas promastigotas de *Leishmania* (Mikus and Steverding, 2000) e epimastigotas de *T. cruzi* (Rolón *et al.*, 2006).

A redução do Alamar Blue® depende dos parâmetros utilizados no ensaio, como temperatura de incubação (neste caso, temperatura ótima para cultura do

parasito) número de parasitos, concentração e tempo de reação do corante (Raz *et al.*, 1997). A taxa de redução do Alamar Blue® não aumenta proporcionalmente com a extensão do tempo de incubação, como também relatado na descrição do fabricante, provavelmente devido à nova redução da forma já reduzida (resofurin) do corante. A forma reduzida do Alamar Blue®, ao ser novamente reduzida, passa da cor rosa para transparente. Desta forma, o aumento do tempo de reação não aumenta proporcionalmente a taxa de redução do corante, pois tanto a forma oxidada quanto a reduzida podem sofrer oxi-redução (O'Brien *et al.* 2000). Os resultados deste estudo mostraram que o Alamar Blue® se comportou como um corante apropriado para determinar a diferença de susceptibilidade ao Bz de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, uma vez que não foi observada uma redução significativa do corante pela droga utilizada. Além disso, devido à sua rapidez e facilidade, este ensaio poderá ser aplicado a um grande número de amostras para *screening* de drogas/componentes, e a diferentes cepas de *T. cruzi*.

Este ensaio foi capaz de detectar eficientemente *in vitro* a diferença de susceptibilidade ao Bz das formas tripomastigotas entre as populações BZR e BZS de *T. cruzi*. Embora estas populações tenham sido selecionadas *in vivo* ao Bz (Murta & Romanha, 1998), o fenótipo de resistência foi avaliado no sistema *in vitro* e se manteve até a sexta passagem em células de cultura, quando as formas tripomastigotas foram testadas quanto a sua susceptibilidade à droga.

Comparamos o ensaio de susceptibilidade ao Bz de formas tripomastigotas das populações BZR e BZS utilizando o corante Alamar Blue® com o ensaio de susceptibilidade tradicional que se baseia na contagem de parasitos liberados de células hospedeiras mantidas em cultura. Embora existam diferenças marcantes entre os dois ensaios, ainda foi possível observar a diferença de susceptibilidade ao Bz entre as populações BZR e BZS. Entretanto, os valores obtidos de IC<sub>50</sub> (concentração de Bz que inibe em 50% a liberação dos tripomastigotas) e de LC<sub>50</sub> (concentração do Bz que é letal para 50% dos tripomastigotas) foram significativamente diferentes. Foi observada uma diferença de susceptibilidade ao Bz entre as duas populações estudadas de 2 a 3 vezes no ensaio de contagem de tripomastigotas liberados de células e de cerca de 8 vezes no ensaio de viabilidade utilizando o corante. Estes dados podem indicar a participação da célula no

mecanismo de ação do Bz, acentuando o efeito citotóxico da droga, e/ou a diferença de susceptibilidade à droga entre as formas intracelulares (amastigotas) e circulantes (tripomastigotas) do parasito.

Diferença de susceptibilidade entre as formas do parasito aos nitroderivados já foi indicada pela diferença na concentração intracelular de glutathiona em formas amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas de uma mesma cepa. Foi sugerido que a susceptibilidade do *T. cruzi* aos nitroderivados estaria associada com os níveis de glutathiona livre e conjugada. As formas tripomastigotas contêm metade dos tióis (glutathiona, glutathionil-espermedina e tripanotona) comparadas às formas epimastigotas, e as formas amastigotas contêm somente um terço (Maya *et al.*, 1997; Moncada *et al.*, 1989).



