

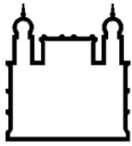
**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**PROTEOMA E FOSFOPROTEOMA QUANTITATIVO**  
**DURANTE ESTRESSE NUTRICIONAL DA FORMA**  
**EPIMASTIGOTA DE *Trypanosoma cruzi***

**ALINE CASTRO RODRIGUES LUCENA**

**CURITIBA/PR**

**2015**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia**

***ALINE CASTRO RODRIGUES LUCENA***

Proteoma e Fosfoproteoma quantitativo durante o estresse nutricional da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Fabricio K. Marchini

Coorientadora: Dra. Lyris M. F. de Godoy

**CURITIBA/PR**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

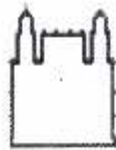
L935 Lucena, Aline Castro Rodrigues

Proteoma e fosfoproteoma quantitativo durante o estresse nutricional da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* / Aline Castro Rodrigues Lucena. – Curitiba, 2015.  
xvii, 101 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2015.  
Bibliografia: f. 92-101

1. Estresse nutricional. 2. Proteoma. 3. Fosfoproteoma. 4. SILAC. 5. Metaciclôgenese. I. Título.

CDD 616.9383



Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Carlos Chagas  
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e  
Biotecnologia



Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de **Mestre** em  
Biociências e Biotecnologia.

Aos 25 dias do mês de Fevereiro de dois mil e quinze, às 09 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: **Dra. Tatiana de A. C.B. de Souza**, **Dr. Carlos André Ornelas** e **Dra. Fabíola Barbieri Holetz**, com a finalidade de julgar a **dissertação** da candidata **Aline Castro Rodrigues Lucena**, intitulada: **"FOSFOPROTEOMA QUANTITATIVO DURANTE ESTRESSE NUTRICIONAL DA FORMA EPIMASTIGOTA DE TRYPANOSOMA CRUZI"**, sob a orientação de **Fabício Kleriynton Marchini**, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dra. Tatiana A.C.B. de Souza**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da tese por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo(a) candidato(a).

**Profa. Dra. Tatiana de A. C.B. de Souza**

ICC/FIOCRUZ

**Prof. Dr. Carlos André Ornelas**  
UNB

**Profa. Dra. Fabíola Barbieri Holetz**

ICC/FIOCRUZ

Candidato(a): **Aline Castro Rodrigues Lucena**

Instituto Carlos Chagas – ICC – Fiocruz – PR  
Rua Prof. Alcides Munhoz Mader, 3776 – CIC  
CEP 61350-010 – Curitiba – Paraná – Brasil. Tel: +55 41 3316 3236

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Orientador Dr. Fabricio Marchini, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de iniciar minha carreira científica, pela paciência e além de todos os mais diversos ensinamentos.

A minha Coorientadora Dra. Lyris Martins Franco de Godoy, por todos os ensinamentos, pela ajuda e pela paciência.

A doutoranda Juliana Amorim pela amizade construída e por todo apoio, suporte e ajuda durante o projeto.

A Dra. Carla Vanessa de Paula Lima e o Dr. Michel Batista pela ajuda e ensinamentos em Proteômica.

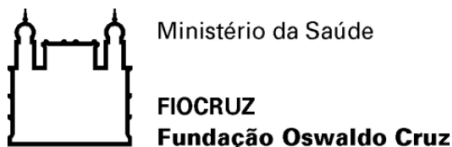
A todos os colegas do Laboratório de Genômica.

A meu marido Presley, pela paciência e companheirismo ao longo de todo o período do mestrado.

Aos meus pais, Lurdes e Osvaldo, pelo apoio a minha carreira.

A toda minha família, por sempre acreditarem em mim.

A todos que me deram apoio e me ajudaram de alguma forma neste período.



## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### PROTEOMA E FOSFOPROTEOMA QUANTITATIVO DURANTE ESTRESSE NUTRICIONAL DA FORMA EPIMASTIGOTA DE *Trypanosoma cruzi*

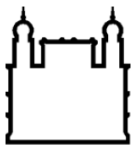
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Castro Rodrigues Lucena

Durante a metaciclo gênese *in vitro*, a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, se diferencia em tripomastigota metacíclica após ser submetido a estresse nutricional em meio TAU, com isso, adquire a capacidade de infectar o hospedeiro vertebrado. Durante a diferenciação, os parasitas sofrem diversas adaptações que incluem a modulação de modificações pós-traducionais. Em um trabalho recente, nosso grupo delineou, sem quantificar, o perfil de fosforilação em *T. cruzi* durante a metaciclo gênese. Neste trabalho, visando realizar a quantificação dos sítios de fosforilação, foi utilizada a metodologia SILAC, que marca proteínas durante o cultivo celular, através da incorporação de aminoácidos contendo isótopos pesados. Visando compreender a sinalização através de fosforilação que ocorre nos momentos iniciais de metaciclo gênese, ou seja, durante o estresse nutricional, foram selecionados os pontos epimastigotas em crescimento exponencial (epimastigotas 3 dias, EPI-3D) e na fase estacionária (epimastigotas 5 dias – EPI-5D), bem como alguns pontos ao longo do estresse nutricional (5 e 15 minutos, 1 e 2 horas). Para cada ponto experimental, os peptídeos foram digeridos, fracionados por FR básica, então os fosfopeptídeos foram enriquecidos utilizando *beads* de TiO<sub>2</sub>, e analisados por LC-MS/MS. Foram identificados 5.405 grupos de proteínas, 1.679 grupos de fosfoproteínas, 3.893 grupos de sítios de fosforilação sendo 3049 em Serina, 786 em Treonina

e, 58 em Tirosina, entre os quais cerca de 99% foram quantificados. As análises foram realizadas de duas formas: inicialmente comparando as diferentes fases de cultivo celular (exponencial e estacionária), e os diferentes pontos ao longo do estresse nutricional. Foram observadas diversas alterações no perfil de expressão das proteínas e modulação dos sítios de fosforilação, envolvidos em diversos processos como síntese de ácidos graxos, sinalização celular, locomoção, estresse oxidativo, processamento de RNA, entre outros. Projetos “ômicos”, assim como este, são importante para gerar listas com um número limitado de alvos para posterior caracterização. Nesse sentido, nós objetivamos caracterizar alguns dos elementos apontados visando elucidar o “gatilho” da metaciclologênese.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### PROTEOMA E FOSFOPROTEOMA QUANTITATIVO DURANTE ESTRESSE NUTRICIONAL DA FORMA EPIMASTIGOTA DE *Trypanosoma cruzi*

#### ABSTRACT

#### MASTER'S THESIS

Aline Castro Rodrigues Lucena

During metacyclogenesis *in vitro*, the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, differentiates into metacyclic trypomastigote, after nutritional stress in TAU medium, and acquires capability to infect the vertebrate host. During differentiation, the parasites suffer several adaptations that include modulation of post-translational modulations. In a recent work, our group outlined, without quantifying, the protein phosphorylation profile of *T. cruzi* during metacyclogenesis. Here, in order to accomplish the quantification the phosphorylation sites, we applied the SILAC methodology, which labels proteins by incorporation of amino acids containing heavy isotopes, in culture. Aiming to understand the signaling that occurs through phosphorylation in the initial moments of metacyclogenesis, that is, during the nutritional stress, epimastigotes in exponential growth (Epimastigote 3 days, EPI-3D) and in the late log phase (Epimastigote 5 days, EPI-5D), as well as several points during the nutritional stress (5 and 15 minutes, 1 and 2 hours) were selected. For each experimental point, peptides were digested, fractionated by basic RP, then phosphopeptides were enriched with TiO<sub>2</sub> beads, and analyzed by LC-MS/MS. In total, 5,405 proteins groups were identified, including 1,679 groups of phosphoproteins and 3,893 phosphorylation sites, being 3,049 in Serine, 786 in Threonine and, 58 in Tyrosine residues, among which around 99% were quantified. The analyzes were performed in two ways: first comparing the



different stages of cell growth (exponential and stationary), and the different points along the nutritional stress. Several changes were observed in the expression profile of the proteins and modulation of the phosphorylation sites, involved in various processes such as fatty acid synthesis, cell signaling, mobility, oxidative stress, RNA processing, among others. Omics projects like this one are important to generate lists that have limited number of targets for further characterization. In this sense we aim to characterize some of the elements pinpointed to elucidate the trigger of metacyclogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	3
Figura 2: Diferentes tipos de Ionização.....	10
Figura 3: Misturas realizadas entre os pontos experimentais e a cultura referênciã. ....	22
Figura 4: Esquema de um Stage-Tip.....	24
Figura 5: Contagem das formas tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas no sobrenadante e estimativa de aderidos após 96 horas de diferentes metaciclogêneses <i>in vitro</i> . ....	30
Figura 6: Correlação entre as proteínas identificadas nas réplicas de cada ponto experimental.....	32
Figura 7: Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas entre EPI-3D e EPI-5D.....	35
Figura 8: Fórmula para calcular o enriquecimento de termos GO.....	38
Figura 9: Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas entre EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H. ....	40
Figura 10: Correlação entre os sítios de fosforilação identificados de cada ponto experimental.....	43
Figura 11: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos EPI-3D e EPI-5D. ....	46
Figura 12: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H.....	49
Figura 13: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H.....	51
Figura 14: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H.....	53
Figura 15: Comparação entre os proteomas de Godoy (2012) e o obtido neste trabalho de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	57
Figura 16: Perfil de expressão do Cluster A.....	58
Figura 17: Enriquecimento de termos GO no Cluster A .....	59
Figura 18: Perfil de expressão do Cluster B.....	61
Figura 19: Enriquecimento de termos GO no Cluster B .....	61
Figura 20: Perfil de expressão do Cluster C.....	64
Figura 21: Enriquecimento de termos GO no Cluster C .....	65
Figura 22: Perfil de expressão do Cluster D.....	68
Figura 23: Enriquecimento de termos GO no Cluster D .....	68
Figura 24: Perfil de expressão do Cluster 1 .....	70
Figura 25: Perfil de expressão do Cluster 2 .....	72

Figura 26: Perfil de expressão da proteína <i>Procyclic form surface glycoprotein</i> (Tc00.1047053507711.100) .....	72
Figura 27: Perfil de expressão do grupo de proteínas <i>Fatty acid desaturase</i> (Tc00.1047053509239.10; Tc00.1047053511073.10; Tc00.1047053426435.9) .....	73
Figura 28: Comparação entre os fosfoproteomas de Marchini (2011) e o obtido neste trabalho de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	75
Figura 29: Perfil de expressão do sítio S-31 da proteína <i>Serine/threonine protein phosphatase</i> (Tc00.1047053506863.80).....	80
Figura 30: Perfil de expressão do sítio S-165 da proteína Acetyl-CoA carboxylase (Tc00.1047053474937.9) e do sítio S-380 da proteína Mitogen-activated protein kinase (Tc00.1047053506229.10).....	81
Figura 31: Perfil de expressão do sítio S-212 da proteína <i>GTP-binding protein</i> (Tc00.1047053504149.110) .....	82
Figura 32: Perfil de expressão do sítio S-163 da proteína hipotética (Tc00.1047053510663.40) .....	83
Figura 33: Perfil de expressão do sítio S-153 da proteína hipotética (Tc00.1047053510663.40) .....	83
Figura 34: Perfil de expressão do sítio S-533 da proteína <i>Paraflagellar rod protein 3</i> (Tc00.1047053509617.20) .....	84
Figura 35: Perfil de expressão do sítio S-153 da proteína hipotética (Tc00.1047053510663.40) .....	85
Figura 36: Perfil de expressão do sítio S-143 da proteína <i>60S acidic ribosomal</i> (Tc00.1047053508355.250) .....	85
Figura 37: Perfil de expressão do sítio S-103 da proteína <i>Flagellar calcium-binding protein</i> (Tc00.1047053507891.3).....	86
Figura 38: Perfil de modulação do sítio S-339 da proteína hipotética Tc00.1047053508951.90 e do sítio S-503 da proteína hipotética Tc00.1047053510579.14 .....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio LM-14B .....	19
Tabela 2: Identificação de peptídeos e grupos de proteínas em cada ponto experimental e nas diferentes frações.....	33
Tabela 3: Grupos de Proteínas com mais de 50% de aumento entre EPI-3D e EPI-5D.....	36
Tabela 4: Grupos de Proteínas com mais de 50% de diminuição entre EPI-3D e EPI-5D.....	37
Tabela 5: Enriquecimento GO nos clusters correspondentes às proteínas diferencialmente expressas entre EPI-3D e EPI-5D.....	39
Tabela 6: Grupos de Proteínas diferencialmente expressas durante os diferentes pontos ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H).....	41
Tabela 7: Identificação e quantificação de peptídeos e grupos de proteínas por ponto experimental e também cada fração, após o enriquecimento dos fosfopeptídeos.....	42
Tabela 8: Identificação e quantificação dos sítios de fosforilação.....	44
Tabela 9: Sítios de fosforilação com 50% de aumento entre os pontos EPI-3D e EPI-5D.....	47
Tabela 10: Sítios de fosforilação com 50% de diminuição entre os pontos EPI-3D e EPI-5D.....	48
Tabela 11: Grupos de Sítios de Fosforilação aumentados durante os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H).....	50
Tabela 12: Grupos de Sítios de Fosforilação diminuídos durante os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H).....	50
Tabela 13: Grupos de Sítios de Fosforilação regulados entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D.....	52
Tabela 14: Grupos de Sítios de Fosforilação considerados diferencialmente expressos ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H) após a normalização com as intensidades das proteínas.....	52

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACN – Acetonitrila;

Arg – Arginina;

BSA – *Bovine serum albumin*;

cAMP – Monofosfato cíclico de Adenosina;

CID – *Collision Induced Dissociation*;

DDA – *Data dependente analysis*;

DHB – Ácido Dihidrobencóico;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DTT - Ditiotreitól;

EGF – Fator epidermal de crescimento;

eIF2 $\alpha$  – Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 alfa;

EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias;

EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias;

ERLIC – *Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography*;

ESI – Ionização electrospray;

ETD – *Eletron-transfer dissociation*;

F10% – Fração resultante da eluição com 10% de ACN;

F14% – Fração resultante da eluição com 14% de ACN;

F18% – Fração resultante da eluição com 18% de ACN;

F60% – Fração resultante da eluição com 60% de ACN;

FA – Formiato de Amônio;

FASP – *Filter Aided Sample Preparation*;

FDR – *False discovery rate*;

FR – Fase reversa;

GO – Ontologia Gênica;

GOMF – Classe de ontologia gênica de funções moleculares;

GOCC – Classe de ontologia gênica de compartimentos celulares;

GOBP – Classe de ontologia gênica de processos biológicos;

HCD – *High-energy collisional dissociation*;

HILIC - *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*;

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance;

HSP – *Heat Shock Protein*;

IAA – Iodacetamida;

ICAT – *Isotope-coded affinity tags*;

IMAC - *Immobilized Metal Affinity Chromatography*;

iTRAQ - *Isobaric tags for relative and absolute quantification*;

LB – *Loading buffer*;

LC – Cromatografia líquida;

LFQ – *Label free quantification*;

Lys – Lisina;

MALDI - Matrix Assisted laser desorption ionization;

MOAC - *Metal Oxide Affinity Chromatography*;

MS – Espectro de massas;

MS/MS – Espectro de massas após fragmentação;

m/z – Razão massa/carga;

ORF – *Open Reading frame*;

PBS – Tampão fosfato-salino;

PKA – Proteína quinase A;

PKAc – Subunidade catalítica da proteína quinase A;

PKAr – Subunidade regulatória da proteína quinase A;

PKC – Proteína quinase C;

p.p.m – Parte por milhão;

PTM – Modificação pós traducional;

R1 – Réplica 1;

R2 – Réplica 2;

S – Serina;

SAX – *Strong anion exchange*;

SCX – *Strong cation exchange*;

SFB – Soro fetal bovino;

SILAC - *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture*;

ST – Estresse nutricional;

ST-5MIN – Epimastigotas cultivados por 5 dias submetidos a estresse nutricional por 5 minutos;

ST-15MIN – Epimastigotas cultivados por 5 dias submetidos a estresse nutricional por 15 minutos;

ST-1H – Epimastigotas cultivados por 5 dias submetidos a estresse nutricional por 1 hora;

ST-2h – Epimastigotas cultivados por 5 dias submetidos a estresse nutricional por 2 horas;

T – Treonina;

TAU – Urina artificial de Triatomíneo;

TAU3AAG - TAU suplementado com Ácido L-aspártico, Ácido L-glutâmico, L-Prolina e Glicose;

TFA – Ácido trifluoracético;

TiO<sub>2</sub> – Dióxido de Titânio;

TOF – *Time-of-flight*;

XIC - *Extracted Ion Chromatogram*;

Y – Tirosina.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS .....	1
1.1.1. Ciclo de vida .....	2
1.1.2. Estresse nutricional e metaciclogênese.....	4
1.2. SINALIZAÇÃO CELULAR E DIFERENCIAÇÃO .....	5
1.3. EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
1.4. PROTEÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	9
Os íons entram no espectrômetro de massas por um pequeno orifício, e dentro do MS são manipula .....	10
1.5. FOSFOPROTEÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. ORGANISMOS .....	17
3.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES .....	17
3.2.1. Protocolo FASP .....	17
3.2.2. Fracionamento dos peptídeos .....	17
3.2.3. Stage-tips .....	17
3.2.4. Enriquecimento dos Fosfopeptídeos .....	17
3.3. MEIOS DE CULTIVO .....	18
3.4. CONTAGEM DIFERENCIAL DOS PARASITAS SUBMENTIDOS A METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE .....	19
3.4.1. Metaciclogênese <i>in vitro</i> a partir de diferentes tempos de estresse nutricional .....	19
3.4.2. Metaciclogênese <i>in vitro</i> sem estresse nutricional em meio TAU . 20	
3.5. OBTENÇÃO DOS PARASITAS .....	20
3.5.1. Obtenção dos parasitas nos diferentes pontos experimentais .....	20



3.5.2.	Obtenção da cultura referência.....	21
3.6.	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA PROTEÔMICA.....	22
3.6.1.	Protocolo FASP .....	22
3.6.2.	Fracionamento dos peptídeos .....	23
3.6.3.	Stage-Tips .....	24
3.7.	ENRIQUECIMENTO DOS FOSFOPEPTÍDEOS.....	25
3.8.	ANÁLISE POR NANO LC-MS/MS.....	26
3.9.	ANÁLISE DOS DADOS.....	27
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
4.1.	COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES CONDIÇÕES DE METACICLOGÊNESES <i>IN VITRO</i> .....	29
4.2.	ANÁLISES PROTEÔMICAS .....	30
4.3.	ANÁLISES FOSFOPROTEÔMICAS.....	41
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
5.1.	COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES CONDIÇÕES DE METACICLOGÊNESES <i>IN VITRO</i> .....	54
5.2.	ANÁLISES PROTEÔMICAS .....	55
5.2.1.	Proteínas diferencialmente expressas nos pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D.....	58
5.2.1.1.	Cluster A.....	58
5.2.1.2.	Cluster B.....	60
5.2.1.3.	Cluster C .....	64
5.2.1.4.	Cluster D .....	67
5.2.2.	Proteínas diferencialmente expressas entre os pontos ao longo do estresse nutricional.....	69
5.2.2.1.	Cluster 1 .....	70
5.2.2.2.	Cluster 2 .....	71
5.2.2.3.	Cluster 3.....	73
5.3.	ANÁLISES FOSFOPROTEÔMICAS.....	73
5.3.1.	Sítios de fosforilação diferente expressos entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D .....	76
5.3.1.1.	Cluster A.....	76
5.3.1.2.	Cluster B.....	76
5.3.1.3.	Cluster C .....	77
5.3.1.4.	Cluster D .....	78

5.3.2. Sítios de fosforilação diferente expressos entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H.....	79
5.3.2.1. Cluster 1 .....	80
5.3.2.2. Cluster 2 .....	81
5.3.2.3. Cluster 3 .....	83
5.3.3. Sítios de fosforilação considerados modulados após a etapa de normalização entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D.....	87
5.3.4. Sítios de fosforilação considerados modulados após a etapa de normalização entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H.....	88
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O *TRYPANOSOMA CRUZI* E A DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado membro da Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida (CHAGAS, 1909).

Estima-se que existam atualmente entre 12 e 14 milhões de pessoas infectadas com este parasita no mundo, principalmente na América Latina, e ainda, que cerca de 60 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a doença nos países endêmicos (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

A principal forma de transmissão da Doença de Chagas é através da via vetorial, na qual o inseto *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como “barbeiro”, elimina fezes contaminadas com a forma infectiva do parasita durante seu repasto sanguíneo (BRENER, 1973).

Também existem relatos de transmissão através de transfusão sanguínea (ESPARRACH; BAGNARDI; PERGOLA, 1967), via congênita (SALAS CLAVIJO et al., 2012), manipulação de animais infectados, acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (COURA, 2003), além da transmissão via oral, que ocorre através da ingestão de alimentos contaminados e tem ganhado destaque na mídia após os casos ocorridos em 2005 em Santa Catarina, com a contaminação de 25 pessoas e morte de três após a ingestão de caldo de cana e, em 2006 no Amazonas, com a infecção de 178 pessoas após a ingestão de suco de açaí (NÓBREGA et al., 2009; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A Doença de Chagas se manifesta em duas fases distintas: na fase inicial, também denominada aguda, uma grande quantidade de parasitas circula no sangue, dura cerca de dois meses após a infecção e geralmente é assintomática ou apresenta alguns sintomas leves como febre, dor de cabeça, aumento dos gânglios linfáticos, palidez, dificuldade para respirar, inchaço

abdominal ou dor no peito; na fase crônica, os parasitas encontram-se principalmente no coração e no sistema digestivo. Cerca de 30% dos pacientes em fase crônica apresentam sintomas cardíacos como distúrbios no sistema de condução cardíaco, miocardite, arritmia cardíaca, trombose e insuficiência cardíaca, além de outros distúrbios microvasculares que pode resultar em morte súbita. Ainda, cerca de 10% dos pacientes crônicos apresentam sintomas digestivos, como alargamento do esôfago e do intestino, com menor frequência, também podendo ocorrer alterações no sistema nervoso (revisto por PEREIRA; NAVARRO, 2013).

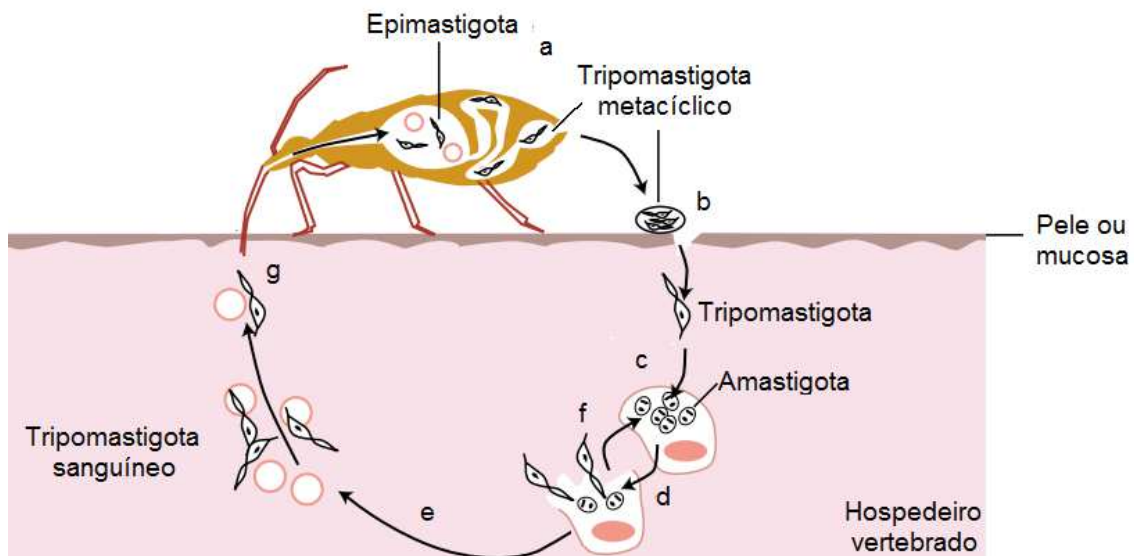
Até o momento, não há vacina nem tratamento específico eficaz para a Doença de Chagas. O tratamento disponível é efetivo em fases iniciais, mas pouco benéfico em fases avançadas (DIAS, 2007). São utilizadas as drogas Nifurtimox e Benznidazol, porém ambos não são efetivos na fase crônica da doença, causam sérios efeitos colaterais e, existem relatos de parasitas resistentes a estes compostos, além de terem um custo elevado e não possuírem formulações pediátricas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

#### 1.1.1. Ciclo de vida

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, com dois hospedeiros, um inseto triatomíneo e um mamífero (Figura 1). Durante o ciclo, o parasita pode ser encontrado em diferentes formas morfológicas, de acordo com o hospedeiro e a região do organismo onde estão habitando.

No hospedeiro inseto encontramos as formas epimastigota e tripomastigota metacíclico, sendo que a primeira é replicativa e a segunda infectiva, ou seja, é capaz de infectar o hospedeiro vertebrado. Já no hospedeiro mamífero, são encontradas as formas amastigotas e tripomastigota sanguíneo, sendo que a primeira é replicativa e é encontrada principalmente dentro das células do hospedeiro e a segunda é infectiva e é encontrada na corrente sanguínea.

Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



FONTE: Adaptado de Macedo *et al.*, 2002.

Dentro do intestino médio do triatomíneo são encontradas as formas epimastigotas, que se replicam por fissão binária e aumentam a população. O microambiente onde o parasita se encontra apresenta uma baixa disponibilidade de nutrientes e, o aumento populacional também contribui para a escassez de alimento. Acredita-se que esses fatores contribuam para a diferenciação do parasita na forma tripomastigota metacíclica, um processo conhecido como metaciclogênese (Figura 1a). Durante o repasto sanguíneo, o “barbeiro” elimina fezes contendo as formas infectivas tripomastigotas metacíclicas que podem entrar na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero através da lesão da picada ou mucosa e infectar diferentes tipos celulares no processo (Figura 1b). Uma vez dentro das células do hospedeiro mamífero, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam nas formas replicativas amastigotas (Figura 1c). Após inúmeras replicações, os parasitas passam por uma nova diferenciação, agora em tripomastigotas sanguíneos (Figura 1d), e então, são liberados na corrente sanguínea (Figura 1e) podendo infectar novas células (Figura 1f) ou ser ingeridos pelo vetor (Figura 1g), onde se diferenciam novamente em epimastigotas, reiniciando o ciclo. (ÁVILA *et al.*, 2003; BONALDO *et al.*, 1988)

### 1.1.2. Estresse nutricional e metaciclogênese

Como mencionado anteriormente, o processo de diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas é conhecido como metaciclogênese. No intestino do vetor, os parasitas são submetidos a uma baixa disponibilidade de nutrientes gerando um estresse nutricional, e acredita-se que esse estresse seja um dos fatores que desencadeia a diferenciação (KOLLIEN; SCHAUB, 2000).

A metaciclogênese pode ser reproduzida *in vitro* submetendo as formas epimastigotas em fase estacionária a estresse nutricional através da incubação em meio TAU (Urina Artificial de Triatomíneos). Este meio mimetiza as condições encontradas na urina do hospedeiro invertebrado e também permite a sincronização metabólica das células (CONTRERAS et al., 1985).

As células em fase estacionária não apresentam crescimento e, tem sido proposto que este estágio de cultivo celular é uma etapa pré-adaptativa para a metaciclogênese (HERNÁNDEZ et al., 2012).

Após a incubação em meio TAU (estresse nutricional), as formas epimastigotas aderem à parede das garrafas de cultivo antes de se transformarem em tripomastigotas metacíclicos. A adesão também é observada *in vivo* e ocorre pelo flagelo, onde é observada uma expansão da membrana flagelar na região de ligação (BONALDO et al., 1988). Também tem sido reportado que a adesão é desencadeada pelo estresse nutricional, uma vez que a depleção de glicose no meio leva a alongação do flagelo de epimastigota (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000; TYLER; ENGMAN, 2000). Porém a adesão, apesar de essencial para a metaciclogênese, não é o único mecanismo que está associado à diferenciação (BONALDO et al., 1988). Além disso, a alongação do flagelo também pode representar uma adaptação do parasita para que haja uma área maior da membrana capaz de capturar os nutrientes do meio (HERNÁNDEZ et al., 2012).

