

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

Pós-graduação em Biologia Molecular

Tese de Doutorado

SUBPROTEÔMICA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: PROTEÍNAS ÁCIDAS E FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM ORGANELAS DE ALTA DENSIDADE

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular

Rafael Augusto Pontes Guércio

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart Co-orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Brasília, novembro 2009

Dedico esta tese a minha mãe que, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos na minha vida, com dedicação sempre me ensinou o caminho certo das coisas, da educação e dos estudos. Dedico esta tese a meu pai, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos na minha vida que Deus o tenha!

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me guiar em um caminho correto, sem vícios e cheios de esperança, pois sempre esteve ao meu lado na execução das grandes coisas em minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart pela oportunidade, apoio, incentivo, visão científica, pelas críticas construtivas, pela paciência, pelas conversas, pelo conhecimento transmitido, pela confiança ao longo destes anos todos, também na execução deste trabalho e muito mais, a lista é muito longa!

Aos meus pais, Edna Lúcia Pontes e Miguel Guércio Filho, que com muito amor e carinho sempre me incentivaram em toda minha vida e em cada passo ao longo de toda a minha vida acadêmica.

Um agradecimento especial ao meu amigo e co-orientador Prof. Dr. Sébastien Charneau, pois sem o auxílio dele talvez esta tese jamais seria igual ao que é e muito provavelmente nem sairia do papel. Agradeço pelo conhecimento repassado, pela paciência na execução dos experimentos, pela responsabilidade, pela exigência em querer fazer desta tese "uma obra prima".

A toda minha família, meus irmãos Ângela Letícia, Giovanni, Giuliano e Miguel, Nayara e sobrinha Giovanna pela compreensão, carinho e apoio, meus primos Cristiano, Fernando, Eduardo, e meus tios que me apoiaram nesta aventura.

Um agradecimento especial ao amigo Prof. Dr. Jaime Paba, a grande amiga Mirta Mittelsted e ao Carlos Garcia, que mesmo longe de Brasília, sempre me apoiaram e me incentivaram no desenvolvimento desta tese e na minha vida acadêmica e nunca abandonaram nossa amizade, mesmo cada um em diferentes pontos do planeta.

Ao Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa coordenador do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas - UnB pela confiança na execução deste trabalho. Agradeço a Adriana Dias Magalhães pelo auxílio na análise de imagens através programa ImageMaster, pela amizade ao longo destes anos, pelas discussões científicas ao nosso trabalho e agradeço também ao seu esposo Carlos Uribe pelas análises estatísticas, organização e explicação das mesmas.

Ao Rayner Myr Queiroz que durante a Iniciação científica participou nas identificações de proteínas por MS e pela amizade.

Aos Professores Jaime M. Santana e Izabela M. D. Bastos pelo opoio na cultura do *T. cruzi* e pelo fornecimento dos anticorpos MTAP e POP*Tb*80.

À Profa. Beatriz D. Lima, pela colaboração e prestatividade, que gentilmente nos forneceu a cultura celular bem como todo espaço físico e apoio técnico com muita confiança ajudando-nos nos fracionamentos celulares realizados no laboratório de Microbiologia - UnB.

Ao Prof. Dr. José Raimundo Corrêa pelas análises ao Microscópio Eletrônico de Transmissão que enriqueceram muito esta tese.

Aos professores Dr. Wagner Fontes, Dra. Mariana de Souza Castro, Dr. Ricardo Bastos Cunha, Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, Msc. Pedro Portugal Zanotta, por contribuírem na minha formação profissional.

Aos amigos/colegas de bancada do LBQP, Aline, Alex, Anna, Anne, Carlos Garcia, Caroline, Diana, Diogo "japa", Elaine, Elaine Marinho, Everton, Fabiane, Fábio, Flávia, Gabriel, Gisele, Humberto, Jaques, Jéssica, Jimmy, Lanuse, Liudy, Liz, Luis "Maluquinho", Pedro Ivo, Vitório por fazerem sempre mais divertidos todos os momentos, pelas discussões científicas, pela boa vontade, pela amizade e desta forma manter o bom ambiente que sempre foi o laboratório de bioquímica. Aos amigos de outros laboratórios, Adelson, Cristiano, Felix, Geraldino, Larissa, "Migué", Marcelo Carpes, Natália, Prof. Dr. Werner Treptow.

Aos amigos e amigas Amanda, Sr. Antonio Leiva, André Felipe, Clayton, Cláudia, Cristiano, Dalila, Eugênio, Glaubert, Junior, José Cláudio, Maurício, Natan Monsores, Rubens, que sempre estiveram ao meu lado pelo apoio e incentivo.

Agradeço à Ana, secretária do departamento de biologia celular, pelo empenho, pela boa vontade, prestatividade e pelas cobranças e ajudando desta forma a manter o alto nível da nossa pós-graduação.

Agradeço a comissão de pós-graduação pelas prorrogações cedidas, demonstrando deste modo, confiança em mim, nos meus orientadores e no nosso trabalho.

Aos amigos/funcionários Nuno Manuel Domingues e Antônio Rufino por serem muito prestativos e pelo apoio técnico.

A todos os meus amigos que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também às agências financiadoras, OMS/TDR, CNPq, FAP-DF e FINEP pelo apoio financeiro e à Universidade de Brasília que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

ABREVIATURAS (ABBREVIATIONS)

2-DE. Eletroforese bidimensional em gel (*two-dimensional gel electrophoresis*)A. Ampère (*Ampere*)

ACN. Acetonitrila (Acetonitrile)

BCIP. Sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato p-toluidina (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt)

BLAST. Ferramenta de busca de alinhamento local básico (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA. Albumina sérica bovina (bovine serum albumine)

CBB. Coloração com azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue*)

CDC. Centro de controle e prevenção de doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CER. Reagente de estração citoplasmatica (Cytoplasmic Extraction Reagent)

Da. Dalton (Dalton)

DNA. Ácido desoxiribonucléico (desoxiribonucleic acid)

DMEM. Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DTT. Ditiotreitol (Dithiothreitol)

EDTA. Ácido etilenodiamino tetraacético (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)

EGTA. Ácido glicol-bisaminoetileter (ethylene glycol-bis-(b-amino-ethyl ether)

GAR. Anticorpos de cabra contra coelho (Goat Anti Rabbit)

ICAT. Marcação de afinidade por isótopo (Isotope-Coded Affinity Tag)

IEF. Focalização isoelétrica (Isoelectric focusing)

IPG. Gradiente imobilizado de pH (Immobilized pH gradient)

LIT. Meio de cultura Liver infusion tryptose

mA. Miliampère (Milliampere)

MALDI-TOF/TOF MS. Espectrometria de massas de tempo de vôo *in tandem* por desorção e ionização a laser assistida por matriz (*Matrix assisted laser desorption/ ionization time of flight/ time of flight mass spectrometry*)

mRNA. Ácido ribonucléico mensageiro (Messenger ribonucleic acid)

MS. Espectrometria de massas (Mass Spectrometry)

MTAP. Metiladenosina fosforilase (Methyl Adenosine Phosphorylase)

NBT. azul de nitro-tetrazólio (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)

NER. Reagente de extração nuclear (Nuclear Extraction Reagent)

NL. Não linear (Non Linear)

PAGE. Eletroforese em gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

PBS. Solução salina tamponada por fosfato (phosphate buffered saline)

pI. Ponto isoelétrico (Isoelectric point)

PMF. Perfil de massa dos peptídeos (Peptide mass fingerprinting)

POPTb80. Prolil oligopeptidase de *Trypanosoma brucei* (*Prolyl oligopeptidase from Trypanosoma brucei*)

SCC1. Complexo de coesão de cromátides irmãs (*Sister chromatid cohesion complex*)

SDS. Dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate)

SL. Seqüência líder (Leader sequence)

TBS. Tampão tris salino (Tris buffered saline)

TCA. Ácido tricloroacético (trichloroacetic acid)

TFA. Ácido trifluoroacético (trifluoracetic acid)

TOF. Tempo de vôo (Time of flight)

V. Volt (*Volt*)

RESUMO

O agente etiológico da Doença de Chagas é o parasito flagelado Trypanosoma cruzi (T. cruzi), o qual possui um ciclo de vida alternado entre vetores triatomíneos e hospedeiros mamíferos. A regulação da expressão gênica em T. cruzi dá-se ao nível pós-transcricional o que impossibilita a correlação direta entre os níveis de mRNA e proteínas e ao mesmo tempo torna atrativa a abordagem proteômica. O presente trabalho pretendeu contribuir com os estudos proteômicos do parasito seguindo duas vertentes, sendo a primeira a proteômica comparativa dos diferentes estágios de vida do T. cruzi com ênfase nas proteínas ácidas e a segunda a caracterização subproteômica de T. cruzi de uma fração enriquecida em organelas de alta densidade. Assim, foram padronizados perfis eletroforéticos bidimensionais em géis de poliacrilamida (2-DE) usando gradientes estreitos de pH nas faixas de pH 3-5,6NL; 5,3-6,5 para extratos totais das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota. Os perfis bidimensionais das formas tripomastigota e amastigota mostraram-se bastante complexos com mais de 1.000 spots/gel e foram analisados computacionalmente a fim de detectarem-se spots protéicos estágio-específicos e diferencialmente expressos. Proteínas dos géis foram identificadas por técnicas de espectrometria de massa (MS). No que diz respeito ao subproteoma organelar, foi isolada da forma epimastigota uma fração de organelas de alta densidade. Análises por microscopia eletrônica de transmissão, e por imunotransferência, mostraram claramente um forte enriquecimento de núcleo. Os spots dos géis bidimensionais, em faixa ampla de pH 3-10 e nas faixas de pH 4-7 e pH 6-11, foram identificados por MS sendo encontradas proteínas nucleares, mitocondriais, flagelares e glicosomais e diversas proteínas hipotéticas.

ABSTRACT

The flagellate parasite Trypanosoma cruzi (T. cruzi), the etiological agent of Chagas disease, possesses an alternate life cycle between triatomine vectors and mammalian hosts. The fact that T. cruzi gene expression regulation is posttranscriptional prevents the direct correlation between mRNA and protein levels and makes the proteomic approach very attractive. The present work aimed at contributing to the parasite proteomic studies following two different approaches, the comparative proteomics of *T. cruzi* life stages emphasizing the acidic proteins and the subproteome characterization of a *T. cruzi* fraction enriched in high density organelles. Thus, narrow pH range (pH 3-5.3 and pH 5.3-6.5) were optimized for protein extracts of epimastigote, tripomastigote and amastigote cells. The resulting tripomastigote and amastigote 2-DE profiles, that were rather complex, displaying more than 1,000 spots/gel, were computationally analyzed in order to determine stage-specific an differentially expressed spots. The 2-DE spots of interest were identified by mass spectrometry (MS) methods. Concerning the T. cruzi subproteome we isolated a fraction from epimastigote cells that was enriched in high density organelles including nuclei as confirmed by transmission electron microscopy, and immunoblotting. The spots of the 2-DE gels in the pH ranges 3-10, 4-7 and 6-11 were identified by MS displaying nuclear, mitochondrial, flagellar, glycosomal as well as hypothetical proteins.

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CICLO DE VIDA DO TRYPANOSOMA CRUZI	1
1.2. Controle da expressão em T. cruzi	3
1.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	4
1.4. PROTEÔMICA DE T. CRUZI	8
2. JUSTIFICATIVA	10
	40
3.1. ANALISES PROTEOMICAS COMPARATIVAS DAS PROTEINAS ACIDAS DE ESTAGIOS DE 1. CRUZI 3.2. ANÁLISE SUBPROTEÔMICA DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM ORGANELAS DE ALTA DENSIDADE DA	. 12
	13
	14 11
4.2. EXTRAÇÃO DE PROTEINAS PARA 2-DE	14
4.4. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SUBCELUI AR ENRIQUECIDA EM ORGANELAS DE ALTA DENSIDADE DE	15
EPIMASTIGOTA	15
4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA FRACÃO SUBCELULAR	18
4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNAS	18
4.7. SDS-PAGE E 2-DE	19
4.8. ELETROTRANSFERÊNCIA E IMUNODETECÇÃO (WESTERN BLOTTING)	21
4.9. REVELAÇÃO DOS GÉIS COM NITRATO DE PRATA E CBB	21
4.10. DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	22
4.11. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	23
4.12. ANÁLISES COMPUTACIONAIS DE IMAGENS	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA ÁCIDO DOS ESTÁGIOS DE VIDAS DO T. CRI	JZI 26
	27
5 1 1 Padronização dos perfis 2-DE de T cruzi em faixas estreitas de nH ácido	27
5.1.2. Análise proteômica comparativa das formas tripomastigota e amastigota em fa	aixa
estreita de pH ácido	32
5.2. Discussão	48
DENSIDADE DE T. CRUZI	58
	50
6.1.1. Extração das proteínas nucleares de T. cruzi utilizando kit 2-D Sample Prep for	59
Nuclear Proteins (PIERCE) 6.1.2. Obtenção da fração subcelular enriquecida em organelas de alta densidade de	59
epimastigota	61
6.1.3. Microscopia eletronica de transmissão da fração enriquecida de organelas de	alta
densidade	/8
6.2. DISCUSSAO	79
FIGURA 27:. CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DAS	96
	00
7. CONCLUSAO E PERSPECTIVAS	87
	88

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi. Adaptado do Centro de Controle de
Doenças (CDC), 2009 no site

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm2
Figura 2 : Ilustrações esquemáticas dos estágios de vida do <i>T. cruzi.</i> A) epimastigota, B) tripomastigota, C) amastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i> estudas neste trabalho. Fonte de Sousa, 2000
Figura 3: Fluxograma do fracionamento subcelular de T.cruzi 177
Figura 4 : Sistema de IEF IPGphor 3 (GE Healthcare). A, suporte de focalização isoelétrica do tipo "manifold" onde os IPG strips são mantidos fixos por eletrodos (B); C, equipamento de IEF IPGphor 3 (GE Healthcare) ; D, método de reidratação in gel no IPG strip holder ("sarcófago")
Figura 5 : Padronização dos perfis 2-DE da forma epimastigota na faixa de 3-5,6 NL. As 2-DE foram realizadas utilizando <i>IPG strips</i> 3-5,6 NL de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e corados com nitrato de prata. A, B, C, e D se referem aos métodos de IEF aplicados seguindo os programas da Tabela 1
Figura 6 : Padronização dos perfis 2-DE da forma epimastigota na faixa de pH 5,3- 6,5. As proteínas da forma epimastigota foram aplicadas nos <i>IPG strips</i> por reidratação <i>in gel</i> . A IEF foi realizada em <i>strip holder</i> (A) ou <i>manifold</i> (B). As 2-DE foram realizadas utilizando <i>IPG strips</i> 5,3-6,5 de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e corados com nitrato de prata
Figura 7 : Perfis 2-DE ácidos de <i>T. cruzi</i> na faixa de pH 3-5,6 NL. As amostras foram provenientes de extratos dos estágios A) tripomastigota e B) amastigota. A quantidade de amostra foi de 220 µg de proteína por gel. As 2-DE foram realizadas utilizando <i>IPG strips</i> 3-5,6 NL de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e revelados com nitrato de prata
Figura 8 : Perfis 2-DE ácidos de <i>T. cruzi</i> na faixa de pH 5,3-6,5. As amostras foram provenientes de extratos dos estágios A) tripomastigota e B) amastigota. A quantidade de amostra foi de 220 µg de proteína por gel. As 2-DE foram realizadas utilizando <i>IPG strips</i> 5,3-6,5 de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e revelados com nitrato de prata
Figura 9 : <i>Spots</i> identificados por MS no mapa 2-DE de amastigota na faixa de pH 3-5,6 NL em SDS-PAGE 12%
Figura 10 : <i>Spots</i> identificados por MS no mapa 2-DE de tripomastigota na faixa de pH 3-5,6 NL em SDS-PAGE 12%

Figura 14: SDS-PAGE 12% dos extratos protéicos das três formas de *T. cruzi* preparados usando o kit 2-D *Sample Prep for Nuclear Proteins*-PIERCE. E) epimastigota, T) tripomastigota e A) amastigota. O gel foi revelado com nitrato de prata.

Figura 17: Validação do fracionamento sub-celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* por imunodetecção (fração FS2). Em A) imunodetecção com anticorpos anti-SCC-1: Em B) limunodetecção anticorpos anti-MTAP: 1- extrato total de epimastigota; 2- fração FS2; 3- fração FC. ET; extrato total de epimastigota...... 62

Figura 18: Perfil 2-DE da fração FS2 exibindo a localização das isoformas de SCC-1 de *T. cruzi* reveladas por imunotransferência em destaque em vermelho. 64

Figura 23: Mapa 2-DE da fração FS1 na faixa de pH de 3-10 seguido de SDS-PAGE 12% e revelado com nitrato de prata com a localização das proteínas identificadas por MS. O resultado das identificações está apresentado na tabela 9.

Figura 25: Classificação funcional das proteínas identificadas da fração FS1 84

Figura 26 Classificação funcional das proteínas identificadas da fração FS2 85

Figura 27:.	Classificação	funcional	das proteínas	identificadas	das frações	FS1 e
FS2						86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos testados para IEF na faixa estreita de pH 3-5,6 NL...... 29

 Tabela 2. Métodos testados para IEF na faixa estreita de pH 5,3-6,5

 31

Tabela 4: Proteínas identificadas do mapa 2-DE das formas amastigota etripomastigota na faixa pH entre 3-5,6 NL. Alguns spots após análise por *peptide*mass fingerprinting foram confirmados por fragmentação de dois peptídeossubmetidos a MS/MS.41

Tabela 5: Proteínas identificadas do mapa 2-DE das formas amastigota etripomastigota na faixa pH entre 5,3-6.5.45

Tabela 6: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS2 da formaepimastigota na faixa de pH 4-7 por PMF.68

Tabela 7: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS2 da forma epimastigota na faixa de pH 4-7 por fragmentação (MS/MS)......70

Tabela 8: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS2 da formaepimastigota na faixa de pH entre 6-11 por PMF72

Tabela 9: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS1 da formaepimastigota na faixa de pH entre 3-10 por PMF76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas é uma doença endêmica em toda a América Latina que afeta 16-18 milhões de pessoas com mais de 100 milhões expostas em áreas de risco (Word Health Organization, 2002). Também conhecida como tripanosomíase americana, tem como agente etiológico o parasito flagelado *Trypanosoma cruzi* (reino protista, filo protozoa, classe kinetoplastidae, ordem trypanomastida, família trypanosomatidae).

A família Trypanosomatidae diverge no início da evolução dos eucariotos próximo à base da árvore evolucionária antes mesmo do surgimento das várias linhagens de protozoários e bem antes da separação das linhagens metazoa que compreendem animais, plantas e fungos (Sogin et al., 1993). Durante sua evolução os tripanossomatídeos colonizaram hospedeiros mamíferos independentemente dando origem ao ancestral tripanossoma sul americano Trypanosoma cruzi, o tripanossoma africano T. brucei e Leishmania, sendo que todos eles estão associados a diferentes insetos vetores, diferentes estratégias de sobrevivência no hospedeiro mamífero e diferentes patologias (Beverly, 2003). O Trypanosoma cruzi apresenta uma única e grande mitocôndria onde o DNA mitocondrial (kDNA) está compartimentado em uma estrutura chamada cinetoplasto. Esta estrutura é composta por centenas de moléculas de DNA circulares formando os maxi e mini círculos de DNA que codificam os RNAs ribossômicos e as enzimas envolvidas na respiração celular (Da Silveira, 2000).

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida digenético alternado entre insetos vetores e hospedeiros mamíferos. Durante seu ciclo evolutivo, o parasito se diferencia em quatro estágios principais: epimastigota, tripomastigota metacíclico, tripomastigota e amastigota (de Souza, 1984). Devido aos diferentes ambientes a que é submetido, o parasito fica sujeito a mudanças de condições tais como temperatura, nutrientes, pH e fatores imunológicos. Em resposta a estes fatores, o parasito modifica a expressão de certas proteínas de forma a se adaptar ao novo *hábitat*.



Figura 1: Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi. Adaptado do Centro de Controle deDoenças(CDC),2009nositehttp://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm

No interior do intestino do inseto vetor, subfamília Triatominae, família Reduviidae, ordem Hemíptera (de Paula *et al.*, 2005) as formas epimastigotas se replicam e migram para a porção posterior onde rapidamente sofrem diferenciação em tripomastigotas metacíclicos, os quais são as formas infectantes para os mamíferos. Quando o triatomíneo se alimenta do sangue de mamíferos ele expele através de suas fezes e urina as formas metacíclicas que quando alcançam a corrente sangüínea, invadem outras células iniciando o ciclo celular infeccioso. No interior das células do organismo hospedeiro, a forma tripomastigota diferencia-se em amastigota (forma esférica e sem flagelo aparente) e após algumas replicações diferenciam-se novamente na forma tripomastigota que são liberadas para a corrente sanguínea, dando continuidade ao ciclo infeccioso.



Figura 2: Ilustrações esquemáticas dos estágios de vida do *T. cruzi.* A) epimastigota, B) tripomastigota, C) amastigota do *Trypanosoma cruzi* estudas neste trabalho. Fonte de Sousa, 2000.

1.2. Controle da expressão em T. cruzi

Os tripanossomatídeos não usam o início da transcrição como uma etapa regulatória do controle da expressão gênica. De uma forma geral, os genes codificadores de proteínas nestes organismos estão organizados em grandes unidades de transcrição policistrônicas que geram RNAs mensageiros policistrônicos precursores, os quais são processados em mRNA monocistrônicos através mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação (Graham, 1995; Vanhamme & Pays, 1995).