Este é o primeiro estudo em que a estratégia proteômica é utilizada na busca de proteínas que possam estar envolvidas no mecanismo de resistência a drogas das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Esta estratégia foi anteriormente utilizada pelo nosso grupo para investigar a resistência a drogas em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Andrade *et al.*, em preparação) e também em outros membros da família dos tripanossomatídeos como *T. brucei* (Foucher *et al.*, 2006) e *Leishmania* (Drummelsmith *et al.*, 2003). Devido às diferenças marcantes entre as formas morfoevolutivas do *T. cruzi*, é importante que o mecanismo de resistência a drogas seja estudado também nas formas do parasito presentes no hospedeiro vertebrado, uma vez que estas têm contato direto com as drogas utilizadas no tratamento da Doença de Chagas. Os estudos de mudanças no perfil de expressão de proteínas em tripanossomatídeos tornam-se bastante adequados, pois a regulação da expressão gênica nestes organismos ocorre pós-transcricionalmente. Sendo assim, podem ocorrer variações na estabilidade e localização de proteínas (Teixeira, 1998; Clayton, 2002).

Géis 2D de proteína total de formas tripomastigotas de duas populações de *T. cruzi*, susceptível (BZS) e seu par com resistência selecionada *in vivo* ao Bz (BZR), foram comparados e as proteínas que apresentaram expressão diferencial entre as

populações serão identificadas por espectrometria de massa. O número de *spots* encontrados nos géis 2D de proteínas totais de formas tripomastigotas, em média 238 *spots*, foi menor do que o número encontrado por Paba e cols. (2004) que encontraram aproximadamente 500 *spots* em géis com gradiente de pH de 4-7, corados pela prata. Este resultado pode ser explicado pela diferença do gradiente de pH das fitas de IPG e pelo tipo de coloração utilizada. Embora a coloração dos géis pela prata seja mais sensível, e por isso detecta um número superior de *spots*, a coloração pelo Comassie Blue é mais compatível com os protocolos de identificação de proteínas por espectrometria de massa. Além disso, com base na visualização dos *spots* nos géis, realizamos a edição manual dos *spots* detectados nas imagens dos géis, eliminando das nossas amostras *spots* que não eram possíveis de serem excisados, como os muito fracos e muito próximos de outros *spots*.

Para a detecção de proteínas diferencialmente expressas entre as populações BZR e BZS em formas tripomastigotas, foi utilizada uma linha de corte de 2 vezes com base nos valores de intensidade média obtida para cada *spot*. A mesma linha de corte foi utilizada por Paba e cols. (2004) para comparar as 3 formas evolutivas do *T. cruzi*, tripomastigota, amastigota e epimastigota. Um parâmetro adicional pode ser utilizado na indicação final de proteínas diferencialmente expressas, que se baseia no coeficiente de variação dos valores de intensidade de cada *spot* nas triplicatas de géis analisadas. Neste trabalho este parâmetro não foi utilizado e, independente dos valores do coeficiente de variação, todos os *spots* com valores de intensidade média superiores a 2 vezes serão excisados para identificação por espectrometria de massa. A importância deste parâmetro será avaliada após a identificação das proteínas, com base na relevância das proteínas e sua implicação relatada na bibliografia no mecanismo de resistência do *T. cruzi* a drogas.

As duas populações de parasitos utilizadas neste estudo se originaram da mesma cepa parental (cepa Y), de forma que as diferenças na expressão de proteínas na forma tripomastigota observadas pela 2D-PAGE fossem também responsáveis pela diferença fenotípica de resistência ao Bz observada entre elas. Através de um dos testes realizados *in vitro* de susceptibilidade ao Bz foi observada uma diferença de aproximadamente 8 vezes entre a população susceptível, BZS, e

seu par com resistência selecionada *in vivo*, BZR. Pelos experimentos de 2D-PAGE e análise dos géis 2D pelo *software* PDQuest, 23 proteínas foram indicadas como diferencialmente expressas entre as populações, cerca de 9,4% de todos os *spots* analisados, o que corresponde a 1,5% do número total de proteínas da forma tripomastigota do *T. cruzi* identificadas por LC/MS/MS (Atwood *et al.*, 2005) e 0,001% do total de proteínas preditas do parasito (El-Sayed *et al.*, 2005). Utilizando uma estratégia de proteoma mais abrangente, como a LC/MS/MS, um número maior de proteínas diferencialmente entre as duas populações estudadas poderia ser encontrado. A 2D-PAGE no entanto é a metodologia disponível, também utilizada em estudos similares de busca de proteínas diferencialmente expressas entre populações de tripanossomatídeos .