A escassez de nutrientes também está associada ao processo de acidificação do conteúdo do reservossomo, uma organela que armazena proteínas e lipídeos. Essas estruturas diminuem de tamanho ao longo da metaciclogênese e não são observadas em tripomastigotas metacíclicos

(SOARES, 1999). Como o meio TAU não possui nenhuma fonte de energia é sugerido que os parasitas usam o conteúdo do reservossomo como fonte de energia (SOARES et al., 1989).

Outra alteração que ocorre durante a diferenciação é a composição lipídica do parasita. Os epimastigotas submetidos a estresse nutricional apresentam o conteúdo lipídico mais similar ao de tripomastigotas metacíclicos, em relação ao de epimastigotas. Essas alterações lipídicas incluem a diminuição dos ácidos mirístico e linoleico, e aumento dos ácidos palmítico, esteárico e linolênico. E essa diminuição no grau de insaturação também influencia na permeabilidade da membrana do parasita (ESTEVES et al., 1989).

Em análises proteômicas do processo de metaciclogênese, foi reportada uma diminuição na expressão de grande parte da maquinaria de tradução (ATWOOD III et al., 2005; DE GODOY et al., 2012).

Como resposta ao estresse nutricional, a autofagia em *T. cruzi* mostra-se um mecanismo essencial para a forma epimastigota sobreviver no intestino do inseto hospedeiro, através da degradação de proteínas e organelas, e também, importante para o remodelamento durante o desenvolvimento e diferenciação celular (ALVAREZ et al., 2008).

Todos estes mecanismos exemplificam a importância do estresse nutricional para o processo de diferenciação em *Trypanosoma cruzi*.

## 1.2. SINALIZAÇÃO CELULAR E DIFERENCIAÇÃO

A capacidade de responder rapidamente a diferentes condições ambientais permite a sobrevivência dos organismos às mais diversas situações. Para isso, as células possuem mecanismos que permitem uma sinalização celular que leve a uma resposta que permita a sobrevivência dos organismos em diferentes condições.

A proteína quinase A (PKA) tem sido sugerida como um importante regulador da diferenciação da forma epimastigota em *T. cruzi*. A PKA é uma

holoenzima composta de 4 subunidades, duas catalíticas (PKAc) e duas regulatórias (PKAr) (HUANG et al., 2002, 2006). Quando ativada por cAMP e ocorre a separação das subunidades catalíticas que possuem a capacidade de fosforilar proteínas alvo. Como já foi reportado há um aumento na concentração de cAMP e PKA na fase estacionária de *T. cruzi*, e tem sido sugerido que a PKAc interaja e fosforile membros da família das transialidases, proteínas que catalisam a transferência de ácido siálico a partir dos glicoconjugados do hospedeiro às mucinas localizadas na membrana dos parasitas, permitindo a adesão e invasão de células do hospedeiro (BAO et al., 2010; GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988).

Uma dos controles da síntese proteica em eucariotos é através de da fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2 (eIF2). Enquanto altos níveis de eIF2 fosforilado inibem a tradução, níveis moderados de eIF2 fosforilado permitem a ativação de mensagens específicas. Durante o estresse nutricional de *T. cruzi*, a fosforilação eIF2 $\alpha$  é aumentada e durante a incubação em meio TAU3AAG ocorre uma desfosforilação parcial de eIF2 $\alpha$ , demonstrando que a diferenciação requer a inibição de tradução e a via de eIF2 $\alpha$  para a resposta ao estresse é necessária para a diferenciação *in vitro* de *T. cruzi* (TONELLI et al., 2011).

Outro exemplo de sinalização é a via da proteína quinase mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) que controla diferentes vias de sinalização intracelular, estando associada à resposta a disponibilidade de nutrientes, concentração de aminoácidos, níveis de energia e concentração de fatores extracelulares, modulando diferentes mecanismos como crescimento celular, através da regulação da tradução de proteínas, biogênese dos ribossomos e alongação da tradução; organização do citoesqueleto, mediante a regulação de seus componentes; e ativação da cascata mediada por uma proteína quinase C (PKC). Em *T. brucei* foram encontrados dois ortólogos de mTOR, TbTOR1 e TbTOR2 e dois genes mais divergentes TbTOR1-*like* e TbTOR2-*like*. TbTOR1-*like* parece estar relacionada ao controle dos níveis de polifosfato e cálcio, sugerindo um vínculo entre a sinalização da via TOR e a resposta osmótica, muito relevante considerando a variedade de ambientes que o parasita atravessa ao longo do seu ciclo de vida. E a inibição de TbTOR1 e TbTOR2



inibe a proliferação celular. TbTOR1 está localizada no núcleo, regulando aspectos temporais do crescimento e, TbTOR2 está no citoplasma, regulando a polarização celular e citocinese. Já em *T. cruzi* foram encontrados sequências ortólogas a TbTOR, porém o gene não possui nenhum dos domínios esperados em uma quinase TOR (revisto por DIGIROLAMO et al., 2012).

### 1.3. EXPRESSÃO GÊNICA EM *Trypanosoma cruzi*

O genoma nuclear de *T. cruzi* possui 60,3 Mb e normalmente se organiza em 41 pequenos cromossomos (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009). Com o sequenciamento do genoma da cepa CL Brener de *T. cruzi* foram previstos 22.570 genes codificadores de proteínas, dos quais 12.570 representam pares alélicos, além da constatação de que mais de 50% do genoma consiste de sequências repetidas (EL-SAYED et al., 2005).

Em tripanossomatídeos, cerca de 20 a 25% do conteúdo do DNA está condensado em uma estrutura localizada no interior da mitocôndria, denominada cinetoplasto. O DNA presente nesta estrutura recebe o nome de kDNA e está organizado em maxicírculos, que apresentam genes codificadores de RNA ribossomal e de algumas proteínas mitocondriais, e minicírculos, que codificam RNAs que guiam a edição de RNA (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; WESTENBERGER et al., 2006).

Existem muitas evidências de que a iniciação da transcrição dependente de RNA polimerase II não é regulada, portanto o controle da expressão gênica é observado principalmente a nível pós-transcricional. Além disso, os tripanossomatídeos apresentam algumas peculiaridades no metabolismo de RNA: na mitocôndria ocorre uma edição massiva de RNA e o DNA mitocondrial carece de genes para tRNA então, os tRNAs são codificados pelo DNA genômico e são importados do citosol para a mitocôndria; os genes são organizados em grandes unidades de transcrição policistrônicas, com até 100 ORFs, e não possuem nenhuma relação funcional; após a transcrição dos pré-mRNAs eles são processados através *trans-splicing*, que adiciona uma sequência líder (SL) na região 5' e poliadenilação na região 3', resultando em

mRNAs monocistrônicos maduros; a RNA polimerase I é capaz de transcrever mRNAs funcionais; há uma ausência de promotores pra RNA polimerase II e fatores de transcrição regulatórios, com exceção do promotor SL (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011; revisto por FERNÁNDEZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010; PREUSSE; JAÉ; BINDEREIF, 2012)

As fronteiras das unidades policistrônicas são delimitadas pela conformação da cromatina, além disso, a estrutura da cromatina pode desempenhar um papel importante no isolamento de unidades de transcrição de RNA polimerase II, portanto, a iniciação da transcrição pode ser vislumbrada como um mecanismo controlado por marcação de histonas (revisto por FERNÁNDEZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010; RESPUELA et al., 2008).

Sugere-se que a transcrição da maioria dos genes codificadores de proteínas acontece continuamente. Portanto, como dito anteriormente, a regulação da expressão gênica ocorre principalmente a nível pós-transcricional, e envolve a estabilidade do mRNA, associação dos mRNAs a maquinaria de tradução e síntese proteica, modificações pós-traducionais (PTMs) e estabilidade das proteínas.

Dentre as PTMs destaca-se a fosforilação, que consiste na adição reversível de um grupo fosfato, regulada pela ação de proteíno-quinases e proteíno-fosfatases, atuando na modulação das funções proteicas (TAN, 2011). É estimado que 1/3 das proteínas eucarióticas sejam fosforiladas (GRIMSRUD et al., 2010). Além disso, aproximadamente 2% do genoma de *T. cruzi* codifica quinases, sugerindo que elas desempenham um importante papel regulatório no desenvolvimento do parasita (PARSONS et al., 2005)

A fosforilação ocorre mais comumente em Serina, Treonina e Tirosina, mas também foram identificadas em Histidina, Cisteína, Arginina, Lisina, Aspartato e Glutamato (CIEŚLA; FRĄCZYK; RODE, 2011; STASYK; HUBER, 2012).

Como resposta às mudanças ambientais, as fosforilações podem resultar na formação de complexos proteicos, podem alterar a estabilidade das proteínas e atividade enzimática, bem como controlar a regulação de importantes processos através da transdução de sinal, levando a mudança na

expressão de genes específicos (CHOUDHARY; MANN, 2010; RIGBOLT; BLAGOEV, 2012; STASYK; HUBER, 2012).

#### 1.4. PROTEÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As proteínas são as principais efetoras das funções biológicas, portanto sua análise é de fundamental importância para a compreensão de diversos processos celulares. A análise de proteínas em larga escala, proteômica, engloba além da identificação das proteínas expressas em um determinado momento, suas isoformas, PTMs, interações com outras moléculas (proteínas, DNA, RNA, etc.), quantificação e localização (TYERS; MANN, 2003; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

Na década de 70, foram realizados os primeiros estudos de proteínas em larga escala através de eletroforese bidimensional (2D) porém, atualmente é mais comum à análise em larga escala de proteínas através de espectrometria de massas (COX; MANN, 2007).

A espectrometria de massas é uma técnica de análise que determina a razão massa/carga ( $m/z$ ) de íons em fase gasosa. Para tanto, os analitos devem ser passíveis de ionização (WISNIEWSKI, 2008).

Apesar de o espectrômetro de massas ser capaz de mensurar a massa de proteína inteiras (abordagem *top-down*), os peptídeos são mais comumente utilizados para o estudo proteômico devido à dificuldade de se trabalhar com proteínas intactas. Portanto, inicialmente, as proteínas são digeridas em peptídeos através da ação de uma protease específica (abordagem *bottom-up*), o que resulta em uma mistura complexa de peptídeos. Essa complexidade é solucionada através da realização de uma cromatografia líquida de alta performance (HPLC), em geral com a utilização de fase reversa, em que os peptídeos são eluídos através do aumento gradual de um solvente e, conseqüentemente, são separados de acordo com sua hidrofobicidade (peptídeos hidrofílicos são eluídos rapidamente, enquanto que os peptídeos mais hidrofóbicos vão sendo eluídos no decorrer da cromatografia) (STEEN; MANN, 2004; WALTHER; MANN, 2010).

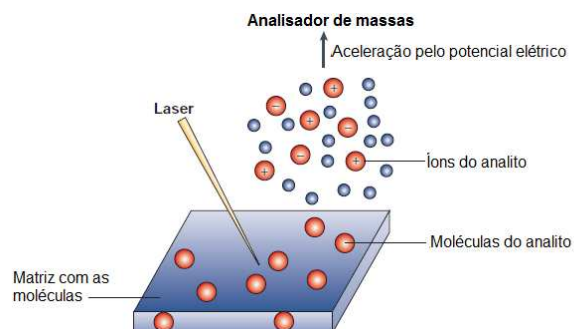
No final da coluna cromatográfica ocorre a ionização dos peptídeos. No caso de amostras líquidas, normalmente é utilizada a ionização electrospray (ESI), que consiste na aplicação de uma corrente elétrica na porção terminal da coluna cromatográfica, gerando um aerossol com pequenas gotículas de solvente e analito (Figura 2a). Além deste método de ionização, também pode ser utilizada a técnica *Matrix Assisted laser desorption ionization* (MALDI), em que um laser incide sobre uma matriz sólida contendo moléculas do analito (Figura 2b) (STEEN; MANN, 2004; WISNIEWSKI, 2008; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

**Figura 2: Diferentes tipos de Ionização.** a) ESI: os peptídeos são separados através de cromatografia líquida, no final da coluna recebem uma carga elétrica através da aplicação de uma corrente elétrica de alta voltagem. Então, as gotículas são liberadas e transportadas pelo ar até o espectrômetro e o solvente é evaporado, diminuindo o tamanho e aumentando a densidade da carga das gotículas (Adaptado de CHOUDHARY, 2010). b) MALDI: os peptídeos são misturados em grande quantidade em uma matriz absorvente de raios ultravioletas. Através da irradiação de um feixe de laser com onda de comprimento adequado, ocorre a sublimação das moléculas em excesso do analito, as quais são transferidas para a fase de gás. Adaptado de (STEEN; MANN, 2004).

**a) ESI**



**b) MALDI**



Os íons entram no espectrômetro de massas por um pequeno orifício, e dentro do MS são manipulados por campos elétricos no vácuo. Então, é determinado o valor  $m/z$  das moléculas com base em sua trajetória no campo elétrico. Existem vários analisadores de massa como o *Time-of-flight* (TOF), em que os íons são acelerados por uma mesma energia cinética e a velocidade do voo é proporcional à massa, ou seja, o tempo que o íon demora a “voar” fornece a medida de massa; o *Orbitrap*, que é preciso, porém lento, e os íons giram em torno de um eletrodo, então são traduzidos em uma frequência, e posteriormente em massa; o *Ion Trap*, que aprisiona e acumula íons em uma armadilha e isso aumenta a sensibilidade; o *Quadrupole*, em que os íons são

oscilados no quadrupolo, mudando o campo magnético para chegar ao detector (STEEN; MANN, 2004; WALTHER; MANN, 2010).

Após a determinação dos valores  $m/z$  e intensidade de MS é determinada a sequência proteica através da fragmentação do peptídeo em outro espectrômetro acoplado. Com a fragmentação dos peptídeos, são gerados espectros de massa dos fragmentos (MS/MS). No MS/MS os peptídeos são isolados e fragmentados. Existem diversas metodologias de fragmentação, tais como: dissociação induzida por colisão (CID), que fragmenta os peptídeos através da colisão de um gás inerte, realizando a quebra nas ligações peptídicas; dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD); dissociação por transferência de elétrons (ETD). Tipicamente, são fragmentados os peptídeos mais intensos. A espécie que gera os fragmentos é chamada íon precursor e os íons do MS/MS são chamados íons produtos. Através da diferença entre os picos vizinhos é possível inferir a sequência peptídica com maior semelhança (STEEN; MANN, 2004; WALTHER; MANN, 2010).

Por fim, para a identificação dos peptídeos, é necessária a comparação dos dados obtidos ( $m/z$ , intensidade e lista de íons produtos) com o banco de dados através de programas computacionais, como por exemplo, o Sequest (ENG et al., 2008), OMSSA (BARSNES et al., 2009) e Andromeda (COX et al., 2011).

Apesar de a intensidade do pico ser proporcional a quantidade de amostra, o MS não é diretamente quantitativo devido à variação na resposta do detector, diferente ionização e outros fatores, para tanto, foram desenvolvidas diversas metodologias que permitem a quantificação de diferentes condições experimentais (ONG et al., 2002).

Dentre as várias metodologias quantitativas destaca-se a marcação metabólica *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture* (SILAC) que permite a comparação de duas ou mais condições experimentais, devido à incorporação de aminoácidos contendo isótopos em suas versões “pesadas”. A principal vantagem desta técnica é que os aminoácidos são incorporados em cultura, portanto ocorre a mistura das células nas diferentes condições (leve e pesado) antes do processamento da amostra, minimizando a introdução de

variações experimentais entre as diferentes amostras analisadas (MANN, 2006; ONG; MANN, 2006; ONG et al., 2002).

Além do SILAC, outras metodologias vêm sendo utilizadas em experimentos de Proteômica quantitativa, tais como: *Isotope-coded affinity tags* (ICAT), que marca cisteínas livres (GYGI et al., 1999); *Isobaric tags for relative and absolute quantification* (iTRAQ), que marca aminas livres e os níveis de peptídeos são aferidos no MS/MS (ROSS et al., 2004); é possível realizar quantificação sem marcação (*label-free*), como é usada a contagem de espectros ou intensidade dos peptídeos por extração da intensidade do cromatograma (XIC – *Extracted Ion Chromatogram*), para estimar a abundância dos peptídeos (ONG; MANN, 2005; WANG et al., 2008).

Já foram realizadas algumas análises proteômica de *T. cruzi*. Parodi-Talice (2004), realizou uma análise do proteoma do parasita, utilizando eletroforese-2D seguida por MALDI-TOF, contemplando somente a forma epimastigota como ponto experimental. Neste trabalho, foram analisados 70 *spots*, dentre os quais 45 foram identificados.

Atwood III (2005), utilizando cromatografia líquida multidimensional *off-line* seguida de cromatografia líquida de fase reversa *on-line*, MS e MS/MS, identificou 1.168 grupos de proteínas e 5.720 peptídeos nos diferentes estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* (epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguíneo). Dentre os resultados obtidos, durante a metaciclogênese, foi observado um aumento na produção de enzimas associadas à defesa antioxidante e também a diminuição de proteínas ribossomais.

Em 2012, nosso grupo publicou o proteoma quantitativo de *T. cruzi* utilizando a metodologia *label free*, e espectrometria de massas de alta resolução, contemplando cinco pontos experimentais durante a metaciclogênese (epimastigota, epimastigota sob estresse nutricional por 30 minutos e 2 horas, aderido 12 horas e tripomastigota metacíclico). Foram identificados 5.513 peptídeos e 3.094 grupos de proteínas. Poucas destas proteínas são reguladas nas fases iniciais da metaciclogênese com diversas funções como: metabolismo de RNA, adesão, transporte de nutrientes essenciais e manutenção do estado redox (DE GODOY et al., 2012).

## 1.5. FOSFOPROTEÔMICA BASEADA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O *T. cruzi*, ao longo do seu ciclo de vida, precisa se adaptar a distintos ambientes com diferentes condições de temperatura e disponibilidade de nutrientes, requerendo mudanças na expressão gênica. Como mencionado anteriormente, a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre principalmente a nível pós transcricional e a regulação por PTMs, como por exemplo a fosforilação, permite que às células possam se adaptar a estímulos ambientais em milissegundos (LOROCH et al., 2013).

A fosfoproteômica é um campo da proteômica que identifica e quantifica proteínas fosforiladas, bem como localiza o sítio em que ocorre a fosforilação em larga escala, permitindo uma maior compreensão da sinalização celular em decorrência de algum estímulo ou em uma determinada condição celular.

Recentes avanços na fosfoproteômica baseada em MS permitem a análise da transdução de sinal mediada por fosforilação com uma alta confiança na identificação dos sítios. Portanto, com essa técnica, é possível o estudo da transdução de sinal após a estimulação (GRIMSRUD et al., 2010; NILSSON, 2011; STASYK; HUBER, 2012).

Em relação ao proteoma, a abundância de peptídeos fosforilados é baixa, portanto foram desenvolvidas várias técnicas de enriquecimento que permitem a identificação destes sítios de fosforilação. Porém, peptídeos com muitos resíduos ácidos (Ácido glutâmico e Ácido aspártico), resíduos de Histidina ou Ácido siálico contendo glicopeptídeos, podem interferir na estratégia de enriquecimento (LOROCH et al., 2013; STASYK; HUBER, 2012).

Dentre os métodos de enriquecimento de peptídeos, é bastante observada na literatura a técnica baseada na afinidade de óxidos de metais com os íons fosfato, denominado *Metal Oxide Affinity Chromatography* (MOAC). Podem ser utilizados óxidos de diferentes metais como Alumínio, Zircônio e Titânio, sendo este último, o metal mais comumente utilizado. Os fosfopeptídeos interagem com  $TiO_2$  devido à característica covalente do óxido, e se ligam a  $TiO_2$  em condições ácidas e são eluídos em pH alcalino

(BODENMILLER et al., 2007). Para diminuir a ligação de peptídeos não fosforilados são utilizados ácidos orgânicos como o ácido Ftálico, Glicólico, Dihidrobencóico (DHB) entre outros (BODENMILLER et al., 2007; DUNN; REID; BRUENING, 2010).

Outras técnicas como *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), que se baseiam na interação entre a carga negativa do grupo fosfato e diferentes íons metais, e anticorpos anti-fosfotirosina, também vem sendo utilizadas para o enriquecimento de fosfopeptídeos. Vários métodos de pré-fracionamento dos fosfopeptídeos também são utilizadas como *Strong Cation Exchange Chromatography* (SCX), que se baseia na diferença de carga dos peptídeos fosforilados e não fosforilados na solução; *Anion Exchange Chromatography* (SAX), que se baseia na retenção da carga negativa dos fosfopeptídeos em um fase estacionária carregada positivamente; *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC), que separa as moléculas com base em sua polaridade; e, *Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography* (ERLIC), que combina as propriedade do SCX ou SAX com HILIC (revisto por DUNN; REID; BRUENING, 2010; MARCHINI et al., 2014; STASYK; HUBER, 2012).

Já foram realizados alguns trabalhos visando à obtenção do fosfoproteoma de *T. cruzi*. Nakayasu (2009) identificou 119 proteínas fosforiladas e 221 sítios de fosforilação (148 em Serina, 57 em Treonina e 8 em Tirosina) na forma epimastigota de *T. cruzi*, utilizando as técnicas de pré-fracionamento SCX e enriquecimento por IMAC. Os resultados obtidos sugerem que a propagação de cascatas de sinalização de células por quinases proteicas e fosfatases desempenha um papel importante em processos fisiológicos, incluindo a motilidade celular, o metabolismo, o transporte de íons, diferenciação e sobrevivência.

Recentemente, Queiroz (2014) realizou uma análise quantitativa do Fosfoproteoma de *T. cruzi* durante a amastigogênese, processo no qual as formas tripomastigotas Sanguíneas se diferenciam em amastigotas, utilizando a estratégia quantitativa iTRAQ. Nesse trabalho foram contemplados quatro pontos experimentais ao longo do ciclo de vida do parasita (tripomastigotas, tripomastigotas após 30 minutos de indução, tripomastigotas após 2 horas de



indução e amastigotas) e foram identificadas 1.339 proteínas, sendo 229 fosforiladas. Foi utilizada a técnica de fracionamento HILIC e o enriquecimento por  $\text{TiO}_2$ . Como resultado, foi observado que a via de sinalização do cAMP desempenha um papel importante na amastigogênese, assim como fosfatases.

Nosso grupo também delineou um perfil do fosfoproteoma de *T. cruzi*, foram identificados 2.572 sítios de fosforilação, 1.671 grupos de proteínas, sendo que destes, 753 eram fosforiladas, em 5 pontos experimentais ao longo da metaciclogênese (epimastigota, epimastigota sobre estresse nutricional 30 minutos, epimastigota sobre estresse nutricional 2 horas, aderido 12 horas e tripomastigota metacíclico) (MARCHINI et al., 2011). Este trabalho trouxe algumas informações sobre as vias que podem estar envolvidas na metaciclogênese, porém, como não pode ser quantitativo, não foi possível verificar como ocorre a modulação destas vias.

Olsen (2006) demonstrou a dinâmica do fosfoproteoma de células HeLA após a estimulação por fatores de crescimento (EGF). Com isso, pode-se observar a modulação de diversos sítios de fosforilação ao longo dos tempos observados como resposta ao estímulo por EGF. Também foi verificado sítios distintos em uma mesma proteína podem ser modulados de forma diferente.

Como a metaciclogênese é o processo no qual o parasita adquire a capacidade de infectar o hospedeiro vertebrado, que resulta na transmissão da Doença de Chagas e, levando em consideração que a regulação em tripanossomatídeos ocorre a nível pós transcricional e que a fosforilação é uma PTM importante para a adaptação, torna-se essencial avaliar o perfil de modulação dos sítios de fosforilação nos momentos iniciais da metaciclogênese, ou seja, na fase que precede a diferenciação (fase estacionária) e estresse nutricional buscando por sítios de fosforilação e vias que podem estar associadas ao processo de diferenciação.

## 2. OBJETIVOS

Delinear o perfil do proteoma e fosfoproteoma quantitativo de *Trypanosoma cruzi* ao longo do estresse nutricional, nos momentos iniciais da metaciclogênese *in vitro*.

### 2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o proteoma de forma quantitativa de *Trypanosoma cruzi* durante o estresse nutricional utilizando a metodologia SILAC;
- Caracterizar o fosfoproteoma de forma quantitativa de *Trypanosoma cruzi* durante o estresse nutricional utilizando a metodologia SILAC;
- Definir quais são as proteínas com perfil de expressão alterado ao longo do estresse nutricional;
- Definir quais são os sítios de fosforilação com alteração na modulação ao longo do estresse nutricional.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ORGANISMOS

***Trypanosoma cruzi***: linhagem *Dm28c*.

#### 3.2. SOLUÇÕES E TAMPÕES

##### 3.2.1. Protocolo FASP

**Tampão de lise**: SDS 4%, Tris.HCl 100 mM pH 7,5, DTT 100 mM.

**UA**: Uréia 8 M em Tris.HCl 100 mM pH, 8,8.

**UA + DTT**: Uréia 8 M, DTT 10 mM em Tris.HCl 100 mM pH, 8,8.

**IAA**: Iodacetamida 50 mM em UA.

**ABC**: Bicarbonato de Amônio 50 mM.

##### 3.2.2. Fracionamento dos peptídeos

**Formiato de Amônio 200 mM**: Hidróxido de Amônio 0,8%, Ácido Fórmico 0,16%.

##### 3.2.3. Stage-tips

**Solução A**: 0,1% TFA em água.

**Solução B**: 0,1% TFA em Acetonitrila 80%.

**Solução A\***: Acetonitrila 5%, TFA 1%, DMSO 5%.

##### 3.2.4. Enriquecimento dos Fosfopeptídeos

**LB (*Loading Buffer*)**: Acetonitrila 80%, TFA 2,5%, Ácido Ftálico 70 mg/ml.

**Solução de *beads***: Acetonitrila 80%, TFA 2,5%, *Beads* de TiO<sub>2</sub> 40 mg/ml.

**L1:** Acetonitrila 80%, TFA 0,1%.

**L2:** TFA 0,1%.

**Eluição das *beads*:** Hidróxido de Amônio 0,3 M.

### 3.3. MEIOS DE CULTIVO

**Meio de cultivo LM-14B:** A composição do meio LM-14B (DE PAULA LIMA et al., 2014) está representada na Tabela 1. Todos os componentes, com exceção dos que são adicionados diretamente na solução final (16 primeiros itens da tabela, Defatted BSA e Penicilina), devem ser solubilizados inicialmente em uma solução estoque. Primeiramente os componentes que foram solubilizados em álcool devem ser misturados em um Béquer e aquecidos a 40° C até que todo o etanol evapore. Então, o soluto deve ser ressuspense em água ultrapura (aproximadamente metade do volume final) e agitado até que todos os componentes sejam solubilizados. Em seguida são adicionados todos os sais e todos os componentes solubilizados pré-solubilizados em água, HCl e NaOH. Por último é adicionada a hemina, o vermelho de fenol e a penicilina. Por fim, o pH é ajustado para 7,2 e o meio é esterilizado através da filtração em membrana 0,22 µM.

**LIT-B com SFB:** Extrato de levedura 15 g/L; Fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L; Glucose 2,2 g/L; Hemina 0,02 g/L (solubilizada em NaOH 1 M na concentração de 50mg/ml); Infuso de fígado 5 g/L; KCl 0,442 g/L; NaCl 4,4 g/L; Triptose 5 g/L; suplementado com 10% de soro fetal bovino e Penicilina 63 mg/l; pH 7,2.

**TAU (Urina Artificial de Triatomíneos):** CaCl<sub>2</sub> 2 mM; KCl 17 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; NaCl 190 mM; Tampão fosfato 8 mM e Penicilina 63 mg/l; pH 6,0.