O trans-splicing é uma reação intermolecular da qual participam uma espécie doadora (RNA da seqüência líder, SL) e um aceptor, que é o mRNA que está sendo sintetizado. A reação envolve a clivagem das duas espécies de RNAs e transferência da SL para o mRNA. Como os RNAs mensageiros e a SL são codificados por genes situados em diferentes sítios do genoma, o processo foi denominado *trans-splicing*. A SL está teoricamente presente em todos os mRNAs do tripanossoma. Existem evidências de que a SL confere estabilidade ao mRNA, impedindo sua degradação auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomos (Da Silveira, 2000)

Devido à complexa regulação pós-transcricional em *T. cruzi* e a falta de correlação, em muitos casos, entre níveis de mRNA e proteínas, é evidente a importância da análise de proteomas para o estudo da expressão gênica nesse parasito. O estudo do proteoma das várias formas celulares do parasito também pode fornecer informações complementares, tais como modificações pós-traducionais de proteínas, que certamente desempenham um papel crucial na modulação da função protéica nestes parasitos.

1.3. Análise proteômica

O proteoma é o conjunto de proteínas expressas em uma amostra biológica em um dado momento, independente se sua origem é celular, tecidual ou fluida (Aebersold & Goodlett, 2001). Enquanto o genoma é praticamente estático e pode ser bem definido para um determinado organismo, o proteoma está continuamente em mudança devido às respostas aos estímulos internos e externos. Várias são as metodologias e estratégias adotadas pela proteômica para estudar a expressão protéica de um organismo. Dentre elas destacamos, 1) a separação de proteínas por meio de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE), seguida de análise dos *spots* protéicos após digestão proteolítica usando espectrometria de massas (MS), e 2) digestão enzimática das proteínas totais presentes na amostra e análise dos peptídios resultantes por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massa (LC-MS/MS).

A eletroforese bidimensional como técnica qualitativa, vem sendo utilizada desde que foi descrita em 1975 (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Esta técnica tem um poder de resolução que permite separar milhares de polipeptídios de acordo com seus pontos isoelétricos na primeira dimensão e suas massas moleculares aparentes na segunda dimensão.

Instrumentos hoje indispensáveis na pesquisa proteômica, os espectrômetros de massas tem passado por um progresso tecnológico constante em diversos aspectos como o melhoramento na resolução, no limite de detecção e na facilidade no manuseio dos mesmos.

Os espectrômetros de massas são equipamentos analíticos que determinam as massas moleculares de compostos químicos através da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa/carga (m/z).

De um modo geral, as amostras introduzidas em um espectrômetro de massas sofrem ionização e os íons formados são separados por um analisador de massas de acordo com seus m/z e detectados por um detector de íons, convertendo-os em sinais elétricos que são processados e gerando, enfim, o espectro de massas.

Algumas configurações de equipamento de MS comumente utilizadas são a ionização/ desorção de matriz assistida por laser acoplada a analisador tipo "tempo de vôo" (*Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight,* MALDI-TOF) e a ionização por *electrospray* (*Electrospray ionization ESI*) conjugada com analisador híbrido ortogonal constituído de quadrupolo e "tempo de vôo" (TOF).

Nas análises de biopolímeros como proteínas e peptídeos, no modo MALDI, a amostra é misturada com uma matriz em fase sólida e ionizada pela incidência de um feixe de laser, enquanto que no modo ESI, a amostra em fase liquida é ionizada através da nebulização de gotículas altamente carregadas na presença de um forte campo elétrico.

Uma ampla variedade de analisadores compatíveis com MALDI e ESI são usados em proteômica tais como os analisadores "tempo de vôo" (TOF), onde as massas são determinadas medindo-se o tempo de vôo que um íon leva até chegar ao detector, este tempo é proporcional a raiz quadrada de *m/z* (Siuzdak, 1996). Um analisador TOF/TOF acoplado ao MALDI fornece a geração de dados para *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) e para sequenciamento de peptídeos em um único instrumento. Basicamente, dois analisadores TOF são separados por uma célula de colisão sendo que o primeiro analisador TOF é usado para a seleção do íon precursor e onde ocorrem as colisões de alta energia, o segundo analisador TOF determina a razão *m/z* dos íons separados. Esta configuração permite uma alta sensibilidade e alta resolução nos modos MS e MS/MS (Medzihradszky *et al.*, 2000; Westermeier, 2008).

A maioria dos equipamentos MALDI comerciais vem incorporada a um refletor (*reflectron*) o qual melhora a resolução dos íons agindo como um espelho eletrostático, invertendo a trajetória dos íons aumentando a eficiência do tubo de vôo e reduzindo a energia cinética de um íon.

lons gerados de mesma massa podem conter diferentes energias cinéticas quando saem da fonte, dependendo de sua posição na fonte quando a tensão de aceleração foi aplicada e por conseguinte, os íons de mesma massa chegam ao detector em diferentes momentos, reduzindo a resolução e acurácia das massas. Um refletor pode acomodar essas pequenas diferenças de energia cinética resultando que íons de mesma massa atingem bem mais focados no detector, melhorando muito a resolução e, posteriormente, a precisão das massas (Mamyrin, 1994).

Espectrômetros de massas com ionização ESI muitas vezes utilizam analisadores do tipo quadrupolo que consiste em quatro barras paralelas hiperbólicas, através do qual os íons em fase gasosa atingem uma trajetória estável. Estes instrumentos utilizam potenciais de corrente contínua e de radiofreqüência (RF) para separar diretamente os íons de acordo com a sua razão m/z. Em geral os quadrupolos são limitados e possuem baixa resolução. Sendo assim, há a possibilidade de combinação com outros analisadores como TOF aumentando o poder de resolução e tornando as identificações muito mais precisas.

Os analisadores do tipo *lon Trap* (IT) são baseados no mesmo princípio dos quadrupolos, porém nos IT, os íons não apresentam mais uma trajetória através dos quadrupolos e sim sendo aprisionados, entre eles (March, 1997) pelo campo elétrico formado. Os íons são ejetados para fora do analisador devido a uma crescente RF que desestabiliza os íons e desta forma os ejeta em direção ao detector de acordo com os valores de m/z.

Outro analisador utilizado em estudos proteômicos é o FT-ICR (*Fourier transform ion cyclotron-FT-ICR*). Similarmente a um *ion trap*, este instrumento é capaz de prender e armazenar íons. A célula de ICR reside em um forte campo magnético e consiste de três placas paralelas dispostas em um cubo. Na célula,

os íons de uma dada razão m/z tem uma freqüência ciclotron de um determinado raio de órbita. Aplicando uma tensão de RF na mesma freqüência que a freqüência ciclotron, os respectivos íons absorvem a energia e são acelerados para um raio de órbita maior. Quando a tensão RF é removida os íons energizados aceleram até atingirem um raio de rotação constante. Íons que apresentam freqüência ciclotron diferente permanecem excitados e portanto, os íons de diferentes massas podem ser separados (Westermeier, 2008).

Em resumo, foi desenvolvida uma diversidade de configurações de espectrômetros de massas com diferentes capacidades em termos de velocidade, resolução, sensibilidade e faixa de massa/carga, porque nenhum deles possui todas as características desejadas para um experimento ideal de proteômica (Wysocki *et al.*, 2005).

Um dos métodos mais difundidos e bem estabelecidos de identificação de proteínas e peptídeos por espectrometria de massas consiste na técnica de *peptide mass fingerprinting* (PMF) no qual a proteína a ser identificada é digerida com tripsina ou algum outro agente proteolítico e as massas dos peptídeos são determinadas. É gerada uma lista de massas que é comparada através de programas de bioinformática com os peptídeos resultantes da digestão teórica das seqüências depositadas em bancos de dados (Mann *et al.*, 1993).

Novas metodologias têm sido apresentadas no sentido de melhorar as análises proteômicas tornando-as mais eficientes, tal como a aplicação de métodos fluorescentes na marcação de proteínas em gel. A utilização deste tipo de marcação permite quantificar as proteínas em uma grande faixa de concentrações e apresenta um limite de detecção semelhante ao da coloração com nitrato de prata. Neste contexto, destaca-se a tecnologia DIGE-*Difference Gel Electrophoresis* (Unlu *et al.*, 1997; Tonge *et al.*, 2001; Alban *et al.*, 2003) na qual após a marcação de dois ou três extratos protéicos com fluorocromos (moléculas fluorescentes) diferentes (Cianina 2, Cianina 3 e Cianina 5) são misturados e separados em um único gel 2-DE.

A visualização de cada um dos perfis proteômicos é possível após excitar o gel em 3 comprimentos de onda diferentes, específicos para cada fluorocromo.

Normalmente, uma das amostras funciona como controle interno o qual permite aumentar ainda mais o rigor da normalização e da comparação das concentrações de diferentes proteínas nas amostras biológicas comparadas.

Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos de marcação *in vivo* e *in vitro* com o objetivo de se distinguir, por espectrometria de massas, a concentração relativa de proteínas de duas amostras biológicas, através de diferenças (isotópicas) da sua massa molecular (Steen & Pandey, 2002; Mann, 2006). Um dos métodos *in vivo*, desenvolvidos para detectar diferenças na abundância de proteínas entre duas amostras é conhecida como *SILAC* (*Stable Isotope Labelling with Amino Acid in Cell Culture*). Nesta metodologia, duas populações de células são mantidas em cultura, sendo que uma das populações é mantida em meio contendo aminoácidos não marcados. O meio de crescimento da segunda população contém aminoácidos carregados com isótopos estáveis; assim, quando as células estão crescendo neste meio, elas incorporam aminoácido marcado. As proteínas de ambas populações celulares podem ser combinadas e analisadas juntas em espectrômetro de massas.

Por outro lado, a marcação *in vitro* processa-se sobre extratos protéicos através de vários passos de modificação química, sendo a marcação com *ICAT* (*isotope-coded affinity tag*) um dos primeiros processos utilizados (Gygi *et al.*, 1999).

1.4. Proteômica de *T. cruzi*

Em 2004, nosso grupo publicou um dos primeiros estudos de análise proteômica entre as formas do *T. cruzi*, usando a eletroforese bidimensional, análise computacional e espectrometria de massas (Paba *et al.*, 2004a). Nesse trabalho foram otimizadas as condições para eletroforese bidimensional apresentando os primeiros mapas 2-DE. Grande parte das proteínas identificadas apresentaram níveis de expressão diferencial entre três formas evolutivas epimastigota, tripomastigota e amastigota e durante a amastigogênese. Porém, o número de proteínas focalizadas nos géis e o número de identificações obtidas

representaram uma pequena parte do proteoma total de cada forma evolutiva. Similarmente, outros estudos através do uso de 2-DE e PMF identificaram apenas 45 proteínas presentes em epimastigota da linhagem Dm28c (Parodi-Talice *et al.*, 2004).

Também usando uma abordagem proteômica baseada em 2-DE-MS foi analisado o processo de metaciclogênese do parasito (Parodi-Talice *et al.*, 2007). Mais recentemente, foi produzido um primeiro mapa proteômico bidimensional da linhagem CL Brener, a qual foi a mesma escolhida para o projeto de sequenciamento genômico (Sodré *et al.*, 2009).

A fração alcalina do proteoma de *T. cruzi* foi analisada utilizando-se um método otimizado de 2-DE. Nesse mesmo trabalho foram realizadas comparações entre os proteomas das formas epimastigota e tripomastigota usando a técnica *two-in-one gel* (Magalhães *et al.*, 2008).

Abordagens que não usam a 2-DE também tem sido aplicadas para estudos proteômicos do *T. cruzi.* (Paba *et al.*, 2004b) utilizaram uma análise comparativa quantitativa das proteínas das formas tripomastigota e amastigota utilizando a tecnologia *ICAT* (*isotope-coded affinity tag*), seguido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Assim, 41 proteínas foram identificadas com nível de expressão quantificado sendo a maioria delas pertencentes a proteínas de organização celular, metabolismo e proteínas de destinação.

Ainda por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), foi realizada a análise proteômica de *T. cruzi* usando-se uma estratégia de larga escala (*shotgun proteomics*) sendo identificadas 2784 proteínas totais de amastigotas e tripomastigotas, encontrando 1008 correspondentes as seqüências gênicas anotadas como hipotéticas(Atwood *et al.*, 2005).

Desde então, alguns estudos do proteoma de *T. cruzi* tomaram nova direção, isto é, a abordagem foi direcionada para o fracionamento celular no sentido de identificar novas proteínas ainda não descritas, pois no caso do subproteoma organelar, existe a redução da complexidade da amostra e as proteínas presentes em pequenas quantidades e em organelas específicas são reveladas (Taylor *et al.*, 2003). Esse foi o caso do estudo proteômico de um enriquecido organelar

onde foram identificadas 396 proteinas por LC-MS/MS, sendo 138 anotadas como hipotéticas com 38 proteínas não descritas anteriormente (Ferella *et al.*, 2008). Usando uma abordagem semelhante, foi analisado o subproteoma da fração de reservosoma de epimastigota com identificação de 709 proteínas, sendo 456 proteínas com funções conhecidas e 253 classificadas como hipotéticas e desta forma foi possível a identificação de novas proteínas de diferentes classes como enzimas, proteínas transportadoras, dentre outras (Sant'Anna *et al.*, 2009).

Outros estudos proteômicos têm sido conduzidos com abordagem clínica usando géis comparativos de pacientes em estado chagásico, utilizando identificações por PMF e espectrometria de massas para observação do perfil protéico da cardiomiopatia no músculo miocárdio (Teixeira *et al.*, 2006). Outro estudo aborda uma análise proteômica de *T. cruzi* resistente ao medicamento Benzonidazol (Andrade *et al.*, 2008). Este medicamento conhecido mais eficaz contra a doença de Chagas, um derivado 2-nitroimidazólico, diminui a síntese de proteínas, reduz a incorporação dos precursores de RNA e diminui a incorporação de timidina ao DNA (Silveira, 2000). Assim demonstraram que o parasito apresenta superexpressão de proteínas que o torna resistente ao medicamento.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos trabalhos prévios de análise proteômica e de caracterização bioquímica de proteínas de *T. cruzi*, o número de proteínas reveladas até o momento foi relativamente pequeno comparado com os mais de 12.000 genes codificantes de proteínas sequenciados do parasito (El-Sayed *et al.*, 2005). Nesse trabalho tentou-se contribuir para a obtenção de um conhecimento mais abrangente do proteoma do *T. cruzi*. Assim foi realizada a separação de proteínas por 2-DE com gradientes estreitos em faixas ácidas de pH (pH 3-5,6 NL, 5,3-6,5), nas quais é observada uma maior concentração de *spots* de modo a obter maior resolução dos mesmos. Essa abordagem foi aqui empregada para comparar o proteoma de diferentes estágios de vida do parasito. Além disso foram isoladas

proteínas de frações subcelulares por metodologias de extração ou fracionamento, definindo o "subproteoma" a ser estudado. Trabalhar com fração organelar celular permitiu focalizar nossas análises em um conjunto de proteínas de origem conhecida como, por exemplo, uma fração enriquecida em organelas de alta densidade de *T. cruzi* a partir de um método simples e rápido de fracionamento.

Nas duas abordagens, objetivou-se o enriquecimento e a posterior identificação de proteínas pouco expressas no parasito, com o intuito de entender melhor as bases da regulação da expressão gênica/ proteômica bem como as proteínas envolvidas em processos como a diferenciação e divisão celular do *T. cruzi*.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou a análise proteômica e subproteômica dos diferentes estágios de vida do *Trypanosoma cruzi* com o intuito de gerar novas informações a respeito dos aspectos moleculares do parasito. O trabalho pode ser dividido em duas partes principais, e os objetivos específicos de cada uma das partes segue abaixo.

3.1. Análises proteômicas comparativas das proteínas ácidas de estágios de *T. cruzi*

Objetivou-se construir mapas proteômicos dos diferentes estágios de vida do parasito em faixas ácidas de pH, assim como verificar a expressão diferencial de proteínas ácidas, com a finalidade de correlacioná-la com características do ciclo de vida do parasito. Para tanto foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Obter os estágios de vida epimastigota, amastigota e tripomastigota.

- Otimizar as condições de focalização isoelétrica em gradientes estreitos de pH nas faixas 3-5,6 NL e 5,3-6,5;

- Produzir perfis 2-DE ácidos com alta resolução para os três estágios do parasito;

 Proceder a análise digital dos perfis bidimensionais a fim de quantificar o número total de *spots* assim como determinar a expressão diferencial de proteínas entre os diferentes estágios de vida do parasito através de análises estatísticas;

-Identificar os *spots* de proteínas dos géis 2-DE através de espectrometria de massa;

-Correlacionar os resultados obtidos com as características biológicas de cada estágio de vida

3.2. Análise subproteômica da fração enriquecida em organelas de alta densidade da forma epimastigota

Objetivou-se a análise das proteínas de uma fração enriquecida em organelas de alta densidade, com ênfase nas proteínas nucleares e mitocondriais da forma epimastigota. Para tanto foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Cultivar formas epimastigotas

- Isolar fração subcelular enriquecida em organelas de alta densidade da forma epimastigota;

- Otimizar e construir perfis 2-DE do sub-proteoma da fração organelar de alta densidade;

- Identificar as proteínas organelares de epimastigota para construção do mapa proteômico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura celular

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* dos estoques Berenice e CL Brener foram mantidas em monocamadas de células musculares L6, linhagem celular de mioblasto de rato bem como em células heteropóides Vero derivadas de células renais de macacos *Cercopithecus aethiops*, em meio líquido DMEM pH 7,5 suplementado com 7,5% de soro fetal bovino a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ (Andrews & Colli, 1982). Formas amastigotas axênicas foram obtidas a partir da incubação de tripomastigotas em meio DMEM ácido (pH 5,0) durante 9 h a 37 °C. Formas epimastigota foram mantidas em meio LIT (*liver infusion tryptose*) com 7,5% de soro fetal bovino inativado a 28 °C durante 5 dias observando a turbidez do meio até o momento de colheita e solubilização dos parasitos.

4.2. Extração de proteínas para 2-DE

Formas epimastigota, tripomastigota e amastigota foram coletadas por centrifugação a 3.400 × g, 10 min, 4 °C e lavadas três vezes em TBS 1 X, pH 7,4. Alíquotas da suspensão de células foram fixadas com formaldeído 3.7% em TBS e contadas em câmara de Neubauer. Ao *pellet* de 1 × 10⁹ células equivalente a 100 µL, foram adicionados 100 µL de SDS 0,2% e a amostra foi fervida por 5 min para lisar as células e inativar as proteases e então colocada imediatamente no gelo por 1 min. Um volume de 100 µL de tampão de solubilização (7,77 M uréia, 2,22 M tiouréia, 85 mM DTT, 2,5% Triton X-100) suplementado com um coquetel de inibidor de proteases (Complete Mini Protease Inhibitor cocktail, Roche, Mannheim, Germany) foi adicionado ao lisado celular e imediatamente aliguotado e armazenado a -20 °C. Para minimizar a variabilidade da amostra para cada estágio de vida do parasito, amostras provenientes de cinco culturas separadas foram misturadas formando uma mistura de proteínas as quais foram usadas nas análises de eletroforese bidimensional. O volume das amostras foi completado com o mesmo tampão de solubilização 2-DE para manter a concentração final em 1,5 × 10⁸ células/mL. Os *pools* de proteínas foram mantidos sob agitação por uma

hora e centrifugadas (12.000 \times *g*, 15 min. a 4 °C) e ao final de todo o processo, os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados a -20 °C.

4.3. Extração de proteínas nucleares de T. cruzi

A extração das proteínas nucleares das formas epimastigota de T. cruzi (estoque Berenice) foi realizada utilizando-se um kit específico para células de mamíferos (2-D Sample Prep for Nuclear Proteins-PIERCE) seguindo as instruções do fabricante. Assim, para cada 40 mg de parasitos foram adicionados 200 µL de Cytoplasmic Extraction Reagent 1 (CER 1) gelado suplementado com inibidores de protease, seguido de agitação em vortex por 15 segundos e mantido no gelo por 10 min. Às amostras foram adicionados 11 µL de CER 2 seguido de agitação por 5 segundos e resfriamento em gelo por 1 min. O material foi agitado por 5 segundos seguido de centrifugação a 16.000 \times g, 5 min a 4 °C. O sobrenadante (extrato citoplasmático) foi aliquotado e congelado imediatamente. O pellet foi ressuspenso em 100 µL de Nuclear Extraction Reagent (NER), adicionado de coquetel de inibidores de proteases e deixado no gelo por 10 min. (etapa repetida quatro vezes). Ao final foi centrifugado a 16.000 g por 10 min. O sobrenadante contendo o extrato nuclear foi aliguotado e congelado a -20 °C. O pellet (fração insolúvel restante de toda a extração) foi congelado à -20 °C. Antes do uso, o extrato nuclear foi desalinizado em mini colunas fornecidas no kit.

4.4. Obtenção da fração subcelular enriquecida em organelas de alta densidade de epimastigota

O fluxograma das etapas de fracionamento subcelular estão mostradas na Fig. 3. Formas epimastigotas de linhagem CL Brener foram coletadas de uma cultura em fase de crescimento logarítmico tardia (0,8-1,0 × 10⁷ células por mL) por centrifugação a 5.000 × *g* por 15 min. seguida de lavagem do sedimento de células em NKM ou PBS com um volume de 1/3 da cultura inicial, centrifugando a 5.000 × *g*, 15 min. As células foram ressuspensas em tampão TENM2 hipotônico (Tris 10 mmol/L pH7,4; NaCl 10 mmol/L; MgCl₂ 1 mmol/L; MnCl₂ 1 mmol/L; βmercaptoetanol 5 mmol/L) adicionado do coquetel de inibidores de proteases (Complete Mini Protease Inhibitor cocktail, Roche) e incubadas no gelo por 5 minutos acompanhando o inchaço das células por microscopia ótica. Adicionou-se a suspensão o detergente não iônico NP-40 para uma concentração final de 0,5% (v/v) seguida de homogenização manual (20 movimentos) com um homogenizador de vidro (Dounce). A lise foi checada ao microscópio de luz. A osmolaridade da amostra foi restaurada por adição de 1/7 do volume da amostra de solução de sacarose 2 mol/L em TENM2 tornando a concentração final de sacarose 0,25 mol/L. A amostra foi aplicada sobre um "colchão" de sacarose a 20% (p/v) ou 0,58 mol/L em TENM2 e submetido a centrifugação a 2.000 \times g, 10 min a 4 °C para sedimentação dos núcleos e outras estruturas de alta densidade. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão XBE2 (Hepes 10 mmol/L pH 7,7; KCl 0,1 mol/L; MgCl₂ 2 mmol/L, com inibidores de proteases) adicionados de 1 mmol/L de CaCl₂, 15.000 UI/mL de nuclease microcócica (e incubados a 37 °C por 1 h. Foram adicionados 20 mmol/L EGTA seguido de centrifugação a 2.000 x q, 10 min. A fração sobrenadante (FS1) foi congelada a -20 °C e o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para a 2-DE (uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L, DTT 85 mmol/L, Triton X-100 2,5% (v/v)) o gual foi centrifugado a $15.000 \times q$, 10 min. O sobrenadante resultante foi chamado de (FS2).