Em dois trabalhos de resistência a drogas em outros tripanossomatídeos onde a estratégia de 2D-PAGE associada à MS também foi utilizada, foi identificada somente uma proteína potencialmente envolvida no fenômeno. Drummel-Smith e cols. observaram a superexpressão da pteridina redutase (PTR1) em uma população de *L. major* resistente ao metrotexato. Foucher e cols. (2006) observaram a ausência de uma proteína entre os 2000 *spots* analisados (vários gradientes de pH foram analisados) em uma população de *T. brucei* resistente a drogas arsenicais (Cymelarsan). Estes estudos indicam que a resistência a drogas em tripanossomatídeos pode estar associada a uma pequena variação no perfil de expressão de proteínas, que em conjunto, resultaria no fenótipo de resistência observado. As proteínas diferencialmente expressas na forma tripomastigota entre as populações BZR e BZS, indicadas pela estratégia de 2D-PAGE, serão identificadas por MS. Os resultados serão refinados pela avaliação da relevância das proteínas identificadas e sua implicação relatada na literatura no mecanismo de resistência do *T. cruzi* a drogas. Outros géis com gradiente de pH diferentes também poderão ser produzidos e utilizados para aumentar o número de *spots* a serem analisados, uma vez que foi observado um número maior de *spots* na faixa de pH 4-7 nos géis em que as proteínas foram separadas em gradiente de pH 3-10. Utilizando fitas de IPG com gradiente de pH mais curto (4-7) os *spots* que anteriormente poderiam estar sobrepostos poderão ser melhor separados e desta forma, melhor analisados. Os resultados obtidos neste trabalho poderão indicar

proteínas envolvidas no mecanismo de resistência da forma tripomastigota do *T. cruzi* aos nitroderivados. Estas proteínas poderão ser estudadas individualmente para verificar seu papel na manutenção do fenótipo natural ou induzido de resistência ao Bz.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O ensaio que se baseia da redução do Alamar Blue® demonstrou ser apropriado para determinar *in vitro* a susceptibilidade ao Bz de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. O ensaio colorimétrico descrito neste trabalho é simples de ser realizado, sendo uma melhor alternativa em termos de confiabilidade, sensibilidade e reprodutibilidade em relação aos ensaios que se baseiam na contagem de parasitos. Este ensaio foi capaz de detectar eficientemente a diferença de susceptibilidade ao Bz entre formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *T. cruzi*. Este ensaio poderá ser aplicado a um grande número de amostras, por exemplo, em *screenings* de drogas utilizando diferentes cepas de *T. cruzi*.
- A diferença de susceptibilidade determinada *in vitro* ao Bz entre as populações BZR e BZS de *T. cruzi* foi de aproximadamente 8 vezes quando foi avaliada a atividade direta da droga sobre as formas tripomastigotas, e de 2 a 3 vezes quando avaliada a atividade da droga sobre a liberação dos parasitos de células infectadas. Embora estas populações tenham sido selecionadas *in vivo* (Murta & Romanha, 1998), o fenótipo de resistência se manteve na cultura *in vitro* até a sexta passagem em células Vero, quando as formas tripomastigotas foram testadas quanto à susceptibilidade a droga.
- A PCR e a observação de células ao microscópio óptico de fluorescência se mostraram ferramentas eficientes no monitoramento da contaminação da cultura de células e parasitos por *Mycoplasma* sp e da confirmação de cura. Embora esse monitoramento seja muito pouco utilizado como parte do controle de qualidade em estudos em biologia celular e molecular, foi fundamental para a garantia da qualidade das amostras utilizadas neste trabalho.