**TAU3AAG:** Meio TAU suplementado com Glicose 10 mM, Ácido L-aspártico 2 mM, Ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM e Penicilina 63 mg/L; pH 6,0.

**Tabela 1: Composição do meio LM-14B**

Componente	Quantidade (mg) para 1 litro				
		Hydroxyproline	9.000	Riboflavin	0.109
		Isoleucine	318.000	Thiamine.HCl	1.000
		Leucine	513.000	Trans retinoic acid	0.400
CaCl <sub>2</sub>	176.000	Lysine.HCl	422.000	Vitamin A acetate	0.120
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	2.600	Methionine	113.000	Succinic acid	270.000
KCl	700.000	Phenylalanine	272.000	Adenine SO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	8.800
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	900.000	Proline	228.000	Adenosine	20.000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	176.000	Serine	182.000	AMP.H <sub>2</sub> O	0.180
NaCl	6980.000	Threonine	386.000	ATP.Na <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O	0.880
NaHCO <sub>3</sub>	2740.000	Tryptophan	99.000	Cytidine	20.000
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	123.000	Tyrosine	155.000	D-ribose	0.440
acetate.Na	548.000	Valine	382.000	deoxy-D-ribose	0.440
Citrate.Na <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	600.000	p-aminobenzoic acid	0.044	Guanine.HCl.2H <sub>2</sub> O	0.260
Glucose	4500.000	Ascorbic acid	0.044	Guanosine	20.000
Glucosamine.HCl	73.000	D-alpha-tocopherol	4.000	Hypoxanthine	0.260
Phenol Red	23.000	DL-alpha-lipoic acid	0.400	Thymine	0.260
HEPES	19000.000	B12 / Cobalamin	1.000	Uracil	0.260
EDTA disodium	80.000	Biotin	1.000	Uridine	20.000
Hemin	25.000	D-Ca pantothenate	1.000	Xanthine.Na	0.260
Alanine	182.000	Choline chloride	1.440	Cholesterol	0.180
Arginine.HCl	462.000	Calciferol	0.088	Tween 80	17.600
Asparagine	100.000	Folic Acid	10.000	Tween 40 (palmitate)	5.000
Aspartic acid	426.000	i-Inositol	2.040	Linoleic acid	8.000
Cysteine	100.000	L-glutathione (reduced)	0.010	Defatted BSA	300.000
Cystine	58.000	Menadione	0.410	Penicilina	63.000
Glutamic acid	290.000	Niacin / Nicotinic Acid	0.022	Putrescine	10 µM
Glutamine	188.000	Nicotinamide	1.000	Biopterine	1 µM
Glycine	144.000	Pyridoxal.HCl	1.022		
Histidine.HCl.H <sub>2</sub> O	178.000	Pyridoxine.HCl	0.022		

### 3.4. CONTAGEM DIFERENCIAL DOS PARASITAS SUBMENTIDOS A METACICLOGÊNESE *IN VITRO* A PARTIR DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

#### 3.4.1. Metaciclogênese *in vitro* a partir de diferentes tempos de estresse nutricional

As formas epimastigotas foram mantidas por dois repiques consecutivos de 3 dias, seguidos pelo cultivo por 3, 4 e 5 dias, todos iniciados na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml em meio LIT B. As células foram centrifugadas 3.000 xg, 10 minutos, 28° C, lavadas 1x com TAU, e então incubadas em meio TAU por 2 horas, na concentração de  $5 \times 10^8$  células/ml. Os parasitas com 5 dias de cultivo foram estressados por diferentes tempos, 5, 15, 30 minutos, 1 hora e 2 horas. Após o tempo de estresse nutricional, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultivo contendo TAU3AAG na

concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml. As garrafas de cultivo foram mantidas a 28° C por 4 dias, e no final deste período foi realizada a contagem diferencial das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos em câmaras de Neubauer. Esse experimento foi realizado em quintuplicata.

#### 3.4.2. Metaciclogênese *in vitro* sem estresse nutricional em meio TAU

Nessa condição o parasita não foi incubado em meio TAU, as formas epimastigotas foram mantidas por dois repiques consecutivos de 3 dias, seguidos pelo cultivo por 3, 4 e 5 dias, todos iniciados na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml. As células foram centrifugadas 3.000 xg, 10 minutos, 28° C, lavadas 1x com TAU3AAG e transferidos para garrafas de cultivo contendo TAU3AAG na concentração de  $5 \times 10^6$  células/ml. As garrafas de cultivo foram mantidas a 28°C por 4 dias, e no final deste período foi realizada a contagem diferencial das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos em câmaras de Neubauer. Esse experimento foi realizado em quintuplicata.

### 3.5. OBTENÇÃO DOS PARASITAS

#### 3.5.1. Obtenção dos parasitas nos diferentes pontos experimentais

Os epimastigotas foram obtidos a partir do cultivo dos parasitas em meio complexo LIT-B. Foram coletadas  $1,5 \times 10^9$  células (~ 5 mg de proteínas) para cada uma, das duas réplicas dos seguintes pontos experimentais: células na fase exponencial (EPI-3D) e na fase estacionária (EPI-5D), células mantidas em estresse nutricional por 5 minutos (ST-5MIN), 15 minutos (ST-15MIN), 1 hora (ST-1H) e 2 horas (ST-2H). Os parasitas em fase estacionária e exponencial foram centrifugados 7.000 xg, 5 minutos, lavados com 10 ml de PBS 1X e, ressuspensos em PBS 1X na concentração final de  $5 \times 10^8$  células/ml. As células submetidas a estresse nutricional foram centrifugadas 7.000 xg, 5 minutos, lavadas uma vez com 10 ml de TAU e ressuspensas em meio TAU na concentração final de  $5 \times 10^8$  células/ml. Os diferentes estresses foram iniciados de forma dessincronizada para que todos os diferentes pontos

fossem coletados em um mesmo momento. Cada diferente réplica de cada ponto experimental foi misturado na proporção 1:1 com a cultura referência.

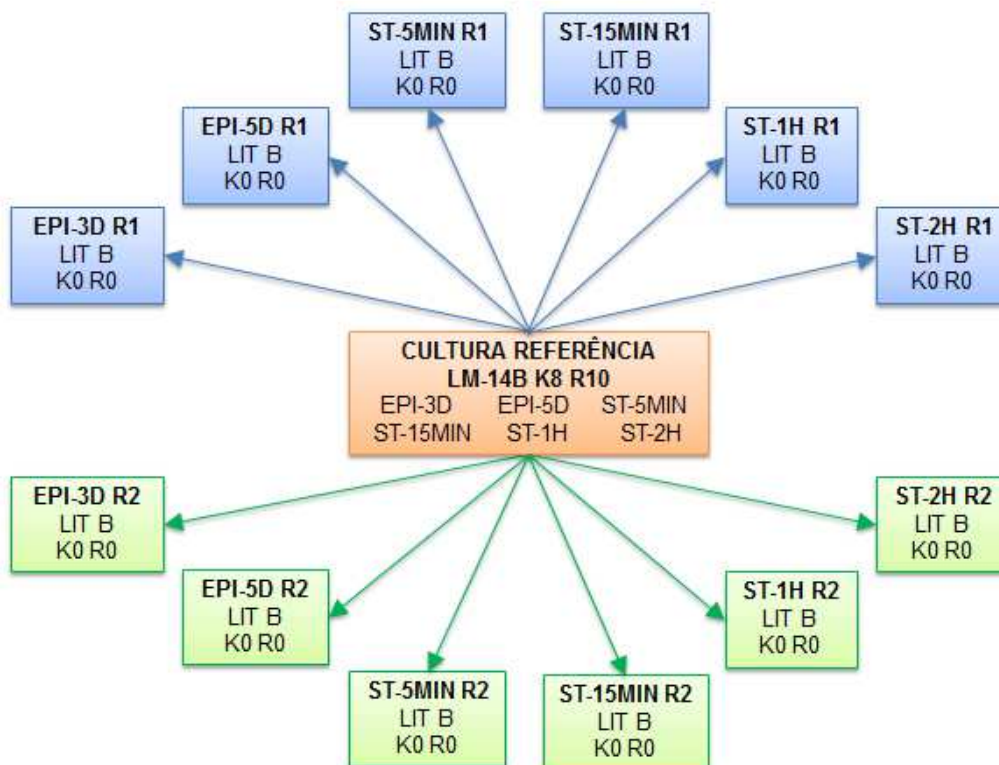
### 3.5.2. Obtenção da cultura referência

Para a cultura referência, os parasitas foram cultivados em meio definido LM-14B com a substituição dos aminoácidos Lisina e Arginina por suas versões contendo isótopos pesados (Lys-8 e Arg-10) por duas passagens sequenciais em fase exponencial, seguida de uma passagem em fase estacionária, partindo de um inóculo de  $1 \times 10^6$  células/ml. Foram coletadas  $3 \times 10^9$  células (~ 10 mg de proteínas) para cada ponto experimental diferente: células na fase exponencial (EPI-3D) e na fase estacionária (EPI-5D), células mantidas em estresse nutricional por 5 minutos (ST-5MIN), 15 minutos (ST-15MIN), 1 hora (ST-1H) e 2 horas (ST-2H). Os parasitas em fase estacionária e exponencial foram centrifugados 7.000 xg, 5 minutos, lavados com 10 ml de PBS 1X e, ressuspensos em PBS 1X na concentração final de  $5 \times 10^8$  células/ml. As células submetidas a estresse nutricional foram centrifugadas 7.000 xg, 5 minutos, lavadas uma vez com 10 ml de TAU e ressuspensas em meio TAU na concentração final de  $5 \times 10^8$  células/ml. Os diferentes estresses foram iniciados de forma dessincronizada para que todos os diferentes pontos fossem coletados em um mesmo momento.

Então foi realizada a mistura de todos os diferentes pontos (EPI-3D, EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H) oriundos de LM-14B, na proporção 1:1:1:1:1:1.

A cultura referência foi misturada com cada réplica de cada ponto experimental de LIT-B na proporção 1:1. A Figura 3 resume como foram realizadas as misturas entre os pontos experimentais (oriundos de parasitas cultivados em LIT-B) e a cultura referência (oriundos de parasitas cultivados em LM-14B com Lisina e Arginina “pesadas”).

Figura 3: Misturas realizadas entre os pontos experimentais e a cultura referência.



EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente; LM-14B e LIT-B – meios de cultivo dos parasitas; K0, K8 – versões de Lisina, leve e pesada, respectivamente; R0, R10 – versões de Arginina, leve e pesada, respectivamente.

### 3.6. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA PROTEÔMICA

#### 3.6.1. Protocolo FASP

Após a realização das misturas foi feita a lise das células, sendo utilizada a proporção de 65  $\mu$ l de tampão para cada  $1 \times 10^8$  células. As amostras foram incubadas em banho a 95 $^{\circ}$  C por 5 minutos e em seguida sonicadas por aproximadamente 1 hora, até não apresentarem mais viscosidade. Então, as amostras foram centrifugadas 20.000 xg, 10 minutos, 20 $^{\circ}$ C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, incubado em gelo seco, por aproximadamente 30 minutos, e por fim, armazenados a -80 $^{\circ}$ C.

Para dar prosseguimento ao processo, as amostras foram descongeladas e então processadas segundo o protocolo FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*), descrito abaixo (WISNIEWSKI; ZOUGMAN; MANN,



2009), que retira o SDS utilizado na lise das células (utilizado na lise das células, mas que pode prejudicar na digestão enzimática e nas análises por espectrometria de massas, por também ser ionizável e mais abundante que alguns peptídeos).

Inicialmente cada amostra foi dividida em 2 Amicons Ultra 15 10K (Millipore), sendo cerca de 5 mg de proteína em cada filtro. Foi adicionado UA + DTT 10 mM (6,7 x volume do lisado) em cada Amicon, as amostras foram homogeneizadas com a pipeta e centrifugadas a 4.000 xg, ~ 30 minutos, 20° C. Essa etapa foi repetida por mais três vezes. Em seguida, foram alquiladas com IAA 50 mM (3,3 x volume do lisado), homogeneizadas sob agitação por 1 minuto a ~ 600 rpm, incubadas no escuro por 20 minutos e centrifugadas a 4.000 xg, ~ 40 minutos, 20° C. Na sequência, foram realizadas duas etapas de lavagem com UA (3,3 x volume do lisado), seguidas por duas etapas de lavagem com ABC (3,3 x volume do lisado), sendo que, a cada lavagem, as amostras foram homogeneizadas com a pipeta e centrifugadas a 4.000 xg, ~ 30 minutos.

Os extratos foram dosados por Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Em seguida foi adicionado tripsina, na proporção de 1 µg de tripsina : 100 µg de proteína, e ABC e incubado por 18 horas a 37° C. Após este período foi realizada a troca do reservatório para armazenagem dos peptídeos que foram digeridos no filtro, e foi feita a eluição dos peptídeos digeridos com ABC (3,3 x volume do lisado), seguido de homogeneização e centrifugação a 4.000 xg, ~ 40 minutos, 20° C; e com NaCl 0,5M (1,5 x volume do lisado), seguido de homogeneização e centrifugação 4.000 xg, ~ 40 minutos, 20°C. Por fim, os peptídeos foram dosados no NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) e acidificados com 0,5% de TFA.

### 3.6.2. Fracionamento dos peptídeos

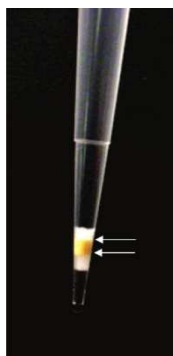
Após a digestão das proteínas, as amostras peptídicas foram fracionadas através de cromatografia líquida de fase reversa (FR) básica. Foram utilizadas 10 colunas Sep Pack C18 130mg para cada réplica de cada ponto. As colunas foram ativadas com 5 ml de metanol e equilibradas com 5 ml

de FA 20mM. O volume das amostras peptídicas foi aumentado para 100 ml com FA 20mM e então cada réplica de cada ponto foi distribuída entre as 10 colunas (10 ml por coluna). Cada coluna foi lavada 2x com 5ml de FA 20mM. Então foram realizadas as eluições, com diferentes concentrações de Acetonitrila (ACN), em diferentes frascos. No primeiro frasco, os peptídeos foram eluídos da coluna com 1ml de ACN 10%, FA 20mM; num segundo frasco, com 1ml de ACN 14%, FA 20mM; num terceiro frasco, com 1ml de ACN 18%, FA 20mM; por fim, no último frasco, com 1ml de ACN 60%, FA 20mM. Os eluídos foram dosados por Qubit, uma alíquota de 50 µg foi separada para a Proteômica, e o restante do volume foi destinado ao enriquecimento dos fosfopeptídeos, conforme será descrito mais adiante. Todas as frações foram secas em Speed Vac, aproximadamente 10 horas e armazenadas em Stage-Tips.

### 3.6.3. Stage-Tips

Os Stage-tips são utilizados para purificação e armazenamento dos peptídeos. Foram fabricados através da inserção de uma porção de membrana C18 em uma ponteira P200 (Figura 4).

**Figura 4: Esquema de um Stage-Tip.**



Esquema de um Stage-tip indicando a localização da membrana C18. FONTE: (ISHIHAMA; RAPPSILBER; MANN, 2006)

Inicialmente o Stage-tip deve ser acoplado a um adaptador de centrífuga com um reservatório. A membrana C18 deve ser ativada com 100 µl de metanol, centrifugada 1.000 xg, 2 minutos e, equilibrada com 200 µl de solução

A, centrifugada 1.000 xg, 6 minutos. Os peptídeos secos no Speed Vac foram ressuspensos em 1 ml de solução A. Em seguida, a amostra deve ser passada pela membrana C18 através de centrifugação a 1.000 xg, pelo tempo necessário até que toda a amostra passe pela membrana. Por fim, os Stage-tips devem ser lavados 2 vezes com 200 µl de solução A, centrifugados 1.000 xg, 6 minutos. Então, podem ser armazenados a 4° C até o momento da eluição.

Para a eluição dos peptídeos, cada Stage-tip deve ser lavado com 200 µl de solução A, centrifugado 1.000 xg, 6 minutos. Em um tubo novo, os peptídeos são eluídos 2 vezes com 20 µl da solução B. A Acetonitrila deve ser retirada através de secagem em Speed-Vac (aproximadamente 10 minutos, sem aquecimento). Então, os peptídeos devem ser ressuspensos em 20 µl de solução A\* e transferidos para o cromatógrafo, onde serão separados e entraram no espectrômetro de massas para serem analisados.

### 3.7. ENRIQUECIMENTO DOS FOSFOPEPTÍDEOS

Inicialmente, cada fração foi ressuspensa em 1 ml de LB, 100 µl de solução de *beads* foram adicionados e as amostras foram incubadas por 1h, sob agitação por inversão. Na sequência, foram centrifugadas a 1.000 xg, 1 min, para baixar as *beads*, sendo o *flow-trough* retirado e armazenado a -80° C. As *beads* foram lavadas 2 vezes com 500 µl de LB, 2x com 500 µl de L1 e 2 vezes com 500 µl de L2. Após as lavagens, foram adicionados a cada amostra 50 µl de NH<sub>4</sub>OH 0,3M, realizada incubação por 5 min seguida por centrifugação a 1.000 xg, 1 minuto e o sobrenadante (eluído), foi armazenado em um novo frasco. Esse processo de eluição foi repetido 3 vezes. Todo o eluído foi totalmente seco no Speed Vac (aproximadamente 2 horas).

Para que não restasse nenhuma *bead* quando as amostras fossem separadas por cromatografia líquida para entrar no espectrômetro, os eluídos foram purificados em Stage-Tips (processo descrito no item 3.6.3).

### 3.8. ANÁLISE POR NANO LC-MS/MS

As misturas peptídicas foram separadas por nanocromatografia líquida de fase reversa e analisadas por ESI MS/MS. Os experimentos foram realizados com um cromatógrafo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado ao espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de ionização (voltagem de 2,3 kV).

Foram injetados 10 µl (aproximadamente 3 µg da amostra do proteoma e 15 µg do fosfoproteoma) de cada amostra no cromatógrafo. A separação dos peptídeos ocorreu com um fluxo de 250 nl/min em fase móvel com Acetonitrila (ACN), 0,1% de ácido fórmico, 5% de DMSO. Utilizou-se um gradiente linear de 5 a 28% de ACN em 107 minutos seguido de 28 a 40% em 13 minutos para fosfoproteômica (total 120 minutos). Para proteômica o gradiente foi de 5 a 28% de ACN em 214 minutos seguido de 28 a 40% em 26 minutos (total 240 minutos). A cromatografia ocorreu em coluna analítica de sílica de 30 cm, com diâmetro interno de 75 µm e partículas de C18 com diâmetro de 1,9 µm aquecida a 60 °C. Os peptídeos foram ionizados por nano eletro spray (voltagem de 2,3 kV) e injetados no MS.

O modo de aquisição foi por *Data Dependent Analysis* (DDA) como segue: *scan* inicial no Orbitrap com resolução de 15.000, seguido de seleção dos 12 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID e analisados no *ion trap*. Paralelamente ao MS/MS, foi realizado um *full scan* no Orbitrap com uma resolução de 60.000. Na seleção dos íons para MS2 foi usada uma lista de exclusão dinâmica de 90 segundos. Nas corridas de fosfoproteômica, o isolamento e fragmentação dos precursores contendo grupamento fosfato foi feita utilizando-se os métodos de *neutral loss* e *multistage activation*. A opção *lock mass* foi utilizada para obtenção de melhor acurácia – erro abaixo de 0,5 p.p.m. - de massa dos peptídeos trípticos precursores detectados por MS.

### 3.9. ANÁLISE DOS DADOS

A comparação dos dados obtidos no MS e MS/MS, identificação e quantificação dos peptídeos, proteínas e sítios de fosforilação, foi realizada através do *software* MaxQuant versão 1.5.0.25. Foi utilizado o banco de dados de *Trypanosoma cruzi* do UniProt de 24.02.2015 ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), com um total de 19.242 sequências. Entre os parâmetros de busca, foi especificado uma tolerância de MS/MS de 0.5 Da; foram permitidas 2 *missed cleavages* (sítios de clivagem da tripsina que não foram clivados); foi considerada a carbamidometilação da Cisteína como uma modificação fixa e, a oxidação da Metionina e acetilação N-terminal foram consideradas modificações variáveis; nos arquivos referentes às análises fosfoproteômicas foi incluída a busca por sítios de fosforilação.

Para a validação das identificações, foram requeridos peptídeos com no mínimo 7 aminoácidos. Foi aplicado um FDR de 1% independente para sítio de fosforilação, peptídeo e proteína. Sequências similares de proteínas que não permitiram a distinção das proteínas foram agrupadas em grupos de proteínas. As proteínas e sítios de fosforilação foram quantificados pela diferença de expressão entre os pares de peptídeos “leves” e “pesados”.

As tabelas geradas pelo MaxQuant foram analisadas pelo *software* Perseus versão 1.5.0.31. Após a eliminação das sequências reversas e contaminantes, a razão das intensidades pesado/leve foi convertida a escala  $-\log_2()$ , para facilitar a observação das diferenças de expressão entre os diferentes pontos. Foram consideradas somente as proteínas/sítios de fosforilação com intensidade em todos os diferentes pontos experimentais. Foram realizadas diferentes análises: a primeira comparando os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D, sendo selecionadas as proteínas e sítios de fosforilação com FDR menor que 10% para posterior análise; a segunda, entre os pontos EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H, sendo selecionadas as proteínas com FDR inferior a 20% e os sítios de fosforilação com FDR menor que 10% para posterior análise; e também, após a normalização dos sítios de fosforilação com a expressão das proteínas através da subtração do  $-\log_2$  da intensidade da proteína, do  $-\log_2$  da intensidade do sítio, resultando na

modulação do sítio de fosforilação, independente da variação da proteína. Para esses casos, os sítios de fosforilação com FDR menor que 5% foram selecionados para posterior análise. A correlação entre as réplicas, a clusterização, enriquecimento e demais análises, foram realizadas com o *software* Perseus.

Foram consideradas como diferencialmente expressas as proteínas/sítios de fosforilação com diferença de mínima de 50% entre os pontos experimentais.

## 4. RESULTADOS

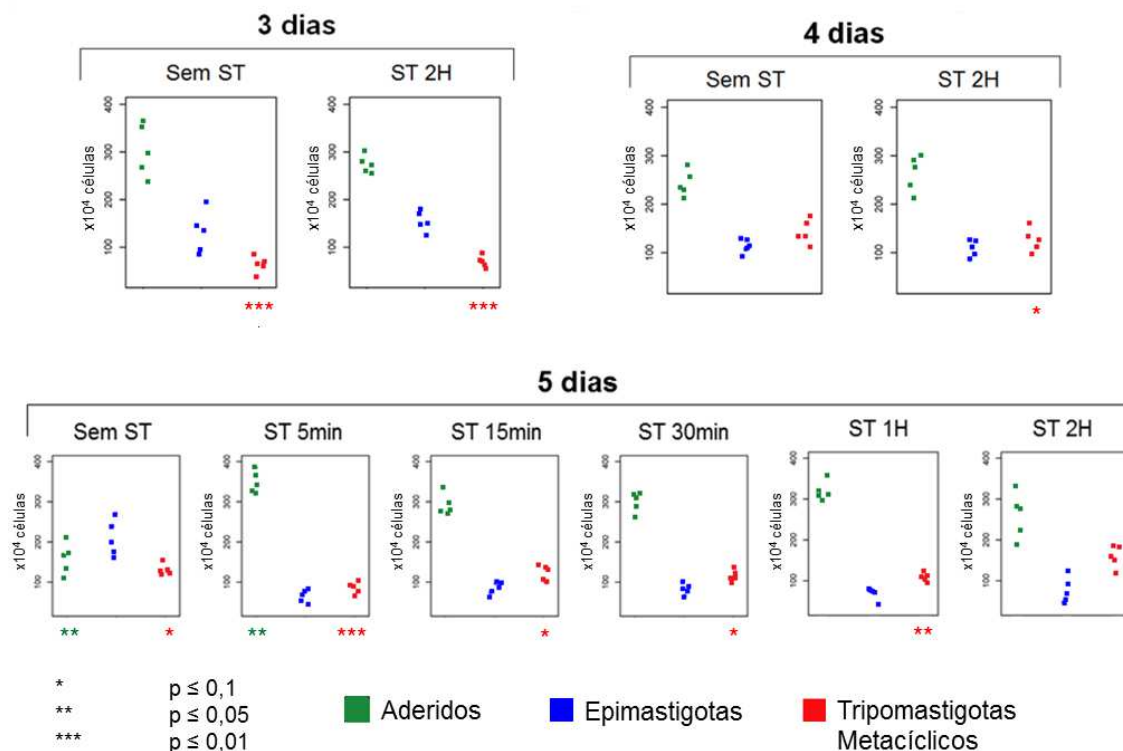
### 4.1. COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES CONDIÇÕES DE METACICLOGÊNESES *IN VITRO*

Inicialmente, para entender a influência do estresse nutricional para a diferenciação, foram realizadas diferentes metaciclogênese *in vitro*, alterando algumas condições em relação ao protocolo padronizado em nosso laboratório (as formas epimastigotas são cultivados por dois repiques sequenciais de 3 dias, seguido de um repique de 5 dias, então são submetidos a estresse nutricional através da incubação em meio TAU por duas horas e em seguida, são transferidos às garrafas de cultivo contendo o meio TAU3AAG para que se diferenciem em tripomastigotas metacíclicos).

Dentre as condições alteradas para este experimento, foram realizadas metaciclogêneses a partir de parasitas com diferentes tempos de cultivo (células em fase exponencial – 3 dias; células em fase estacionária – 5 dias; período intermediário – 4 dias), a fim de observar a influência da fase de cultivo celular na diferenciação; com ou sem a incubação por duas horas em meio TAU (com ou sem estresse nutricional); e também a incubação por diferentes tempos em meio TAU (5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas) tendo como base o protocolo original.

Após 96 horas de incubação em meio TAU3AAG, foi realizada a contagem diferencial de tripomastigotas metacíclicos e epimastigotas presentes no sobrenadante e, ainda, foram estimados os parasitas que permaneceram aderidos (Figura 5).

**Figura 5: Contagem das formas tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas no sobrenadante e estimativa de aderidos após 96 horas de diferentes metaciclogêneses *in vitro*.**



3 dias, 4 dias, 5 dias – Metaciclogêneses *in vitro* a partir de Epimastigotas cultivados por 3 dias, 4 dias e 5 dias, respectivamente. Sem ST - Metaciclogêneses *in vitro* sem a incubação dos parasitas em meio TAU para estressá-los. ST 5min, ST 15min, ST 30min, ST 1H, ST 2H - Metaciclogêneses *in vitro* com diferentes tempos de incubação dos parasitas em meio TAU para estressá-los, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. p – valor de p em relação à condição 5 dias – ST 2H.

## 4.2. ANÁLISES PROTEÔMICAS

Os parasitas foram cultivados paralelamente em dois meios de cultura diferentes: meio LIT-B e meio LM-14B suplementado com Lys-8 e Arg-10, em ambos os casos para a obtenção dos diferentes pontos experimentais (EPI-3D, EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H). As células com proteínas contendo os aminoácidos na versão “pesada” foram utilizadas como um padrão para que pudesse ser realizada a quantificação relativa entre a expressão das proteínas na versão “leve” nos diferentes pontos experimentais com base em uma amostra referência comum. Para a montagem da cultura referência foi realizada a mistura de todos os pontos experimentais pesados na mesma proporção. A fim de garantir a confiabilidade da quantificação pela metodologia



de SILAC, é necessário verificar antes se há a incorporação de pelo menos 95% de aminoácidos “pesados” no proteoma marcado. Para isso, é realizada uma corrida independente, somente com a amostra da cultura referência e os dados obtidos são comparados com o banco de dados com o software MaxQuant, utilizando os mesmos parâmetros mencionados no Material e Métodos, gerando uma lista de peptídeos e proteínas identificadas. A lista de peptídeos contém a informação da razão de peptídeos com aminoácidos “pesados” por peptídeos com aminoácidos “leves” (razão pesado/leve), e com isso é possível determinar a porcentagem de peptídeos que obtiveram a incorporação de aminoácidos “pesados”. Neste experimento, a taxa média de incorporação foi de 96,07% demonstrando-se suficiente para atingir uma quantificação confiável.