Figura 3: Fluxograma do fracionamento subcelular de T.cruzi

4.5. Microscopia eletrônica de transmissão da fração subcelular

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizado de acordo (Corrêa et al., 2008) com algumas modificações. O material proveniente da fração FS2 foi fixado em solução de Karnovisk seguido de duas lavagens com 0,1 mol/L cacodilato de sódio pH 7,4 por 5 min. Foi então pós fixado com tetróxido de ósmio 0,5 mol/L e em solução ferrocianeto de potássio 1,6 % (p/v) em 10 mmol/L de cloreto de cálcio em tampão caocodilato de sódio 0,2 mol/L na proporção de 1:1 (v:v) por 30 min. em seguida lavado com água destilada e 0,1 mol/L cacodilato de sódio pH 7,4 por 5 min. A contrastação do bloco se deu em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% (p/v) por 2 h seguido de lavagem em água destilada. A desidratação ocorreu com intervalos de 10 min. por imersão do bloco em solução de concentração crescente de acetona em água 30%, 50%, 70%, 90% e 3 incubações de 10 min. em 100% acetona. A inclusão da amostra foi feita em resina SPUR nas proporções de resina-acetona de 1:2, 1:1 e 2:1 de seis a doze horas em cada etapa e resina SPUR pura por 6 h. com emblocamento do material em resina pura sendo levada a estufa a 65 °C por 72 h. A amostra emblocada foi cortada em ultramicrótomo Leica Reichert Supernova com faca de diamante **Diatome** 45⁰, com cortes ultrafinos de 70 nm foram obtidos colhidos em grades de cobre de 300 mesh e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila a 3% (p/v) por 30 min. seguido de incubação em solução aquosa de citrato de chumbo 0,04 mol/L por 10 min. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011.

4.6. Dosagem de Proteínas

As misturas das extrações protéicas das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota, bem como dos extratos nucleares e citoplasmáticos foram quantificados usando o *Plus One 2D Quant Kit* (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) de acordo com as instruções do fabricante. Alternativamente, a concentração de proteínas foi estimada por análise de aminoácidos. Assim, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de HCI 0,1 mol/L, colocadas no tubo de

hidrólise e secas sob vácuo dentro do frasco de hidrólise. Depois de secas, adicionou-se 200 μ L de HCl 6 mol/L no frasco de hidrólise. Em seguida colocou-se o frasco de hidrólise na estação Pico-Tag (Waters) a 109 °C por 24 h sob vácuo. Após esse período, ressuspenderam-se as amostras em 60 μ L de HCl 0,1 mol/L. Após centrifugação (10000 x *g*, 4 min.) o sobrenadante foi aplicado no Analisador de aminoácidos Hitachi L-8500 em triplicata (10 μ L cada injeção) que trabalha com derivatização pós-coluna com ninhidrina.

4.7. SDS-PAGE e 2-DE

Para eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) foram utilizados géis com 12% de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Para experimentos de 2-DE em faixas estreitas de pH ácido foram usadas amostras dos extratos totais dos estágios de vida de *T. cruzi* (220 µg de proteínas em 350 µL de tampão 2-DE) contendo uréia 7 mol/L, tiouréia 2 mol/L, DTT 85 mmol/L, Triton X-100 2,5% (v/v), 1% (v/v) IPG buffer 3-5,5 para strips de pH 3-5,6 NL e IPG buffer de pH 4-7 para strips 5,3-6,5 e azul de bromofenol. Para a focalização isoelétrica (IEF), géis de 18 cm com gradientes imobilizados de pH (IPG) em pH 3-5,6 não lineares-NL (*Immobiline Drystrip*, GE Healthcare), foram reidratados com as amostras durante 14 h. (Sanchez *et al.*, 1997), e submetidos à IEF em equipamento Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Fig. 4) com quatro etapas sucessivas: 1 h. a 500 V (*step-n-hold*), 1 h. a 1.000 V (gradiente), 3 h. a 10.000 V (gradiente), 1:45 h. 10.000 V (*step-n-hold*). Para focalização na faixa de pH 5,3-6,5 o programa foi: 2 h. a 500 V (*step-n-hold*), 2 h. a 1.000 V (gradiente), 3 h. a 10.000 V (gradiente), 6:40 h. a 10.000 V (*step-n-hold*), 2 h. a 20 °C.

Para IEF da fração **FS2** de epimastigotas foram usados 60 μ g na faixa de pH 3-10, 180 μ g nas faixas de pH 4-7 e 360 μ g 6-11 para géis corados com nitrato de prata e 1080 μ g na faixa de pH 6-11 no gel corado com CBB G 250 coloidal (Anderson *et al.*, 1991). A IEF de strips em pH 4-7 foi 1 h. a 500 V (*step-n-hold*), 1 h. a 1.000 V (gradiente), 2:06h. a 10.000 V (gradiente), 1 h. 10.000 V (*step-n-hold*). Para a IEF de strips em pH 6-11 foi 1h. (*step-n-hold*), 150 V 1h. (*step-n-hold*), 300 V. 1h. (*step-n-hold*) 600 V. 9:30h. (*step-n-hold*) 3500 V de

acordo com Magalhães et al. (2008). Em todos esses casos, as proteínas foram solubilizadas em 350 µL de tampão 2-DE contendo uréia 7 mol/L, tiuréia 2 mol/L, DTT 85 mmol/L, Triton X-100 2,5% (v/v), 1% (v/v) IPG *buffer* (3-10 ou 4-7 ou 6-11) e azul de bromofenol. A fração FS1 com 100 µg de proteína foi precipitada em TCA 100% e ressuspensa em tampão 2-DE. A reidratação do strip 3-10 foi de 12 horas sendo que as primeiras 6 horas sem voltagem, seguida de 6 h. a 30 V (step*n-hold*), 1 h. a 500 V (step-n-hold), 1 h. a 1.000 V (step-n-hold) e 4 h a 8.000 V (step-n-hold), a 20 °C em strip holder. Usando o método maninfold (ver Fig. 4) a reidratação do strip foi de 14 horas seguido de focalização isoelétrica com 1 h. a 500 V (step-n-hold), 1 h. a 1.000 V (gradiente), 2:06 h. a 10.000 V (step-n-hold), 1 h. 10.000 V (step-n-hold). Para todos os casos, finalizada a IEF, os géis de IPG foram submetidos a redução e alquilação por incubação consecutiva em 3 mL em tampão de equilíbrio (Tris-HCI 50 mmol/L pH 6.8, uréia 6 mol/L, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) acrescido de DTT 125 mmol/L e de acrilamida 300 mmol/L durante 40 min. em cada etapa. A separação na segunda dimensão foi realizada por eletroforese desnaturante em presença de SDS em gel 12% de poliacrilamida (Laemmli, 1970) com stacking gel de 1 cm de altura a 5% usando o sistema PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 20 °C.



Figura 4: Sistema de IEF IPGphor 3 (GE Healthcare). A, suporte de focalização isoelétrica do tipo "manifold" onde os IPG strips são mantidos fixos por eletrodos (B); C, equipamento de IEF IPGphor 3 (GE Healthcare) ; D, método de reidratação in gel no IPG strip holder ("sarcófago")

4.8. Eletrotransferência e imunodetecção (Western blotting)

Amostras provenientes do fracionamento celular de epimastigotas foram submetidas a SDS-PAGE. As proteínas dos géis foram então eletrotransferidas para membranas de PVDF (Hybond-C Extra, GE Healthcare) de acordo com Towbin et al. (1979), em equipamento Trans-Blot Cell[®] (BioRad). A transferência foi realizada a 100 mA overnight seguido por 15 min. a 400 mA. A revelação das bandas da membrana foram feitas com Brown 10 a 0,05% (p/v) em água. As membranas de PVDF foram bloqueadas com 5% (p/v) de leite em pó desnatado em TBS sob agitação por 1 h. As membranas foram incubadas com soros primários contra a proteína nuclear SCC1 (Sister Chromatid Cohesion Complex), fornecidos pela Profa. Beatriz D. Lima (CEL-UnB) ou contra as proteínas citoplasmáticas MTAP (Methyl Adenosine Phosphorylase) ou POPTb80 (Prolyl oligopeptidase from Trypanosoma brucei) fornecidos pela Profa. Izabela Bastos (CEL-UnB), respectivamente diluídos com 1% leite desnatado em TBS na proporção 1: 500, 1: 200 e 1:100. As membranas foram lavadas 3 vezes 5 min. com TBS e incubadas por 1 h. com o anticorpo secundário (Goat IgG Anti- Rabbit conjugado a fosfatase alcalina, 1: 1.500) em 1% leite desnatado em TBS. Após lavagem com TBS a atividade de fosfatase alcalina foi revelada com o tampão 100 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris pH 9,5, 5 mmol/L MgCl contendo 33 µL BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt, Bio Rad) e 66 µL NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride, Bio Rad) como substratos para cada 10 mL de tampão.

4.9. Revelação dos géis com nitrato de prata e CBB

Após a eletroforese, os géis foram corados com nitrato de prata (Blum, 1987). Os géis foram fixados com etanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v), formaldeído 0,05% (v/v) por 20 min., incubados com álcool etílico 50% (v/v) por 20 min. e sensibilizados em tiossulfato de sódio 0,02% (p/v) por 1 min. seguido de 3 lavagens de 20 segundos com água Milli Q. Posteriormente os géis foram impregnados por 20 min. em nitrato de prata 0,2% (p/v) e formaldeído 0,075%

(v/v), lavados por 20 segundos com água por duas vezes e revelados com carbonato de sódio 6% (p/v), formaldeído 0,05% (v/v). A reação foi parada com etanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v). Os géis foram guardados em ácido acético 1% (v/v). Para coloração com CBB após a eletroforese, o gel foi fixado em 50% etanol (v/v) e ácido fosfórico 3% por 3 horas seguido de três lavagens de 20 min. em água. Após esta etapa, o gel foi pré-incubado por 1h. em metanol 34%, ácido fosfórico 3% e sulfato de amônio 17% com a adição de 0,07% (p/v) de CBB sob agitação ao longo de três a quatro dias (Anderson *et al.*, 1991). Os géis foram guardados em ácido acético 1% (v/v).

4.10. Digestão de proteínas em gel

Os spots de interesse foram cortados dos géis bidimensionais, descorados com ferrocianeto de potássio 15 mmol/L e tiossulfato de sódio 50 mmol/L, desidratados com acetonitrila, secos em centrífuga do tipo Speed Vac (Savant) e submetidos à digestão proteolítica com tripsina (Katayama et al., 2001). Inicialmente, as bandas foram lavadas sucessivamente com 200 µL de bicarbonato de amônio 50 mmol/L (p/v) por 10 min, acetonitrila 50% (v/v) por 10 min seguido de quatro lavagens alternadas com bicarbonato de amônio e acetonitrila 50%. Terminadas as etapas de lavagem, os spots foram secos em Speed Vac. Aos spots secos foram adicionados de 5-10 µL de solução de tripsina 12 ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mmol/L e cloreto de cálcio 2,5 mmol/L e incubados por 30 min. Os spots foram incubados overnight com tampão bicarbonato de amônio 50 mmol/L, cloreto de cálcio 2,5 mmol/L a 37°C em Thermomixer (Eppendorf, Germany). No dia seguinte, a reação de digestão foi parada com TFA 2% (v/v) e parte do digesto foi recolhido e plaqueado na placa em aço 600/384 Anchor chip[®] do MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics) com 1µL do digesto e 1µL de matriz. O restante dos peptídeos foram extraídos com adição sucessiva de volumes de 2,5-5 µL de solução extração com acetonitrila: água: ácido trifluoroacético (66:33:0,1, v/v/v) sob ação de ultra-som. Os peptídeos extraídos foram então concentrados por secagem em Speed Vac.
4.11. Espectrometria de massas

Após a digestão com tripsina os peptídeos resultantes foram ressuspensos em TFA 0,1% (v/v) e aplicados na placa de aço inoxidável 600/384 com poços Anchor Chip[®] do espectrômetro de massas usando a metodologia dryed droppled. Assim, 1 μ L de solução de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico-(HCCA) 10 µg/µL em acetonitrila 70%, TFA 0,1% (1:1) era misturada a 1 µL da solução contendo o digesto tríptico seguido de uma segunda aplicação de matriz ancoradora a 90% acetonitrila, 9% água e 1 % TFA 0,1% na proporção (19:1) por cima da amostra a ser examinada. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro de massas Autoflex II (Bruker Daltonics) usando modo refletor positivo com aplicação de 300 pulsos de laser sobre a amostra com voltagens aplicadas às fontes ionizadoras de 20 kV e 16,5 kV. A voltagem aplicada às lentes foi de 9,8 kV e 23 kV ao refletor. Os resultados obtidos por Peptide Mass Fingerprinting (PMF) e por seguenciamento no modo MS/MS foram submetidos a de dados usando buscas em banco 0 programa MASCOT (http://www.matrixscience.com). As massas dos peptídeos [M+H⁺] foram geradas na faixa de 700 a 3.500 Da. Foi utilizado o programa Flex Control versão 3.0 (Bruker Daltonics) para a aquisição de espectros; o processamento dos espectros foi realizado utilizando o programa *FlexAnalysis* versão 2.4 (Bruker Daltonics) para a geração da listas dos picos. Os parâmetros usados na busca foram: oxidação da metionina como modificação variável, acetilação N-terminal e modificação fixa com propionamida (resultando da alquilação da cisteína com acrilamida) com erro de até 100 ppm sendo considerado válida a identificação com score maior que 65 e 1 de erro clivagem da tripsina (tripsin miss cleavage) na següência peptídica. Para experimentos MS/MS, picos obtidos do espectro PMF foram com maior intensidade escolhidos e fragmentados no modo LIFT utilizando os parâmetros de acordo com as condições do programa FlexControl versão 3.0.

4.12. Análises computacionais de imagens

A análise computacional das imagens digitais dos géis de 2-DE foi feita utilizando-se o programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE *Healthcare*). O programa fornece dados de volume, intensidade, porcentagem dos *spots* separados nos géis normalizando-os a fim de fornecer ao final da análise, dados estatísticos para os diferentes *spots*. Os géis em triplicata foram pareados usando como referência, o gel que apresentou o maior número de *spots*. A detecção automática foi realizada utilizando 4 *spots* de referência (*landmarks*) na faixa de pH de 3-5,6 NL e 4 *landmarks* na faixa de 5,3-6,5 com *spots* bem definidos e distribuídos uniformemente. Para determinação da expressão diferencial de proteínas entre amostras de tripomastigotas e amastigotas, os volumes normalizados dos spots foram submetidos à análise estatística através do teste paramétrico t-Student com valores de probabilidade de P < 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. ANÁLISE COMPARATIVA DO PROTEOMA ÁCIDO DOS ESTÁGIOS DE VIDAS DO *T. CRUZI*

5.1. Resultados

5.1.1. Padronização dos perfis 2-DE de *T. cruzi* em faixas estreitas de pH ácido

A separação de proteínas ácidas de *T. cruzi* por 2-DE fez uso de dois tipos de gradiente imobilizado de pH na etapa de IEF, pH 3-5,6NL e pH 5,3-6,5. Como tais faixas de gradientes estreito de pH são pouco exploradas na literatura científica, foi necessária a padronização das condições da 2-DE para o nosso modelo, o *T. cruzi*.

Durante a padronização da 2-DE foram utilizadas amostras da forma epimastigota devido a maior facilidade de cultivo em grande escala.

Perfil 2-DE de epimastigota na faixa estreita de pH 3-5,6NL

Primeiramente, testamos vários métodos de IEF para a faixa estreita de pH 3-5,6NL utilizando extrato de proteínas de formas epimastigotas e os mais representativos deles estão detalhados na Tabela 1. Os métodos se diferenciaram em função ao tipo de equipamento, reidratação do *strip*, e condição de voltagem das corridas.

Foram inicialmente comparados dois equipamentos de IEF. O método **A** utilizou o equipamento Multiphor II (GE Healthcare) e o método **B** utilizou o equipamento IPGphor 2 (GE Healthcare) seguindo as condições fornecidas pelo fabricante para a faixa estreita de pH de 3-5,6 NL para IPG strip de 18 cm, com gradiente de pH não linear. O equipamento IPGphor 2 apresenta algumas vantagens sobre Multiphor II já que permite só uma manipulação para as etapas de reidratação *e* focalização além de permitir aplicar uma voltagem mais alta, o que deixa o tempo de corrida menor. De forma geral, os perfis 2-DE relativos aos métodos A e B (Fig. 5 A e 5 B) não foram considerados satisfatórios, devido a ausência de *spots* de alta massa molecular com rastros horizontais (*horizontal streaking*) de *spots*.

A IEF foi então testada no equipamento IPGphor 3 (GE Healthcare) o qual permite o uso de voltagens ainda mais altas (até 10.000 V contra 8.000 V no IPGphor 2 e 3.500 V no Multiphor II) além da possibilidade de aplicação de amostra por uma técnica chamada de *paper-bridge* (ponte de papel) quando usada em conjunto com o suporte de IEF denominado *manifold* (Fig. 4 A).

Foram realizados dois experimentos usando o IPGphor 3 variando o método de aplicação de amostra, reidratação *paper-bridge* (Fig. 4 C) ou *in gel* (Fig. 4 D) com os métodos C e D respectivamente (Tabela 1). Na reidratação *in gel*, a tira de gel contendo o gradiente imobilizado de pH (*IPG strip*) foi reidratada diretamente em solução contendo tampão 2-DE (Sanchez *et al.*, 1997). Já na técnica de *paper bridge*, a amostra foi aplicada em papel de filtro conectada ao ânodo ou ao cátodo e a transferência desta para o *strip* se deu sob ação do campo elétrico (Sabounchi-Schutt *et al.*, 2000). Em ambos os casos a IEF foi realizada com o auxílio do suporte *manifold*.

A reidratação *in gel* e o uso de IPGphor 3 com *manifold* permitiu a obtenção de um perfil 2-DE (Fig. 5, método D) de maior resolução e apresentando *spots* de maior intensidade para a faixa de pH 3-5,6 NL quando comparado com o método de reidratação com somente tampão 2-DE e transferência da amostra para o *strip* através da ponte de papel (Fig. 5, método C).

28

	Anlicação da	Reidratação	Fauinamento	Programa de IEF			
Método	Amostra	do strip	de IEF	Voltagem (V)	Tempo (h:min)	Volts-horas (Vh)	
	Reidratação <i>in</i>			2 mA e 5 W			
A	<i>gel</i> do <i>strip</i> fora do equipamento	14 h	Multiphor II	Step 500 Step 3.500 Step 3.500	6:01 1:30 9:25	3.008 5.250 32958	
В	Reidratação <i>in gel</i> do <i>strip</i> dentro do equipamento	12 h	IPGphor 2	50 μA/strip Step 500 Grad 1.000 Grad 8.000 Step 8.000	1:00 1:00 3:00 2:40	500 750 13.500 21.333	
С	Paper-bridge	12 h no tampão 2- DE sem amostra	IPGphor 3 com Manifold	50 μA/strip Step 30 Step 500 Grad 1.000 Grad 8.000 Step 8.000	6:00 1:00 1:00 3:00 2:40	180 500 750 13.500 21.333	
D	Reidratação <i>in</i> <i>gel</i> do <i>strip</i> fora do equipamento	14 h	IPGphor 3 com Manifold	50 μA/strip Step 500 Grad 750 Grad 10.000 Step 10.000	1:00 1:00 3:00 1:45	500 750 16.500 17.500	

 Tabela 1. Métodos testados para IEF na faixa estreita de pH 3-5,6 NL.



Figura 5: Padronização dos perfis 2-DE da forma epimastigota na faixa de 3-5,6 NL. As 2-DE foram realizadas utilizando *IPG strips* 3-5,6 NL de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e corados com nitrato de prata. A, B, C, e D se referem aos métodos de IEF aplicados seguindo os programas da Tabela 1.

Perfil 2-DE de epimastigota na faixa estreita de pH 5,3-6,5

A reidratação *in gel* também foi escolhida como método de aplicação de amostra na faixa de pH 5,3-6,5, ao invés do *paper-bridge*. Foram comparadas, porém, duas variações nos suportes usados para conter os *IPG strips* durante a IEF: o *strip holder* ("sarcófago"), método E e o *manifold*, método F, apresentados

na Tabela 2. A Fig. 6 mostra perfis 2-DE de formas epimastigota na faixa de pH 5,3-6,5, utilizando os dois métodos supracitados. Pode-se perceber que o perfil 2-DE para o método F que usou o manifold apresentou, mais uma vez, maior resolução (Fig. 6, método B).