- A estratégia de 2D-PAGE foi capaz de indicar proteínas diferencialmente expressas entre as formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *T. cruzi*. Os *spots* indicados foram localizados nos géis, e serão excisados e digeridos com tripsina para identificação por espectrometria de massa através do módulo MALDI-ToF-ToF. Esta etapa será realizada no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ) em colaboração com os Drs. Jonas Enrique Perales Aguilar e Alex Chapeaurouge. Acreditamos que os resultados obtidos neste trabalho poderão ajudar na identificação de proteínas envolvidas no(s) mecanismo(s) de resistência do *T. cruzi* ao benzonidazol.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdo MCB *Caracterização da sensibilidade e resistência in vitro de cepas e linhagens de Trypanosoma cruzi aos compostos nitroheterocíclicos nifurtimox e benzonidazol*. 1991 89 p. Dissertação, Mestrado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Andrade SG, Magalhaes JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull World Health Organ*. 1985;63(4):721-6.

Ashton PD, Curwen RS, Wilson RA. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends Parasitol*. 2001 Apr;17(4):198-202.

Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):473-6.

Bertelli MS, Brener Z. Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*. 1980 Dec;66(6):992-7.

Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol*. 1988 Apr;106(4):1349-58.

Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7;72:248-54

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2000 2 ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Brener Z, Costa CA, Chiari C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1976 Nov-Dec;18(6):450-5.

Brobey RK, Mei FC, Cheng X, Soong L. Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. *Braz J Infect Dis*. 2006 Feb;10(1):1-6.

Buckner FS, Wilson AJ, White TC, Van Voorhis WC. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Dec;42(12):3245-50.

Camandaroba EL, Reis EA, Goncalves MS, Reis MG, Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Mar-Apr;36(2):201-9

Camandaroba EL, Reis EA, Gonçalves MS, Reis MG, Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Mar-Apr;36(2):201-9.

Cancado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002 Jan-Feb;44(1):29-37.

Carucci DJ, Yates JR, Florens L. Exploring the proteome of *Plasmodium*. *Int J Parasitol*. 2002 Dec 4;32(13):1539-42.

Choe Y, Brinen LS, Price MS, Engel JC, Lange M, Grisostomi C, Weston SG, Pallai PV, Cheng H, Hardy LW, Hartsough DS, McMakin M, Tilton RF, Baldino CM, Craik CS. Development of alpha-keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. *Bioorg Med Chem*. 2005 Mar 15;13(6):2141-56.

Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J*. 2002 Apr 15;21(8):1881-8.

Cohen AM, Rumpel K, Coombs GH, Wastling JM. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2002 Jan;32(1):39-51

Coura J R, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jan;97(1):3-24.

Curwen RS, Ashton PD, Johnston DA, Wilson RA. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 Nov;138(1):57-66

Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics*. 2003 Mar;2(3):146-55.

Dvorak JA, Howe CL. The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells in vitro. *J Protozool*. 1976 Nov;23(4):534-7.

Dvorak JA, Hyde TP. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol*. 1973 Oct;34(2):268-83.

Dvorak JA, Poore CM. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. IV. Environmental temperature effects. *Exp Parasitol*. 1974 Aug;36(1):150-7.

El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2002 Aug;2(8):1007-17.

Engel JC, Torres C, Hsieh I, Doyle PS, McKerrow JH. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*. 2000 Apr;113 ( Pt 8):1345-54. Erratum in: *J Cell Sci* 2000 Jul;113(Pt 14):2638.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):755-9.

Foucher AL, McIntosh A, Douce G, Wastling J, Tait A, Turner CM. A proteomic analysis of arsenical drug resistance in *Trypanosoma brucei*. *Proteomics*. 2006 May;6(9):2726-32

Góngora R, Acestor N, Quadroni M, Fasel N, Saravia NG, Walker J. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica*. 2003 Jun;23(2):153-60.