A cultura referência foi adicionada em cada diferente ponto experimental leve, na proporção 1:1. Na sequência, foi realizada a extração das proteínas, que foram digeridas em peptídeos com Tripsina, os quais foram pré-fracionadas. No pré-fracionamento, os peptídeos foram inseridos em colunas de FR básica e então, eluídos com diferentes concentrações de Acetonitrila (10%, 14%, 18% e 60%) gerando 4 diferentes frações. Cerca de 50 µg de cada fração foram purificadas e armazenadas em Stage-Tips, para posterior análise por LC-MS/MS, conforme descrito na metodologia. Foram feitas duas réplicas biológicas e, foram realizadas duas corridas para fração de cada ponto experimental, totalizando 96 corridas. No total, foram adquiridos 3.375.235 espectros MS/MS. Estes espectros foram confrontados com o banco de dados e, dentre eles, 1.389.377 espectros (cerca de 40%) foram identificados.

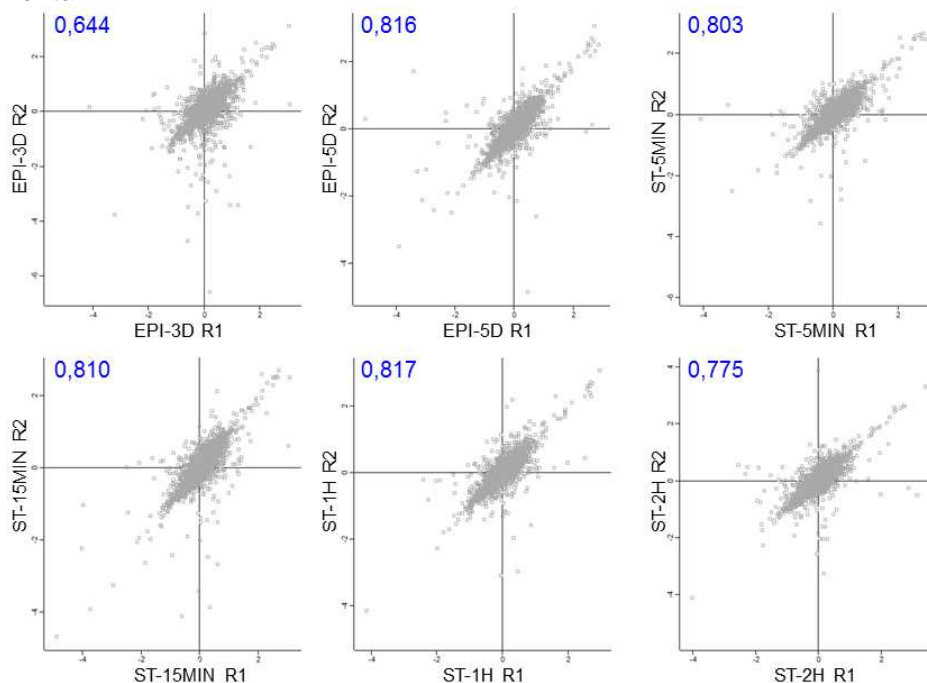
Após a exclusão dos contaminantes (como queratinas) e das sequências reversas identificadas, foram obtidas 35.982 sequências peptídicas e 8.687 proteínas em ambas as frações, leve e pesado. Algumas sequências peptídicas podem ser comuns a mais de uma proteína. Assim, essas proteínas foram agrupadas em 5.405 grupos de proteínas, em ambas as frações. Para que as proteínas possam ser quantificadas, é necessário que sejam identificadas tanto na fração “leve” quanto na fração “pesada”, referente à cultura em meio LM-14B. Considerando isso, puderam ser quantificadas 5.331 grupos de proteínas (98,8%).

A Tabela 2 mostra a quantidade de peptídeos e grupos de proteínas identificados na fração leve (Identificados) e aqueles identificados em ambas às frações (Quantificados), em cada diferente condição experimental de cada réplica. Também está representado o número de identificação em cada fração de cada ponto experimental. Não estão sendo considerados os peptídeos e grupos de proteínas exclusivos da fração pesada, uma vez que, a fração pesada foi utilizada somente como referência, e os pontos “leves” serão analisados.

A relação contendo todas as proteínas identificadas, juntamente com o valor de  $-\log_2$  da razão das intensidades pesado/leve está disponível no CD-ROM no arquivo Anexo 01.

A correlação entre as réplicas está representada na Figura 6. Conforme observado, as réplicas biológicas mostraram-se consideravelmente reprodutíveis entre si.

**Figura 6: Correlação entre as proteínas identificadas nas réplicas de cada ponto experimental.**



Em azul está representado o valor da correlação de Pearson. Foram utilizados os valores de  $-\log_2$  da razão pesado/leve para montagem dos gráficos. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 2: Identificação de peptídeos e grupos de proteínas em cada ponto experimental e nas diferentes frações.**

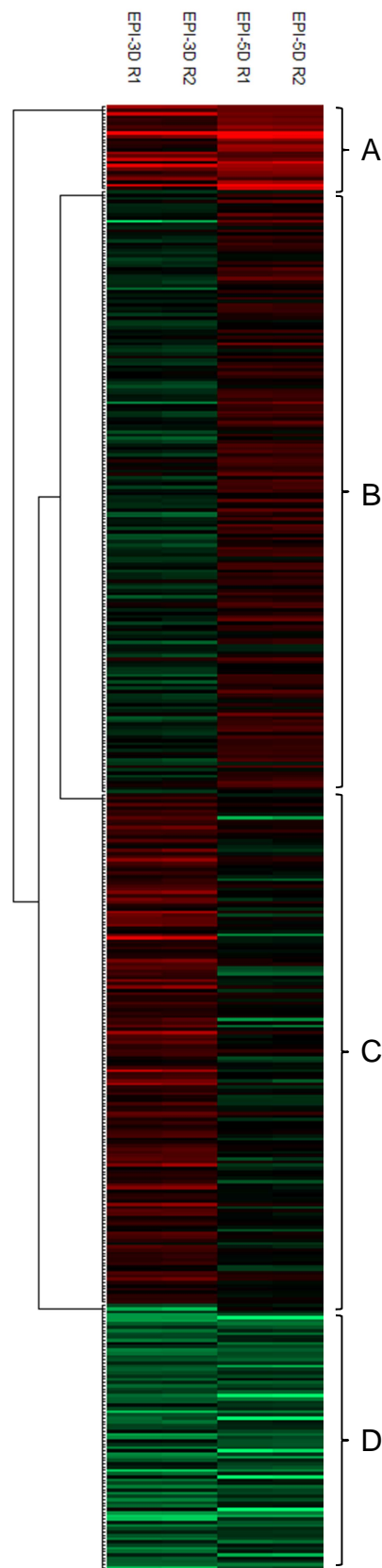
	PROTEÍNAS		PEPTÍDEOS	
	Identificados em LIT	Quantificados	Identificados em LIT	Quantificados
<b>TOTAL</b>	<b>5395</b>	<b>5331 (98.8%)</b>	<b>35481</b>	<b>35419 (99.8%)</b>
EPI-3D R1	4735	4201 (88.7%)	23191	23156 (99.8%)
EPI-3D R1 - F10%	2930	2081 (71.0%)	8070	7026 (87.1%)
EPI-3D R1 - F14%	3099	2110 (68.1%)	10193	8742 (85.8%)
EPI-3D R1 - F18%	3216	2099 (65.3%)	11391	9921 (87.1%)
EPI-3D R1 - F60%	3047	2004 (65.8%)	9134	7983 (87.4%)
EPI-3D R2	4935	4373 (88.6%)	25068	25007 (99.8%)
EPI-3D R2 - F10%	3194	2028 (63.5%)	8874	7106 (80.1%)
EPI-3D R2 - F14%	3207	2114 (65.9%)	10049	8079 (80.4%)
EPI-3D R2 - F18%	3068	2126 (69.3%)	10049	8125 (80.9%)
EPI-3D R2 - F60%	3420	2125 (62.1%)	10606	8546 (80.6%)
EPI-5D R1	4815	4198 (87.2%)	24630	24601 (99.9%)
EPI-5D R1 - F10%	2962	1989 (67.2%)	8412	7607 (90.4%)
EPI-5D R1 - F14%	2809	2047 (72.9%)	9142	8316 (91.0%)
EPI-5D R1 - F18%	2797	2104 (75.2%)	9057	8215 (90.7%)
EPI-5D R1 - F60%	3083	2110 (68.4%)	9570	8690 (90.8%)
EPI-5D R2	4747	4142 (87.3%)	23573	23544 (99.9%)
EPI-5D R2 - F10%	2817	1995 (70.8%)	7410	6740 (91.0%)
EPI-5D R2 - F14%	2720	2051 (75.4%)	8483	7710 (90.9%)
EPI-5D R2 - F18%	2736	1877 (68.6%)	8743	7948 (90.9%)
EPI-5D R2 - F60%	2986	2059 (69.0%)	8959	8223 (91.8%)
ST-5MIN R1	4205	3586 (85.3%)	18082	18048 (99.8%)
ST-5MIN R1 - F10%	2108	1433 (68.0%)	4835	4529 (93.7%)
ST-5MIN R1 - F14%	2127	1491 (70.1%)	5834	5487 (94.1%)
ST-5MIN R1 - F18%	2713	2014 (74.2%)	8826	8054 (91.3%)
ST-5MIN R1 - F60%	2694	1957 (72.6%)	9140	8335 (91.2%)
ST-5MIN R2	4718	4099 (86.9%)	23314	23281 (99.9%)
ST-5MIN R2 - F10%	2695	1938 (71.9%)	7208	6486 (90.0%)
ST-5MIN R2 - F14%	2689	1978 (73.6%)	8578	7749 (90.3%)
ST-5MIN R2 - F18%	2749	2011 (73.2%)	8698	7866 (90.4%)
ST-5MIN R2 - F60%	2954	2051 (69.4%)	9031	8257 (91.4%)
ST-15MIN R1	4733	4202 (88.8%)	23642	23613 (99.9%)
ST-15MIN R1 - F10%	2857	2018 (70.6%)	7740	6905 (89.2%)
ST-15MIN R1 - F14%	2923	2113 (72.3%)	9204	8137 (88.4%)
ST-15MIN R1 - F18%	2936	2173 (74.0%)	9367	8373 (89.4%)
ST-15MIN R1 - F60%	2979	2027 (68.0%)	8205	7361 (89.7%)
ST-15MIN R2	4783	4196 (87.7%)	24307	24279 (99.9%)
ST-15MIN R2 - F10%	2809	2023 (72.0%)	7654	6833 (89.3%)
ST-15MIN R2 - F14%	2937	2177 (74.1%)	9071	8079 (89.1%)
ST-15MIN R2 - F18%	2799	2039 (72.8%)	8591	7773 (90.5%)
ST-15MIN R2 - F60%	3078	2155 (70.0%)	9107	8251 (90.6%)
ST-1H R1	4657	4034 (86.6%)	23610	23591 (99.9%)
ST-1H R1 - F10%	2623	1916 (73.0%)	7003	6428 (91.8%)
ST-1H R1 - F14%	2708	2063 (76.2%)	8668	7913 (91.3%)
ST-1H R1 - F18%	2275	1634 (71.8%)	6284	5973 (95.1%)
ST-1H R1 - F60%	2940	2076 (70.6%)	9235	8513 (92.2%)
ST-1H R2	4554	3898 (85.6%)	22114	22094 (99.9%)
ST-1H R2 - F10%	2174	1496 (68.8%)	4923	4660 (94.7%)
ST-1H R2 - F14%	2769	2007 (72.5%)	8747	7975 (91.2%)
ST-1H R2 - F18%	2209	1574 (71.3%)	5902	5618 (95.2%)
ST-1H R2 - F60%	2854	2003 (70.2%)	8603	7930 (92.2%)
ST-2H R1	4768	4196 (88.0%)	24060	24043 (99.9%)
ST-2H R1 - F10%	2901	2075 (71.5%)	8114	7428 (91.5%)
ST-2H R1 - F14%	3015	2154 (71.4%)	10069	9186 (91.2%)
ST-2H R1 - F18%	2942	2199 (74.7%)	10162	9301 (91.5%)
ST-2H R1 - F60%	3085	2144 (69.5%)	10002	9177 (91.8%)
ST-2H R2	4774	4215 (88.3%)	23625	23601 (99.9%)
ST-2H R2 - F10%	2963	2091 (70.6%)	8179	7344 (89.8%)
ST-2H R2 - F14%	2931	2147 (73.3%)	9637	8751 (90.8%)
ST-2H R2 - F18%	2873	2140 (74.5%)	9480	8595 (90.7%)
ST-2H R2 - F60%	3030	2049 (67.6%)	9618	8823 (91.7%)

EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente. F10%, F14%, F18% e F60% - referem-se às diferentes concentrações de ACN resultantes da eluição da FR básica.

Optamos por realizar a análise das proteínas diferencialmente expressas separadamente, comparando os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D, que estão relacionados a diferenças de cultivo celular, ou seja, fase exponencial e fase estacionária, respectivamente; e uma segunda análise entre os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H), para verificar quais são as proteínas diferencialmente expressas ao longo do estresse.

Na primeira análise, entre EPI-3D e EPI-5D, foram consideradas somente as proteínas com intensidade nas duas réplicas dos dois pontos experimentais, um total de 3.468 proteínas. Foram selecionadas as proteínas com FDR de até 10%, utilizando o teste estatístico Benjamini-Hochberg, resultando em 452 proteínas reguladas para as análises posteriores. Estas proteínas foram distribuídas em 4 clusters, com base em seu perfil de expressão (Figura 7). No Anexo 02, disponível no CD-ROM, estão listadas todas as proteínas, separadas por cluster.

Figura 7: Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas entre EPI-3D e EPI-5D.



Em verde estão representadas as proteínas com expressão diminuída e em vermelho, as proteínas com expressão aumentada. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.

Dentre as proteínas consideradas diferencialmente expressas foram selecionadas aquelas com diferença na expressão superior a 50% para serem analisadas, sendo que apresentam um aumento na expressão estão representadas na Tabela 3, já as que diminuem a expressão estão representadas na Tabela 4.

**Tabela 3: Grupos de Proteínas com mais de 50% de aumento entre EPI-3D e EPI-5D.**

Cluster	IDs Uniprot	IDs TriTryp	Nome	p-valor
A	Q4DRF1	Tc00.1047053508547.160	Uncharacterized protein	9,48E-03
	Q4DIF6; Q4D0N7	Tc00.1047053511215.119; Tc00.1047053508961.79	69 kDa paraflagellar rod protein, putative	3,99E-03
	Q4D7J7; Q4D0S6	Tc00.1047053509719.40; Tc00.1047053509231.10	Cytochrome P450, putative	2,36E-03
	Q4D634	Tc00.1047053509617.20	Paraflagellar rod protein 3, putative	4,92E-03
	Q4CYC9	Tc00.1047053506123.70	Uncharacterized protein	6,78E-03
	Q4CQJ2	Tc00.1047053506011.10	Uncharacterized protein	4,75E-03
	Q4CKQ6; Q4CLD7; Q4CKJ0	Tc00.1047053509239.10; Tc00.1047053511073.10; Tc00.1047053426435.9	Fatty acid desaturase, putative	2,08E-03
	Q4CLW8	Tc00.1047053505683.10	Sterol 24-c-methyltransferase, putative	5,10E-03
B	Q4E300; Q4DAU8	Tc00.1047053506435.420; Tc00.1047053507739.50	Uncharacterized protein	7,70E-03
	Q4DX81	Tc00.1047053506945.190	Cytochrome p450-like protein, putative	1,12E-03
	Q4DX52	Tc00.1047053508257.70	Phosphomannomutase-like protein, putative	1,68E-03
	Q4DSV5	Tc00.1047053506227.150	Protein kinase A regulatory subunit, putative	3,85E-03
	Q4DLM7; Q4DCG8; Q4DGV9; Q4CYW1; Q4CQZ7	Tc00.1047053508857.30; Tc00.1047053508859.118; Tc00.1047053506975.80; Tc00.1047053508089.10; Tc00.1047053503993.10	Trans-sialidase, putative	3,57E-03
	Q4DJW4	Tc00.1047053510879.190	Uncharacterized protein	5,33E-03
	Q4DJQ7; Q4CZ54	Tc00.1047053509395.100; Tc00.1047053503653.60	Cytochrome b-domain protein, putative	9,92E-03
	Q4DE71	Tc00.1047053506493.9	Uncharacterized protein (Fragment)	4,88E-03
	Q4DCU5	Tc00.1047053506839.30	Uncharacterized protein	1,70E-03
	Q4DB00	Tc00.1047053510087.80	Uncharacterized protein	9,89E-03
	Q4DAZ9	Tc00.1047053510087.90	Uncharacterized protein	6,35E-04
	Q4DAS1	Tc00.1047053506485.70	Uncharacterized protein	9,66E-03
	Q4DY78; Q4DA04	Tc00.1047053511907.89; Tc00.1047053506797.110	Uncharacterized protein	5,79E-03
	Q4D2P4	Tc00.1047053506193.60	Ascorbate-dependent peroxidase, putative	2,35E-03
	Q4D4R8; Q4D0P9	Tc00.1047053504163.60; Tc00.1047053510301.30	Uncharacterized protein	1,10E-02
	Q4CYZ6	Tc00.1047053507689.30	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	5,07E-03
	Q4CWA5; Q4CRC5	Tc00.1047053507241.30; Tc00.1047053482369.29	Arginine kinase, putative	2,15E-03
	Q4CW64	Tc00.1047053509003.30	Calpain-like cysteine peptidase, putative	3,34E-03
	Q4CRX7	Tc00.1047053503745.30	Ascorbate-dependent peroxidase, putative	2,84E-03
	Q4CR73	Tc00.1047053509939.19	Uncharacterized protein (Fragment)	1,10E-02
	Q4CQR0	Tc00.1047053509943.20	cAMP specific phosphodiesterase, putative	4,01E-03
	Q4CN66; Q4E2S5	Tc00.1047053506125.20; Tc00.1047053504153.30	Uncharacterized protein	2,63E-03
D	Q4E5I9; Q4DY23	Tc00.1047053511277.60; Tc00.1047053506357.50	Alcohol dehydrogenase, putative	2,80E-03
	Q4CVJ1; Q4DIP8	Tc00.1047053504199.20; Tc00.1047053506635.130	Uncharacterized protein	1,99E-03
	Q4CLM5; Q4CQX5; Q4DCX8	Tc00.1047053510009.19; Tc00.1047053460747.30; Tc00.1047053509895.60	Uncharacterized protein (Fragment)	5,23E-03

**Tabela 4: Grupos de Proteínas com mais de 50% de diminuição entre EPI-3D e EPI-5D.**

Cluster	IDs Uniprot	IDs TriTryp	Nome	p-valor	
C	Q4E4C2	Tc00.1047053510187.290	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	3,32E-03	
	Q4E1C5	Tc00.1047053511807.200	Uncharacterized protein	1,15E-02	
	Q4E0T1	Tc00.1047053509965.290	p22 protein, putative	5,74E-03	
	Q4DZN0	Tc00.1047053504147.150	RNA helicase, putative	7,73E-03	
	Q4DYQ8	Tc00.1047053507641.170	Uncharacterized protein	1,49E-03	
	Q4DY42	Tc00.1047053511727.160	Uncharacterized protein	3,73E-03	
	Q4DXX8	Tc00.1047053510431.160	Nucleolar GTP-binding protein 1	1,08E-02	
	Q4E4H6; Q4DWW9	Tc00.1047053506885.270; Tc00.1047053510729.150	Tubulin tyrosine ligase, putative	6,17E-03	
	Q4DWW8; Q4E4H7	Tc00.1047053510729.160; Tc00.1047053506885.260	Uncharacterized protein	1,05E-02	
	Q4E554; Q4DWK0	Tc00.1047053510359.170; Tc00.1047053506755.160	AAA ATPase, putative	1,19E-03	
	Q4DWA3	Tc00.1047053506989.30	ABC transporter, putative	1,26E-03	
	Q4DU29	Tc00.1047053506241.200	Uncharacterized protein	2,41E-03	
	Q4DS23	Tc00.1047053510657.160	Uncharacterized protein	1,90E-03	
	Q4DRX6	Tc00.1047053508307.170	60S acidic ribosomal protein, putative	3,49E-04	
	Q4DRS1; Q4DEP5	Tc00.1047053506739.10; Tc00.1047053510819.10	Uncharacterized protein	2,69E-03	
	Q4E610; Q4DR96	Tc00.1047053508153.830; Tc00.1047053508181.130	Peter pan protein, putative	2,15E-03	
	Q4DQC0	Tc00.1047053511827.10	Uncharacterized protein (Fragment)	7,96E-03	
	Q4DK47	Tc00.1047053508827.10	Membrane-bound acid phosphatase, putative (Fragment)	3,36E-03	
	Q4DJC2	Tc00.1047053508851.130	Uncharacterized protein	2,56E-03	
	Q4DUK5; Q4DHY3	Tc00.1047053511245.150; Tc00.1047053506661.10	Elongation of fatty acids protein	4,94E-03	
	Q4DHP3	Tc00.1047053511491.70	Endosomal integral membrane protein, putative	7,24E-03	
	Q4DBW7	Tc00.1047053504103.80	Uncharacterized protein	5,54E-03	
	Q4DMY2; Q4DAM4	Tc00.1047053511529.130; Tc00.1047053506727.130	Uncharacterized protein	9,75E-03	
	Q4DAC4	Tc00.1047053506145.40	Uncharacterized protein	7,56E-03	
	Q4D8U5	Tc00.1047053503781.90	Universal minicircle sequence binding protein (UMSBP), putative	6,59E-03	
	Q4D239; Q4CY88	Tc00.1047053507529.10; Tc00.1047053510001.10	Uncharacterized protein	1,08E-02	
	Q4D1S6; Q4CXR2	Tc00.1047053506025.4; Tc00.1047053511209.69	Membrane-bound acid phosphatase, putative (Fragment)	1,02E-02	
	Q4CYP1	Tc00.1047053509463.41	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative (Fragment)	3,68E-03	
	Q4CYD2	Tc00.1047053506123.40	Nucleolar RNA helicase II, putative	4,88E-03	
	Q4CZK6; Q4CXB2	Tc00.1047053510299.20; Tc00.1047053503527.10	Uncharacterized protein	6,35E-03	
	Q4CTE4; Q4DND4	Tc00.1047053508579.20; Tc00.1047053507521.30	Uncharacterized protein	7,46E-03	
	D	Q4E0J7; Q4E0J6	Tc00.1047053509429.320; Tc00.1047053509429.329	Cysteine peptidase, putative	4,25E-04
		Q4DIV2	Tc00.1047053507709.120	Uncharacterized protein	2,61E-03
Q4DF41		Tc00.1047053508177.70	Uncharacterized protein	6,70E-03	
Q4DA30		Tc00.1047053506947.10	Uncharacterized protein	4,74E-03	
Q4D4X4; Q4CPA3		Tc00.1047053511909.10; Tc00.1047053510721.10	Uncharacterized protein	8,00E-04	
Q4CXV8		Tc00.1047053506413.10	Phosphatidate cytidyltransferase (Fragment)	3,07E-03	
Q4CRC4; Q4CR27; Q4D3P8; Q4CQ00		Tc00.1047053430895.4; Tc00.1047053505757.20; Tc00.1047053508179.70; Tc00.1047053504269.20	Uncharacterized protein (Fragment)	1,72E-03	

Para a verificação do enriquecimento de termos GO foi utilizado o *software* Perseus, que calcula o valor de enriquecimento com base no total de proteínas reguladas e tamanho do cluster em relação ao número de vezes que o termo aparece no total e também no cluster, através da fórmula representada na Figura 8.

**Figura 8: Fórmula para calcular o enriquecimento de termos GO.**

$$\left( \frac{\text{Total de proteínas reguladas}}{\text{Nº de vezes que o termo aparece no total}} \right) \cdot \left( \frac{\text{Nº de vezes que o termo aparece no Cluster}}{\text{Tamanho do Cluster}} \right)$$

Alguns clusters apresentam um enriquecimento de termos de GO (Tabela 5), mostrando que proteínas agrupadas em um mesmo cluster possuem funções parecidas.



**Tabela 5: Enriquecimento GO nos clusters correspondentes às proteínas diferencialmente expressas entre EPI-3D e EPI-5D.**

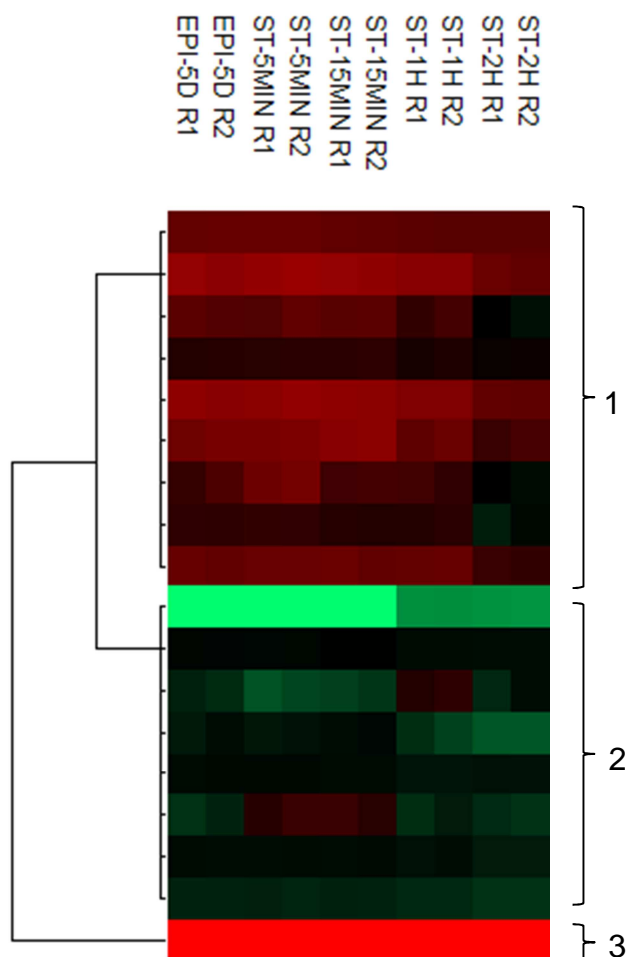
Cluster	Domínio	Nome	Enriquecimento	Total	Cluster	Tamanho do cluster	P-valor	
A	GOCC	cilium	17,385	3	3	26	1.70E-04	
	GOCC	cell projection	17,385	3	3	26	1.70E-04	
	GOBP	motile cilium	17,385	3	3	26	1.70E-04	
	GOBP	cilium	17,385	3	3	26	1.70E-04	
	GOBP	cell projection	17,385	3	3	26	1.70E-04	
B	GOMF	cellular component movement	24,301	12	12	186	1.90E-01	
	GOBP	cytoskeletal part	24,301	10	10	186	1.20E-04	
	GOBP	microtubule associated complex	24,301	8	8	186	7.51E-04	
	GOBP	dynein complex	24,301	5	5	186	1.14E-02	
	GOCC	protein complex	14,581	25	15	186	2.48E-02	
C	GOMF	translation	27,419	21	20	157	4.06E-05	
	GOCC	ribonucleoprotein complex	26,804	29	27	157	1.60E-07	
	GOBP	ribonucleoprotein complex	26,804	29	27	157	1.60E-07	
	GOCC	ribosome	26,575	26	24	157	4.28E-06	
	GOBP	ribosome	26,575	26	24	157	4.28E-06	
	GOCC	intracellular non-membrane-bounded organelle	24,819	29	25	157	4.64E-05	
	GOBP	non-membrane-bounded organelle	24,819	29	25	157	4.64E-05	
	GOBP	intracellular non-membrane-bounded organelle	24,819	29	25	157	4.64E-05	
	GOMF	protein folding	23,032	15	12	157	3.17E-04	
	GOBP	cytoplasmic part	22,621	42	33	157	1.13E-05	
	GOMF	RNA metabolic process	22,146	13	10	157	1.79E-03	
	GOMF	protein metabolic process	19,555	53	36	157	1.29E-03	
	GOMF	biosynthetic process	17,567	59	36	157	6.46E-02	
	GOBP	intracellular part	16,027	97	54	157	9.97E-03	
	GOMF	nucleobase-containing compound metabolic process	15,502	39	21	157	5.13E-03	
	GOMF	cellular metabolic process	14,735	127	65	157	3.10E-02	
	GOCC	cell part	14,282	127	63	157	1.98E-01	
	GOBP	cell part	14,282	127	63	157	1.98E-01	
	GOMF	primary metabolic process	13,391	129	60	157	3.90E-04	
	GOMF	cellular process	12,875	161	72	157	3.61E-04	
	GOMF	metabolic process	12,836	157	70	157	5.15E-04	
	GOMF	ribosome biogenesis	2,879	4	4	157	1.42E-02	
	GOMF	DNA metabolic process	2,879	4	4	157	1.42E-02	
	GOCC	organelle	2,125	42	31	157	5.62E-08	
	GOCC	intracellular organelle	2,125	42	31	157	5.62E-08	
	GOBP	organelle	2,125	42	31	157	5.62E-08	
	GOBP	intracellular organelle	2,125	42	31	157	5.62E-08	
	GOMF	macromolecule metabolic process	2,062	74	53	157	1.13E-08	
	GOCC	macromolecular complex	1,748	56	34	157	1.44E-01	
	GOBP	macromolecular complex	1,748	56	34	157	1.44E-01	
	D	GOMF	organic acid metabolic process	22,123	32	13	83	1.42E-03
		GOMF	cellular ketone metabolic process	22,123	32	13	83	1.42E-03
		GOMF	small molecule metabolic process	2,052	69	26	83	1.92E-01

Cluster – cluster no qual a proteína foi agrupada. Domínio – domínio ao qual o termo pertence. Enriquecimento – valor de enriquecimento do termo, calculado com base na fórmula representada na Figura 8. Termo Total – representa o número de vezes que o termo aparece no total. Termo Cluster – representa o número de vezes que o termo aparece no cluster. Tamanho Cluster – representa o tamanho do cluster. GOMF – classe de ontologia gênica de funções moleculares. GOCC – classe de ontologia gênica de compartimentos celulares. GOBP – classe de ontologia gênica de processos biológicos.