Método	Aplicação da	Reidratação	Equipamento -	Programa de IEF			
	Amostra	do strip	de IEF	Voltagem (V)	Tempo (h:min)	Volts-horas (Vh)	
E	Na reidratação <i>in gel</i> do <i>strip</i> dentro do equipamento	12 h	IPGphor 3	50 μA/strip Step 500 Grad 1.000 Grad 8.000 Step 8.000	1:00 1:00 3:00 2:40	500 750 13.500 21.333	
F	Na reidratação <i>in gel</i> do <i>strip</i> fora do equipamento	14 h	IPGphor 3 com Manifold	50 μA/strip Step 500 Grad 1.000 Grad 10.000 Step 10.000	2:00 3:00 3:00 6:19	1.000 2.250 16.500 63.166	

Tabela 2. Métodos testados para IEF na faixa estreita de pH 5,3-6,5



Figura 6: Padronização dos perfis 2-DE da forma epimastigota na faixa de pH 5,3-6,5. As proteínas da forma epimastigota foram aplicadas nos *IPG strips* por reidratação *in gel*. A IEF foi realizada em *strip holder* (A) ou *manifold* (B). As 2-DE foram realizadas utilizando *IPG strips* 5,3-6,5 de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e corados com nitrato de prata.

5.1.2. Análise proteômica comparativa das formas tripomastigota e amastigota em faixa estreita de pH ácido

Perfis 2-DE em faixas estreitas de pH ácido

Os métodos padronizados para as duas faixas estreitas de pH foram então aplicados para a separação de proteínas a partir de extratos totais das formas encontrados nos hospedeiros mamíferos tripomastigota e amastigota. As triplicatas de cada forma foram realizadas com grande reprodutibilidade. Os mapas 2-DE das faixas de pH 3-5,6 NL e pH 5,3-6,5 para estas amostras são apresentados nas Fig. 5 e 6, respectivamente.

Análise computacional comparativa dos géis 2-DE entre as formas tripomastigota e amastigota

A análise computacional de imagens dos géis bidimensionais na faixa de pH 3-5,6 NL e 5,3-6-5 utilizando o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE *Healthcare*) permitiu a contagem do número total de *spots* detectados nos géis referentes a expressão protéica em cada forma adaptativa do parasito. O pareamento entre os *spots* dos perfis bidimensionais de cada forma adaptativa e a determinação dos *spots* específicos para cada forma do parasito.

Os dados comparativos entre as formas tripomastigota e amastigota gerados pelo programa foram transportados para planilha do programa Excel (Microsoft) para análises estatísticas com intuito que fossem identificadas proteínas diferencialmente expressas entre as formas adaptativas, intrínsecas a cada faixa de pH (Tabela 3).

Na faixa de pH 3-5,6 NL a forma amastigota apresentou um total de 1127 spots sendo 407 exclusivos e 37 de maior volume que no tripomastigota (A>T) dentro da faixa ácida de 3-5,6 NL. Enquanto a forma tripomastigota apresentou um total de 1016 spots sendo 282 exclusivos e 33 de maior volume que no amastigota (T>A), dentro da mesma faixa de pH.

A detecção na faixa de pH entre 5,3-6,5 foi de 1283 *spots* para amastigota sendo 768 específicos desta forma com 21 apresentando maior volume (T>A). Foram detectados 928 *spots* nos géis de tripomastigota com 434 específicos e 515 spots pareados entre estas duas formas, sendo que 12 apresentaram volume (A>T). Acreditamos que a diferença entre o número de *spots* nas duas formas seja tão grande devido a análise ser restrita a uma pequena fração do proteoma total, ou seja, podendo a diferença de quantidade de proteínas entre as dois estágios nesta faixa ser maior do que em outras faixas de pH.



Figura 7: Perfis 2-DE ácidos de *T. cruzi* na faixa de pH 3-5,6 NL. As amostras foram provenientes de extratos dos estágios A) tripomastigota e B) amastigota. A quantidade de amostra foi de 220 µg de proteína por gel. As 2-DE foram realizadas utilizando *IPG strips* 3-5,6 NL de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e revelados com nitrato de prata.



Figura 8: Perfis 2-DE ácidos de *T. cruzi* na faixa de pH 5,3-6,5. As amostras foram provenientes de extratos dos estágios A) tripomastigota e B) amastigota. A quantidade de amostra foi de 220 µg de proteína por gel. As 2-DE foram realizadas utilizando *IPG strips* 5,3-6,5 de 18 cm para a IEF e SDS-PAGE de 12% na segunda dimensão e revelados com nitrato de prata.

Faixa de pH	3-5,6		5,3-6,5	
Formas	Т	А	Т	А
Total de <i>spots</i>	1016	1127	928	1283
Estágio-específicos	282	407	434	768
Diferencialmente expressos	33(T>A)	37(A>T)	12(T>A)	21(A>T)

Tabela 3: Números de spots totais, específicos e diferencialmente expressos das formas tripomastigota e amastigota nas faixas de pH 3-5,6 NL e 5,3-6,5.

T e A correspondem as formas tripomastigota e amastigota respectivamente.

Identificação de proteínas a partir dos géis 2-DE ácidos das formas tripomastigotas e amastigotas

Após a obtenção dos perfis 2-DE das formas adaptativas do *T. cruzi* nas faixas estreitas de pH ácido, e da análise computacional de imagens nos direcionamos para as identificações dos *spots* protéicos. Foram analisadas as proteínas dos géis dos estágios presentes no hospedeiro mamífero, tripomastigota e amastigota, com ênfase naquelas encontradas exclusivamente em uma das formas e nas proteínas que apresentaram expressão diferencial e em *spots* estágio-específicos. Também foram analisados alguns *spots* mais intensos nos géis, correspondendo aos "landmark proteins", que se encontram na duas formas de vida e de fato são proteínas constitutivas (*housekeeping*).

As figuras 9 e 10 mostram os perfis 2-DE de amostras de amastigotas e tripomastigotas, respectivamente, na faixa de pH 3-5,6 NL e os *spots* identificados por espectrometria de massas (MS). As identidades desses *spots* são apresentadas na Tabela 4.

As figuras 11 e 12 mostram os perfis 2-DE de amostras de amastigotas e tripomastigotas, respectivamente, na faixa de pH 5,3-6,5 e os *spots* identificados por espectrometria de massas (MS). As identidades desses *spots* são apresentadas na Tabela 5.



Figura 9: *Spots* identificados por MS no mapa 2-DE de amastigota na faixa de pH 3-5,6 NL em SDS-PAGE 12%.



Figura 10: *Spots* identificados por MS no mapa 2-DE de tripomastigota na faixa de pH 3-5,6 NL em SDS-PAGE 12%.



Figura 11: *Spots* identificados por MS no mapa 2-DE de amastigota na faixa de pH 5,3-6,5 em SDS-PAGE 12%.



Figura 12: *Spots* identificados por MS no mapa 2-DE de tripomastigota na faixa de pH 5,3-6,5 em SDS-PAGE 12%.

Tabela 4: Proteínas identificadas do mapa 2-DE das formas amastigota e tripomastigota na faixa pH entre 3-5,6 NL. Alguns spots após análise por *peptide mass fingerprinting* foram confirmados por fragmentação de dois peptídeos submetidos a MS/MS.

Spot ^a	Proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	р <i>I</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) ^e	Expressão ^f
1	Beta tubulin	gi 91983201	T. grayi	142	43588 (36493)	5,50 (5,29)	32	A>T
2	Beta tubulin	gi 3885846	T. cruzi	86	9244 (29783)	3,71 (4,69)	14	A>T
3	Beta-tubulin	gi 74229926	T cruzi	137	50477 (35180)	3,96 (4,74)	25	А
4	Beta tubulin 1.9	gi 18568139	T. cruzi	210	50520 (53887)	4,05 (4,74)	42	T>A
5	Alpha tubulin	gi 71397525	T. cruzi	82	50549 (51602)	4,45 (4,94)	29	А
6	Alpha tubulin	gi 71397525	T. cruzi	210	50549 (55115)	4,40 (4,74)	42	T>A
7	Alpha tubulin	gi 71397525	T. cruzi	80	50549 (37310)	4,94 (4,46)	17	А
8	Beta actin protein	gi 15277503	H. sapiens	119	40620 (45078)	5,55 (4,84)	32	T=A
9	Eukaryotic initiation factor 5a, putative	gi 71659667	T. cruzi	92	18004 (23280)	4,82 (3,96)	46	A=T
10	Protein kinase, putative	gi 71407567	T. cruzi	96	88197 (34527)	8,71 (3,53)	8	А
11	S-phase kinase-associated protein	gi 71409231	T. cruzi	111	21499 (24063)	4,57 (3,76)	49	A>T
12	ATP synthase, epsilon chain, putative	gi 71664003	T. cruzi	131	20447 (22962)	4,61 (5,74)	51	A=T
13	Pyruvate dehydrogenase e1 beta subunit, putative	gi 71420903	T. cruzi	87	38401 (36369)	5,24 (4,48)	29	A=T
14	Calreticulin, putative	gi 71423784	T. cruzi	83	46396 (48988)	4,11 (4,77)	18	T>A
15	Tryparedoxin peroxidase	gi 71408703	T. cruzi	101	25790 (27784)	4,62 (7,62)	33	A=T
16	Chaperonin hsp60, mitochondrial precursor	gi 71665072	T. cruzi	165	27240 (35150)	4,05 (4,75)	39	А
17	Hypothetical protein	gi 74025776	T. brucei	78	50867(23074)	5,18 (4,14)	12	А
18	Hypothetical protein	gi 71401962	T. cruzi	109	14532 (14548)	4,87 (4,92)	53	A=T

Spot ^a	proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>l</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]	Expressão ^f
19	Hypothetical protein	gi 71667211	T. cruzi	96	30452 (32612)	9,35 (3,65)	38	А
20	Hypothetical protein	gi 72392070	T. brucei	68	17259 (12713)	11,09 (5,3)	23	А
21	Serine/threonine protein phosphatase 2a regulatory subunit	gi 71650849	T. cruzi	68	63663 (22178)	6,23 (4,94)	16	А
22	Intraflagellar Transport protein IFT88	gi 71754697	T. brucei	74	90338 (22485)	5,61 (3,66)	14	А
23	Eukaryotic initiation factor5a	gi 71659667	T. cruzi	116	18146 (23716)	4,82 (3,93)	71	А
24	25 kda translation elongation factor 1-beta	gi 71402893	T. cruzi	71	24437 (33200)	5,43 (5,37)	29	А
25	Beta tubulin 1.9	gi 18568139	T. cruzi	228	50520 (36431)	4,74 (4,58)	56	А
26	Hypothetical protein	gi 71425732	T. cruzi	69	67739 (44278)	7,23 (3,87)	20	А
27	Cystathionine beta-synthase	gi 71668089	T. cruzi	67	44784 (47980)	6,17 (4,67)	26	А
28	Beta-tubulin	gi 74229926	T. danilewskyi	159	50477 (35150)	4,74 (4,58)	37	А
29	Chaperonin hsp60, mitochondrial precursor	gi 71665072	T. cruzi	114	27240 (62874)	4,75 (5,03)	38	А
30	Chaperonin hsp60, mitochondrial	gi 71665068	T. cruzi	107	59413 (55115)	5,38 (4,60)	41	А
31	GDP-mannose 4,6 dehydratase	gi 71650679	T. cruzi	68	28107 (20640)	9,25 (5,05)	24	А
32	ISG75	gi 78127721	T. equiperdum	71	58990 (23431)	5,71 (4,32)	19	А
33	Hypothetical protein	gi 71421121	T. cruzi	68	28830 (41396)	6,56 (4,36)	24	А
34	Alkyldihydroxyacetone phosphate synthase	gi 8927986	T. brucei	73	69946 (61367)	8,82 (4,41)	20	А
35	Hypothetical protein	gi 71401962	T. cruzi	88	14352 (14316)	4,92 (4,72)	58	Т
36	Calmodulin, putative	gi 71659820	T. cruzi	112	17641 (15704)	5,16 (3,85)	52	T>A
37	Eukaryotic initiation factor 5a, putative	gi 71659667	T. cruzi	92	18146 (22976)	4,82 (3,90)	52	Т

Spot ^a	proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>l</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]	Expressão ^f
38	Cytochrome c oxidase subunit v, putative	gi 71412456	T. cruzi	91	22237 (25272)	5,97 (5,50)	31	т
39	Hypothetical protein	gi 71651803	T. cruzi	89	22577 (25466)	5,50 (5,23)	37	Т
40	Proteasome alpha 2 subunit, putative	gi 71396420	T. cruzi	79	20036 (27462)	5,34 (5,35)	33	T = A
41	Beta tubulin	gi 1220547	T. cruzi	66	50262 (27841)	4,69 (3,65)	15	Т
42	Hypothetical protein	gi 71655282	T. cruzi	78	25146 (28463)	5,95 (5,31)	26	T = A
43	I/6 autoantigen, putative	gi 71425779	T. cruzi	197	23495 (29909)	5,19 (4,82)	56	Т
44	14-3-3 protein, putative	gi 71651607	T. cruzi	197	30088 (31548)	4,99 (4,48)	42	Т
45	Hypothetical protein	gi 71667211	T. cruzi	97	30452 (32228)	9,35 (3,70)	37	Т
46	25 kda translation elongation factor 1-beta	gi 71402893	T. cruzi	76	24437 (33685)	5,43 (5,30)	29	т
47	Alpha tubulin	gi 71397525	T. cruzi	114	50549 (35369)	4,94 (4,73)	18	Т
48	Beta tubulin	gi 91983201	T.grayi	84	42807 (37793)	5,29 (4,55)	20	т
49	Hypothetical protein	gi 71400391	T. cruzi	66	33766 (36076)	4,89 (3,92)	22	Т
50	Beta tubulin, putative	gi 71656281	T. cruzi	136	50520 (36939)	4,70 (4,55)	19	Т
51	Seryl-tRNA synthetase, putative	gi 71407799	T. cruzi	92	26549 (37880)	5,51 (5,00)	38	A>T
52	Hypothetical protein	gi 71654050	T. cruzi	143	33907 (41508)	4,94 (4,28)	51	Т
53	Asparagine synthetase a, putative	gi 71404075	T. cruzi	171	39375 (43894)	5,83 (5,28)	39	Т
54	Protein phosphatase, putative	gi 71659677	T. cruzi	145	45605 (43949)	5,04 (4,32)	43	T>A
55	Hypothetical protein	gi 71421179	T. cruzi	98	38929 (45000)	4,83 (3,99)	17	Т
56	Hypothetical protein	gi 71418019	T. cruzi	66	37992 (45525)	4,34 (3,51)	16	т
57	Proteasome regulatory ATPase subunit 2, putative	gi 71411120	T. cruzi	87	49316 (56757)	5,51 (5,42)	24	т

Spot ^a	proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>l</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]	Expressão ^f
58	Protein disulfide isomerase	gi 71658893	T. cruzi	80	54011 (57838)	4,87 (4,04)	13	T>A
59	9 invariant surface glycoprotein, putative	gi 188593007	T. brucei	66	59178 (58598)	5,43 (4,51)	19	Т
60	Protein kinase a regulatory subunit, putative	gi 71657902	T. cruzi	132	56717 (61919)	5,09 (4,48)	28	Τ = Α
61	Dihydrolipoamide acetyltransferase precursor, putative	gi 71665855	T. cruzi	126	50014 (58006)	6,29 (5,29)	27	T = A
62	Chaperonin hsp60, mitochondrial precursor	gi 3023478	T. cruzi	200	59374 (63649)	5,38 (4,79)	36	T = A
63	Chaperonin containing t-complex protein	gi 71663486	T. cruzi	111	60214 (63649)	5,05 (4,39)	32	т
64	Glucose-regulated protein 78, putative	gi 71415505	T. cruzi	155	71272 (75478)	5,09 (4,55)	34	Т
65	Heat shock protein 85, putative	gi 71403337	T. cruzi	105	81244 (90178)	5,07 (4,48)	18	Т
66	Cytoskeleton-associated protein cap5.5, putative	gi 71401694	T. cruzi	164	80729 (96155)	5,26 (4,36)	24	Т
67	2,3-bisphosphoglycerate- independent phosphoglycerate mutase, putative	gi 71666782	T. cruzi	179	60754 (62279)	5,59 (5,36)	38	T = A
68	Variant surface glycoprotein	gi 74026404	T. brucei	70	52835 (34913)	8,22 (4,85)	25	Т

^a Números dos spots correspondendo aos indicados nas figuras 9 e 10; ^b Probabilidade baseada no algoritmo da ferramenta MASCOT;

^c Valores de massa molecular relativa em Daltons teórico e experimental, respectivamente;

^d Valores de p*l* teórico e experimental, respectivamente;

^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;

^f A e T correspondem aos *spots* específicos de estágios amastigota e tripomastigota respectivamente A>T e T>A correspondem a *spots* que apresentam volumes estatisticamente diferentes entre os dois estágios (p<0,05). A=T/T=A: correspondem aos spots cujos volumes não são estatísticamente diferentes (p<0,05);

T. equiperdum, Trypanosoma equiperdum; T. cruzi, Trypanosoma cruzi; T. brucei, Trypanosoma brucei; T. danilewskyi, Trypanosoma danilewskyi; T. gravi, Trypanosoma gravi; H sapiens, Homo sapiens.

Spot ^a	proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	р <i>I</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]	Expressão ^f
1	2-Oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	gi 71420819	T. cruzi	102	49265 (49165)	7,71 (6,36)	32	А
2	Hypothetical protein	gi 71413031	T. cruzi	70	54936 (48811)	9,53 (5,75)	13	А
3	Hypothetical protein	gi 71666666	T. cruzi	67	34284 (45000)	5,23 (5,78)	21	A>T
4	Condensin subunit 1	gi 71744524	T.brucei	77	143010(42366)	5,96 (5,88)	11	A>T
5	Hypothetical protein	gi 71416536	T. cruzi	69	60211 (38900)	7,27 (6,11)	13	A>T
6	Retrotransposon hot spot (RHS) protein	gi 71412337	T. cruzi	74	111798(38505)	6,21 (6,35)	16	А
7	Hypothetical protein	gi 71404610	T. cruzi	75	52814 (34704)	6,13 (5,82)	22	А
8	Hypothetical protein	gi 70831074	T. brucei	66	3595 (34576)	9,30 (5,64)	100	T>A
9	Heat shock protein 70	gi 40548863	T. rangeli	94	27543 (32222)	5,23 (6,10)	44	A>T
10	Hypothetical protein	gi 74025110	T. brucei	71	39560 (31747)	9,46 (6,38)	21	А
11	Hypothetical protein	gi 71411649	T. cruzi	69	54987 (31717)	8,96 (6,32)	19	A=T
12	N9 protein	gi 3860073	T. cruzi	68	3699 (31600)	6,78 (5,74)	81	A>T
13	Cystathionine beta-synthase	gi 71649184	T. cruzi	107	42805 (30733)	6,37 (5,78)	28	А
14	Tyrosine aminotransferase	gi 71659493	T. cruzi	84	46834 (30139)	5,82 (5,96)	18	А
15	Proteasome 26s non-ATPase subunit 9	gi 72393207	T. brucei	69	25516 (28888)	5,20 (6,10)	33	А
16	Hypothetical protein	gi 71411837	T. cruzi	76	34566 (27328)	9,92 (5,55)	21	А
17	Heat shock protein 70	gi 40548863	T. rangeli	86	27543 (23030)	5,23 (5,43)	44	A>T
18	Hypothetical protein	gi 71652117	T. cruzi	74	58021 (21770)	6,48 (6,24)	21	А
19	Hypothetical protein	gi 71662284	T. cruzi	67	27055 (19284)	8,83 (5,90)	18	А

 Tabela 5: Proteínas identificadas do mapa 2-DE das formas amastigota e tripomastigota na faixa pH entre 5,3-6.5.