Gutteridge WE, Knowler J, Coombes JD. Growth of *Trypanosoma cruzi* in human heart tissue cells and effects of aminonucleoside of puromycin, trypacidin and aminopterin. *J Protozool*. 1969 Aug;16(3):521-5.

Hauschka TS. Persistence of strain-specific behavior in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. *J Parasitol*. 1949 Dec;35(6):593-9.

Jefferies JR, Campbell AM, van Rossum AJ, Barrett J, Brophy PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics*. 2001 Sep;1(9):1128-32.

Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*. 1988 Aug 1;168(2):649-59.

Luban NA, Dvorak JA. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 3. Selection for biological characteristics following intracellular passage. *Exp Parasitol*. 1974 Aug;36(1):143-9.

Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Jan;96(1):53-9.

Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978 Apr 27;272(5656):819-21.

Moncada C, Repetto Y, Aldunate J, Letelier ME, Morello A. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp Biochem Physiol C*. 1989;94(1):87-91.

Muelas-Serrano S, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* 2000 Dec;86(12):999-1002

Murta SM, dos Santos WG, Anacleto C, Nirde P, Moreira ES, Romanha AJ. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of P-glycoprotein (PGP) genes. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Oct;117(2):223-8.

Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Jun 1;93(2):203-14

Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdé P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ. 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*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Apr;146(2):151-62.

Murta SM, Romanha AJ. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology.* 1998 Feb;116 ( Pt 2):165-71.

Murta SM, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ. In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunol.* 1999 Oct;21(10):535-44

Neal RA, van Bueren J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(5):709-14.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 1988 Jun;9(6):255-62.

Nirdé P, Larroque C, Barnabe C. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *C R Acad Sci III*. 1995 Dec;318(12):1239-44.

Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop*. 2006 Nov;100(1-2):119-32.

Nogueira N, Bianco C, Cohn Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 1975 Jul 1;142(1):224-9.

Nozaki T, Engel JC, Dvorak JA. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Jul;55(1):111-7.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(17):5421-6.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975 May 25;250(10):4007-21.

Paba J, Ricart CA, Fontes W, Santana JM, Teixeira AR, Marchese J, Williamson B, Hunt T, Karger BL, Sousa MV. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. *J Proteome Res*. 2004(b) May-Jun;3(3):517-24.

Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*. 2004(a) Apr;4(4):1052-9.

Parodi-Talice A, Duran R, Arrambide N, Prieto V, Pineyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cervenansky C, Robello C. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2004 Jul;34(8):881-6.



Pontes AL, Andrade SG. Response to chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice inoculated with strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from previously treated animals. *Resumo do XX Congresso da Soc. Bras. Med. Trop.* 1984 P.25.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001 Sep;1(2):92-100.

Rassi A, Amato Neto V, de Siqueira AF, Ferriolli Filho F, Amato VS, Rassi GG, Rassi Junior A. Treatment of chronic Chagas' disease with an association of nifurtimox and corticoid. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Nov-Dec;35(6):547-50.

Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* 2006 Jul;99(2):103-7.

Sanderson CJ, Thomas JA, Twomey CE. The growth of *Trypanosoma cruzi* in human diploid cells for the production of trypomastigotes. *Parasitology.* 1980 Feb;80(1):153-62.

Teixeira SM. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Dec;31(12):1503-16.

Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Jul;39(7):907-14.

Ullman B. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *J Bioenerg Biomembr.* 1995 Feb;27(1):77-84.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003 Nov;19(11):495-501.

Villarreal D, Barnabe C, Sereno D, Tibayrenc M. Lack of correlation between in vitro susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp Parasitol.* 2004 Sep-Oct;108(1-2):24-31.

Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummel-Smith J, Burchmore R, Girard I, Ouellette M. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 May;147(1):64-73.

World Health Organization 1991 *Control of Chagas Disease*. WHO Technical Report Series n° 811. WHO, Geneva.

World Health Organization 2002 *Control of Chagas Disease*. WHO Technical Report Series 905. WHO, Geneva; 1-109.