Na segunda análise, entre os diferentes pontos de estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H), também só foram consideradas as proteínas com intensidade nas duas réplicas de todos os cinco pontos experimentais, um total de 2.925 proteínas. Foram selecionadas as proteínas com FDR de até 20%, utilizando o teste estatístico Benjamini-Hochberg, resultando em 18 proteínas reguladas, que foram selecionadas para as

análises posteriores. Estas proteínas foram distribuídas em 3 clusters, com base em seu perfil de expressão (Figura 9) e estão relacionadas na Tabela 6.

**Figura 9: Agrupamento das proteínas diferencialmente expressas entre EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H.**



Em verde estão representadas as proteínas com expressão diminuída e em vermelho, as proteínas com expressão aumentada. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 6: Grupos de Proteínas diferencialmente expressas durante os diferentes pontos ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H).**

Cluster	IDs Uniprot	IDs TriTryp	Nome	p-valor
1	Q4E4T3	Tc00.1047053508461.280	Protein kinase A catalytic subunit isoform 2, putative	9,41E-04
	Q4DIF6; Q4D0N7	Tc00.1047053511215.119; Tc00.1047053508961.79	69 kDa paraflagellar rod protein, putative	4,33E-04
	Q4DCU5	Tc00.1047053506839.30	Uncharacterized protein	4,70E-04
	Q4DAE1; Q4CU51	Tc00.1047053510099.120; Tc00.1047053506263.20	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative	5,85E-05
	Q4D634	Tc00.1047053509617.20	Paraflagellar rod protein 3, putative	5,15E-05
	Q4D5J9	Tc00.1047053511527.70	Myosin heavy chain, putative	7,41E-04
	Q4CUE3; Q4CQ64	Tc00.1047053509825.20; Tc00.1047053510425.10	Uncharacterized protein	8,11E-04
	Q4CS11	Tc00.1047053410923.20	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	1,16E-03
	Q4CST9; Q4CS95	Tc00.1047053507165.30; Tc00.1047053507793.40	Uncharacterized protein	1,40E-04
2	Q4DZR8	Tc00.1047053507711.100	Procyclic form surface glycoprotein, putative	6,66E-04
	Q4DZM5	Tc00.1047053504147.200	Proteasome regulatory ATPase subunit, putative	4,26E-04
	Q4DX43	Tc00.1047053508257.150	Small nuclear ribonucleoprotein SmD3, putative	9,10E-04
	Q4DPV9; Q4E572	Tc00.1047053510877.10; Tc00.1047053506559.559	Antigenic protein, putative (Fragment)	9,66E-04
	Q4DH88; Q4E030	Tc00.1047053503955.70; Tc00.1047053507063.20	Translation initiation factor, putative	2,33E-04
	Q4DFT7	Tc00.1047053507765.149	Uncharacterized protein (Fragment)	7,94E-04
	Q4DBM7; Q4CQS6; Q4DKH8	Tc00.1047053509105.140; Tc00.1047053507713.30; Tc00.1047053509105.150	Heat shock protein 85, putative	4,82E-04
	Q4D6V2; Q4DFS6	Tc00.1047053506621.30; Tc00.1047053511555.80	Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	1,11E-03
3	Q4CKQ6; Q4CLD7; Q4CKJ0	Tc00.1047053509239.10; Tc00.1047053511073.10; Tc00.1047053426435.9	Fatty acid desaturase, putative	1,14E-03

### 4.3. ANÁLISES FOSFOPROTEÔMICAS

Para as análises fosfoproteômicas foram utilizadas as mesmas amostras da proteômica, porém foi acrescentada a etapa de enriquecimento para fosfopeptídeos com  $\text{TiO}_2$ .

Após a análise por espectrometria de massas foram obtidos 528.907 espectros MS/MS, dos quais 109.830 (cerca de 20%) foram identificados.

Foram identificados 2.424 grupos de proteínas na fração leve ou na fração pesada, sendo que destes, 1.679 são fosforilados, cerca de 70%. E, 5.929 peptídeos, sendo que destes, 2.989 são fosforilados, cerca de 50%. A Tabela 7 detalha o número de proteínas e peptídeos identificados na fração leve e quantificados em cada ponto experimental e também por fração.

**Tabela 7: Identificação e quantificação de peptídeos e grupos de proteínas por ponto experimental e também cada fração, após o enriquecimento dos fosfopeptídeos.**

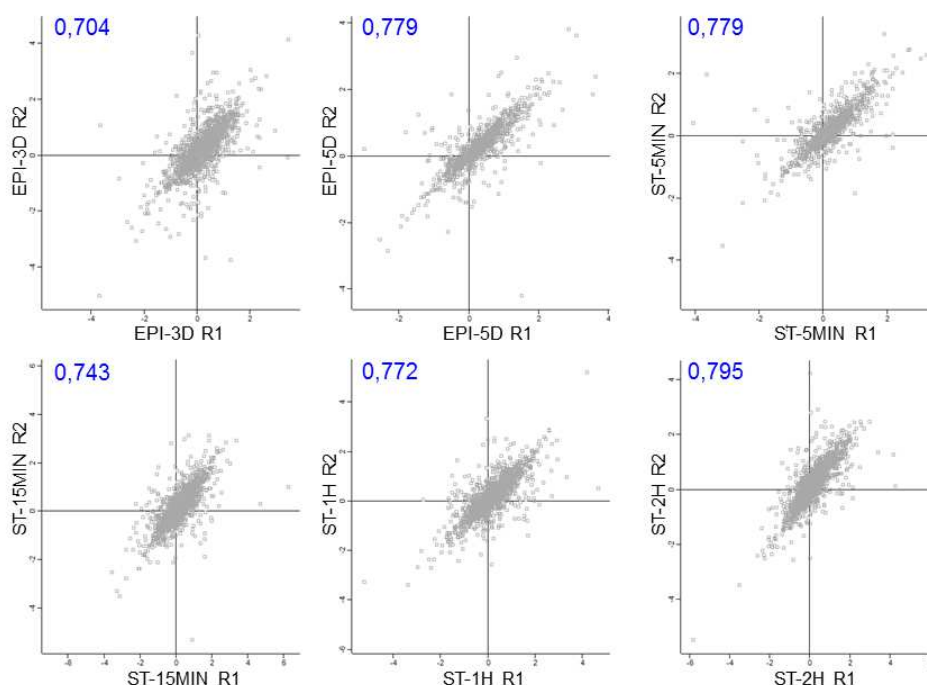
	GRUPOS DE PROTEÍNAS				PEPTÍDEOS			
	Identificados em LIT		Quantificados		Identificados em LIT		Quantificados	
	Total	Fosforilados	Total	Fosforilados	Total	Fosforilados	Total	Fosforilados
<b>TOTAL</b>	<b>2394</b>	<b>1658 (69.3%)</b>	<b>2268</b>	<b>1588 (70.0%)</b>	<b>5791</b>	<b>2937 (50.7%)</b>	<b>5729</b>	<b>2923 (51.0%)</b>
EPI-3D R1	1962	1396 (71.2%)	1434	1066 (74.3%)	3734	2160 (57.8%)	3688	2139 (58.0%)
EPI-3D R1 - F10%	1083	919 (84.9%)	337	314 (93.2%)	1627	1257 (77.3%)	1384	1071 (77.4%)
EPI-3D R1 - F14%	1058	826 (78.1%)	306	273 (89.2%)	1545	1060 (68.6%)	1313	892 (67.9%)
EPI-3D R1 - F18%	997	711 (71.3%)	306	251 (82.0%)	1463	850 (58.1%)	1263	734 (58.1%)
EPI-3D R1 - F60%	849	547 (64.4%)	246	182 (74.0%)	1217	561 (46.1%)	1042	472 (45.3%)
EPI-3D R2	1954	1401 (71.7%)	1375	1042 (75.8%)	3767	2210 (58.7%)	3712	2192 (59.1%)
EPI-3D R2 - F10%	1183	994 (84.0%)	351	328 (93.4%)	1806	1386 (76.7%)	1386	1066 (76.9%)
EPI-3D R2 - F14%	1055	828 (78.5%)	302	268 (88.7%)	1545	1070 (69.3%)	1192	824 (69.1%)
EPI-3D R2 - F18%	910	678 (74.5%)	243	201 (82.7%)	1291	769 (59.6%)	1015	604 (59.5%)
EPI-3D R2 - F60%	804	471 (58.6%)	204	145 (71.1%)	1173	439 (37.4%)	875	320 (36.6%)
EPI-5D R1	1382	1047 (75.8%)	889	707 (79.5%)	2287	1528 (66.8%)	2273	1520 (66.9%)
EPI-5D R1 - F10%	827	727 (87.9%)	238	223 (93.7%)	1203	986 (82.0%)	1012	836 (82.6%)
EPI-5D R1 - F14%	665	575 (86.5%)	207	192 (92.8%)	947	747 (78.9%)	815	640 (78.5%)
EPI-5D R1 - F18%	466	319 (68.5%)	122	101 (82.8%)	608	315 (51.8%)	535	271 (50.7%)
EPI-5D R1 - F60%	371	239 (64.4%)	98	74 (75.5%)	485	208 (42.9%)	415	166 (40.0%)
EPI-5D R2	1276	965 (75.6%)	816	645 (79.0%)	2098	1354 (64.5%)	2092	1350 (64.5%)
EPI-5D R2 - F10%	723	648 (89.6%)	209	198 (94.7%)	1035	844 (81.5%)	892	724 (81.2%)
EPI-5D R2 - F14%	597	502 (84.1%)	169	154 (91.1%)	827	610 (73.8%)	706	512 (72.5%)
EPI-5D R2 - F18%	398	284 (71.4%)	100	84 (84.0%)	500	283 (56.6%)	446	249 (55.8%)
EPI-5D R2 - F60%	389	235 (60.4%)	100	68 (68.0%)	502	191 (38.0%)	442	163 (36.9%)
ST-5MIN R1	1209	877 (72.5%)	806	637 (79.0%)	1986	1221 (61.5%)	1977	1216 (61.5%)
ST-5MIN R1 - F10%	609	512 (84.1%)	174	166 (95.4%)	848	633 (74.6%)	740	555 (75.0%)
ST-5MIN R1 - F14%	591	509 (86.1%)	174	163 (93.7%)	850	658 (77.4%)	735	563 (76.6%)
ST-5MIN R1 - F18%	472	348 (73.7%)	125	108 (86.4%)	618	363 (58.7%)	552	313 (56.7%)
ST-5MIN R1 - F60%	360	211 (58.6%)	104	74 (71.2%)	473	174 (36.8%)	415	141 (34.0%)
ST-5MIN R2	1530	1083 (70.8%)	980	744 (75.9%)	2943	1558 (52.9%)	2900	1544 (53.2%)
ST-5MIN R2 - F10%	634	566 (89.3%)	190	185 (97.4%)	923	762 (82.6%)	778	646 (83.0%)
ST-5MIN R2 - F14%	623	528 (84.8%)	178	163 (91.6%)	856	643 (75.1%)	740	555 (75.0%)
ST-5MIN R2 - F18%	713	580 (81.3%)	204	186 (91.2%)	964	705 (73.1%)	846	616 (72.8%)
ST-5MIN R2 - F60%	682	377 (55.3%)	233	134 (57.5%)	1188	310 (26.1%)	1031	267 (25.9%)
ST-15MIN R1	1884	1357 (72.0%)	1349	1033 (76.6%)	3627	2106 (58.1%)	3560	2079 (58.4%)
ST-15MIN R1 - F10%	1023	843 (82.4%)	304	279 (91.8%)	1519	1138 (74.9%)	1292	974 (75.4%)
ST-15MIN R1 - F14%	1003	822 (82.0%)	323	294 (91.0%)	1514	1102 (72.8%)	1317	954 (72.4%)
ST-15MIN R1 - F18%	845	630 (74.6%)	248	208 (83.9%)	1222	734 (60.1%)	1033	623 (60.3%)
ST-15MIN R1 - F60%	675	451 (66.8%)	181	138 (76.2%)	957	442 (46.2%)	826	370 (44.8%)
ST-15MIN R2	1936	1384 (71.5%)	1355	1038 (76.6%)	3771	2186 (58.0%)	3705	2156 (58.2%)
ST-15MIN R2 - F10%	1042	881 (84.5%)	324	300 (92.6%)	1558	1209 (77.6%)	1336	1031 (77.2%)
ST-15MIN R2 - F14%	982	820 (83.5%)	304	281 (92.4%)	1479	1113 (75.3%)	1269	942 (74.2%)
ST-15MIN R2 - F18%	801	612 (76.4%)	242	213 (88.0%)	1131	732 (64.7%)	985	639 (64.9%)
ST-15MIN R2 - F60%	648	404 (62.3%)	193	133 (68.9%)	949	366 (38.6%)	819	304 (37.1%)
ST-1H R1	1952	1366 (70.0%)	1360	1013 (74.5%)	3816	2098 (55.0%)	3777	2084 (55.2%)
ST-1H R1 - F10%	1012	850 (84.0%)	316	296 (93.7%)	1532	1158 (75.6%)	1332	1012 (76.0%)
ST-1H R1 - F14%	939	766 (81.6%)	284	259 (91.2%)	1395	1015 (72.8%)	1222	880 (72.0%)
ST-1H R1 - F18%	798	550 (68.9%)	227	177 (78.0%)	1148	602 (52.4%)	1012	524 (51.8%)
ST-1H R1 - F60%	684	396 (57.9%)	199	133 (66.8%)	1051	366 (34.8%)	912	316 (34.6%)
ST-1H R2	1948	1382 (70.9%)	1338	1017 (76.0%)	3833	2158 (56.3%)	3777	2133 (56.5%)
ST-1H R2 - F10%	1016	865 (85.1%)	316	291 (92.1%)	1523	1174 (77.1%)	1336	1028 (76.9%)
ST-1H R2 - F14%	944	784 (83.1%)	309	287 (92.9%)	1412	1060 (75.1%)	1238	925 (74.7%)
ST-1H R2 - F18%	810	573 (70.7%)	240	192 (80.0%)	1157	654 (56.5%)	1007	563 (55.9%)
ST-1H R2 - F60%	671	390 (58.1%)	202	134 (66.3%)	1020	362 (35.5%)	893	307 (34.4%)
ST-2H R1	1956	1361 (69.6%)	1366	986 (72.2%)	3802	2124 (55.9%)	3761	2112 (56.2%)
ST-2H R1 - F10%	1110	941 (84.8%)	358	336 (93.9%)	1684	1313 (78.0%)	1503	1168 (77.7%)
ST-2H R1 - F14%	887	598 (67.4%)	269	205 (76.2%)	1301	680 (52.3%)	1155	594 (51.4%)
ST-2H R1 - F18%	917	637 (69.5%)	296	233 (78.7%)	1338	737 (55.1%)	1195	648 (54.2%)
ST-2H R1 - F60%	757	488 (64.5%)	238	173 (72.7%)	1113	469 (42.1%)	992	406 (40.9%)
ST-2H R2	1935	1373 (71.0%)	1427	1061 (74.4%)	3751	2143 (57.1%)	3701	2125 (57.4%)
ST-2H R2 - F10%	1058	876 (82.8%)	346	316 (91.3%)	1597	1196 (74.9%)	1380	1036 (75.1%)
ST-2H R2 - F14%	996	779 (78.2%)	331	296 (89.4%)	1513	1023 (67.6%)	1326	895 (67.5%)
ST-2H R2 - F18%	895	645 (72.1%)	274	225 (82.1%)	1312	749 (57.1%)	1158	657 (56.7%)
ST-2H R2 - F60%	734	480 (65.4%)	222	173 (77.9%)	1036	475 (45.8%)	909	414 (45.5%)

EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente. F10%, F14%, F18% e F60% - referem-se às diferentes concentrações de ACN resultantes da eluição da FR básica.

Também foram identificados, 5.899 sítios de fosforilação únicos, porém, os sítios podem estar em sequências peptídicas comuns a diferentes proteínas, não permitindo a correta identificação do sítio. Nesses casos, os fosfossítios foram agrupados 3.893 grupos, sendo 3.049 em Serina (78,3%), 786 em Treonina (20,2%) e 58 em Tirosina (1,5%). Cerca de 99% dos grupos de fosfossítios puderam ser quantificados, ou seja, foram identificados na fração leve e na fração pesada. A **Erro! Autoreferência de indicador não válida.** detalha o número de sítios de fosforilação identificados na fração leve e quantificados em cada ponto experimental, e também os dados de cada ponto experimental por fração. A relação contendo todas as proteínas identificadas, juntamente com o valor de  $-\log_2$  da razão das intensidades pesado/leve está disponível no CD-ROM no Anexo 03.

A correlação dos sítios entre as réplicas está representada na Figura 10. Conforme observado, as réplicas biológicas mostraram-se consideravelmente reproduzíveis entre si.

**Figura 10: Correlação entre os sítios de fosforilação identificados de cada ponto experimental.**



Em azul está representado o valor da correlação de Pearson. Foram utilizados os valores de  $-\log_2$  da razão pesado/leve para montagem dos gráficos. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 8: Identificação e quantificação dos sítios de fosforilação.

	SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO							
	Identificados em LIT				Quantificados			
	Total	S	T	Y	Total	S	T	Y
<b>TOTAL</b>	<b>3591</b>	<b>2845 (79.2%)</b>	<b>694 (19.3%)</b>	<b>52 (1.4%)</b>	<b>3570</b>	<b>2826 (79.2%)</b>	<b>693 (19.4%)</b>	<b>51 (1.4%)</b>
EPI-3D R1	2385	1934 (81.1%)	427 (17.9%)	24 (1.0%)	2369	1921 (81.1%)	425 (17.9%)	23 (1.0%)
EPI-3D R1 - F10%	1293	1065 (82.4%)	219 (16.9%)	9 (0.7%)	1093	904 (82.7%)	182 (16.7%)	7 (0.6%)
EPI-3D R1 - F14%	1078	883 (81.9%)	188 (17.4%)	7 (0.6%)	906	737 (81.3%)	162 (17.9%)	7 (0.8%)
EPI-3D R1 - F18%	837	676 (80.8%)	157 (18.8%)	4 (0.5%)	717	582 (81.2%)	131 (18.3%)	4 (0.6%)
EPI-3D R1 - F60%	534	437 (81.8%)	93 (17.4%)	4 (0.7%)	451	368 (81.6%)	80 (17.7%)	3 (0.7%)
EPI-3D R2	2399	1937 (80.7%)	438 (18.3%)	24 (1.0%)	2378	1924 (80.9%)	430 (18.1%)	24 (1.0%)
EPI-3D R2 - F10%	1449	1202 (83.0%)	238 (16.4%)	9 (0.6%)	1120	920 (82.1%)	192 (17.1%)	8 (0.7%)
EPI-3D R2 - F14%	1093	899 (82.3%)	187 (17.1%)	7 (0.6%)	835	696 (83.4%)	133 (15.9%)	6 (0.7%)
EPI-3D R2 - F18%	739	595 (80.5%)	141 (19.1%)	3 (0.4%)	587	470 (80.1%)	114 (19.4%)	3 (0.5%)
EPI-3D R2 - F60%	409	333 (81.4%)	73 (17.8%)	3 (0.7%)	284	238 (83.8%)	44 (15.5%)	2 (0.7%)
EPI-5D R1	1586	1308 (82.5%)	269 (17.0%)	9 (0.6%)	1578	1302 (82.5%)	267 (16.9%)	9 (0.6%)
EPI-5D R1 - F10%	993	820 (82.6%)	172 (17.3%)	1 (0.1%)	838	686 (81.9%)	151 (18.0%)	1 (0.1%)
EPI-5D R1 - F14%	732	607 (82.9%)	123 (16.8%)	2 (0.3%)	627	515 (82.1%)	111 (17.7%)	1 (0.2%)
EPI-5D R1 - F18%	288	245 (85.1%)	39 (13.5%)	4 (1.4%)	248	211 (85.1%)	34 (13.7%)	3 (1.2%)
EPI-5D R1 - F60%	198	167 (84.3%)	31 (15.7%)	0 (0.0%)	155	126 (81.3%)	29 (18.7%)	0 (0.0%)
EPI-5D R2	1403	1151 (82.0%)	239 (17.0%)	13 (0.9%)	1397	1145 (82.0%)	239 (17.1%)	13 (0.9%)
EPI-5D R2 - F10%	862	718 (83.3%)	142 (16.5%)	2 (0.2%)	743	616 (82.9%)	125 (16.8%)	2 (0.3%)
EPI-5D R2 - F14%	588	503 (85.5%)	82 (13.9%)	3 (0.5%)	491	414 (84.3%)	74 (15.1%)	3 (0.6%)
EPI-5D R2 - F18%	266	221 (83.1%)	41 (15.4%)	4 (1.5%)	233	192 (82.4%)	38 (16.3%)	3 (1.3%)
EPI-5D R2 - F60%	165	140 (84.8%)	25 (15.2%)	0 (0.0%)	146	123 (84.2%)	23 (15.8%)	0 (0.0%)
ST-5MIN R1	1255	1023 (81.5%)	220 (17.5%)	12 (1.0%)	1250	1018 (81.4%)	220 (17.6%)	12 (1.0%)
ST-5MIN R1 - F10%	619	509 (82.2%)	108 (17.4%)	2 (0.3%)	542	443 (81.7%)	97 (17.9%)	2 (0.4%)
ST-5MIN R1 - F14%	635	524 (82.5%)	109 (17.2%)	2 (0.3%)	537	441 (82.1%)	95 (17.7%)	1 (0.2%)
ST-5MIN R1 - F18%	329	275 (83.6%)	50 (15.2%)	4 (1.2%)	286	241 (84.3%)	42 (14.7%)	3 (1.0%)
ST-5MIN R1 - F60%	152	129 (84.9%)	21 (13.8%)	2 (1.3%)	123	104 (84.6%)	18 (14.6%)	1 (0.8%)
ST-5MIN R2	1602	1311 (81.8%)	279 (17.4%)	12 (0.7%)	1591	1302 (81.8%)	277 (17.4%)	12 (0.8%)
ST-5MIN R2 - F10%	768	639 (83.2%)	126 (16.4%)	3 (0.4%)	652	542 (83.1%)	107 (16.4%)	3 (0.5%)
ST-5MIN R2 - F14%	615	514 (83.6%)	100 (16.3%)	1 (0.2%)	532	439 (82.5%)	92 (17.3%)	1 (0.2%)
ST-5MIN R2 - F18%	687	568 (82.7%)	115 (16.7%)	4 (0.6%)	600	496 (82.7%)	101 (16.8%)	3 (0.5%)
ST-5MIN R2 - F60%	272	221 (81.3%)	49 (18.0%)	2 (0.7%)	232	187 (80.6%)	43 (18.5%)	2 (0.9%)
ST-15MIN R1	2328	1917 (82.3%)	389 (16.7%)	22 (0.9%)	2292	1885 (82.2%)	385 (16.8%)	22 (1.0%)
ST-15MIN R1 - F10%	1197	987 (82.5%)	204 (17.0%)	6 (0.5%)	1013	835 (82.4%)	172 (17.0%)	6 (0.6%)
ST-15MIN R1 - F14%	1142	953 (83.5%)	184 (16.1%)	5 (0.4%)	983	822 (83.6%)	159 (16.2%)	2 (0.2%)
ST-15MIN R1 - F18%	736	610 (82.9%)	118 (16.0%)	8 (1.1%)	617	516 (83.6%)	95 (15.4%)	6 (1.0%)
ST-15MIN R1 - F60%	414	353 (85.3%)	59 (14.3%)	2 (0.5%)	348	298 (85.6%)	48 (13.8%)	2 (0.6%)
ST-15MIN R2	2397	1959 (81.7%)	412 (17.2%)	26 (1.1%)	2361	1930 (81.7%)	407 (17.2%)	24 (1.0%)
ST-15MIN R2 - F10%	1296	1067 (82.3%)	219 (16.9%)	10 (0.8%)	1098	904 (82.3%)	186 (16.9%)	8 (0.7%)
ST-15MIN R2 - F14%	1157	955 (82.5%)	195 (16.9%)	7 (0.6%)	975	805 (82.6%)	167 (17.1%)	3 (0.3%)
ST-15MIN R2 - F18%	744	624 (83.9%)	116 (15.6%)	4 (0.5%)	650	542 (83.4%)	104 (16.0%)	4 (0.6%)
ST-15MIN R2 - F60%	327	280 (85.6%)	45 (13.8%)	2 (0.6%)	269	227 (84.4%)	40 (14.9%)	2 (0.7%)
ST-1H R1	2291	1866 (81.4%)	395 (17.2%)	30 (1.3%)	2274	1850 (81.4%)	394 (17.3%)	30 (1.3%)
ST-1H R1 - F10%	1254	1032 (82.3%)	213 (17.0%)	9 (0.7%)	1088	901 (82.8%)	179 (16.5%)	8 (0.7%)
ST-1H R1 - F14%	1057	876 (82.9%)	174 (16.5%)	7 (0.7%)	900	749 (83.2%)	147 (16.3%)	4 (0.4%)
ST-1H R1 - F18%	592	495 (83.6%)	91 (15.4%)	6 (1.0%)	515	428 (83.1%)	81 (15.7%)	6 (1.2%)
ST-1H R1 - F60%	325	275 (84.6%)	49 (15.1%)	1 (0.3%)	272	236 (86.8%)	36 (13.2%)	0 (0.0%)
ST-1H R2	2328	1902 (81.7%)	400 (17.2%)	26 (1.1%)	2307	1884 (81.7%)	397 (17.2%)	26 (1.1%)
ST-1H R2 - F10%	1230	1010 (82.1%)	214 (17.4%)	6 (0.5%)	1073	886 (82.6%)	181 (16.9%)	6 (0.6%)
ST-1H R2 - F14%	1109	908 (81.9%)	193 (17.4%)	8 (0.7%)	957	779 (81.4%)	171 (17.9%)	7 (0.7%)
ST-1H R2 - F18%	633	535 (84.5%)	96 (15.2%)	2 (0.3%)	537	452 (84.2%)	83 (15.5%)	2 (0.4%)
ST-1H R2 - F60%	319	259 (81.2%)	57 (17.9%)	3 (0.9%)	268	220 (82.1%)	45 (16.8%)	3 (1.1%)
ST-2H R1	2322	1893 (81.5%)	405 (17.4%)	24 (1.0%)	2309	1882 (81.5%)	404 (17.5%)	23 (1.0%)
ST-2H R1 - F10%	1387	1148 (82.8%)	230 (16.6%)	9 (0.6%)	1231	1026 (83.3%)	197 (16.0%)	8 (0.6%)
ST-2H R1 - F14%	632	528 (83.5%)	101 (16.0%)	3 (0.5%)	559	469 (83.9%)	87 (15.6%)	3 (0.5%)
ST-2H R1 - F18%	724	600 (82.9%)	117 (16.2%)	7 (1.0%)	636	525 (82.5%)	104 (16.4%)	7 (1.1%)
ST-2H R1 - F60%	435	360 (82.8%)	72 (16.6%)	3 (0.7%)	373	313 (83.9%)	57 (15.3%)	3 (0.8%)
ST-2H R2	2358	1913 (81.1%)	419 (17.8%)	26 (1.1%)	2336	1894 (81.1%)	417 (17.9%)	25 (1.1%)
ST-2H R2 - F10%	1273	1042 (81.9%)	221 (17.4%)	10 (0.8%)	1100	906 (82.4%)	185 (16.8%)	9 (0.8%)
ST-2H R2 - F14%	1040	862 (82.9%)	173 (16.6%)	5 (0.5%)	907	755 (83.2%)	148 (16.3%)	4 (0.4%)
ST-2H R2 - F18%	733	599 (81.7%)	127 (17.3%)	7 (1.0%)	630	517 (82.1%)	108 (17.1%)	5 (0.8%)
ST-2H R2 - F60%	457	371 (81.2%)	80 (17.5%)	6 (1.3%)	398	325 (81.7%)	67 (16.8%)	6 (1.5%)

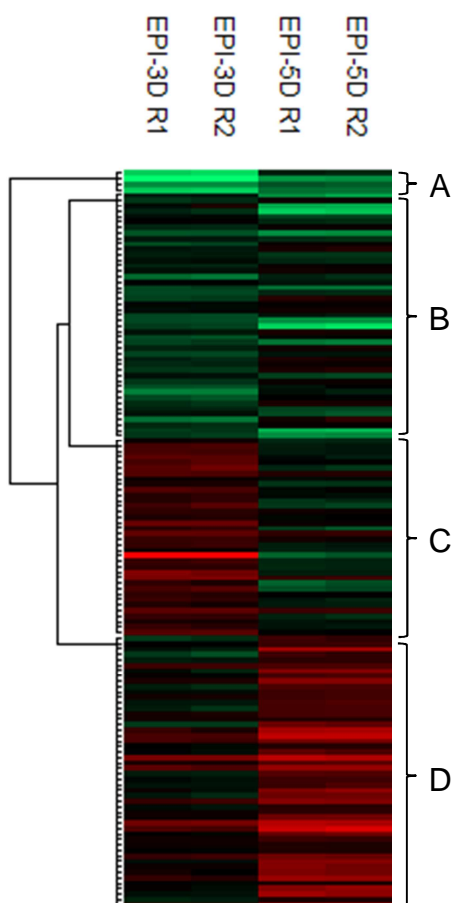
EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente. F10%, F14%, F18% e F60% - referem-se às diferentes concentrações de ACN resultantes da eluição da FR básica.