Spot ^a	proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>l</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]	Expressão ^f
20	Open reading frame b; putative	gi 162056	T. brucei	68	38416 (17371)	4,75 (6,39)	20	А
21	Heat shock 70 kda protein mitochondrial precursor	gi 71407515	T. cruzi	208	71585 (74680)	5,75 (5,37)	42	A=T
22	Arginine kinase	gi 71407949	T. cruzi	233	40528 (43562)	6,29 (6,24)	60	A=T
23	Hypothetical protein	gi 71414645	T. cruzi	68	10353 (15632)	5,33 (5,52)	58	А
24	Invariant surface glycoprotein	gi 790933	T. brucei	68	58959 (15498)	6,09 (6,41)	18	А
25	Tryparedoxin peroxidase	gi 17224953	T. cruzi	155	22743 (26890)	5,96 (6,10)	54	T=A
26	69 kda paraflagellar rod protein	gi 71650963	T. cruzi	98	70087 (83648)	5,85 (5,80)	18	T>A
27	Proteasome regulatory ATPase subunit 5	gi 71662712	T. cruzi	71	49237 (27920)	5,71 (5,64)	18	T>A
28	Surface glycoprotein tc-85/35	gi 37778138	T. cruzi	77	67299 (94169)	8,33 (5,59)	13	T>A
29	Tryparedoxin peroxidase	gi 17224953	T. cruzi	88	22743 (14412)	5,96 (5,34)	39	T=A
30	Kinetoplastid membrane protein	gi 76365105	T. rangeli	80	11077 (15866)	5,54 (5,84)	57	T>A
31	Proteasome beta 6 subunit	gi 71654519	T. cruzi	79	28042 (27446)	6,17 (5,87)	34	T>A
32	Actin-like protein	gi 71664419	T. cruzi	65	42556 (29365)	5,74 (6,17)	24	T=A
33	Leucine-rich repeat protein	gi 71406147	T. cruzi	91	25819 (29340)	5,99 (5,70)	36	T>A
34	Proteasome beta 6 subunit	gi 71654519	T. cruzi	79	28042 (29390)	6,17 (6,38)	52	T>A
35	Dynein arm light chain	gi 71662496	T. cruzi	100	28135 (32140)	5,85 (5,61)	50	Т
36	Heat shock protein-like protein	gi 71661216	T. cruzi	135	36005 (38218)	5,80 (5,74)	51	T>A
37	Protein transport protein sec 13	gi 71652119	T. cruzi	77	41759 (44559)	5,94 (5,91)	21	Т
38	Paraflagellar rod protein 3	gi 71415533	T. cruzi	292	69188 (44956)	5,81 (5,92)	58	T>A
39	Asparagine synthetase A	gi 71404075	T. cruzi	83	39375 (45834)	5,83 (5,45)	33	Т

Spot ^a	proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	р <i>I</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) ^e	Expressão ^f
40	Enolase	gi 71665461	T. cruzi	66	46983 (46500)	5,92 (6,06)	24	A>T
41	Hypothetical protein	gi 71666666	T. cruzi	69	34284 (47987)	5,23 (5,43)	19	A>T
42	Thiol-dependent reductase 1	gi 71410141	T. cruzi	92	51147 (51038)	5,60 (5,57)	19	Т
43	Mitochondrial processing peptide beta subunit	gi 71666305	T. cruzi	83	54685 (53436)	5,67 (5,57)	21	A>T
44	Paraflagellar rod protein 3	gi 71415533	T. cruzi	176	69188 (72401)	5,81 (5,35)	41	T=A
45	69 kda paraflagellar rod protein	gi 71650963	T. cruzi	78	70087 (85844)	5,86 (5,86)	19	T>A
46	Trans-sialidase	gi 71404821	T. cruzi	73	89553 (94518)	5,30 (5,41)	11	Т
47	Kinetoplastid membrane protein 11	gi 76365105	T. rangeli	66	11077 (12984)	5,54 (5,43)	57	T>A

^a Números dos *spots* corresponde aos indicados nas figuras 11 e 12; ^b Probabilidade baseada no algoritmo da ferramenta MASCOT;

^c Valores de massa molecular relativa em Daltons teórico e experimental, respectivamente;

^d Valores de p*I* teórico e experimental, respectivamente;

^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;

^f A e T correspondem aos *spots* específicos de estágios amastigota e tripomastigota respectivamente A>T e T>A correspondem a *spots* que apresentam volumes estatisticamente diferentes entre os dois estágios (p<0,05). A=T/T=A: correspondem aos spots cujos volumes não são estatísticamente diferentes (p<0,05);

T. cruzi, Trypanosoma cruzi, T. brucei, Trypanosoma brucei, T. rangeli, Trypanosoma rangeli.

5.2. Discussão

A eletroforese bidimensional continua sendo uma ferramenta inigualável para a separação de proteínas, pois possui uma alta capacidade de resolver alguns milhares de *spots* protéicos simultaneamente. Mesmo tal capacidade de resolução é, na maioria das vezes, insuficiente para resolver todas as proteínas de um proteoma em um único gel.

Quando tomamos o *T. cruzi*, por exemplo, vemos que este apresenta mais de 12.000 genes codificantes de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005). Considerandose que cada gene pode dar origem a mais de uma proteína devido a processamentos e modificações pós-traducionais, conclui-se ser impossível representar todo o proteoma do parasito em um único gel.

Uma das estratégias encontradas para aumentar a representação das proteínas de um proteoma em géis bidimensionais faz uso dos gradientes estreitos de pH (*narrow pH gradients*). Em um dos primeiros trabalhos sobre proteômica de *T. cruzi* (Paba *et al.*, 2004a) foi utilizado géis 2-DE na faixa de pH 4-7 para os diferentes estágios de vida do parasito. Neste mesmo trabalho os autores afirmam que estudos futuros envolvendo a análise de proteínas básicas, assim como o uso de gradientes estreitos de pH poderiam levar a uma visão mais completa do proteômica do *T. cruzi* na faixa alcalina de pH (Magalhães *et al.*, 2008). Seguindo a mesma linha de raciocínio, o presente trabalho procurou analisar os proteomas das formas do *T. cruzi* encontradas nos hospedeiros mamíferos, tripomastigota e amastigota, utilizando faixas estreitas de pH 3-5,6 NL e 5,3-6,5.

No primeiro momento, foi padronizada a separação de extratos protéicos da forma epimastigota devido a maior facilidade de cultivo em grande escala. Foram assim obtidos mapas 2-DE de alta resolução nas duas faixas de pH por meio de protocolos otimizados de focalização isoelétrica.

Os métodos otimizados foram empregados na análise proteômica dos estágios encontrados nos hospedeiros mamíferos resultando em perfis 2-DE bem resolvidos e reprodutíveis. Isso nos proporcionou visualizar mapas proteômicos

ricos e complexos nas duas faixas de pH ácido o que não seria possível utilizando gradientes mais amplos de pH. A título de comparação, no trabalho de Paba *et al.* (2004a) foram detectados em média 500 *spots* revelados com prata/gel usando-se gradiente de pH 4-7. No presente trabalho foram detectados acima de 1000 *spots* em média para cada gel, tanto na faixa de pH 3-5,6 quanto para a de pH 5,3-6,5. O aumento no número de *spots* detectados com o uso de gradients mais estreitos de pH também foi observado por outros autores. Sodré *et al* (2009), por exemplo, trabalhando com epimastigotas, detectaram 256 *spots* corados com Coomassie Blue em géis de pH 3-10 e 338 *spots* em géis 4-7.

A partir desses perfis, foi possível comparar a distribuição de *spots* de cada 2-DE e perceber padrões 2D parecidos mas não idênticos, entre as duas formas em cada janela estreita de pH ácido, o que corrobora resultados anteriores de nosso grupo (Paba *et al.*, 2004a). O fato de serem dois estágios de vida do mesmo protozoário, encontrados dentro de células de mamíferos, justifica as semelhanças entre os perfis. Contudo, diferenças são esperadas já que diversas mudanças morfológicas ocorrem durante a amastigogênese do parasito incluindo perda do flagelo externo, remodelagem do citoesqueleto e mudanças de tamanho e volume. Além disso, características metabólicas, de virulência e capacidade de replicação diferem de uma forma para a outra (Tyler & Engman, 2001).

No presente trabalho foram identificadas 68 proteínas no intervalo entre 3-5,6 NL e 47 proteínas entre o pH 5,3-6,5. Tais identificações foram agrupadas de acordo com suas funções celulares utilizando o sistema de classificação *Panther Ontologies* (<u>http://www.pantherdb.org/panther/ontologies.jsp</u>) e os resultados estão apresentados em formato de gráfico na Fig. 13.

Foram feitas análises computacionais de imagens dos géis a fim de verificarmos a expressão relativa das proteínas nas formas tripomastigota e amastigota. Contudo, esses resultados devem ser analisados com cautela, já que se referem ao resultado obtido de uma faixa de pH específica do proteoma. Mesmo assim, alguns dos resultados obtidos estão de acordo com as características biológicas dos estágios de vida e também corroboram estudos prévios de proteômica de *T. cruzi*.

Foram identificados vários polipeptídios como alfa e beta tubulinas, que são extremamente abundantes no *T. cruzi*. Essa abundância se justifica pela característica dos tripanosomatídeos de possuirem uma rede subpelicular de microtúbulos, os quais são formados por heterodímeros de alfa e beta tubulinas, que envolve todo o corpo celular do parasito. Além disso, outros tipos de estruturas com microtúbulos são encontradas como o axonema flagelar e o corpo basal. As **alfa/beta tubulinas** (*Alpha/Beta Tubulins*) existem em várias isoformas e sofrem vários tipos de modificações pós-traducionais. Estas modificações podem explicar a distribuição destas tubulinas ao longo do gel devido as diferenças de *pl* e massa molecular (Westermann & Weber, 2003). A detecção de vários *spots* correspondendo a tubulinas com grande variação de *pl* e *Mr* foi verificado anteriormente para tripomastigotas metacíclicos na faixa de pH 3-10 (Parodi-Talice *et al.*, 2007) e para formas epimastigotas na faixa de pH 4-7 (Sodré *et al.*, 2009).

O principal componente dos microfilamentos, a actina, também foi identificada neste trabalho. Alguns autores sugerem que a actina do citoesqueleto da célula hospedeira é um facilitador para a invasão do T. cruzi (Kipnis et al., 1979; Burleigh & Andrews, 1995; Mortara et al., 2008), enguanto que outros acreditam que a actina inibe a internalização do parasito (Nogueira & Cohn, 1976; Meirelles et al., 1982). Cada protômero de actina liga uma molécula de ATP e íons cálcio ou magnésio. A actina existe como um monômero em baixas concentrações de sal, mas os filamentos se formam rapidamente com o aumento da concentração de sal com a consegüente hidrólise de ATP. O domínio ATPase da actina compartilha semelhanças com os domínios ATPase da hexocinase e de proteínas HSP 70. Dentre as proteínas ácidas identificadas encontramos algumas Proteínas Cinases (ou quinases). Estas enzimas catalizam a fosforilação de proteínas, transferindo um grupo fosfato do ATP para resíduos de serina, treonina ou tirosina e a fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extra e intracelulares. O conjunto de proteínas cinases de um organismo é chamado de cinoma (kinome). O cinoma dos tripanosomatídeos é complexo e do mesmo modo que ocorre nos eucariotos superiores, suas cinases podem potencialmente

se organizar em cascatas (Parsons *et al.*, 2005). No presente trabalho, foram identificadas uma proteína cinase A putativa, uma subunidade regulatória de proteína cinase A putativa e uma proteína cinase associada a fase S foram identificadas. A **proteína cinase A** é uma proteína dependente de AMP cíclico implicada em vários processos celulares incluindo transcrição, metabolismo dentre outros. Usando recursos de bioinformática verificamos que a proteína cinase, e apresenta uma alta homologia com a *NIMA-related kinase C* de *Trypanosoma brucei Tb*NRKC (61% de identidade e 73% de similaridade). Neste organismo responsável pela doença do sono, esta é uma proteína associada ao corpo basal envolvida na citocinese (Pradel *et al.*, 2006). Isso faz dela um excelente candidato a marcador da amastigogênese e da divisão celular da forma amastigota bem como provável alvo terapêutico.

Outra proteína identificada na faixa ácida foi a **proteína 14-3-3** (*14-3-3 Protein*). As proteínas 14-3-3 representam uma família de proteínas ácidas de 24-33 kDa que tem função crucial nos eventos de sinalização celular que estão envolvidos no controle do ciclo celular, nas alterações transcricionais em resposta aos estímulos ambientais e na morte celular programada (Ferl *et al.*, 2002). Esta proteína foi isolada e caracterizada em parasitos tais como *Schistosoma sp*, *Echinococcus sp*, *T. brucei* e *T. cruzi* (Siles-Lucas Mdel & Gottstein, 2003).

As triparedoxinas peroxidases (*Tryparedoxin Peroxidase, putative*) pertencem a família das peroxidases multifuncionais, as peroxi-redoxinas, que são proteínas antioxidantes tiol-específicas e que exercem um papel protetor nas células através da sua atividade peroxidase, reduzindo peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroperóxidos orgânicos. A triparedoxina peroxidase está envolvida na defesa contra o estresse oxidativo em parasitos tripanosomatídeos (Alphey *et al.*, 2000). Essa proteína havia sido identificada anteriormente em géis 2-DE de *T. cruzi* (Paba *et al.*, 2004a), mas sua expressão relativa entre as formas tripomastigotas e amastigotas não foram mostradas naquele artigo. No presente trabalho não observamos diferenças significativas de expressão desta proteína nas duas formas do parasito.

O provável fator de iniciação de tradução 5A (*eIF5A Eukaryotic Initiation Factor*) é uma proteína abundante e altamente conservada em todos os organismos eucarióticos, sendo também presente em arqueobactérias. O fator eIF5A é essencial para a viabilidade celular e esta é a única proteína descrita que contém o resíduo de aminoácido hipusina (uma modificação pós-traducional do aminoácido lisina). Apesar de eIF5A ser conhecida há quase 30 anos, a sua função biológica ainda é obscura. Este fator está envolvido com diferentes etapas do metabolismo de RNA mensageiro (mRNA), como o início da tradução, o transporte núcleo-citoplasma e o decaimento dos níveis de mRNA. Ainda, há estudos que evidenciaram o envolvimento de eIF5A com a proliferação celular e progressão no ciclo celular (Frigieri, 2006).

A enzima **asparagina sintetase A**, **putativa** (*Asparagine Synthetase A*, *putative*) catalisa reversivelmente a conversão do aminoácido aspartato em asparagina, sendo descrito que o aspartato induz o processo de diferenciação da forma não infectiva epimastigota em trypomastigota (Canepa *et al.*, 2005).

A proteína auto antígena I/6 (*I/6 Autoantigen, putative*) é uma MAP (*Microtubule-Associate Proteins*) ou proteína associada a microtúbulo codificada por um simples gene, sendo um polipeptídeo de 33 kDa e inclui um domínio de seis aminoácidos repetitivos aranjados em "tandem" (Gaertig *et al.*, 1995). Essa proteína foi detectada em géis da forma tripomastigota mas não em amastigota na faixa de pH analisada.

As **Proteínas Disulfeto Isomerases** (**PDI**-*Protein Disulfide Isomerase*) são membros da superfamília das tioredoxinas e estão presentes abundantemente no lúmen do retículo endoplasmático. As PDI catalizam a oxidação, redução e isomerização das pontes de dissulfeto de proteínas dependentes de potencial redox (Padilla *et al.*, 2003).

A Proteína do CAP 5.5 associada ao citoesqueleto (*Cytoskeleton-Associated Protein CAP5.5, putative*) é o primeiro membro de uma nova família de proteínas de tripanossomas caracterizado por apresentar similaridade em sua região catalítica às proteases do tipo calpaína (família de cisteíno-proteases dependentes de cálcio) e por serem proteínas especificamente associadas ao citoesqueleto. Em *T. brucei*, estas proteínas foram encontradas na forma procíclica do parasito (Hertz-Fowler *et al.*, 2001).

A **calreticulina** (*Calreticulin*), a qual apresentou expressão maior em géis de tripomastigotas, é uma chaperona multifuncional que liga Ca²⁺ e é implicada em vários processos celulares, sendo um modulador essencial tanto nas funções de adesão celular como no início da sinalização mediada por integrina. Estudos sugerem que ela esteja envolvida com uma interação estável com a membrana celular (Park *et al.*, 2001).

Foram identificadas neste trabalho uma série de **HSPs** (*Heat Shock Proteins*) ou proteínas de choque térmico. As HSPs, junto com actinas, tubulinas e histonas fazem parte do grupo de proteínas constitutivas (*housekeeping proteins*) e tem sido observadas por vários autores em trabalhos de proteômica de *T. cruzi* (Paba *et al.*, 2004a; Parodi-Talice *et al.*, 2007; Sodré *et al.*, 2009). A resposta ao choque térmico é um mecanismo homeostático que proteje as células dos efeitos deletérios do estresse ambiental, tal como calor. Esta resposta é universal e inclui a síntese de *heat-shock proteins* (Folgueira & Requena, 2007).

A proteína 78 regulada por glicose (*Glucose Regulated Protein 78 - GRP78, putative*) pertence a família das proteínas de choque térmico hsp 70. Nas células as hsp 70 são encontradas no citoplasma, núcleo, mitocondria e retículo endoplasmático e pertencem a classe de proteínas conhecidas como chaperonas sendo essenciais para funções celulares tais como translocação de proteínas através das membranas das organelas o enovelamento e empacotamento de proteínas, também para proteger as células do calor e do estresse químico. As GRP 78 são encontradas no retículo endoplasmático e foi identificada como uma proteína que tem seu nível aumentado em resposta à privação de glicose em *T. cruzi* (Tibbetts *et al.*, 1994) além da translocação de proteínas do citoplasma ao retículo endoplasmático (Sanders *et al.*, 1992), dentre outras funções.

A fosfogliceratato mutase independente de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-Bisphosphoglycerate-Independent Phosphoglycerate Mutase) é um segundo tipo de fosfoglicerato mutase que é independente de cofatores, sendo encontrada em plantas, em algumas bactérias e foi identificada em *T. brucei* sendo uma enzima monomérica de cerca de 60 kDa que cataliza uma reação intramolecular e requer cátions metálicos divalentes para sua atividade (Collet *et al.*, 2001).

A SeriI-tRNA sintetase (*SeryI-tRNA Synthetase, putative*) identificada é uma aminoaciI-tRNA sintetase de classe II que contém o domínio do sítio ativo característico desta família de enzimas responsável pela incorporação de serina e selenocisteína nas proteínas do *T. cruzi* (Geslain *et al.*, 2006).

Foi identificada a **subunidade alfa 2 do proteasoma** (*Proteasome Alpha 2 subunit*). O proteassoma é o complexo protéico de atividade proteásica multicatalítica importante na clivagem de proteínas, estando envolvido em diversas funções celulares. O proteassoma é um componente essencial às células tanto eucarióticas quanto procarióticas sendo o responsável pela degradação proteolítica da maioria das proteínas e peptídeos celulares. As principais atividades dos proteassomas estão relacionadas ao controle do ciclo celular, na apresentação de antígenos gerando peptídeos antigênicos, regulação da transcrição e tradução, apoptose dentre outras. Em alguns parasitos protistas, incluindo o *T. cruzi* o proteasoma está envolvido na diferenciação celular e replicação (Cardoso *et al.*, 2008).

Em ambas as formas celulares e nos dois gradientes de pH analisados foram identificadas um total de 23 **proteínas hipotéticas** ou proteínas sem função conhecida (*hypothetical proteins*), isto é, proteínas que deixaram de apresentar apenas uma seqüencia teórica obtida através do gene para serem identificadas a partir da digestão dos *spots* no gel como proteínas reais, porém com função ainda indefinida, mesmo assim algumas destas proteínas hipotéticas quando analisadas no banco de dados BLAST apresentaram algum domínio de outras proteínas tais como *Leucine-rich repeats, LSm14_N, chromosome segregation protein, Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, Strictosidine synthase, PEP-CTERM system TPR-repeat lipoprotein, DnaJ domain, chromosome segregation protein SMC e Ubiquitin homologs.*

Proteína de transporte Sec 13 (Protein Transport Protein SEC 13) é uma proteína específica de tripomastigota. As proteínas de transporte sec 13 estão

envolvidas na formação de vesículas apartir do retículo endoplasmático (Pryer *et al.*, 1993).

A proteína **KMP 11** (*Kinetoplastid Membrane Protein* 11) também foi identificada. A partir das análises digitais, ela demonstrou estar mais expressa em tripomastigota do que em amastigota. Embora a função biológica desta proteína atualmente seja desconhecida, sua importância vem de vários estudos imunológicos os quais demonstraram que esta proteína é capaz de provocar tanto a proliferação celular de linfócitos B e T, quanto conferir proteção imunológica contra a infecção por *T. cruzi* no modelo murino (Diez *et al.*, 2008).

A subunidade 1 da condensina (Condensin subunit 1) também foi identificada em géis da faixa ácida de pH. A condensina é um complexo multiprotéico de subunidades cujas massas moleculares variam de 109622 a 141932 Da e p*I* de 6,05 a 6,4 que atua como um regulador essencial na condensação dos cromossomos. As proteínas coesina e condensina pertencem à família das proteínas de manutenção estrutural dos cromossomos (SMC proteins). Elas são altamente conservadas desde arqueobactérias até humanos executando importantes funções no processo de divisão celular, estando envolvidas na condensação dos cromossomos e na coesão das cromátides irmãs durante o processo de divisão celular. A principal função do complexo coesina é manter as cromátides irmãs juntas até a segregação na anáfase, que é dependente da clivagem proteolítica da subunidade SCC1 da coesina (Gluenz et al., 2008). A condensina tem um papel na organização da estrutura da cromatina que forma heterodímeros. Estes heterodímeros constituem uma parte essencial de complexos de ordem superior, os quais estão envolvidos na dinâmica do DNA e da cromatina. Estes dois complexos são necessárias para a coesão das cromátides irmãs e condensação dos cromossomos (Strunnikov & Jessberger, 1999).

A cisteína pode ser sintetizada por uma via alternativa: a sulfurilação da *O*acetil homoserina gerando homocisteína, na qual pode ser convertida em cisteina via cistationa pela via de transulfuração. Em vertebrados, a cisteína é sintetizada a partir da metionina via cistationina pela via da transulfuração. Acredita-se que esta via seja a rota única para a síntese de cisteína em vertebrados através da cistationina β -sintase (CBS) atuando como uma enzima controladora de fluxo. A cistationina β -sintase (CBS), é uma enzima chave na via da transulfuração do *Trypanosoma cruzi*. CBS de *T. cruzi*, diferentemente da CBS de mamíferos, não possui um grupo heme na extremidade carboxi teminal e não é ativada por S-adenosil metionina. Esta enzima forma um heterotetrâmero e além da atividade de CBS, a enzima possui atividades sulfidrilase e cisteína sintase (Nozaki *et al.*, 2001).

Algumas proteínas paraflagelares, componentes do flagelo de T. cruzi foram detectados somente na forma tripomastigota como previamente descrito pelo nosso grupo nos géis 2-DE de pH 4-7 (Paba et al., 2004b; Paba et al., 2004a; Magalhães et al., 2008). Do mesmo modo, foram encontradas só em tripomastigota trans-sialidases que são proteínas de superfície celular responsáveis para a incorporação do ácido siálico a partir das células hospedeiras em moleculas presentes na membrana do parasito e tem um papel nos mecanismos da evasão a resposta imune e da penetração celular (Frasch, 2000). Já foi mostrado pela análise de MUDPIT que as Trans-sialidases são altamente expressas em tripomastigota (Atwood et al., 2005) o que valida a nossa abordagem. O T. cruzi, por ser incapaz de sintetizar o ácido siálico, transfere este ácido através da Trans-sialidase. A trans-sialidase pertence à família de glicoproteínas de superfície do T. cruzi constituituindo um dos poucos exemplos de glicosiltransferases de superfície encontradas em eucariotos (Leguizamon et al., 1994). Esta enzima tem atividades hidrolase e transferase, e catalisa a transferência de ácido siálico para moléculas de mucina, originando ligações α-2,3 com moléculas de β-galactose aceptoras na superfície do parasito. Apesar de ser classificada principalmente como transferase, promovendo reações reversíveis, a trans-sialidase também possui ação hidrolítica residual (Dias, 2009).