Para avaliar o perfil dos sítios de fosforilação modulados entre os diferentes pontos experimentais foram realizadas diferentes análises, considerando somente os fosfossítios quantificados em todos os pontos experimentais. Inicialmente foram verificados os sítios diferencialmente expressos separadamente, assim como na proteômica, comparando os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D, que estão relacionados a diferenças de cultivo celular, ou seja, fase exponencial e fase estacionária, respectivamente; e uma segunda análise entre os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H), para verificar quais são as proteínas diferencialmente expressas ao longo do estresse.

Entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D foram selecionados os sítios de fosforilação com intensidade nas duas réplicas dos dois pontos experimentais, um total de 911 sítios. Para determinação dos fosfossítios modulados, foi utilizado um FDR de 10% e o teste estatístico Benjamini-Hochberg, resultando num total de 135 fosfossítios, que foram selecionados para análises posteriores. Esses sítios de fosforilação modulados foram agrupados em 4 clusters (Figura 11) e no Anexo 04, disponível no CD-ROM, estão listadas todos os fosfossítios, separadas por cluster.



Figura 11: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos EPI-3D e EPI-5D.



Em verde estão representados os sítios de fosforilação diminuídos em verde, e aumentados em vermelho. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.

Dentre os fosfossítios considerados modulados foram selecionados aqueles com diferença na intensidade superior a 50% para serem analisadas posteriormente, sendo que apresentam um aumento na expressão estão representadas na Tabela 9, já as que diminuem a expressão estão representadas na Tabela 10.



**Tabela 9: Sítios de fosforilação com 50% de aumento entre os pontos EPI-3D e EPI-5D.**

Cluster	Amino ácido	Posição	IDs Uniprot	IDs TriTryp	Nome	Probabilidade da Localização	p-valor
A	S	71	Q4E4T4	Tc00.1047053508461.270	Rab7 GTP binding protein, putative	1,000	2,14E-03
	S	2	Q4E4L9	Tc00.1047053506925.300	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,000	4,09E-03
	S	2	Q4CZR0	Tc00.1047053503715.30	Small GTP-binding protein Rab1, putative	1,000	1,31E-03
B	S	337	Q4E0H1	Tc00.1047053510155.50	Uncharacterized protein	1,000	5,65E-03
	S	863	Q4DS87	Tc00.1047053510759.70	Uncharacterized protein	1,000	1,47E-02
	S	410;83	Q4DGP9; Q4DX97	Tc00.1047053506835.60; Tc00.1047053506945.10	Calmodulin, putative	0,967	4,15E-03
	S	224	Q4DBG6	Tc00.1047053506327.50	Uncharacterized protein	1,000	5,75E-03
	S	13	Q4D8M9	Tc00.1047053506221.70	Uncharacterized protein	1,000	1,38E-02
	S	711	Q4D4G8	Tc00.1047053508443.30	Uncharacterized protein	1,000	5,51E-03
	S	443	Q4D3W7	Tc00.1047053510735.90	Uncharacterized protein	0,910	1,88E-03
	S	538	Q4D2S7	Tc00.1047053506389.60	Uncharacterized protein	1,000	1,31E-02
	S	85	Q4D2Q1	Tc00.1047053507005.40	Zinc finger protein, putative	1,000	6,21E-03
	S	1056	Q4D0I8	Tc00.1047053507389.30	Uncharacterized protein	0,944	1,01E-02
	S	722	Q4CZS0	Tc00.1047053509789.59	Uncharacterized protein (Fragment)	1,000	6,08E-03
	S	130	Q4CVJ1	Tc00.1047053504199.20	Uncharacterized protein	1,000	1,04E-02
	D	T	207	Q4E594	Tc00.1047053506559.360	Uncharacterized protein	0,991
T		1364	Q4CY04	Tc00.1047053503643.20	Uncharacterized protein	1,000	1,66E-03
S		270	Q4E651	Tc00.1047053508153.390	Uncharacterized protein	1,000	1,09E-02
S		368	Q4E574	Tc00.1047053506559.540	Uncharacterized protein	1,000	2,11E-03
S		344	Q4E2Q9	Tc00.1047053504153.240	Uncharacterized protein	1,000	7,54E-03
S		394	Q4E0H1	Tc00.1047053510155.50	Uncharacterized protein	1,000	1,22E-02
S		237	Q4E162	Tc00.1047053511585.190	obable eukaryotic initiation factor 4A	1,000	2,91E-05
S		506	Q4DXQ2	Tc00.1047053510421.310	Uncharacterized protein	0,970	5,19E-03
S		196	Q4DX97	Tc00.1047053506945.10	Uncharacterized protein (Fragment)	1,000	1,13E-03
S		137	Q4DX29	Tc00.1047053508831.4	Dynein heavy chain, putative (Fragment)	1,000	2,13E-03
S		13	Q4DWC8	Tc00.1047053509733.60	Uncharacterized protein	1,000	1,12E-02
S		307	Q4DRY8	Tc00.1047053508307.70	Uncharacterized protein	1,000	1,72E-03
S		15	Q4DRF1	Tc00.1047053508547.160	Uncharacterized protein	1,000	1,11E-02
S		30	Q4DPW6	Tc00.1047053507049.170	33 kDa inner dynein arm light chain, axonemal, putative	1,000	2,48E-05
S		336	Q4DMJ9	Tc00.1047053508815.50	Uncharacterized protein	1,000	1,11E-02
S		133	Q4DM21	Tc00.1047053511577.140	Uncharacterized protein	0,999	7,13E-03
S		777;693	Q4DI61; Q4E2W9	Tc00.1047053509151.10; Tc00.1047053508175.280	Uncharacterized protein	1,000	4,40E-04
S		231	Q4DHG6	Tc00.1047053506445.30	Cation transporter, putative	1,000	4,10E-03
S		1895	Q4DD65	Tc00.1047053503975.100	Uncharacterized protein	1,000	1,30E-02
S		282	Q4DBG5	Tc00.1047053506327.60	Uncharacterized protein	1,000	1,17E-02
S		71	Q4DAV2	Tc00.1047053504069.120	Amino acid transporter, putative	1,000	3,61E-03
S		61	Q4D9L7	Tc00.1047053510579.70	Nascent polypeptide associated complex subunit, putative	1,000	3,41E-03
S		235	Q4CY11	Tc00.1047053510797.30	Uncharacterized protein	1,000	5,35E-04
S		442	Q4D4H6	Tc00.1047053506399.30	Uncharacterized protein	1,000	6,63E-03
S		259	Q4CTP2	Tc00.1047053511743.20	Uncharacterized protein	0,944	4,37E-03
S		346	Q4CPQ6	Tc00.1047053505985.9	Calpain cysteine peptidase, putative (Fragment)	1,000	2,57E-04
S		334	Q4CPF3	Tc00.1047053506165.10	Uncharacterized protein	0,988	6,71E-03
S		21	Q4DN96	Tc00.1047053508541.225	Casein kinase, putative	1,000	1,23E-02
S		67	Q4CMS9	Tc00.1047053511763.19	Uncharacterized protein (Fragment)	1,000	7,80E-03
S		229;229	Q4CM66; Q4DHA3	Tc00.1047053509651.10; Tc00.1047053511285.30	Uncharacterized protein	1,000	7,11E-03
S		11	Q4CM64	Tc00.1047053511023.19	Uncharacterized protein (Fragment)	1,000	3,63E-03
S		214	Q4CU35	Tc00.1047053511573.10	Leucine-rich repeat protein, putative (Fragment)	0,983	3,68E-03
S		235	Q4CLW8	Tc00.1047053505683.10	Sterol 24-c-methyltransferase, putative	1,000	2,68E-03

Aminoácido e Posição - indicam em qual o aminoácido e em qual posição na proteína ocorre a fosforilação. IDs UniProt e IDs TriTryp – código da proteína em que o fosfossítios no banco de dados UniProt e TriTryp, respectivamente. Probabilidade da localização – probabilidade de que a localização do fosfossítios esteja correta dentro da proteína.

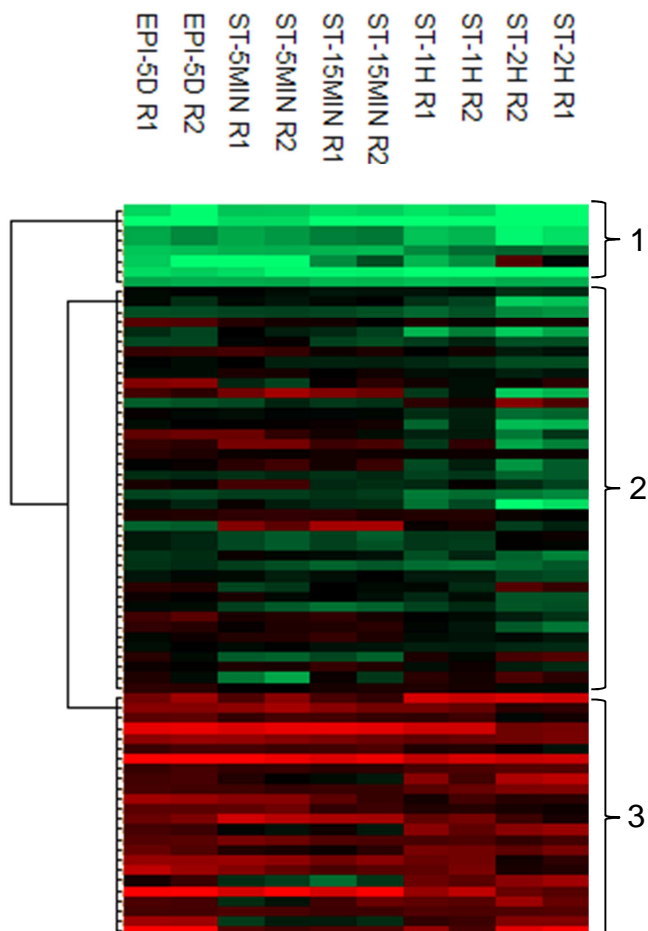
**Tabela 10: Sítios de fosforilação com 50% de diminuição entre os pontos EPI-3D e EPI-5D.**

Cluster	Amino ácido	Posição	IDs Uniprot	IDs TriTryp	Nome	Probabilidade da Localização	p-valor
B	T	285	Q4E3W3	Tc00.1047053510629.460	Uncharacterized protein	0,986	9,96E-03
	T	39	Q4E1C8	Tc00.1047053511807.160	Uncharacterized protein	0,989	1,07E-02
	T	209	Q4E1C8	Tc00.1047053511807.160	Uncharacterized protein	1,000	3,26E-03
	T	307	Q4DMR7	Tc00.1047053511545.140	Uncharacterized protein	0,998	3,31E-03
	S	96	Q4DFL2	Tc00.1047053508323.100	I/6 autoantigen, putative	1,000	5,03E-04
	S	124	Q4DF41	Tc00.1047053508177.70	Uncharacterized protein	1,000	3,90E-03
	S	484	Q4CRE8	Tc00.1047053504933.30	Uncharacterized protein	1,000	2,09E-03
	S	24	Q4CRE8	Tc00.1047053504933.30	Uncharacterized protein	1,000	4,32E-03
C	T	212	Q4DK03	Tc00.1047053509671.10	Uncharacterized protein	0,971	3,23E-03
	T	209	Q4DK03	Tc00.1047053509671.10	Uncharacterized protein	1,000	1,52E-03
	T	204	Q4DJV8	Tc00.1047053511717.30	Uncharacterized protein	1,000	1,08E-02
	T	168	Q4D531	Tc00.1047053510835.40	60S ribosomal protein L7a, putative	1,000	1,06E-02
	T	169	Q4CWW8	Tc00.1047053509037.40	Eukaryotic translation initiation factor 4E, putative	1,000	9,78E-03
	S	373	Q4E2K6	Tc00.1047053508479.180	Uncharacterized protein	1,000	1,47E-03
	S	96	Q4E1J8	Tc00.1047053508909.330	Protein kinase, putative	1,000	9,24E-03
	S	378;378	Q4DZE8; Q4E2Y9	Tc00.1047053506825.150; Tc00.1047053508175.50	Uncharacterized protein	0,835	1,06E-02
	S	707;707	Q4DZE8; Q4E2Y9	Tc00.1047053506825.150; Tc00.1047053508175.50	Uncharacterized protein	1,000	1,18E-02
	S	308	Q4DS38	Tc00.1047053506475.120	Uncharacterized protein	1,000	1,32E-05
	S	912	Q4DMN4	Tc00.1047053510055.50	Uncharacterized protein	1,000	1,32E-02
	S	144	Q4DLU1	Tc00.1047053509683.30	Uncharacterized protein	1,000	3,28E-03
	S	343	Q4DK03	Tc00.1047053509671.10	Uncharacterized protein	0,999	1,37E-03
	S	299	Q4DK03	Tc00.1047053509671.10	Uncharacterized protein	0,990	2,06E-03
	S	296	Q4DK03	Tc00.1047053509671.10	Uncharacterized protein	1,000	7,52E-04
	S	29	Q4DJS5	Tc00.1047053509237.151	Calpain-like cysteine peptidase, putative (Fragment)	1,000	3,27E-03
	S	277	Q4DGL3	Tc00.1047053511671.130	Uncharacterized protein	1,000	8,62E-03
	S	778	Q4DEU5	Tc00.1047053511753.110	Uncharacterized protein	1,000	1,38E-02
	S	588	Q4DDK9	Tc00.1047053511293.60	Kinesin-like protein	1,000	4,74E-03
	S	127	Q4DJV7	Tc00.1047053511717.40	Uncharacterized protein	1,000	1,04E-02
S	378	Q4CY10	Tc00.1047053511267.24	Uncharacterized protein	1,000	4,85E-03	
S	892	Q4CSI2	Tc00.1047053506441.20	Uncharacterized protein	1,000	1,10E-02	
S	182	Q4D481	Tc00.1047053506949.30	Uncharacterized protein	1,000	1,33E-03	

Aminoácido e Posição - indicam em qual o aminoácido e em qual posição na proteína ocorre a fosforilação. IDs UniProt e IDs TriTryp – código da proteína em que o fosfotio no banco de dados UniProt e TriTryp, respectivamente. Probabilidade da localização – probabilidade de que a localização do fosfotio esteja correta dentro da proteína.

Em seguida, foram verificados os fosfotios modulados entre os diferentes pontos de estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H), também só foram considerados os sítios de fosforilação com intensidade nas duas réplicas de todos os cinco pontos experimentais, um total de 650 sítios. Foram selecionados os fosfotios com FDR de 10%, utilizando o teste estatístico Benjamini-Hochberg, resultando em 72 sítios modulados ao longo do estresse, que foram selecionadas para as análises posteriores. Estes fosfotios foram distribuídas em 3 clusters, com base em seu perfil de expressão (Figura 12).

**Figura 12: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H.**



Em verde estão representadas as proteínas com expressão diminuída e em vermelho, as proteínas com expressão aumentada. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H – epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.

Dentre os fosfosítios considerados modulados foram selecionados aqueles com diferença na intensidade superior a 50% para serem analisadas posteriormente, sendo que apresentam um aumento na expressão estão representadas na Tabela 11, já as que diminuem a expressão estão representadas na Tabela 12.

**Tabela 11: Grupos de Sítios de Fosforilação aumentados durante os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H).**

Cluster	Amino ácido	Posição	IDs Uniprot	IDs TriTryp	Nome	Probabilidade de Localização	p-valor
1	S	31	Q4D740	Tc00.1047053506863.80	Serine/threonine protein phosphatase, putative	0,999	1,04E-02
	S	52	Q4DFP4	Tc00.1047053509911.124	Uncharacterized protein	1,000	8,84E-05
2	S	6	Q4DSF3	Tc00.1047053504057.40	Uncharacterized protein	1,000	1,87E-03
	S	165	Q4CL50	Tc00.1047053474937.9	Acetyl-CoA carboxylase, putative (Fragment)	0,986	8,43E-03
	S	825	Q4D6H3	Tc00.1047053509247.30	Uncharacterized protein	0,990	2,47E-03
	S	380	Q4D4Q4	Tc00.1047053506229.10	Mitogen-activated protein kinase, putative	1,000	1,93E-03
	S	100	Q4DKK7	Tc00.1047053509999.70	Uncharacterized protein	1,000	3,55E-03
3	S	374	Q4DBM7	Tc00.1047053509105.140	Heat shock protein 85, putative	1,000	8,94E-03
	S	13	Q4D8M9	Tc00.1047053506221.70	Uncharacterized protein	1,000	1,91E-03
	S	125	Q4DPH0	Tc00.1047053510861.125	Uncharacterized protein	1,000	7,34E-04
	S	216	Q4CL50	Tc00.1047053474937.9	Acetyl-CoA carboxylase, putative (Fragment)	1,000	3,72E-05
	S	11	Q4CM64	Tc00.1047053511023.19	Uncharacterized protein (Fragment)	1,000	2,12E-03
	T	533	Q4D634	Tc00.1047053509617.20	Paraflagellar rod protein 3, putative	1,000	6,84E-03

Aminoácido e Posição - indicam em qual o aminoácido e em qual posição na proteína ocorre a fosforilação. IDs UniProt e IDs TriTryp – código da proteína em que o fosfotio no banco de dados UniProt e TriTryp, respectivamente. Probabilidade da localização – probabilidade de que a localização do fosfotio esteja correta dentro da proteína.

**Tabela 12: Grupos de Sítios de Fosforilação diminuídos durante os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H).**

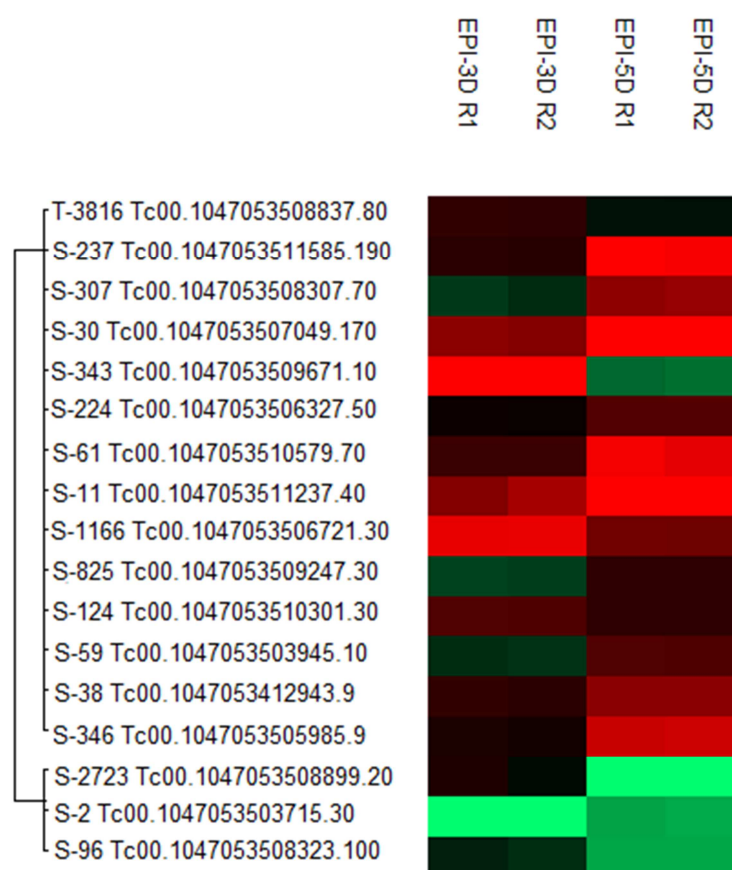
Cluster	Amino ácido	Posição	IDs Uniprot	IDs TriTryp	Nome	Probabilidade de Localização	p-valor
1	S	24	Q4CRE8	Tc00.1047053504933.30	Uncharacterized protein	1,000	2,72E-04
	T	209	Q4E1C8	Tc00.1047053511807.160	Uncharacterized protein	1,000	4,33E-04
2	S	13	Q4DWC8	Tc00.1047053509733.60	Uncharacterized protein	1,000	2,70E-03
	S	283	Q4DMH1	Tc00.1047053508881.140	Uncharacterized protein	1,000	7,05E-03
	T	748	Q4DMM0	Tc00.1047053504021.10	CYC2-like cyclin, putative	0,999	2,01E-04
	T	169	Q4CWW8	Tc00.1047053509037.40	Eukaryotic translation initiation factor 4E, putative	1,000	4,53E-03
	S	212	Q4DUQ2	Tc00.1047053504149.110	GTP-binding protein, putative	1,000	1,75E-04
	S	90	Q4DPW3	Tc00.1047053507049.199	Pumilio protein, putative (Fragment)	1,000	1,54E-04
	S	747	Q4DMM0	Tc00.1047053504021.10	CYC2-like cyclin, putative	0,613	1,83E-03
	S	226	Q4DM74	Tc00.1047053508515.30	Uncharacterized protein	1,000	4,73E-03
	S	268	Q4DH07	Tc00.1047053511809.10	Uncharacterized protein	0,988	6,66E-04
	S	163	Q4D0X9	Tc00.1047053510663.40	Uncharacterized protein	1,000	2,41E-03
	S	121	Q4DF80	Tc00.1047053507087.30	Ubiquitin hydrolase, putative	1,000	6,51E-04
	S	78	Q4DJ00	Tc00.1047053511287.110	Uncharacterized protein	1,000	4,34E-03
	3	S	264	Q4DEX7	Tc00.1047053510515.30	Uncharacterized protein	1,000
S		230	Q4D3F7	Tc00.1047053508719.70	Uncharacterized protein	1,000	1,10E-02
S		224	Q4DKW9	Tc00.1047053506337.220	Uncharacterized protein	1,000	6,85E-03
S		268	Q4DH07	Tc00.1047053511809.10	Uncharacterized protein	0,988	6,66E-04
S		143	Q4E3A4	Tc00.1047053508355.250	60S acidic ribosomal protein P0	0,999	4,31E-05
S		777;693	Q4DI61; Q4E2W9	Tc00.1047053509151.10; Tc00.1047053508175.280	Uncharacterized protein	1,000	5,11E-03
S		419;420	Q4D404; Q4DK60	Tc00.1047053511865.10; Tc00.1047053511871.90	Uncharacterized protein	1,000	7,90E-04
S		339	Q4D3N8	Tc00.1047053508951.90	Uncharacterized protein (Fragment)	0,988	4,21E-03
S		103	Q4CTX1	Tc00.1047053507891.38	Flagellar calcium-binding protein, putative	1,000	6,53E-03
S		277	Q4DGL3	Tc00.1047053511671.130	Uncharacterized protein	1,000	1,78E-03

Aminoácido e Posição - indicam em qual o aminoácido e em qual posição na proteína ocorre a fosforilação. IDs UniProt e IDs TriTryp – código da proteína em que o fosfotio no banco de dados UniProt e TriTryp, respectivamente. Probabilidade da localização – probabilidade de que a localização do fosfotio esteja correta dentro da proteína.

Em seguida, foi realizada a normalização das razões das intensidades dos sítios de fosforilação pelas razões das intensidades das proteínas, pois os sítios de fosforilação podem estar alterados em decorrência da expressão da proteína, podendo não se tratar de uma alteração no sítio de fosforilação. Esta

análise, com normalização, é mais estrigente, pois somente foram considerados os sítios que possuísem intensidade em todas as réplicas (com e sem enriquecimento de fosfopeptídeos). Inicialmente foi realizada a comparação entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D, que estão relacionados a diferenças de cultivo celular, ou seja, fase exponencial e fase estacionária, respectivamente. Um total de 943 sítios de fosforilação obtiveram intensidade nas duas réplicas dos dois pontos experimentais, tanto nas amostras sem enriquecimento, quanto nas amostras com enriquecimento de fosfopeptídeos. Para determinação dos fosfosítios modulados, foi utilizado um FDR de 10% e o teste estatístico Benjamini-Hochberg, resultando num total de 17 fosfosítios, que foram selecionados para análises posteriores e estão representados na Figura 13 e listados na Tabela 13.

**Figura 13: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H.**



Em verde estão representados os sítios de fosforilação diminuídos em verde, e aumentados em vermelho. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 13: Grupos de Sítios de Fosforilação regulados entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D.**

Amino ácido	Posição	IDs UniProt	IDs TriTryp	Nome	Probabilidade de Localização	p-valor
T	3816	Q4DUG1	Tc00.1047053508837.80	Uncharacterized protein	1.000	1.04E-03
S	237	Q4E162	Tc00.1047053511585.190	Probable eukaryotic initiation factor 4A	1.000	2.62E-04
S	307	Q4DRY8	Tc00.1047053508307.70	Uncharacterized protein	1.000	1.76E-03
S	30	Q4DPW6	Tc00.1047053507049.170	33 kDa inner dynein arm light chain, axonemal, putative	1.000	1.27E-03
S	343	Q4DK03	Tc00.1047053509671.10	Uncharacterized protein	0.999	8.45E-05
S	224	Q4DBG6	Tc00.1047053506327.50	Uncharacterized protein	1.000	1.13E-03
S	61	Q4D9L7	Tc00.1047053510579.70	Nascent polypeptide associated complex subunit, putative	1.000	2.01E-03
S	11	Q4D7D0	Tc00.1047053511237.40	Phosphatidate cytidylyltransferase	1.000	1.80E-03
S	1166	Q4D6J0	Tc00.1047053506721.30	Calpain-like cysteine peptidase, putative	1.000	2.25E-04
S	825	Q4D6H3	Tc00.1047053509247.30	Uncharacterized protein	0.990	5.87E-04
S	124	Q4D0P9	Tc00.1047053510301.30	Uncharacterized protein	1.000	9.91E-04
S	59	Q4CQB1	Tc00.1047053503945.10	Eukaryotic translation initiation factor 1A, putative (Fragment)	1.000	8.43E-04
S	38	Q4CKQ7	Tc00.1047053412943.9	Uncharacterized protein (Fragment)	0.999	2.06E-03
S	346	Q4CPQ6	Tc00.1047053505985.9	Calpain cysteine peptidase, putative (Fragment)	1.000	6.40E-04
S	2723	Q4DMQ0	Tc00.1047053508899.20	Uncharacterized protein	0.993	2.81E-03
S	2	Q4CZR0	Tc00.1047053503715.30	Small GTP-binding protein Rab1, putative	1.000	1.79E-03
S	96	Q4DFL2	Tc00.1047053508323.100	I/6 autoantigen, putative	1.000	2.62E-03

Aminoácido e Posição - indicam em qual o aminoácido e em qual posição na proteína ocorre a fosforilação. IDs UniProt e IDs TriTryp – código da proteína em que o fosfotio no banco de dados UniProt e TriTryp, respectivamente. Probabilidade da localização – probabilidade de que a localização do fosfotio esteja correta dentro da proteína.

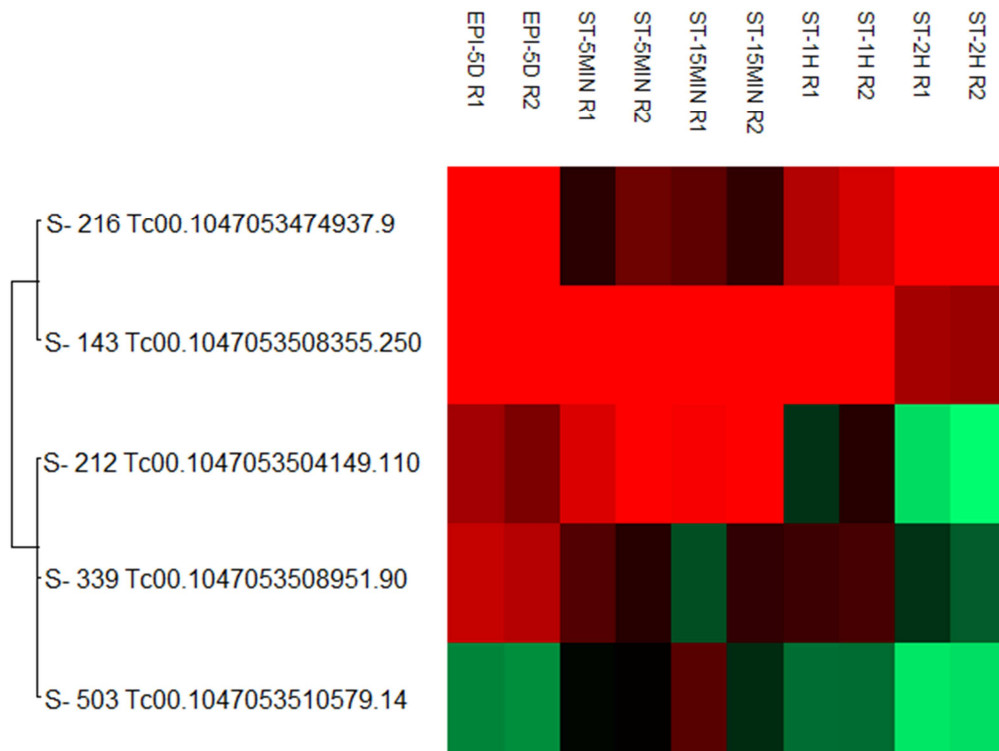
Na segunda análise, entre os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H) após a normalização, um total de 414 sítios de fosforilação obtiveram intensidade nas duas réplicas dos dois pontos experimentais, tanto nas amostras sem enriquecimento, quanto nas amostras com enriquecimento de fosfopeptídeos. Para determinação dos fosfotios modulados, foi utilizado um FDR de 20% e o teste estatístico Benjamini-Hochberg, resultando num total de 5 fosfotios, que foram selecionados para análises posteriores e estão representados na Figura 14 e listados na Tabela 14.

**Tabela 14: Grupos de Sítios de Fosforilação considerados diferencialmente expressos ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H) após a normalização com as intensidades das proteínas.**

Amino ácido	Posição	IDs UniProt	IDs TriTryp	Nome	Probabilidade de Localização	p-valor
S	216	Q4CL50	Tc00.1047053474937.9	Acetyl-CoA carboxylase, putative (Fragment)	1,000	1,89E-03
S	143	Q4E3A4	Tc00.1047053508355.250	60S acidic ribosomal protein P0	0,999	9,84E-05
S	212	Q4DUQ2	Tc00.1047053504149.110	GTP-binding protein, putative	1,000	1,84E-03
S	339	Q4D3N8	Tc00.1047053508951.90	Uncharacterized protein (Fragment)	0,988	1,77E-03
S	503	Q4D9M3	Tc00.1047053510579.14	Uncharacterized protein	1,000	7,97E-06

Aminoácido e Posição - indicam em qual o aminoácido e em qual posição na proteína ocorre a fosforilação. IDs UniProt e IDs TriTryp – código da proteína em que o fosfotio no banco de dados UniProt e TriTryp, respectivamente. Probabilidade da localização – probabilidade de que a localização do fosfotio esteja correta dentro da proteína.

**Figura 14: Agrupamento dos sítios de fosforilação regulados entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H.**



Em verde estão representadas as proteínas com expressão diminuída e em vermelho, as proteínas com expressão aumentada. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H – epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. R1 e R2 - réplicas biológicas 1 e 2, respectivamente.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES CONDIÇÕES DE METACICLOGÊNESES *IN VITRO*

Na metaciclogênese *in vitro* descrita por Bonaldo (1988), as formas epimastigotas de *T. cruzi* com 5 dias de cultivo (fase estacionária), são estressadas através da incubação em um meio pobre em nutrientes (meio TAU) que mimetiza as condições encontradas no intestino do inseto hospedeiro, por duas horas. Após este período, os parasitas são transferidos para uma garrafa de cultivo contendo o meio TAU3AAG. Depois de 96 horas, são encontradas formas tripomastigotas metacíclicas no sobrenadante, além de algumas formas epimastigotas que não se diferenciaram.

A fim de verificar a importância do estresse nutricional para o processo de diferenciação, foram realizadas diversas metaciclogêneses *in vitro*, a partir de epimastigotas em diferentes estágios de crescimento (3 dias, 4 dias, 5 dias), com várias condições de estresse nutricional: com ou sem incubação em meio TAU, e também, com tempos de incubação distintos (5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas). Após 96 horas, foi realizada a contagem diferencial dos parasitas e os resultados obtidos estão representados na Figura 5.

Nossos resultados mostram que a metaciclogênese a partir de células em fase estacionária (5 dias) estressadas por 2 horas de incubação em meio TAU é mais eficiente (32% de metacíclicos) em relação às demais condições testadas, assim como proposto por Bonaldo (1988). Esses dados também corroboram com Hernández (2012) que sugere que a fase estacionária é um estágio pré-adaptativo para a metaciclogênese.

Nas metaciclogêneses realizadas a partir de parasitas em fase exponencial de crescimento (3 dias) houve uma baixa eficiência da metaciclogênese (em média 12%), e não houveram diferenças significativas entre a metaciclogênese com estresse nutricional em meio TAU, ou sem esta etapa. Para as metaciclogêneses realizadas a partir de parasitas com 4 dias de cultivo, também não houveram diferenças significativas entre a



metacicloênese com estresse nutricional em meio TAU, ou sem esta etapa, porém a eficiência da metacicloênese dobrou em relação à metacicloênese a partir de células com 3 dias de cultivo (de 14% para 32%). Já para as metacicloênese a partir de parasitas em fase estacionária (5 dias), apesar de não haver muita diferença entre a eficiência da metacicloênese sem a incubação em meio TAU e os demais pontos, há uma grande diminuição na quantidade de parasitas aderidos e um grande aumento das formas epimastigotas no sobrenadante, sugerindo que o estresse em meio TAU leva os parasitas em fase estacionária a aderirem às garrafas de cultivo e, sabe-se que a adesão é fundamental para a diferenciação do parasita (BONALDO et al., 1988; FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000; HERNÁNDEZ et al., 2012).

Os diferentes tempos de estresse nutricional nos parasitas com 5 dias de cultivo, com exceção de 2 horas, não apresentaram diferenças significativas na eficiência da metacicloênese (em média 24%).

## 5.2. ANÁLISES PROTEÔMICAS

Em experimentos de proteômica *bottom-up* baseada em espectrometria de massas, as proteínas são digeridas por uma protease gerando peptídeos. Estes, por sua vez, são separados por hidrofobicidade através de cromatografia líquida de alta performance acoplada a um espectrômetro de massas (MS), onde são analisados. O MS gera o espectro de massas que representa a intensidade do sinal na escala  $m/z$ . Tipicamente, são selecionados os peptídeos mais intensos para fragmentação, gerando os espectros MS/MS. As informações geradas no espectrômetro de massas são combinadas com o banco de dados através de ferramentas de busca, resultando na identificação dos peptídeos.

Sabe-se que nem todos os peptídeos que são fragmentados contribuem para a identificação. Peptídeos com baixas intensidades na amostra podem gerar espectros MS/MS de baixa qualidade e, portanto, não podem ser identificados com confiabilidade (COX; MANN, 2007, 2008). Neste trabalho, das amostras destinadas a proteômica, uma média de 40% dos espectros

MS/MS foi identificada. No total, foram identificados 5.405 grupos de proteína. Mesmo as formas de vida epimastigota e epimastigota sob estresse nutricional sendo muito similares morfológicamente, obtivemos uma cobertura maior do proteoma de *T. cruzi* do que os trabalhos já publicados para esse parasita até o momento. Atwood III (2005) contemplou diferentes os quatro diferentes estágios de desenvolvimento do parasita e identificou 1.168 grupos de proteínas já, de Godoy (2012), identificou 3.094 grupos de proteínas em 5 diferentes pontos ao longo da metacicloênese.

Realizamos a comparação entre a quantidade de proteínas identificadas no trabalho anterior de nosso grupo. Como foram utilizados métodos quantitativos diferentes nos dois trabalhos, de Godoy (2012) utilizou a técnica *Label-Free* (LFQ) e neste trabalho foi utilizada a técnica SILAC, não é possível uma comparação exata entre os grupos de proteínas identificados, pois não é possível realizar uma mesma análise no MaxQuant contendo os dados dos dois trabalhos. Portanto foi realizada uma comparação entre as proteínas separadamente, ou seja, as proteínas que estavam em um mesmo grupo de proteínas foram separadas. Com o desagrupamento dos grupos de proteínas, de Godoy (2012) identificou 5.002 proteínas, sendo que dessas, 294 proteínas não puderam ser comparadas devido à utilização de bancos de dados diferentes nos trabalhos, neste foi utilizado o banco disponibilizado no portal UniProt (<http://www.uniprot.org/>), que possui menos sequências, porém apresenta a vantagem de possuir as anotações GO, enquanto que no trabalho anterior foi utilizado o banco de dados disponibilizado no portal TriTryp (<http://www.tritrypdb.org/tritrypdb/>). A comparação entre as coberturas obtidas nos dois trabalhos está representada na Figura 15.

**Figura 15: Comparação entre os proteomas de Godoy (2012) e o obtido neste trabalho de *Trypanosoma cruzi*.**

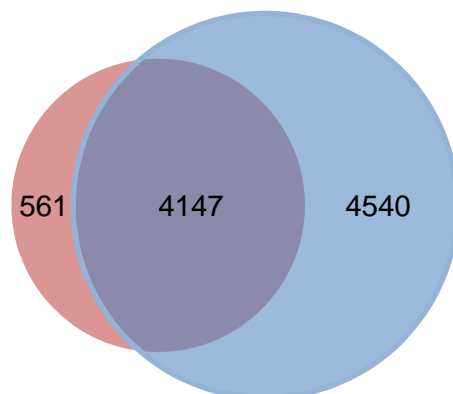


Diagrama de Venn comparando os dados de Godoy (2012) com os dados gerados neste trabalho. O círculo rosa representa as proteínas identificadas no trabalho de Godoy (2012). O círculo azul representa as proteínas identificadas neste trabalho.

Esse aumento na cobertura do proteoma deve-se ao uso de algumas técnicas, como por exemplo, o pré-fracionamento dos peptídeos por FR básica em 4 diferentes frações através da eluição dos peptídeos ligados a colunas FR com diferentes concentrações de ACN (10%, 14%, 18% e 60%), gerando 4 diferentes frações. Cada fração contribui em média 60% (houve sobreposição de identificação entre as frações) para a identificação de cada ponto experimental. Quando é realizado o fracionamento das amostras a abundância das proteínas é aumentada em cada fração, facilitando sua identificação (MANN et al., 2013).

Outra estratégia utilizada neste trabalho que contribuiu para uma maior cobertura do proteoma foi utilização de uma coluna longa (30 centímetros) na cromatografia líquida, com *beads* menores (1,9  $\mu\text{m}$ ) e aquecimento da coluna, permitindo uma melhor separação dos peptídeos. Burgess (2014) demonstrou que o uso de colunas de 30 centímetros com *beads* de 1,9  $\mu\text{m}$  resultou num aumento significativo no número de identificações quando comparadas a experimentos utilizando colunas de 12 centímetros com *beads* de 3  $\mu\text{m}$ . Além de que, o uso de aquecimento reduzia a largura do pico, resultando no aumento da resolução.

### 5.2.1. Proteínas diferencialmente expressas nos pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D

Foram consideradas 452 proteínas como diferencialmente expressas entre EPI-3D e EPI-5D, demonstrando a grande diferença entre o perfis proteicos dos distintos estágios de cultivo celular, fase exponencial (EPI-3D) e fase estacionária (EPI-5D), corroborando com a teoria de que a fase estacionária é um estágio pré-diferenciação (HERNÁNDEZ et al., 2012).

Estas proteínas foram agrupadas em 4 clusters (A a D) de acordo com seu perfil de expressão. As proteínas com mais de 50% de diferença na expressão (0,58 em escala log) entre os diferentes pontos experimentais foram selecionadas para a discussão.

#### 5.2.1.1.Cluster A

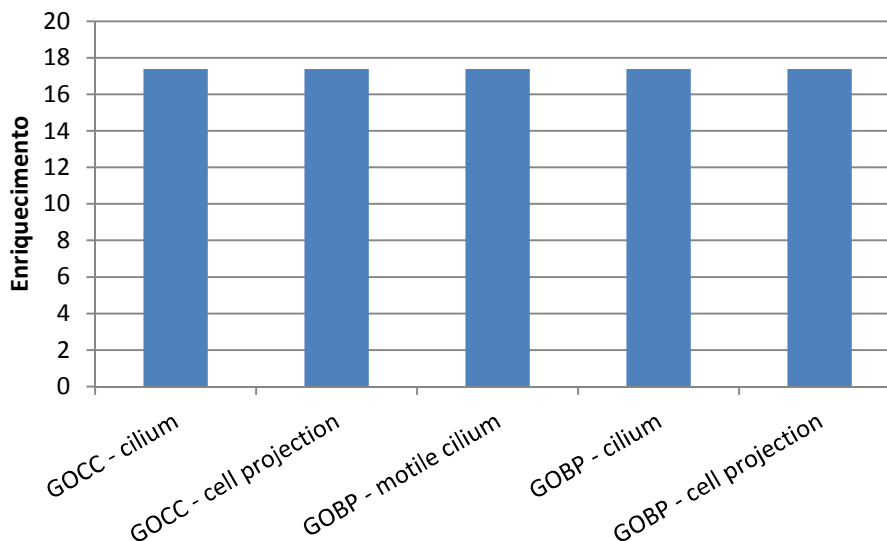
No cluster A foram agrupadas 26 proteínas que apresentam aumento e diminuição na expressão entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D (Figura 16), sendo que 8 proteínas (Tabela 3) possuem mais de 50% de aumento na expressão entre os dois pontos experimentais. Este cluster está enriquecido para alguns termos GO associados à motilidade (*cillium*, *motile cillium*, *cell projection*) (Figura 17). A forma epimastigota em fase estacionária apresenta um corpo celular mais fino, em comparação com o parasita em fase exponencial, além de possuir um flagelo mais alongado (HERNÁNDEZ et al., 2012).

**Figura 16: Perfil de expressão do Cluster A**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias.

**Figura 17: Enriquecimento de termos GO no Cluster A**



Enriquecimento - enriquecimento de termos GO calculados com base na fórmula representada na Figura 8. GOMF – classe de ontologia gênica de funções moleculares. GOCC – classe de ontologia gênica de compartimentos celulares. GOBP – classe de ontologia gênica de processos biológicos.

Na Tabela 3 estão descritas todas as proteínas com mais de 50% de aumento em EPI-5D, entre elas estão agrupadas várias relacionadas à haste paraflagelar (Tc00.1047053511215.119; Tc00.1047053508961.79 – *69kDa paraflagellar rod protein* e Tc00.1047053509617.20 – *paraflagellar rod protein 3*), inclusive a proteína hipotética Tc00.1047053508547.160, que pertence à mesma família (*Paraflagellar rod*), informações obtidas no site <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>. A haste paraflagelar é uma estrutura única de Kinetoplastideos, Euglenóides e Dinoflagelados. Em forma de treliça, esta estrutura corre em paralelo ao axonema dentro da membrana flagelar (BALLESTEROS-RODEA et al., 2012). Várias alterações no flagelo foram demonstradas em parasitas na fase estacionária e também na metaciclogênese *in vitro*, uma vez que a adesão é um processo essencial para a diferenciação (BONALDO et al., 1988; FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000; HERNÁNDEZ et al., 2012; TYLER; ENGMAN, 2000).

Também está inserida neste cluster uma *sterol 24-c-methyltransferase* (Tc00.1047053505683.10), envolvida na síntese de ergosterol (KESSLER et al., 2013; NES et al., 2009; URBINA et al., 1995); um grupo de proteínas pertencentes à família *cytochrome P450* (Tc00.1047053509719.40; Tc00.1047053509231.10), que estão envolvidas na síntese de componentes

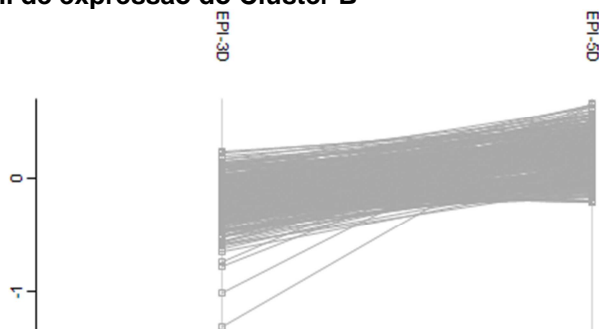
endógenos como esteroides, ácidos graxos e prostaglandinas bem como na ativação e detoxificação de componentes externos como drogas (PORTAL et al., 2008). Ambas proteínas estão presentes na via de biossíntese de esterol, que é requerida para o crescimento e viabilidade celular do parasita (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

Este cluster também contém um grupo de *fatty acid desaturase* (Tc00.1047053509239.10;Tc00.1047053511073.10;Tc00.1047053426435.9), que são enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos insaturados, que por sua vez, são componentes de membranas biológicas, mantêm a viscosidade da bicamada lipídica, permitindo a mobilidade de certas proteínas. Em tripanossomatídeos há uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados, e é sugerido que a fluidez da membrana, proporcionada por esses ácidos graxos, seja vantajosa para a adaptação do parasita às diversas mudanças que está sujeito ao longo do seu ciclo de vida (ALLOATTI; UTTARO, 2011; TRIPODI et al., 2006). Além disso, essas enzimas tem sido foco de estudos de novas drogas para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos (ALLOATTI; TRIPODI; UTTARO, 2013; LEE; STEPHENS; ENGLUND, 2007; MALDONADO et al., 2006).

#### 5.2.1.2.Cluster B

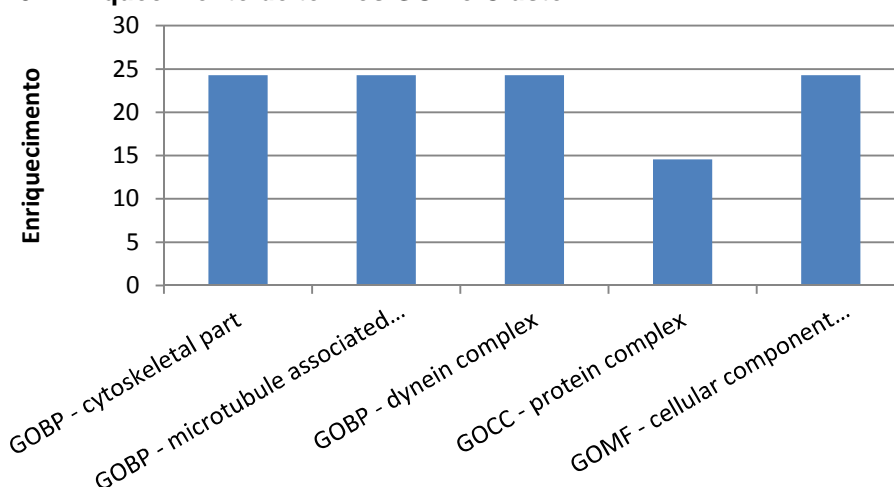
No cluster B, foram agrupadas 186 proteínas que apresentam aumento na expressão entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D (Figura 18). Dessas proteínas, 22 apresentam mais de 50% de aumento entre os dois pontos (Tabela 03). Este cluster também está enriquecido para alguns termos GO demonstrado na Figura 19.

**Figura 18: Perfil de expressão do Cluster B**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias.

**Figura 19: Enriquecimento de termos GO no Cluster B**



Enriquecimento - enriquecimento de termos GO calculados com base na fórmula representada na Figura 8. GOMF – classe de ontologia gênica de funções moleculares. GOCC – classe de ontologia gênica de compartimentos celulares. GOBP – classe de ontologia gênica de processos biológicos.

Na Tabela 3 estão listadas as proteínas inseridas no cluster B com mais de 50% de aumento em EPI-5D, entre elas está inclusa a proteína *phosphomannomutase* (Tc00.1047053508257.70), que é uma enzima que catalisa a transferência do grupo fosfato entre o C6 e o C1 do grupo hidroxila da manose (BANDINI et al., 2012). Em *Pseudomonas aeruginosa* a *phosphomannomutase* está associada à síntese de alginato, que é desencadeada por fatores ambientais, como ausência de nutrientes e também, acredita-se que a encapsulação com alginato protege as células bacterianas de fagocitose bem como, do tratamento antibiótico (YE; ZIELINSKI; CHAKRABARTY, 1994). Portanto, o aumento da expressão desta proteína em *T. cruzi* também pode estar associado a alguma resposta que protege o

parasita da ausência de nutrientes que ocorre na fase estacionária do cultivo celular e nos momentos iniciais da metaciclogênese.

Um grupo de trans-sialidasas (Tc00.1047053508857.30; Tc00.1047053508859.118; Tc00.1047053506975.80; Tc00.1047053508089.10; Tc00.1047053503993.10) também foi inserido neste cluster. As trans-sialidasas são enzimas que catalisam a transferência de ácido siálico de moléculas do hospedeiro para glicoproteínas do parasita, essenciais para a sobrevivência de *T. cruzi*, porém, o parasita não tem capacidade de sintetizá-lo (BUSCHIAZZO et al., 2012).

Duas *ascorbate-dependent peroxidase* (Tc00.1047053503745.30 e Tc00.1047053506193.60) também estão neste cluster, e estão associadas à detoxificação do peróxido de hidrogênio (WILKINSON et al., 2002). Outras análises proteômicas de outros organismos como *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Shigella flexneri*, entre as diferentes fases e cultivo celular, também observaram um aumento na expressão de proteínas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo (SOARES et al., 2010; SOUFI et al., 2015; ZHU et al., 2007). Soares (2010) também demonstrou que há um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos estágios finais de crescimento em *A. baumannii*.

As *calpain-like cystein peptidase* (Tc00.1047053509003.30) pertencem a uma família de proteases de Cisteína dependentes de cálcio. Estão envolvidas em diversos processos como apoptose, transdução de sinal, diferenciação e remodelagem do citoesqueleto (GIESE et al., 2008). Como há um aumento dessa proteína na fase estacionária, e a metaciclogênese *in vitro* é iniciada com parasitas nessa fase de cultivo celular, essa diferença na expressão pode estar associada a uma preparação do parasita para a diferenciação, uma vez que essa proteína está associada à remodelagem do citoesqueleto, e as formas epimastigota e tripomastigota são bem distintas em relação a formato da célula.

Também está inserido neste cluster um grupo de arginina-quinase (Tc00.1047053507241.30; Tc00.1047053482369.29). Essas arginina-quinases são enzimas que catalisam a transfosforilação reversível entre ADP e a fosfoarginina, estando envolvidas na gestão das reservas de energia celular.



Em concordância com o perfil de expressão encontrado, também já foi demonstrado que esta enzima possui um aumento em sua expressão ao longo da curva de crescimento de epimastigotas, sugerindo que ela pode ser regulada pela densidade de parasitas ou pelo estresse nutricional (PEREIRA et al., 2000, 2003).

A proteína quinase A é uma holoenzima composta de 4 subunidades, duas catalíticas e duas regulatórias, quando ativada por cAMP as subunidades catalíticas se separam e podem fosforilar as proteínas alvo. Neste cluster foi agrupada uma *Protein kinase A regulatory subunit* (Tc00.104753506227.150) que se apresenta aumentada em EPI-5D, isso corrobora com dados anteriores de que as formas tripomastigota metacíclico e epimastigotas em fase estacionária apresentam um aumento nos níveis de cAMP, uma vez que, quanto mais cAMP, mais proteínas quinases A serão ativadas e então, serão encontradas as subunidades catalíticas separadas das subunidades regulatórias no proteoma (GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988; HUANG et al., 2002, 2006). Em contrapartida, também foi encontrada uma *cAMP specific phosphodiesterase* (Tc00.1047053509943.20) aumentada em EPI-5D, essa enzima hidrolisa o cAMP, portanto, este dado não é concordante com os anteriores, já que o aumento dessa fosfodiesterase resulta em uma diminuição nos níveis de cAMP.

A proteína *glutamamyl carboxypeptidase* (Tc00.104753507689.30) pertencente à família *acetylornithine deacetylases*, que está associada à biossíntese de Arginina.