Figura 13: Distribuição das proteínas identificadas por função obtidas da faixa ácida de pH.

6. ANÁLISE SUBPROTEÔMICA DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM ORGANELAS DE ALTA DENSIDADE DE *T. CRUZI*
6.1. Resultados

6.1.1. Extração das proteínas nucleares de *T. cruzi* utilizando kit 2-D Sample *Prep for Nuclear Proteins* (PIERCE)

A primeira tentativa de purificação de proteínas nucleares foi feita com o uso do kit 2-D *Sample Prep for Nuclear Proteins* (PIERCE) para as três formas adaptativas. Essa metodologia de purificação é baseada em algumas etapas de extração nuclear por lises utilizando soluções fornecidas pelo kit (composição não revelada), etapas de centrigugação e dessalinização cromatográfica.

A concentração protéica dos extratos nucleares das formas de vida do parasito, foi determinada usando o 2D Quant kit (GE Healthcare), e forneceu valores de 0,3 μ g/ μ L para amostra da forma epimastigota, 0,57 μ g/ μ L para tripomastigota e 1,07 μ g/ μ L para amastigota.

As amostras provenientes dos três estágios foram analisadas por SDS-PAGE como representado na Fig. 14. Os perfis protéicos unidimensionais das três amostras apresentaram diferenças visíveis.



Figura 14: SDS-PAGE 12% dos extratos protéicos das três formas de *T. cruzi* preparados usando o kit 2-D *Sample Prep for Nuclear Proteins*-PIERCE. E) epimastigota, T) tripomastigota e A) amastigota. O gel foi revelado com nitrato de prata.

Como a amostra de amastigota era a mais concentrada e a mais abundante das três formas, esta foi escolhida para realização da primeira 2-DE. Após dessalinização em coluna (incluída no kit), foram aplicados 80 µg de extrato protéico nuclear de amastigota em *strip* linear na faixa de pH ampla entre 3 a 10. O gel mostrou perfil com *spots* bem definidos, sem artefatos e com a maior quantidade deles na faixa central do gel (no intervalo entre pH 5 e 7) como observado na Fig 15.



Figura 15: Perfil 2-DE (pH 3-10) do extrato protéico de amastigota obtido pelo kit 2-D *Sample Prep for Nuclear Proteins* (PIERCE). Foram aplicados 80 µg de amostra. O gel foi revelado com nitrato de prata.

Com a intenção de comprovar a eficiência do processo de extração das proteínas nucleares pelo kit da PIERCE, foi realizado um *immunoblotting* das amostras extraídas usando anticorpos, dirigidos contra a proteína nuclear SCC 1, *Sister chromatid cohesion complex 1* de *T. brucei* e contra duas proteínas

citoplasmáticas, POPTb-Trypanosoma brucei prolyl oligopeptidase e MTAP *methylthioadenosine phosphorylase* de *T. cruzi*.

A POP*Tb* possui homologia de sequência com a POP*Tc*80 (POP de *T. cruzi*), com 77% de identidade. A POP*Tc*80, uma serino protease da família S9, já foi muito bem caracterizada e sugerida como envolvida na invasão de células não fagocitárias (Grellier *et al.*, 2001; Bastos *et al.*, 2005). O soro anti-POP*Tb* responde muito bem contra a POP*Tc*80 (dados não mostrados).

O resultado do *immunoblotting* sugeriu que o método de extração de proteínas nucleares de *T. cruzi* pelo kit 2-D *Sample Prep for Nuclear Proteins*-PIERCE não foi eficiente, sendo observado que as proteínas citoplasmáticas POP*Tc*80 e MTAP estavam presentes tanto no extrato citoplasmático como no extrato nuclear (dados não mostrados). Uma provável razão para o insucesso seria devido ao fato do kit utilizado ser otimizado para células de mamíferos.

6.1.2. Obtenção da fração subcelular enriquecida em organelas de alta densidade de epimastigota

Foi realizado um procedimento para isolamento de fração enriquecida em núcleos e outras organelas de alta densidade da forma epimastigota de *T. cruzi* por uma metodologia de fracionamento celular seguindo protocolo desenvolvido no Laboratório de Microbiologia (Batista *et al.*, 1994), como apresentado na Fig. 3 do capítulo Materiais e Métodos.

Assim, foi feito um novo SDS-PAGE com as frações denominadas **FS1** e **FC** (ver Fig. 1, Material e Métodos) seguido por *immunoblotting* usando os soros anti-SCC-1 nuclear e anti-MTAP fosfatase citoplasmática. O resultado do *immunoblotting* mostrou a detecção da proteína SCC-1 apenas na fração **FS1** e a proteína MTAP apenas na fração **FC**, corroborando a eficiência do método de fracionamento subcelular (Fig. 16).



Figura 16: Validação do fracionamento sub-celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* por imunodetecção (fração **FS1**). Amostras correspondentes a frações **FS1** e **FC** foram submetidas a SDS-PAGE 12% e os géis foram corados com prata ou submetidos a *immunoblotting* utilizando soros Anti-SCC 1 e Anti-MTAP.

A fração **FS2** também foi submetida a validação por *immunoblotting* junto com a fração **FC**. O resultado do *immunoblotting* mostrou a detecção da SCC-1 apenas na fração **FS2** e a detecção de MTAP na fração de **FC** validando mais uma vez a eficiência do método de fracionamento sub-celular. Este resultado pode ser observado na Fig. 17.



Figura 17: Validação do fracionamento sub-celular de formas epimastigotas de *T. cruzi* por imunodetecção (fração FS2). Em A) Imunodetecção com anticorpos anti-SCC-1: Em B) Imunodetecção anticorpos anti-MTAP: **ET**- extrato total de epimastigota; fração **FS2**; fração citoplasmática **FC**;

Além disso, foi realizada uma 2-DE da fração FS2 seguida de imunodetecção usando soro Anti-SCC-1 para identificar os sítios de isoformas da SCC-1 dentro do perfil bidimensional como pode ser observado nas Figs. 15 e 16 e assim corroborando mais uma vez a eficiência do método de extração da fração subcelular. Nesse immunoblotting foram revelados mais de um spot protéico, apresentando a existência de isoformas de SCC-1 na forma epimastigota. As faixas de pH/Mr que estão de acordo com os valores preditos para a seguência protéica de SCC-1 (número de accesso NCBI gi/71655994), de 5,27/63,49 kDa respetivamente, segundo a ferramenta Compute pl/Mw tool (www.expasy.org). Provavelmente as sequências dessas isoformas são bem conservadas para que aconteça uma reação cruzada. A fração FS2 foi então submetida a 2-DE usando gradiente de pH ácido no intervalo de 4-7 e gradiente alcalino de pH entre 6-11 como apresentado nas Figs. 20, 21 e 22 com as identificações obtidas apresentadas nas tabelas 6, 7 e 8, respectivamente. A fração FS1 também foi submetida a IEF usando gradiente de pH de 3-10 seguido de SDS-PAGE 12% podendo ser observada na Fig. 20 com as proteínas identificadas seguido da tabela 9 com as identificações desses spots.



Figura 18: Perfil 2-DE da fração FS2 exibindo a localização das isoformas de SCC-1 de *T. cruzi* reveladas por imunotransferência em destaque em vermelho.



Figura 19: Imunodetecção de SCC1 em perfil 2-DE da fração FS2. A imunodetecção está assinalada em vermelho.



Figura 20: Perfis 2-DE da fração FS2 proveniente de fracionamento de formas epimastigota. As faixas de pH foram: A) pH 4-7 e B) pH 6-11. Foram aplicados nos géis 180 µg e 360 µg de proteínas respectivamente. Ambos foram revelados por nitrato de prata.



Figura 21: Proteínas identificadas por espectrometria de massas (tabelas 6 e 7) do perfil 2-DE pH 4-7 da fração subcelular FS2 da forma epimastigota. SDS-PAGE 12% revelado com nitrato de prata.



Figura 22: Proteínas identificadas por espectrometria de massas (tabela 8) do perfil 2-DE pH 6-11 da fração subcelular FS2 da forma epimastigota. SDS-PAGE 12% revelado com nitrato de prata.

Spot ^ª	Proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>l</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) ^e
1	Hypothetical protein	gi 71407656	T. cruzi	83	49768(34208)	4,94(5,64)	26
2	Beta-tubulin	gi 74229926	T. danilewskyi	105	49668(30828)	4,74(5,70)	39
3	Beta tubulin	gi 1220547	T. cruzi	108	49668(29578)	4,74(4,89)	28
4	Hypothetical protein	gi 71661463	T. cruzi	80	38267(59543)	7,51(7,62)	29
5	Beta-tubulin	gi 74229926	T. danilewskyi	208	50520(51763)	4,74(4,64)	47
6	Alpha tubulin	gi 71397525	T. cruzi	138	50549(50848)	4,94(5,34)	33
7	ATPase beta subunit, putative	gi 71661631	T. cruzi	99	55980(44348)	5,27 (5,40)	17
8	ATPase beta subunit, putative	gi 71661631	T. cruzi	111	55980 (43241)	5,27(5,18)	29
9	Hypothetical protein	gi 71418878	T. cruzi	79	68870(42948)	4,82(5,01)	15
10	Cytochrome c oxidase subunit iv, putative	gi 71667854	T. cruzi	202	39097(37409)	5,72(6,38)	53
11	Beta tubulin	gi 91983201	T. grayi	165	50520(32839)	4,74 (5,70)	38
12	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative	gi 71664388	T. cruzi	91	38393(31159)	5,22(5,50)	27
13	Hypothetical protein	gi 71413869	T. cruzi	93	82413(30918)	7,26 (4,97)	14
14	Alpha-tubulin	gi 1314208	T. cruzi	116	50549(30589)	4,94(5,96)	21
15	Alpha-tubulin	gi 1314208	T. cruzi	87	50549(29511)	4,94(5,96)	17
16	Beta tubulin	gi 91983201	T. grayi	160	24394(28704)	5,30(4,68)	47
17	Beta tubulin	gi 91983204	T. pestanai	82	14871(27557)	4,38(4,56)	54
18	Translation elongation factor 1-beta, putative	gi 71663355	T. cruzi	141	21996 (27016)	4,73(4,65)	62
19	Hypothetical protein	gi 71404614	T. cruzi	88	46456(25732)	8,52(3,98	26
20	Beta tubulin	gij91983201	T. grayi	132	50520(28998)	4,74(4,89)	44
21	Hypothetical protein	gi 71655669	T. cruzi	84	67473(60698)	5,10(5,65)	25
22	25 kda translation elongation factor 1-beta	gi 71649327	T. cruzi	88	38267(28109)	7,51(5,78)	29
23	Beta-tubulin	gi 74229926	T. danilewskyi	78	49668(20609)	4,74(4,94)	21
24	Actin	gi 61207126	T. cruzi	80	42297(27293)	5,40(7,20)	36
29	Par3	gi 2226084	T. cruzi	121	68705(51551)	5,86(7,48)	30
30	Hypothetical protein	gi 71656979	T. cruzi	81	66389(51128)	5,61(5,95)	19
31	Beta tubulin	gi 91983204	T. pestanai	80	49668(25370)	4,74 (3,98)	53
32	Beta tubulin	gi 91983204	T. pestanai	109	49668(24830)	4,74 (3,97)	74
33	50 s ribosomal protein L17	gi 71655553	T. cruzi	80	35361(17568)	6,85(5,39)	25
39	Dihydrolipoamide acetyltransferase	gi 71653864	T. cruzi	92	49629 (55137)	6,07 (6,84)	30

Tabela 6: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS2 da forma epimastigota na faixa de pH 4-7 por PMF.

Spot ^a	Proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>l</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]
40	Dihydrolipoamide acetyltransferase	gi 71665855	T. cruzi	127	50014(54386)	6,29(7,18)	41
41	Hypothetical protein	gi 71407656	T. cruzi	317	41190(40044)	5,28 (6,10)	81
42	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71666490	T. cruzi	87	101833 (38479)	8,42(8,33)	15
43	Ribonuclease III, putative	gi 223531076	R. communis	83	38017(32553)	6,61(5,43)	25
44	Alpha-tubulin	gi 1314208	T. cruzi	90	46927(32490)	5,49(6,36)	29
45	Beta tubulin	gi 91983201	T. grayi	98	49410(26667)	4,69(4,22)	39
46	Beta tubulin	gi 91983201	T. grayi	81	43588 (26217)	5,29(4,22)	33
47	Pyruvate phosphate dikinase	gi 13506836	T. cruzi	102	17904(23933)	5,50(6,52)	56
48	Cytochrome c oxidase subunit v	gi 71412456	T. cruzi	82	22237(23291)	5,97(6,48)	49
49	Prohibitin	gi 71661988	T. cruzi	109	31017(23146)	9,13(6,60)	34
52	Glycyl-tRNA synthetase	gi 71411626	T. cruzi	116	37029(47671)	5,96(6,40)	23
53	Retrotransposon hot spot	gi 71402790	T. cruzi	92	75505(70181)	5,98(6,09)	16
54	pyruvate phosphate dikinase	gi 13506836	T. cruzi	77	17833(24233)	5,50(8,06)	38
55	Hypothetical protein	gi 71655669	T. cruzi	84	67473(60532)	5,10(5,76)	29
56	Hypothetical protein	gi 71407656	T. cruzi	218	40835(41592)	5,28(6,10)	60
57	ATPase beta subunit	gi 71661631	T. cruzi	155	55696(55517)	5,27(5,69)	45
58	Alpha-tubulin	gi 1314208	T. cruzi	82	47638(33910)	5,49(6,36)	21

^a Números dos *spots* correspondendo aos indicados na figura 21 ^b Probabilidade baseada no algoritmo da ferramenta MASCOT ^c Valores de massa molecular relativa em Daltons teórico e experimental, respectivamente; ^d Valores de p*I* teórico e experimental, respectivamente; ^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada; *T. cruzi, Trypanosoma cruzi; T. danilewskyi, Trypanosoma danilewskyi; T. grayi, Trypanosoma grayi; T. pestanai, Trypanosoma pestanai. R. communis,* Ricinus communis;

Tabela 7: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS2 da forma epimastigota na faixa de pH 4-7 por fragmentação (MS/MS)

Spot ^ª	Proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score [♭]	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p/ Teor.(exp) d	Cobertura (%) [°]	Peptídeos ^f
25	pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	107	100785(37083)	8,42 (4,94)	3	1507.8006 R.VDYIVGTMIEVPR.A 1837.8328 K.DPFESIDQEGVGELMR.I
26	dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	gi 71653864	T. cruzi	71	49629 (29196)	6,07 (5,09)	6	2654.2956 R.AEEPSAAAVSPSTGPAAPVTTSPSTSGAR.V
27	25 kDa elongation factor 1-beta	gi 461992	T. cruzi	107	24450 (28109)	5,43 (6,06)	9	2475.2735 K.SSILFDVKPWDDTVDLQALANK.L
28	hypothetical protein	gi 71404579	T. cruzi	128	26029 (30918)	4,86 (4,97)	11	1967.9298 K.LMDQSLPVYDDVVTGSGR.L 1034.5149 R.LYWQEPAK.V
34	dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	gi 71653864	T. cruzi	58	49629(50292)	6,07(6,41)	6	1195.5418 K.NWHAEGAAPSR.A 2028.0841 K.TAQELNVSLEGIIGTGGGVGR.I
35	alpha tubulin	gi 1314208	T. cruzi	146	46927 (20680)	5,49 (6,45)	6	1715.9504 R.AVFLDLEPTVVDEIR.T 1396.7167 R.QLFHPEQLISGK.E
36	beta tubulin	gi 1220547	T. cruzi	202	49410 (18303)	4,70 (3,95)	9	1724.7715 K.NSSYFIEWIPNNIK.S 2063.8693 K.MAVTFVGNNTCIQEMFR.R 1357.6267 R.RVGEQFTAMFR.R 1185.5409 R.VGEQFTAMFR.R 1201.5443 R.VGEQFTAMFR.R

Spotª	Proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p/ Teor.(exp) d	Cobertura (%) [°]	Peptídeos ^f
37	alpha tubulin	gi 71397525	4,94(5,39)	183	49768 (18193)	4,94 (5,39)	5	1715.9342 R.AVFLDLEPTVVDEIR.T 1396.7145 R.QLFHPEQLISGK.E
38	alpha tubulin	gi 1314208	T. cruzi	206	46927(15155)	5,49 (4,99)	8	1715.8729 R.AVFLDLEPTVVDEIR.T 1396.6865 R.QLFHPEQLISGK.E 1023.4353 K.EDAANNYAR.G
50	elongation factor 1-gamma (EF-1- gamma)	gi 71409213	T. cruzi	94	47053(28704)	5,84 (8,26)	5	1565.8162 R.KYAFGVALIIGEER.R 1437.7325 K.YAFGVALIIGEER.R 1255.6283 R.HDIVALWVFR.G
51	alpha tubulin	gi 1314208	T. cruzi	230	46927(18352)	5,49 (5,13)	6	1715.8865 R.AVFLDLEPTVVDEIR.T 1396.6902 R.QLFHPEQLISGK.E 1023.4498 K.EDAANNYAR.G
59	alpha tubulin	gi 3915082	T. cruzi	179	49696 (17627)	4,90 (4,39)	15	1525.6834 R.TIQFVDWSPTGFK.C 1899.8877 K.CGINYQPPTVVPGGDLAK.V 1853.8628 R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I 2346.0635 R.AFVHWYVGEGMEEGEFSEAR.E

^a Números dos *spots* correspondendo aos indicados na figura 21;
 ^b Probabilidade baseada no algoritmo da ferramenta MASCOT;
 ^c Valores de massa molecular relativa em Daltons teórico e experimental, respectivamente;
 ^d Valores de p/ teórico e experimental, respectivamente;
 ^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;

^f De acordo com as massas peptídicas obtidas experimentalemente e os parâmetros escolhidos, a ferramenta de busca mostra possíveis peptídeos correspondentes a essas massas que sejam originados da proteína encontrada.

Spot ^a	Proteína	Nº accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	р <i>I</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]
1	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	221	101851 (99142)	8,42(8,03)	33
2	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	239	101851 (77539)	8,42(8,74)	43
3	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	229	101851 (57128)	8,42(8,71)	33
4	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71666490	T. cruzi	232	101833 (47521)	8,42(8,24)	31
5	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	170	101851 (15080)	8,42(7,45)	23
6	Kinesin	gi 72392104	T. brucei	67	114419 (17420)	6,48(8,53)	15
7	ATP synthase F1 subunit gamma	gi 71746446	T. brucei	68	34491 (20577)	9,45(6,46)	34
8	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	82	101851 (26978)	8,42(9,25)	23
9	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	77	101851 (28224)	8,42(6,62)	14
10	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100	gi 71401304	T. cruzi	121	67834 (29577)	7,67(7,38)	25
11	Glycosyl transferase	gi 71406918	T. cruzi	75	63351 (30305)	8,87(8,63)	14
12	Hypothetical protein	gi 71663969	T. cruzi	76	68176 (31312)	5,72(6,93)	22
13	DNA polymerase delta catalytic subunit	gi 71406868	T. cruzi	70	95511 (31443)	6,86(8,13)	24
14	Hypothetical protein	gi 71416937	T. cruzi	148	86971 (30832)	6,41(7,19)	34
15	Hexokinase	gi 71655813	T. cruzi	91	52802 (31951)	8,70(8,10)	22
16	Nucleoside phosphatase	gi 71414508	T. cruzi	108	71544 (32028)	8,13(9,46)	20
17	Hypothetical protein	gi 71422242	T. cruzi	67	114038 (51228)	8,72(3,34)	12
18	Elongation factor 1-alpha (ef-1-alpha)	gi 71408922	T. cruzi	87	43248 (32507)	7,60(9,20)	27
19	Glycosyl transferase	gi 71406918	T. cruzi	90	64275 (32507)	8,87(9,10)	20
20	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	gi 71408922	T. cruzi	74	43248 (32701)	7,60(6,38)	28
21	Elongation factor 1-alpha	gi 61207288	T. cruzi	110	48279 (33548)	8,70(6,60)	42
22	Open reading frame b putative	gi 162056	T. brucei	76	38416 (34869)	4,75(8,13)	23
23	Ras-related protein rab-5	gi 71748886	T. brucei	67	24683 (35182)	7,66(6,44)	27
24	Hexokinase	gi 19703093	T. cruzi	89	52776 (37182)	8,81(8,99)	32
25	Hypothetical protein	gi 71748632	T. brucei	75	49371 (41505)	5,69(6,48)	21
26	Elongation factor 1-alpha	gi 61207254	T. cruzi	71	48295 (41554)	8,69(9,15)	28
27	Hypothetical protein	gi 71650093	T. cruzi	86	48332 (42227)	9,04(6,73)	40
28	Hypothetical protein	gi 84043792	T. brucei	69	44240 (43475)	9,31(9,33)	36
29	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide	gi 71649252	T. cruzi	106	33606 (43916)	8,31(7,93)	27
30	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	gi 71420836	T. cruzi	118	59395 (44231)	8,70(7,80)	24

Tabela 8: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS2 da forma epimastigota na faixa de pH entre 6-11 por PMF

Spot ^a	Proteína	№ accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	р <i>I</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) [°]
31	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP], glycosomal	gi 1709734	T. cruzi	223	53333 (44336)	8,20(8,07)	31
32	Condensin subunit 1	gi 71666608	T. cruzi	71	109622 (44574)	6,05(9,02)	17
33	Hypothetical protein	gi 71664852	T. cruzi	111	43296 (44786)	9,38(8,66)	36
34	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	gi 71650759	T. cruzi	203	43381 (45000)	7,97(7,67)	57
35	Hypothetical protein	gi 71656979	T. cruzi	94	66674 (45735)	5,61(8,63)	31
36	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gi 71422448	T. cruzi	153	39292 (46482)	8,99(8,01)	50
37	Variant surface glycoprotein	gi 74026432	T. brucei	66	52966 (46482)	8,46(8,48)	21
38	Elongation factor 1-alpha (ef-1-alpha)	gi 71408922	T. cruzi	85	43248 (47521)	7,60(8,03)	33
39	40s ribosomal protein SA	gi 71402795	T. cruzi	165	28114 (48084)	8,33(6,92)	57
40	Hypothetical protein	gi 71661687	T. cruzi	76	20116 (47731)	9,99(7,97)	35
41	Hypothetical protein	gi 71653330	T. cruzi	184	28888 (47521)	6,33(8,78)	45
42	Heat shock protein 70	gi 40548863	T. rangeli	96	27543 (49014)	5,23(8,89)	32
43	Hypothetical protein	gi 71664852	T. cruzi	117	43296 (51304)	9,38(8,05)	32
44	Mitochondrial carrier protein	gi 71748420	T. brucei	76	43363 (51759)	9,20(8,75)	20
45	GTP-binding nuclear protein	gi 71650864	T. cruzi	104	24809 (55063)	6,95(8,74)	50
46	Glucokinase 1	gi 71659505	T. cruzi	78	42124 (55962)	8,66(6,59)	26
47	Elongation factor 1-alpha	gi 61207252	T. cruzi	66	48327 (59184)	8,42(8,60)	19
48	Pyruvate phosphate dikinase	gi 13506836	T. cruzi	129	17904 (61404)	5,50(6,88)	49
49	Pyruvate phosphate dikinase	gi 13506836	T. cruzi	98	17904 (64178)	5,50(7,70)	49
50	Hypothetical protein	gi 71422288	T. cruzi	80	24533 (64273)	9,19(8,94)	45
51	Farnesyltransferase	gi 71407970	T. cruzi	83	47165 (66361)	5,67(6,99)	37
52	Actin	gi 14194452	S. bovinus	80	42063 (70471)	5,31(8,53)	30
53	Hypothetical protein	gi 71407758	T. cruzi	119	13022 (75039)	7,85(8,45)	70

Spot ^a	Proteína	№ accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>I</i> Teor.(exp) ^d	Cobertura (%) ^e
54	Elongation factor 1-alpha	gi 61207296	T. cruzi	91	48235 (77963)	8,58(8,66)	37
55	Enoyl-Coa hydratase/isomerase family protein	gi 71420280	T. cruzi	71	42355 (95946)	5,88(7,73)	31
56	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	205	101851(97531)	8,42(7,58)	33
57	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	208	101851(101332)	8,42(8,46)	26
58	Hypothetical protein	gi 71755357	T. brucei	70	28115 (42554)	4,89(7,74)	38
59	Hypothetical protein	gi 71661544	T. cruzi	80	40657 (51759)	5,92(8,86)	27
60	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	189	101851(101332)	8,42(8,46)	38
61	Hypothetical protein	gi 71664852	T. cruzi	72	43296 (51228)	9,38(7,20)	17
62	Hypothetical protein	gi 71656979	T. cruzi	74	66674 (49961)	5,61(9,02)	23
63	Hypothetical protein	gi 72392461	T. brucei	68	54255 (86753)	8,35(8,42)	15
64	Ras-related protein Rab-5	gi 71748886	T. brucei	67	24683 (35182)	7,66(9,50)	27

^a Números dos *spots* correspondendo aos indicados nas figuras 22
 ^b Probabilidade baseada no algoritmo da ferramenta MASCOT
 ^c Valores de massa molecular relativa em Daltons teórico e experimental, respectivamente;
 ^d Valores de p/ teórico e experimental, respectivamente;
 ^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;
 T. cruzi, Trypanosoma cruzi; T. brucei, Trypanosoma brucei; T. rangeli, Trypanosoma rangeli;

S. bovinus, Suillus bovinus



Figura 23: Mapa 2-DE da fração FS1 na faixa de pH de 3-10 seguido de SDS-PAGE 12% e revelado com nitrato de prata com a localização das proteínas identificadas por MS. O resultado das identificações está apresentado na tabela 9.

Spot ^a	Proteína	Entrada (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) Teor.(exp) ^c	p <i>I</i> Teor(exp) ^d	Cobertura (%) [°]
1	U6 snRNA-associated sm-like protein lsm7p	gi 72389556	T. brucei	66	10278 (16719)	6,82(6,92)	50
2	Open reading frame b	gi 162056	T. brucei	72	38416 (26305)	4,75 (4,59)	27
3	Open reading frame b	gi 162056	T. brucei	66	38416 (40959)	4,75 (6,19)	23
4	Heat shock protein 70	gi 205278868	T. cruzi	139	71548 (79836)	5,32 (5,96)	23
5	Heat shock protein 70	gi 50659756	T. cruzi	66	71472 (32932)	5,06 (4,72)	17
6	Elongation factor 1-gamma	gi 461995	T. cruzi	66	47035 (26826)	5,57 (5,78)	13
7	Elongation factor 1-gamma (ef-1-gamma)	gi 71409213	T. cruzi	159	47053 (28978)	5,84 (6,21)	34
8	Proteasome alpha 5 subunit	gi 71420529	T. cruzi	107	27347 (28415)	4,96 (5,15)	36
9	Calmodulin	gi 71405209	T. cruzi	73	16814 (14493)	4,10 (3,76)	54
10	Cytoskeleton-associated protein cap5.5	gi 71651946	T. cruzi	252	89960 (90769)	4,90 (5,28)	48
11	Basal body component	gi 71650627	T. cruzi	66	166490 (66882)	6,02 (6,10)	18
12	Hypothetical protein	gi 71407656	T. cruzi	177	41190 (45658)	5,28 (5,72)	51
13	Hypothetical protein	gi 71652117	T. cruzi	70	58021 (119166)	6,48 (4,75)	28
14	Hypothetical protein	gi 71663325	T. cruzi	59	60083 (100942)	6,13 (6,67)	21
15	Hypothetical protein	gi 71416386	T. cruzi	85	134163 (70374)	5,22 (4,79)	16
16	Hypothetical protein	gi 71410887	T. cruzi	72	70452 (54642)	5,54 (5,84)	16
17	Hypothetical protein	gi 71661567	T. cruzi	116	43691 (49883)	6,00 (6,98)	44
18	Hypothetical protein	gi 71663484	T. cruzi	77	39309 (44846)	5,31 (4,42)	20
19	Hypothetical protein	gi 71424382	T. cruzi	77	86591 (23800)	5,69 (5,67)	15
20	Hypothetical protein	gi 71663969	T. cruzi	71	68176 (15627	5,72 (7,74)	16
21	Hypothetical protein	gi 71748632	T. brucei	92	49371(24623)	5,69 (7,65)	24
22	Hypothetical protein	gi 71748632	T. brucei	80	49371(25062)	5,69 (8,20)	22
23	Hypothetical protein	gi 71666966	T. cruzi	70	74286 (117075)	9,11 (5,72)	20
24	Hypothetical protein	gi 71748632	T. brucei	74	49371 (59070)	5,69 (7,36)	23
25	Hypothetical protein	gi 71659884	T. cruzi	80	39256 (46265)	11,03 (5,10)	27
26	Hypothetical protein	gi 71652139	T. cruzi	67	35138 (31499)	4,80 (5,43)	17
27	Tryparedoxin peroxidase	gi 17224953	T. cruzi	80	22743 (26116)	5,96 (6,89)	40
28	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	78	101851 (80190)	8,42 (8,71)	16
29	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	131	101851 (100496)	8,42 (3,34)	29
30	Pyruvate phosphate dikinase	gi 71658999	T. cruzi	124	101851 (79483)	8,42 (8,90)	35
31	Pyruvate phosphate dikinase	gi 13506836	T. cruzi	92	17904 (26408)	5,50 (7,16)	52
32	Calpain-like cysteine peptidase	gi 71411006	T. cruzi	66	12940 (15148)	(5,07 (5,19)	33

Tabela 9: Proteínas identificadas do mapa 2-DE da fração FS1 da forma epimastigota na faixa de pH entre 3-10 por PMF

Spot ^a	Proteína	№ accesso (NCBI)	Organismo	Score ^b	Mr (Da) teor(exp) ^c	р <i>I</i> Teor(exp) ^d	Cobertura (%) [°]
33	Calpain cysteine peptidase	gi 71666282	T. cruzi	85	83472 (85127)	6,07 (6,19)	21
34	Histidine ammonia-lyase	gi 71666760	T. cruzi	82	58685 (60731)	8,02 (7,63)	14
35	Histidine ammonia-lyase	gi 71666760	T. cruzi	94	58685 (60331)	8,02 (7,75)	29
36	Histidine ammonia-lyase	gi 71666760	T. cruzi	108	58685 (59855)	8,02 (7,90)	26
37	Par3	gi 2226084	T. cruzi	131	69274 (77058)	5,86 (6,05)	35
38	Hexokinase	gi 71655813	T. cruzi	181	52802 (55077)	8,70 (9,32)	48
39	Thiol transferase	gi 32395732	T. cruzi	72	48448 (53147)	5,22 (6,24)	12
40	ATPase beta subunit	gi 71661631	T. cruzi	110	55980 (61376)	5,27 (5,39)	25
41	ATPase beta subunit	gi 71661631	T. cruzi	199	55980 (62936)	5,27 (5,54)	54
42	Variant surface glycoprotein	gi 74026404	T. brucei	70	52835 (67179)	8,22 (6,26)	21
43	Lipoamide dehydrogenase	gi 194368484	T. cruzi	77	50080 (59226)	6,47 (7,49)	28
44	Lipoamide dehydrogenase	gi 194368484	T. cruzi	155	50080 (58681)	6,47 (7,67)	36
45	Malate dehydrogenase	gi 71664243	T. cruzi	66	33757 (36680)	8,44 (9,34)	27
46	Putative glutamate dehydrogenase	gi 2981039	T. cruzi	75	49355 (51762)	7,99 (8,63)	23
47	Mitochondrial malate dehydrogenase	gi 71414199	T. cruzi	67	31921 (36680)	7,62 (9,44)	29
48	Mitochondrial malate dehydrogenase	gi 71414199	T. cruzi	73	31921 (36523)	7,62 (9,24)	29

^a Números dos *spots* correspondendo aos indicados nas figuras 23
 ^b Probabilidade baseada no algoritmo da ferramenta MASCOT
 ^c Valores de massa molecular relativa em Daltons teórico e experimental, respectivamente;
 ^d Valores de p/ teórico e experimental, respectivamente;
 ^e Relaciona o percentual de cobertura dos peptídeos da busca relativo ao tamanho total da proteína encontrada;

T. cruzi, Trypanosoma cruzi, T. brucei, Trypanosoma brucei.

6.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão da fração enriquecida de organelas de alta densidade

A fração enriquecida em organelas de alta densidade foi analisada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para verificar as estruturas subcelulares contidas na amostra. Para essa análise, foi usado o sedimento obtido antes mesmo que este fosse tratado com o tampão XBE2 e nuclease microcócica e solubilizado em uréia e tiuréia (Fig. 1). A micrografia pode ser visualizada na Fig. 24. As imagens de MET mostraram claramente um enriquecimento de núcleos porém.



Figura 24: Micrografia eletrônica obtida da fração enriquecida em organelas de alta densidade de *T. cruzi* onde pode ser observado o enriquecimento da fração por núcleos.

78

6.2. Discussão

Diversos trabalhos envolvendo diferentes estratégias proteômicas e sub-proteômicas tem sido descritos. No caso específico de proteômica organelar, o uso de fracionamentos celulares reduz a complexidade das amostras, e as proteínas específicas presentes em pequenas quantidades de organelas são então reveladas (Taylor *et al.*, 2003).

No caso do *T. cruzi* já foram publicados artigos enfocando subproteomas como, por exemplo, o estudo de uma fração enriquecida organelar (Ferella *et al.*, 2008), de reservossomos (Sant'Anna *et al.*, 2009) e análise proteômica de proteínas ribossomais (Ayub *et al.*, 2009). Porém nenhum estudo de sub-proteoma de extrato enriquecido de núcleos de *T. cruzi* foi reportado até o momento, até porque, nos estudos com fracionamentos celulares, o núcleo, por possuir maior densidade que as demais organelas, sedimenta rapidamente sendo geralmente descartado.

O núcleo é a principal estrutura da informação genética em células eucariotas e é comumente referido como o centro de controle da célula (Spector, 1993). Descobertas recentes a respeito da dinâmica e do arranjo espacial do número de corpos nucleares e da maguinaria molecular no processamento e transcrição de RNA, evidenciam que o núcleo celular não é somente um modo de proteger o genoma nuclear. O núcleo oferece um ambiente favorável para realização da regulação da expressão gênica em níveis de cromatina, transcrição, processamento e exportação de RNA (Wieslander, 2004). O conteúdo nuclear é espacialmente separado do citoplasma por um conjunto de membranas altamente especializadas conhecido por envelope nuclear (Maul, 1977). A primeira é uma membrana externa, conectada e intimamente associada ao retículo endoplasmático e freqüentemente revestida com ribosomos. Esta porção externa do envelope nuclear é associada aos filamentos intermediários do citoesqueleto. A segunda região é a membrana interna separada da membrana externa por um espaço do lúmem de 20-40 nm. Esta é intimamente associada com proteínas filamentosas da lâmina nuclear. Uma outra estrutura, chamada de poros da membrana (Wozniak & Blobel, 1992), é um domínio ligado às membranas

internas e externas através de poros multi protéicos, o complexo nuclear de poros NPC (*Nuclear Pore Complex*). Enquanto a membrana externa do envelope nuclear parece ter uma composição protéica muito parecida com o retículo endoplasmático rugoso, ao qual está conectado, a porção interna e os poros da membrana têm uma composição protéica única. Os poros da membrana possuem componentes de proteínas integrais de membrana do complexo de poros da membrana (Evans *et al.*, 2004).

No presente trabalho, nós propusemos originalmente a análise subproteômica da fração nuclear do *T. cruzi*. Inicialmente, foi utilizado um kit de isolamento de proteínas nucleares, o qual foi aplicado às formas epimastigota, tripomastigota e amastigota. Contudo, testes imunológicos para verificar a especificidade da purificação, mostraram que a fração isolada continha proteínas citoplasmáticas o que nos levou a abandonar a metodologia. A razão para os resultados insatisfatórios deve-se, provavelmente, ao fato do kit ser otimizado para isolamento de proteínas nucleares de mamíferos.

Foi então empregada, para formas epimastigotas, uma metodologia de fracionamento celular relativamente simples, a qual já havia sido descrita como capaz de fornecer um enriquecimento de núcleos do parasito (Batista *et al.*, 1994). Resultados posteriores de microscopia eletrônica de transmissão (MET) comprovaram o enriquecimento de núcleos na fração isolada mas, ao mesmo tempo, mostraram a presença de membranas e de flagelos na preparação (Fig. 24). Essa fração foi então considerada uma fração enriquecida de organelas de alta densidade, incluindo núcleos.

Esperava-se que a análise proteômica desta fração permitisse a identificação de proteínas presentes em organelas de alta densidade, principalmente o núcleo do parasito, incluindo aquelas envolvidas na transcrição e processamento de RNA que poderiam ser sub-representadas em géis bidimensionais de proteínas totais, e de modo geral entender melhor as bases moleculares da divisão celular da forma epimastigota deste protozoário.

Assim, o procedimento experimental utilizado produziu, a partir do enriquecimento, uma fração (**FS1**) que consistia de proteínas solúveis em um tampão salino (XBE2) e outra (**FS2**) que era composta de proteínas solúveis em condições bem mais drásticas incluindo agentes caotrópicos e detergentes.

Como havia uma perspectiva de trabalharmos com proteínas básicas que interagiriam com o DNA foi dedicada uma atenção especial para a faixa alcalina de pH dos géis 2-DE. Normalmente, géis 2-DE básicos possuem problemas de resolução, apresentando listras horizontais e *spots* pouco definidos. As dificuldades para obterem-se mapas bidimensionais alcalinos com alta qualidade devem-se a uma combinação de fatores, incluindo depleção de agentes redutores carregados (como o DTT) na faixa de pH alto, e fluxo endosmótico reverso que ocorre durante a IEF (Hoving *et al.*, 2002). Para obtermos géis 2-DE satisfatórios foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia específica para a faixa alcalina de pH, que foi inicialmente aplicada para extratos totais do parasito (Magalhães *et al.*, 2008) e para a fração enriquecida em organelas de alta densidade no presente trabalho.

De posse de géis 2-DE das frações **FS1** e **FS2**, partiu-se para a identificação de proteínas por MS. Os resultados confirmaram que o método empregado não forneceu uma preparação pura de núcleos, já que proteínas de localização esperada em outras organelas foram encontradas.

No que diz respeito a análises subproteômicas de organelas, deve-se ressaltar que os estudos anteriores produziram resultados não esperados. Por exemplo, Sant'Anna et al. (2009) fizeram a análise proteômica de uma fração bem caracterizada de reservossomos de T. cruzi. Dentre as proteínas identificadas, estavam várias que normalmente são consideradas constituintes de mitocôndria, glicossomo, acidocalcisoma, citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático e flagelo. Os próprios autores afirmam que a presença de contaminantes derivados de outras organelas é o principal desafio encontrado durante o fracionamento subcelular, apesar de terem evidências de que estavam trabalhando com uma fração pouco contaminada. Uma outra observação interessante diz respeito ao fato de que uma proteína pode ser localizada em mais de uma organela. Na verdade, foi recentemente estimado que mais de 39% das proteínas organelares podem ser detectadas em múltiplos compartimentos celulares (Foster et al., 2006).

Nas frações analisadas foram encontradas proteínas de diversas classes incluindo enzimas metabólicas, proteínas de choque térmico, fatores de elongação, proteínas do citoesqueleto, proteínas ligantes a nucleotídeos de guanina e proteínas de interação com o DNA. As identificações obtidas pelo fracionamento foram agrupadas de acordo com suas funções celulares utilizando o sistema de classificação *Panther Ontologies* (<u>http://www.pantherdb.org/panther/ontologies.jsp</u>). Os resultados estão apresentados em formato gráfico nas figuras- 25, 26 e 27 que apresentam as identificações obtidas para as frações FS1, FS2 e FS1+FS2, respectivamente.

Dentre as proteínas com localização prevista em núcleos, encontramos a proteína Retrotransposon hot spot RHS já detectada em núcleos de *T. brucei*, a subunidade catalítica delta da DNA polimerase, a subunidade 1 da condensina, uma proteína ligante de GTP nuclear e a *U6 snRNA-associated sm-like protein lsm7*. Outras proteínas podem ter possível localização nuclear além de serem encontradas em outras organelas, como o caso de a HSP 70 (de Marval *et al.*, 1993).

As proteínas hipotéticas identificadas foram submetidas a buscas de similaridade de sequência e algumas delas apresentaram homologia com domínios de proteínas nucleares. Foi o caso das proteínas hipotéticas dos *spots* 21 (gi|7165566), 30 (gi|71656979) e 55 (gi|71655669) encontradas nos géis de pH 4-7 e *spots* 35 e 62 (gi|71656979) do gel pH 6-11 da fração FS2 que apresentaram homologia com uma região SMC prok B (*structural maintenance of chromosomes*), encontradas em proteínas que atuam na organização e segregação dos cromossomos durante a divisão celular. Uma das proteínas hipotéticas do gel de pH 6-11 (spot 53 gi|71407758) mostrou homologia com proteínas da superfamília Alba de função desconhecida. Propõe-se que as proteínas Alba apresentem papel no estabelecimento e manutenção da arquitetura da cromatina e da repressão da transcrição (Sandman & Reeve, 2005).

A proteína hipotética gi|71653330 (spot 41, tabela 6) possui domínio Dpy-30. Proteínas de levedura contendo este domínio parecem estar envolvidas com metilação de histonas desempenhando um importante papel no controle epigenético (Nagy *et al.*, 2002).

Foram encontradas diversas proteínas mitocondriais, normalmente envolvidas com o metabolismo energético como a citocromo c oxidase, a diidrolipoamida acetil transferase, a enoil-Coa hidratase/isomerase, a proteína carreadora mitocondrial e a ATP sintase. Dentre os *spots* protéicos analisados foram identificados diversos fatores de elongação da tradução (*Translation elongation factor 1- alfa, beta e gama*). Os fatores de elongação são responsáveis por dois processos principais durante a síntese de proteínas no ribosomo. EF1A (ou EF-Tu) é responsável por selecionar e ligar o respectivo aminoacil-tRNA ao sitio A do ribosomo. EF2 (ou EF-G) é responsável pela translocação do peptidil-tRNA do sitio A para o sítio P (sítio peptidil-tRNA) do ribosomo, liberando-o em um local para o próximo aminoacil-tRNA se ligar. Os fatores de elongação são responsáveis pela precisão na tradução e ambos EF1A e EF2 são conservados durante a evolução (Andersen & Nyborg, 2001).

Foram identificadas também proteínas de choque térmico, chaperonas HSP 70 que estão envolvidas no enovelamento de proteínas. Tal processo utiliza ciclos repetitivos de liga e desliga ao substrato sendo que esta sua atividade é dependente de ATP. Algumas das HSP 70 são expressas apenas sob condições de estresse, enquanto algumas estão presentes em condições celulares normais de crescimento e não são termo induzidas. Estas proteínas podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares como núcleo, mitocôndria e citosol, (Bukau & Horwich, 1998).

Proteínas bastante abundantes nos géis de pH 4-7 da fração **FS2** foram as tubulinas, formadoras dos microtúbulos. Os microtúbulos representam o principal componente do citoesqueleto em tripanossomatídeos. Neste trabalho foram identificadas tanto no estudo proteômico nas faixas estreitas de pH ácido (cf capitulo 5) como na fração organelar. Os microtúbulos estão interligados entre si, com a membrana plasmática e, em alguns casos, com o retículo endoplasmático através de pontes protéicas. Estas pontes apresentam características morfológicas típicas de proteínas associadas aos microtúbulos. Estes microtúbulos apresentam tubulina alfa e beta, organizados de uma maneira que lhe confere estabilidade à estrutura (de Souza, 1988).

Vários *spots* protéicos dos géis das frações **FS1** e **FS2** foram identificados como piruvato fosfato dicinase-PPDK sendo uma enzima pertencente ao glicosoma de tripanosomatideos. Esta enzima catalisa a conversão reversível do piruvato, ATP e fosfato em AMP, pirofosfato e fosfoenol piruvato (PEP). Outras proteínas glicosomais encontradas foram a

hexoquinase e a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, ambas enzimas da via glicolítica.

Também foi identificada a proteína proibitina, que é conservada e presente em todos os organismos, podendo ser localizada em vários compatimentos celulares, tais como núcleo, membrana celular e mitocôndria. Nos tripanossomatídeos, a proibitina é conhecida como uma proteína mitocondrial associada à tradução e na manutenção morfológica desta organela (Tyc *et al.*, 2009).

A glicoproteína variante de superfície VSG (Variant surface glycoprotein) foi descrita pela primeira vez em *T. brucei*. Os tripanossomatídeos expressam esta proteína para escaparem da respota imune do hospedeiro formando uma camada na superfície do parasito pela expressão de várias VSGs antigenicamente distintas e assim conseguem enganar a resposta imunológica (Freymann *et al.*, 1990).



Figura 25: Classificação funcional das proteínas identificadas da fração FS1



Figura 26 Classificação funcional das proteínas identificadas da fração FS2



Figura 27:. Classificação funcional das proteínas identificadas das frações FS1 e FS2

7. Conclusão e perspectivas

Acreditamos que o presente trabalho veio contribuir para uma visão abrangente do proteoma do *T. cruzi*, incluindo sua variação entre seus diferentes estágios de vida. Mais uma vez, ressaltamos a relevância dos estudos proteômicos aplicados ao parasito, tendo em vista o controle pós-transcricional da sua expressão de proteínas.

O uso de gradientes estreitos na faixa ácida de pH produziu géis 2-DE com um número de *spots* protéicos/gel muito superior a trabalhos anteriores, o que forneceu uma idéia mais exata da complexidade do proteoma do parasito. A identificação de proteínas nesta faixa mostrou principalmente proteínas consideradas abundantes como, tubulinas, fatores de transcrição e proteínas de choque térmico. A expressão diferencial destas proteínas entre as formas amastigota e tripomastigota deve ser explorada mas ao mesmo tempo analisadas com cautela, já que a inexistência de uma determinada proteína em uma faixa estreita de pH pode estar associada a presença da mesma em uma outra região de pH devido a mudanças de pI causada por modificações póstraducionais, por exemplo.

A perspectiva de trabalharmos com uma fração nuclear de *T. cruzi* acabou sendo substituída pela análise de uma fração enriquecida em organelas de alta densidade, incluindo núcleos. Mesmo assim, a estratégia de fracionamento celular utilizada, apesar de simples, permitiu o enriquecimento de proteínas que foram identificadas nos géis 2-DE. Dentre estas proteínas foram encontradas várias proteínas consideradas hipotéticas que possuem domínios homólogos a proteínas envolvidas em processos de diferenciação e divisão celular que podem ser alvos de futuras pesquisas. Também seria possível o estudo comparativo desta mesma fração durante a divisão celular de formas epimastigotas e amastigotas ou durante processos de diferenciação celular. Já estamos iniciando a caracterização desta fração usando uma estratégia baseada em métodos cromatográficos ligados a espectrometria de massa (LC-MS/MS). Resultados preliminares não apresentados aqui já mostraram a identificação de proteínas não detectadas nos géis 2-DE como histonas, por exemplo.

8. Referência bibliográfica

- Aebersold, R. and D. R. Goodlett (2001). "Mass spectrometry in proteomics." <u>Chem Rev</u> **101**(2): 269-95.
- Alban, A., S. O. David, L. Bjorkesten, C. Andersson, E. Sloge, S. Lewis and I. Currie (2003). "A novel experimental design for comparative twodimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard." <u>Proteomics</u> 3(1): 36-44.
- Alphey, M. S., C. S. Bond, E. Tetaud, A. H. Fairlamb and W. N. Hunter (2000). "The structure of reduced tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins." <u>J Mol Biol</u> **300**(4): 903-16.
- Andersen, G. R. and J. Nyborg (2001). "Structural studies of eukaryotic elongation factors." <u>Cold Spring Harb Symp Quant Biol</u> **66**: 425-37.
- Anderson, N. L., R. Esquer-Blasco, J. P. Hofmann and N. G. Anderson (1991).
 "A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effects studies." <u>Electrophoresis</u> **12**(11): 907-30.
- Andrade, H. M., S. M. Murta, A. Chapeaurouge, J. Perales, P. Nirde and A. J. Romanha (2008). "Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole." <u>J Proteome Res</u> 7(6): 2357-67.
- Andrews, N. W. and W. Colli (1982). "Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells." <u>J Protozool</u> **29**(2): 264-9.
- Atwood, J. A., 3rd, D. B. Weatherly, T. A. Minning, B. Bundy, C. Cavola, F. R. Opperdoes, R. Orlando and R. L. Tarleton (2005). "The *Trypanosoma cruzi* proteome." <u>Science</u> **309**(5733): 473-6.
- Ayub, M. J., J. Atwood, A. Nuccio, R. Tarleton and M. J. Levin (2009). "Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **382**(1): 30-4.
- Bastos, I. M., P. Grellier, N. F. Martins, G. Cadavid-Restrepo, M. R. de Souza-Ault, K. Augustyns, A. R. Teixeira, J. Schrevel, B. Maigret, J. F. da Silveira and J. M. Santana (2005). "Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP *Tc*80), which is required for parasite entry into mammalian cells." <u>Biochem J</u> **388**(Pt 1): 29-38.
- Batista, J. A., S. M. Teixeira, J. E. Donelson, L. V. Kirchhoff and C. M. de Sa (1994). "Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes." <u>Mol Biochem Parasitol</u> 67(2): 301-12.

- Beverly, S. M. (2003). "Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age." <u>Nat Rev Genetics</u> **4**: 11-19.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987.). "Improved silver staining of plantproteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels." <u>Electrophoresis</u> 8: 93-99.
- Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." <u>Cell</u> **92**(3): 351-66.
- Burleigh, B. A. and N. W. Andrews (1995). "The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells." <u>Annu Rev Microbiol</u> **49**: 175-200.
- Canepa, G. E., L. A. Bouvier, U. Urias, M. R. Miranda, W. Colli, M. J. Alves and C. A. Pereira (2005). "Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*." <u>FEMS Microbiol Lett</u> **247**(1): 65-71.
- Cardoso, J., M. J. Soares, R. F. Menna-Barreto, R. Le Bloas, V. Sotomaior, S. Goldenberg and M. A. Krieger (2008). "Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis." <u>Parasitol Res</u> **103**(4): 941-51.
- Collet, J. F., V. Stroobant and E. Van Schaftingen (2001). "The 2,3bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase from Trypanosoma brucei: metal-ion dependency and phosphoenzyme formation." <u>FEMS Microbiol Lett</u> **204**(1): 39-44.
- Corrêa, J. R., G. C. Atella, M. M. Batista and M. J. Soares (2008). "Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytostomeassociated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis." <u>Exp Parasitol</u> **119**(1): 58-66.
- Da Silveira, J. F. (2000). "Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi* capítulo 8 " <u>Trypanosoma cruzi e doença de Chagas</u> **2** ^a **Edição**: 125-152
- de Marval, M. G., T. Souto-Padron, K. Gottesdiener, R. Silva, L. H. van der Ploeg and E. Rondinelli (1993). "Heat shock proteins in Trypanosoma cruzi: identification and localization of HSP70 and HSP60 proteins and structure of HSP60 genes (brief report)." <u>Biol Res</u> 26(1-2): 313-4.
- de Paula, A. S., L. Diotaiuti and C. J. Schofield (2005). "Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)." <u>Mol Phylogenet Evol</u> **35**(3): 712-8.
- de Souza, W. (1984). "Cell biology of Trypanosoma cruzi." Int Rev Cytol 86: 197-283.
- de Souza, W. (1988). "The cytoskeleton of trypanosomatids." <u>Mem Inst</u> <u>Oswaldo Cruz</u> 83 Suppl 1: 546-60.

- Dias, L. C. D., M. A., Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; (2009). "Quimioterapia da doença de chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos." <u>Quim. Nova</u> XY(00): 1-14.
- Diez, H., L. Sarmiento, M. L. Caldas, M. Montilla, C. Thomas Mdel, M. C. Lopez and C. Puerta (2008). "Cellular location of KMP-11 protein in Trypanosoma rangeli." <u>Vector Borne Zoonotic Dis</u> 8(1): 93-6.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Sevler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart and B. Andersson (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science 309(5733): 409-15.
- Evans, D. E., J. A. Bryant and C. Hutchison (2004). "The nuclear envelope: a comparative overview." <u>Symp Soc Exp Biol</u>(56): 1-8.
- Ferella, M., D. Nilsson, H. Darban, C. Rodrigues, E. J. Bontempi, R. Docampo and B. Andersson (2008). "Proteomics in *Trypanosoma cruzi*localization of novel proteins to various organelles." <u>Proteomics</u> 8(13): 2735-49.
- Ferl, R. J., M. S. Manak and M. F. Reyes (2002). "The 14-3-3s." <u>Genome Biol</u> **3**(7): REVIEWS3010.
- Folgueira, C. and J. M. Requena (2007). "A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids." <u>FEMS Microbiol Rev</u> **31**(4): 359-77.
- Foster, L. J., C. L. de Hoog, Y. Zhang, X. Xie, V. K. Mootha and M. Mann (2006). "A mammalian organelle map by protein correlation profiling." <u>Cell</u> **125**(1): 187-99.
- Frasch, A. C. (2000). "Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*." <u>Parasitol Today</u> **16**(7): 282-6.

- Freymann, D., J. Down, M. Carrington, I. Roditi, M. Turner and D. Wiley (1990).
 "2.9 A resolution structure of the N-terminal domain of a variant surface glycoprotein from *Trypanosoma brucei*." <u>J Mol Biol</u> 216(1): 141-60.
- Frigieri, M. C., Cano, V. S. P., (2006). "eIF5A: uma proteína essencial para a viabilidade celular cuja função permanece obscura." <u>Rev Ciências Farma</u> <u>Básica e Apli</u> 27((3)): 189-195.
- Gaertig, J., M. A. Cruz, J. Bowen, L. Gu, D. G. Pennock and M. A. Gorovsky (1995). "Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*." <u>J Cell Biol</u> **129**(5): 1301-10.
- Geslain, R., E. Aeby, T. Guitart, T. E. Jones, M. Castro de Moura, F. Charriere, A. Schneider and L. Ribas de Pouplana (2006). "Trypanosoma seryltRNA synthetase is a metazoan-like enzyme with high affinity for tRNASec." J Biol Chem 281(50): 38217-25.
- Gluenz, E., R. Sharma, M. Carrington and K. Gull (2008). "Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in Trypanosoma brucei and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages." <u>Mol Microbiol</u> 69(3): 666-80.
- Graham, S. V. (1995). "Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida." <u>Parasitol Today</u> **11**(6): 217-23.
- Grellier, P., S. Vendeville, R. Joyeau, I. M. Bastos, H. Drobecq, F. Frappier, A. R. Teixeira, J. Schrevel, E. Davioud-Charvet, C. Sergheraert and J. M. Santana (2001). "Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes." J Biol Chem 276(50): 47078-86.
- Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb and R. Aebersold (1999). "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." <u>Nat Biotechnol</u> **17**(10): 994-9.
- Hertz-Fowler, C., K. Ersfeld and K. Gull (2001). "CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpainrelated proteins in Trypanosoma brucei." <u>Mol Biochem Parasitol</u> **116**(1): 25-34.
- Hoving, S., B. Gerrits, H. Voshol, D. Muller, R. C. Roberts and J. van Oostrum (2002). "Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients." <u>Proteomics</u> 2(2): 127-34.
- Katayama, H., T. Nagasu and Y. Oda (2001). "Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." <u>Rapid Commun</u> <u>Mass Spectrom</u> **15**(16): 1416-21.

- Kipnis, T. L., V. L. Calich and W. D. da Silva (1979). "Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages." <u>Parasitology</u> 78(1): 89-98.
- Klose, J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals." <u>Humangenetik</u> **26**(3): 231-43.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**(5259): 680-5.
- Leguizamon, M. S., O. Campetella, G. Russomando, M. Almiron, I. Guillen, S. M. Ganzalez Cappa and A. C. Frasch (1994). "Antibodies inhibiting Trypanosoma cruzi trans-sialidase activity in sera from human infections." <u>J Infect Dis</u> **170**(6): 1570-4.
- Magalhães, A. D., S. Charneau, J. Paba, R. A. Guércio, A. R. Teixeira, J. M. Santana, M. V. Sousa and C. A. Ricart (2008). "*Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages." <u>Proteome Sci</u> 6: 24.
- Mamyrin, B. A. (1994). "Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry." Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc **131**: 1-19.
- Mann, M. (2006). "Functional and quantitative proteomics using SILAC." <u>Nat</u> <u>Rev Mol Cell Biol</u> **7**(12): 952-8.
- Mann, M., P. Hojrup and P. Roepstorff (1993). "Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases." <u>Biol Mass Spectrom</u> 22(6): 338-45.
- March, R. E. (1997). "An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry." J. Mass Spectrom. **32**: 351-369.
- Maul, G. G. (1977). "The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution." <u>Int Rev Cytol Suppl(6)</u>: 75-186.
- Medzihradszky, K. F., J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal and A. L. Burlingame (2000). "The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer." <u>Anal Chem</u> **72**(3): 552-8.
- Meirelles, M. N., E. Chiari and W. de Souza (1982). "Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages." <u>Acta Trop</u> **39**(3): 195-203.
- Mortara, R. A., W. K. Andreoli, M. C. Fernandes, C. V. da Silva, A. B. Fernandes, C. L'Abbate and S. da Silva (2008). "Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry." <u>Subcell Biochem</u> 47: 101-9.

- Nagy, P. L., J. Griesenbeck, R. D. Kornberg and M. L. Cleary (2002). "A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 99(1): 90-4.
- Nogueira, N. and Z. Cohn (1976). "*Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells." <u>J Exp Med</u> **143**(6): 1402-20.
- Nozaki, T., Y. Shigeta, Y. Saito-Nakano, M. Imada and W. D. Kruger (2001). "Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*." J Biol Chem **276**(9): 6516-23.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." J Biol Chem **250**(10): 4007-21.
- Paba, J., J. M. Santana, A. R. Teixeira, W. Fontes, M. V. Sousa and C. A. Ricart (2004a). "Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*." <u>Proteomics</u> 4(4): 1052-9.
- Paba, J., C. A. Ricart, W. Fontes, J. M. Santana, A. R. Teixeira, J. Marchese, B. Williamson, T. Hunt, B. L. Karger and M. V. Sousa (2004b). "Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents." <u>J Proteome Res</u> 3(3): 517-24.
- Padilla, A., R. Noiva, N. Lee, K. V. Mohan, H. L. Nakhasi and A. Debrabant (2003). "An atypical protein disulfide isomerase from the protozoan parasite *Leishmania* containing a single thioredoxin-like domain." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> 278(3): 1872-8.
- Park, B. J., D. G. Lee, J. R. Yu, S. K. Jung, K. Choi, J. Lee, Y. S. Kim, J. I. Lee, J. Y. Kwon, A. Singson, W. K. Song, S. H. Eom, C. S. Park, D. H. Kim, J. Bandyopadhyay and J. Ahnn (2001). "Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in *Caenorhabditis elegans*." <u>Mol Biol Cell</u> **12**(9): 2835-45.
- Parodi-Talice, A., R. Duran, N. Arrambide, V. Prieto, M. D. Pineyro, O. Pritsch, A. Cayota, C. Cervenansky and C. Robello (2004). "Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*." <u>Int J</u> <u>Parasitol</u> **34**(8): 881-6.
- Parodi-Talice, A., V. Monteiro-Goes, N. Arrambide, A. R. Avila, R. Duran, A. Correa, B. Dallagiovanna, A. Cayota, M. Krieger, S. Goldenberg and C. Robello (2007). "Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." <u>J Mass Spectrom</u> **42**(11): 1422-32.
- Parsons, M., E. A. Worthey, P. N. Ward and J. C. Mottram (2005). "Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic

trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi." <u>BMC Genomics</u> **6**: 127.

- Pradel, L. C., M. Bonhivers, N. Landrein and D. R. Robinson (2006). "NIMArelated kinase TbNRKC is involved in basal body separation in *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1852-63.
- Pryer, N. K., N. R. Salama, R. Schekman and C. A. Kaiser (1993). "Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro." <u>J Cell Biol</u> **120**(4): 865-75.
- Sabounchi-Schutt, F., J. Astrom, I. Olsson, A. Eklund, J. Grunewald and B. Bjellqvist (2000). "An immobiline DryStrip application method enabling high-capacity two-dimensional gel electrophoresis." <u>Electrophoresis</u> 21(17): 3649-56.
- Sanchez, J. C., V. Rouge, M. Pisteur, F. Ravier, L. Tonella, M. Moosmayer, M. R. Wilkins and D. F. Hochstrasser (1997). "Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients." <u>Electrophoresis</u> 18(3-4): 324-7.
- Sanders, S. L., K. M. Whitfield, J. P. Vogel, M. D. Rose and R. W. Schekman (1992). "Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER." <u>Cell</u> 69(2): 353-65.
- Sandman, K. and J. N. Reeve (2005). "Archaeal chromatin proteins: different structures but common function?" <u>Curr Opin Microbiol</u> **8**(6): 656-61.
- Sant'Anna, C., E. S. Nakayasu, M. G. Pereira, D. Lourenco, W. de Souza, I. C. Almeida and E. S. N. L. Cunha (2009). "Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes." <u>Proteomics</u> 9(7): 1782-94.
- Siles-Lucas Mdel, M. and B. Gottstein (2003). "The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms." <u>Trends Parasitol</u> **19**(12): 575-81.
- Silveira, J. F. (2000). "Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*." <u>In: BRENER,</u> <u>Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas **2**^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,: p. 127-152.</u>
- Siuzdak, G. (1996). "Mass Spectrometry for Biotechnology." <u>Academic Press</u> **1st. ed.**: 161.
- Sodré, C. L., A. D. Chapeaurouge, D. E. Kalume, L. de Mendonca Lima, J. Perales and O. Fernandes (2009). "Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project." <u>Arch Microbiol</u> **191**(2): 177-84.
- Sogin, M. L., G. Hinkle and D. D. Leipe (1993). "Universal tree of life." <u>Nature</u> **362**(6423): 795.
- Spector, D. L. (1993). "Macromolecular domains within the cell nucleus." <u>Annu</u> <u>Rev Cell Biol</u> **9**: 265-315.
- Steen, H. and A. Pandey (2002). "Proteomics goes quantitative: measuring protein abundance." <u>Trends Biotechnol</u> **20**(9): 361-4.
- Strunnikov, A. V. and R. Jessberger (1999). "Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions." <u>Eur J Biochem</u> 263(1): 6-13.
- Taylor, S. W., E. Fahy and S. S. Ghosh (2003). "Global organellar proteomics." <u>Trends Biotechnol</u> **21**(2): 82-8.
- Teixeira, P. C., L. K. Iwai, A. C. Kuramoto, R. Honorato, A. Fiorelli, N. Stolf, J. Kalil and E. Cunha-Neto (2006). "Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy." <u>Braz J Med Biol Res</u> 39(12): 1549-62.
- Tibbetts, R. S., I. Y. Kim, C. L. Olson, L. M. Barthel, M. A. Sullivan, A. G. Winquist, S. D. Miller and D. M. Engman (1994). "Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of *Trypanosoma cruzi*." <u>Infect Immun</u> 62(6): 2499-507.
- Tonge, R., J. Shaw, B. Middleton, R. Rowlinson, S. Rayner, J. Young, F. Pognan, E. Hawkins, I. Currie and M. Davison (2001). "Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology." <u>Proteomics</u> 1(3): 377-96.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **76**(9): 4350-4.
- Tyc, J., D. Faktorova, E. Kriegova, M. Jirku, Z. Vavrova, D. A. Maslov and J. Lukes (2009). "Probing for primary functions of prohibitin in *Trypanosoma brucei*." <u>Int J Parasitol</u>.
- Tyler, K. M. and D. M. Engman (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." Int J Parasitol **31**(5-6): 472-81.
- Unlu, M., M. E. Morgan and J. S. Minden (1997). "Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts." <u>Electrophoresis</u> **18**(11): 2071-7.
- Vanhamme, L. and E. Pays (1995). "Control of gene expression in trypanosomes." <u>Microbiol Rev</u> **59**(2): 223-40.
- Westermann, S. and K. Weber (2003). "Post-translational modifications regulate microtubule function." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **4**(12): 938-47.

Westermeier, R., Naven, T., Höpker, H. R. (2008). "Proteomics in Practice 2nd. ed.: A Guide to Successful Experimental Design." <u>Academic Press</u> **2nd. ed.**: 502.

Wieslander, L. (2004). "The cell nucleus." Exp Cell Res 296(1): 1-3.

- Word Health Organization, W. (2002). "Control of Chagas Disease." <u>World</u> <u>Health Organ. Tech. Rep. Ser. **905**: i-vi, 1-109, back cover.</u>
- Wozniak, R. W. and G. Blobel (1992). "The single transmembrane segment of gp210 is sufficient for sorting to the pore membrane domain of the nuclear envelope." J Cell Biol **119**(6): 1441-9.
- Wysocki, V. H., K. A. Resing, Q. Zhang and G. Cheng (2005). "Mass spectrometry of peptides and proteins." <u>Methods</u> **35**(3): 211-22.

9. Anexos