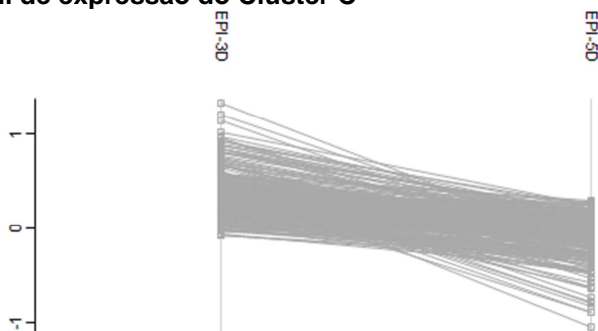
Por fim, dentre as proteínas hipotéticas, o grupo de proteínas Tc00.1047053506435.420; Tc00.1047053507739.50 e a proteína Tc00.1047053510879.190 possuem domínio EF-hand que está associado à transdução e modulação de sinal de  $Ca^{2+}$  (NELSON et al., 2002) e, a presença de  $Ca^{2+}$  facilita a metaciclogênese (KRASSNER et al., 1991); a proteína Tc00.1047053506839.30 possui repetições ricas em leucina, presentes em proteínas receptoras de tirosina-quinase, moléculas de adesão celular, glicoproteínas de ligação a matriz extracelular; e a proteína Tc00.1047053506493.9, que possui um domínio *Tetratricopeptide-like helical*

que media interações proteína-proteína e a montagem de complexos multiproteína, e proteínas com este domínio estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos, como a regulação do ciclo celular, controle da transcrição, transporte de proteínas mitocondrial e peroxisomal, e dobramento de proteínas.

### 5.2.1.3.Cluster C

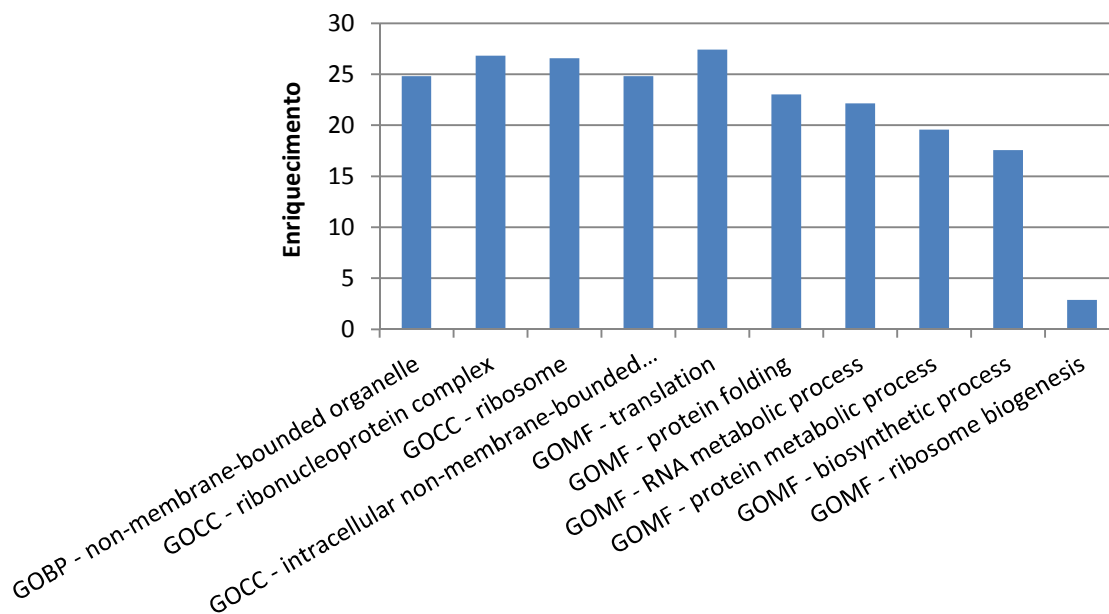
No cluster C foram agrupadas 157 proteínas que apresentam diminuição na expressão entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D (Figura 20), sendo que dessas, 31 apresentam mais de 50% de diminuição em EPI-5D (Tabela 03). Este cluster também está enriquecido para alguns termos GO demonstrado na Figura 21.

**Figura 20: Perfil de expressão do Cluster C**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias.

**Figura 21: Enriquecimento de termos GO no Cluster C**



Enriquecimento - enriquecimento de termos GO calculados com base na fórmula representada na Figura 8. GOMF – classe de ontologia gênica de funções moleculares. GOCC – classe de ontologia gênica de compartimentos celulares. GOBP – classe de ontologia gênica de processos biológicos.

Na Tabela 4 estão listadas as proteínas que se apresentam mais de 50% de diminuição em EPI-5D e estão inseridas neste cluster. Foram agrupadas três RNAs helicases neste cluster, uma *ATP-dependent DEAD/H RNA helicase* (Tc00.1047053510187.290), uma *RNA helicase* (Tc00.1047053504147.150) e uma *Nucleolar RNA helicase II* (Tc00.1047053506123.40). As *ATP-dependent DEAD/H RNA helicase* estão envolvidas em vários aspectos do metabolismo de RNA, incluindo a transcrição nuclear, splicing de pré mRNA, biogênese do ribossomo, transporte nucleocitoplasmático, tradução, decaência RNA e expressão gênica organelar (HOLETZ et al., 2007).

Além desta, várias outras proteínas agrupadas neste cluster estão associadas ao processamento de RNA e a maquinaria de tradução, como por exemplo a proteína p22 (Tc00.1047053509965.290) em *Trypanosoma brucei* tem sido proposta como uma fator acessório de edição de kRNA devido sua interação com RBP16, um fator acessório de edição de RNA que é sujeito de metilação da arginina. Além disso, também contribui para crescimento celular das formas procíclicas (SPREHE et al., 2010). As proteínas *peter pan*

(Tc00.1047053508153.830; Tc00.1047053508181.130) possui um domínio Brix e estão envolvidas no processamento do RNA ribossomal. Os transportadores ABC (Tc00.1047053506989.30) são proteínas transmembrana que utilizam o ATP para carrear processos biológicos como a translocação de vários substratos além de tradução e reparo de DNA. Em *Trypanosoma brucei*, foi observado que a captação do grupo heme, um co-fator essencial em tripanossomatídeos envolve a atividade de um transportador ABC (CUPELLO et al., 2011). As proteínas hipotéticas Tc00.1047053506145.40, Tc00.1047053507641.170 e o grupo de proteínas hipotéticas Tc00.1047053506739.10;Tc00.1047053510657.160 possuem domínios do tipo *armadillo type fold*, uma super estrutura helicoidal que apresenta uma superfície extensa bem adequada a grandes substratos; *MIF4-like tipo 1/2/3* e *MIF4G-like tipo 3*, que estão relacionados ao metabolismo de RNA. Já as proteínas hipotéticas Tc00.1047053511727.160 e Tc00.1047053510657.160 possuem um domínio *plait* alfa-hélice de ligação a nucleotídeo e um domínio motivo de ligação ao RNA. A proteína hipotética Tc00.1047053506241.200 possui um domínio *U3 small nucleolar RNA-associated protein 6* que está envolvido no processamento da Sub-unidade 18S.

A *universal minicircle sequence binding protein (UMSBP)* (Tc00.1047053503781.90) é uma proteína sequência específica de ligação ao DNA que reconhece as duas origens de replicação do DNA do minicírculo em Kinetoplastídeos (ABU-ELNEEL; KAPELLER; SHLOMAI, 1999).As *GTP-binding proteins* são proteínas que funcionam como interruptores moleculares alternando entre o estado inativo ou ativo, quando ligada a GTP, podendo atuar como um sinal para disparar outros eventos na célula. Neste cluster foi agrupada uma *Nucleolar GTP-binding protein 1* (Tc00.1047053510431.160). Foi reportado que uma *GTP-binding protein* nucleolar de *Trypanosoma brucei*, conservada em eucariotas, a NOG1, está relacionada a biogênese dos ribossomos, devido a sua localização e também por estar associada com o precursor da sub-unidade 60S (JENSEN et al., 2003), e coincidentemente a proteína *60S acidic ribosomal protein* (Tc00.1047053508307.170) também apresenta um perfil de diminuição e está inserida neste cluster.

Ainda com a expressão diminuída, está inserido neste cluster um grupo de *Tubulin tyrosine ligase* (Tc00.1047053506885.270; Tc00.1047053510729.150) que são enzimas que catalisam a adição pós-traducional dependente de ATP de uma Tirosina na região carboxi-terminal de uma  $\alpha$ -tubulina detirosinada (ERSFELD et al., 1993). Ainda não é conhecido o papel tirosinação da tubulina, porém tem sido documentada a relação entre a “idade” /estabilidade do microtúbulo e o estado de tirosinação, grande parte da rede de microtúbulos apresenta-se tirosinada e dinâmica, enquanto que microtúbulos velhos apresentam-se detirosinados, estáveis e com distribuição reduzida (Revisto por IDRIS, 2000). A diminuição na expressão dessas proteínas pode estar associada à detirosinação dos microtúbulos, tornando-os envelhecidos. Esse envelhecimento do citoesqueleto pode ser uma etapa pré-diferenciação, pois há uma grande alteração nas formas celulares de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas.

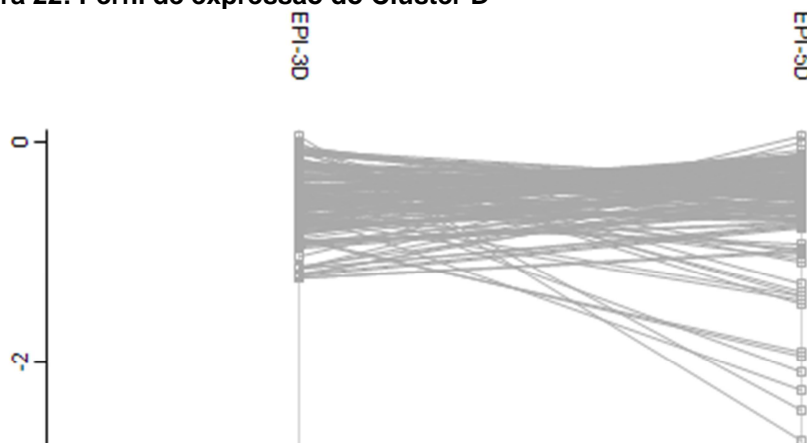
As *fatty acid elongases* (Tc00.1047053511245.150; Tc00.1047053506661.10) estão envolvidas na síntese de ácidos graxos poliinsaturados (LIVORE; TRIPODI; UTTARO, 2007). Têm sido proposto que a via de síntese dos ácidos graxos através da elongase em *T. brucei* é essencial para a rápida adaptação a diferentes ambientes (LEE et al., 2006).

Neste cluster, também foi inserido, com a expressão diminuída, um *Retrotransposon Hot Spot* (Tc00.1047053509463.41). Os retrotransposons são elementos móveis de DNA, que transpõe através de um RNA intermediário, que é integrado em uma nova posição do genoma através de transcrição reversa (SÁNCHEZ-LUQUE et al., 2011).

#### 5.2.1.4.Cluster D

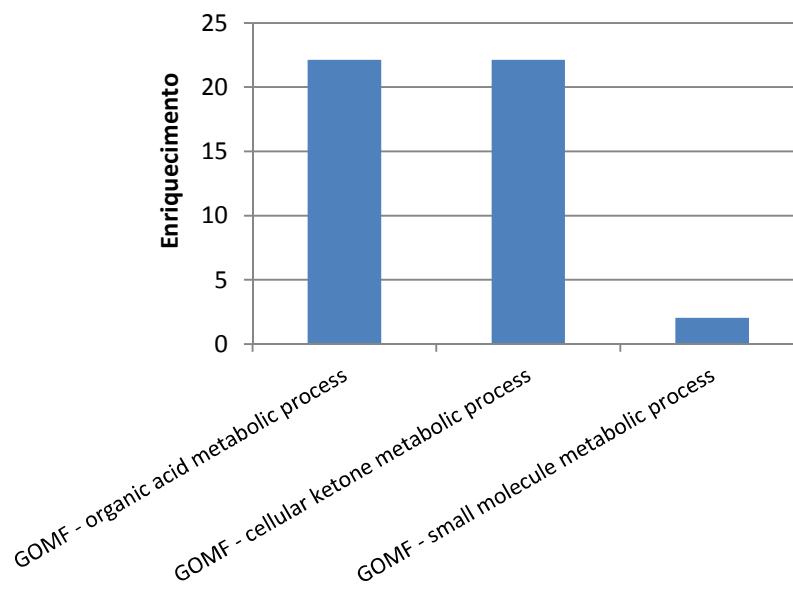
No cluster D foram agrupadas proteínas que apresentam aumento e diminuição na expressão entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D (Figura 22), sendo que dessas, 3 proteínas apresentam um aumento de mais de 50% em EPI-5D (Tabela 3), e 7 apresentam uma diminuição na expressão (Tabela 4). Este cluster também está enriquecido para alguns termos GO demonstrado na Figura 23.

**Figura 22: Perfil de expressão do Cluster D**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-3D – Epimastigotas cultivados por 3 dias; EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias.

**Figura 23: Enriquecimento de termos GO no Cluster D**



Enriquecimento - enriquecimento de termos GO calculados com base na fórmula representada na Figura 8. GOMF – classe de ontologia gênica de funções moleculares. GOCC – classe de ontologia gênica de compartimentos celulares. GOBP – classe de ontologia gênica de processos biológicos.

Entre as proteínas inseridas neste cluster com expressão aumentada, listadas na Tabela 3, está um grupo de *alcohol dehydrogenase* (Tc00.1047053511277.60;Tc00.1047053506357.50), enzimas desidrogenases que facilitam a interconversão entre álcoois e aldeídos ou cetonas com a redução de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ ; além de dois grupos de proteínas hipotéticas, o primeiro (Tc00.1047053504199.20;Tc00.1047053506635.130) pertencente à

família *p25-alpha*, caracterizada por incluir proteínas de 25kDa que são fosforiladas por Ser/Thr-quinases; e o segundo (Tc00.1047053510009.19;Tc00.1047053460747.30;Tc00.1047053509895.60) com um domínio C2, dependente de  $Ca^{2+}$  e envolvido na transdução de sinal e tráfego através da membrana.

Já entre as proteínas inseridas neste cluster com expressão diminuída, listadas na Tabela 4, está um grupo de *cysteine peptidases* (Tc00.1047053509429.320; Tc00.1047053509429.329) são proteínas que catalisam a clivagem das ligações amida de proteínas ou peptídeos oligoméricos e tem como mecanismo catalítico a Cisteína (SAJID; MCKERROW, 2002). As proteinases tem um papel fundamental no processo de diferenciação do parasita (GOLDENBERG; AVILA, 2011), e sua inibição resulta no bloqueio da diferenciação (BONALDO et al., 1991). As proteinases podem estar relacionadas ao *turnover* dos aminoácidos, que podem ser usados para a síntese de novas proteínas ou para a geração de energia, portanto, a redução na expressão destas proteínas podem representar uma preparação da célula para a diferenciação.

Por fim, a proteína hipotética Tc00.1047053506947.10 possuiu um domínio *major facilitator superfamily domain*, característico de transportadores secundários; e o grupo das proteínas hipotéticas (Tc00.1047053511909.10;Tc00.1047053510721.10) pertencem à família *Fatty acyl-CoA reductase*, que reduzem *fatty Acyl-CoA* em álcoois graxos e possuem um domínio de ligação a NAD/NADP.

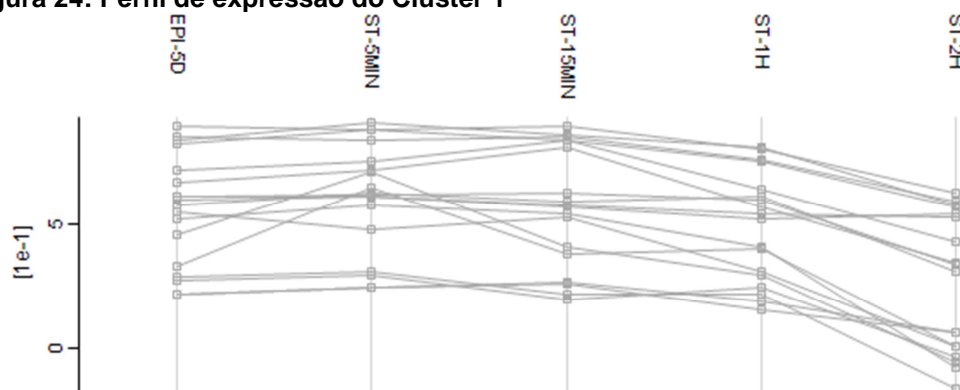
#### 5.2.2. Proteínas diferencialmente expressas entre os pontos ao longo do estresse nutricional

Foram consideradas 18 proteínas como diferencialmente expressas ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H), demonstrando a pequena diferença na expressão das proteínas ao longo do estresse nutricional. Estas proteínas foram agrupadas em 3 clusters (1 a 3) de acordo com seu perfil de expressão.

### 5.2.2.1.Cluster 1

No cluster 1 foram agrupadas 9 proteínas, listadas na Tabela 6, que apresentam uma diminuição na expressão ao longo do estresse nutricional, demonstrado na Figura 24.

**Figura 24: Perfil de expressão do Cluster 1**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente.

Dentre as proteínas agrupadas no cluster 1 (Tabela 6), encontramos as proteínas *69kDa paraflagellar rod protein* (Tc00.1047053511215.119; Tc00.1047053508961.70) e *paraflagellar rod protein 3* (Tc00.1047053509617.20) que também foram consideradas diferencialmente expressas quando analisados somente a expressão das proteínas na fase estacionária (EPI-5D) e na fase exponencial (EPI-3D). Ambas foram agrupadas no cluster A, e apresentavam um aumento de mais de 50% em EPI-5D, porém quando observados os demais pontos ao longo do estresse, não foi observada uma grande variação na expressão. Porém, elas novamente terem sido consideradas diferencialmente expressas ao longo do estresse nutricional, reforça a importância da modulação de proteínas associadas a componentes flagelares no processo de diferenciação do parasita.

Já a proteína hipotética Tc00.1047053506839.30, também considerada aumentada em EPI-5D, porém agrupada no cluster B, quando observada à expressão ao longo do estresse nutricional, apresenta uma pequena



diminuição no ponto ST-2H. Essa proteína possui repetições ricas em leucina, presentes em proteínas receptoras de tirosina-quinase, portanto, ela pode estar sendo modulada através de fosforilação.

Também foi considerado diferencialmente expresso ao longo do estresse nutricional um *Retrotransposon hot spot* (Tc00.1047053410923.20). Comparando com as proteínas diferencialmente expressas nos pontos EPI-3D e EPI-5D, também foi considerada diferencialmente expressa outra proteína da mesma família (agrupada no Cluster C), que se apresentava diminuída em EPI-5D.

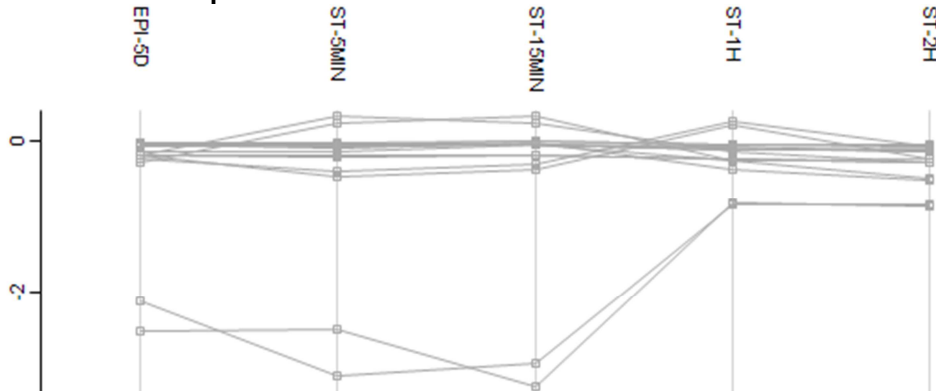
Ainda em comparação com os resultados obtidos na análise de EPI-3D e EPI-5D, no cluster B, com a expressão aumentada em EPI-5D, foi agrupada subunidade regulatória da proteína quinase A. Entre as proteínas diferencialmente expressas ao longo do estresse nutricional, foi agrupada a subunidade catalítica da proteína quinase A (Tc00.1047053508461.280). apesar de se manter constante ao longo do estresse nutricional, o fato de esta proteína ser considerada diferencialmente expressa, nos leva a imaginar que a regulação da proteína quinase A pode estar associada com o processo de diferenciação do parasita.

Neste cluster, também está agrupada o grupo de proteínas hipotéticas Tc00.1047053507165.30;Tc00.1047053507793.40, que possuem domínio *EF-hand*, e como comentado anteriormente, está associado à transdução e modulação de sinal de  $Ca^{2+}$ , e a presença deste íon que pode facilitar a metaciclogênese.

#### 5.2.2.2.Cluster 2

No cluster 2 foram agrupadas 8 proteínas, listadas na Tabela 6, que apresentam um aumento na expressão ao longo do estresse nutricional, demonstrado na Figura 25.

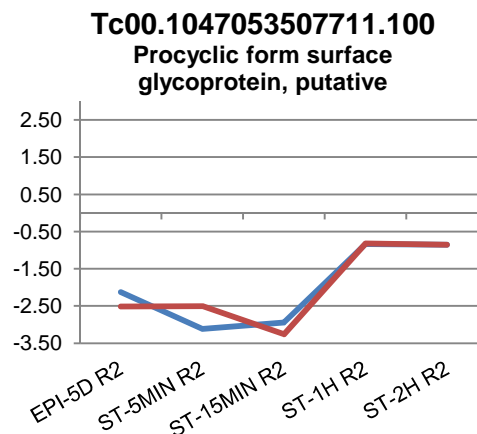
Figura 25: Perfil de expressão do Cluster 2



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente.

Dentre as proteínas inseridas neste cluster, chama atenção a *procyclic form surface glycoprotein* (Figura 26) que está envolvida nos processos de adesão e invasão (GOLDENBERG; AVILA, 2011). Esse aumento na expressão pode estar associado ao processo de adesão, que é a próxima etapa do processo de diferenciação *in vitro* após o estresse nutricional. E também, tem sido demonstrado que durante a diferenciação ocorrem modificações de açúcares de superfície (DE ANDRADE et al., 1991).

Figura 26: Perfil de expressão da proteína *Procyclic form surface glycoprotein* (Tc00.1047053507711.100)

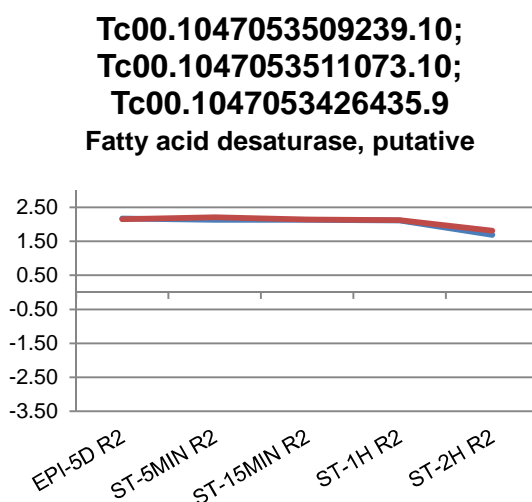


O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente.

### 5.2.2.3.Cluster 3

No cluster 3 foi agrupada o grupo de proteínas *fatty acid desaturase* (Tc00.1047053509239.10; Tc00.1047053511073.10; Tc00.1047053426435.9), que não apresenta uma grande variação na expressão ao longo do estresse (Figura 27). Esse mesmo grupo de proteínas apresenta um aumento de mais de 50% em EPI-5D quando comparada a expressão em EPI-3D.

**Figura 27: Perfil de expressão do grupo de proteínas *Fatty acid desaturase* (Tc00.1047053509239.10; Tc00.1047053511073.10; Tc00.1047053426435.9)**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente.

## 5.3. ANÁLISES FOSFOPROTEÔMICAS

Num desenho experimental de fosfoproteômica há a inclusão de uma etapa, o enriquecimento de fosfopeptídeos. Essa etapa é essencial devido à baixa abundância de proteínas e a ineficiência da ionização de fosfopeptídeos em relação a peptídeos não fosforilados (MARCHINI et al., 2014).

Com as técnicas utilizadas neste trabalho foi possível obter a maior cobertura do Fosfoproteoma de *T. cruzi*. Obtivemos a identificação de 2.424 grupos de proteínas, sendo 1.679 fosforiladas, a maior cobertura até o

momento. Vale ressaltar que neste trabalho comparamos somente as formas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional, que são bastante semelhantes. Porém, como já mencionado anteriormente, o grande número de identificação que foram obtidas deve-se ao uso de algumas técnicas diferenciadas que tem apresentado maior eficiência na literatura, como o fracionamento da amostra, uso de colunas longas e aquecidas (30 centímetros) com *beads* menores (1,9  $\mu\text{m}$ ) na cromatografia líquida, essas escolhas, quando associados a espectrômetros modernos levam a identificação de dezenas de milhares de sítios.

Também foram identificados 3.893 grupos de sítios de fosforilação, sendo 3.049 em Serina, 786 em Treonina e 58 em Tirosina.

Queiroz (2014) realizou uma análise quantitativa do Fosfoproteoma de *T. cruzi* durante a amastigogênese, processo no qual a forma tripomastigota se diferencia em amastigota, utilizando a estratégia quantitativa iTRAQ. Nesse trabalho foram contemplados quatro pontos experimentais (tripomastigotas, tripomastigotas após 30 minutos de indução, tripomastigotas após 2 horas de indução e amastigotas) e foram identificadas 1.339 proteínas, sendo 229 fosforiladas. Outra diferença foi à técnica de fracionamento utilizada, HILIC, e algumas modificações no enriquecimento de fosfopeptídeos.

Nakayasu (2009) identificou 119 proteínas fosforiladas e 221 sítios de fosforilação (148 em Serina, 57 em Treonina e 8 em Tirosina) na forma epimastigota de *T. cruzi*. Assim como Queiroz (2014), utilizou outras diferentes técnicas: pré-fracionamento SCX e enriquecimento por IMAC.

A estratégia experimental utilizada neste experimento: SILAC como metodologia quantitativa, fracionamento através de FR básica, enriquecimento por  $\text{TiO}_2$  resultaram em uma boa cobertura do fosfoproteoma durante o estresse nutricional. Realizamos a comparação entre a quantidade de sítios de fosforilação identificados no trabalho anterior de nosso grupo. Como foram utilizados métodos quantitativos diferentes nos dois trabalhos, Marchini (2011) utilizou a técnica *Label-Free* (LFQ) e neste trabalho foi utilizada a técnica SILAC, não é possível uma comparação exata entre os grupos de proteínas identificados, pois não é possível realizar uma mesma análise no MaxQuant contendo os dados dos dois trabalhos. Portanto foi realizada uma comparação

entre os fosfossítios considerando somente a sequência principal de cada grupo. A comparação entre as coberturas obtidas nos dois trabalhos está representada na Figura 28.

**Figura 28: Comparação entre os fosfoproteomas de Marchini (2011) e o obtido neste trabalho de *Trypanosoma cruzi*.**

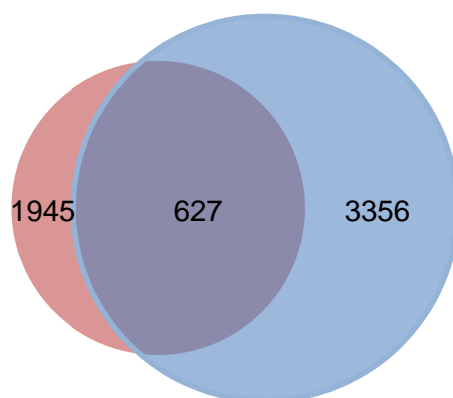


Diagrama de Venn comparando os dados de Marchini (2011) com os dados gerados neste trabalho. O círculo rosa representa os sítios de fosforilação identificados no trabalho de Marchini (2011). O círculo azul representa os sítios de fosforilação identificados neste trabalho.

Para avaliar o perfil dos sítios de fosforilação modulados entre os pontos experimentais foram realizadas diferentes análises, considerando somente os fosfossítios quantificados em todos os pontos experimentais. Inicialmente foram verificados os sítios diferencialmente expressos separadamente, assim como na proteômica, comparando os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D, que estão relacionados a diferenças de cultivo celular, ou seja, fase exponencial e fase estacionária, respectivamente; e uma segunda análise entre os diferentes pontos experimentais ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H, ST-2H), para verificar quais são as proteínas diferencialmente expressas ao longo do estresse. Porém nesta análise a intensidade da proteína pode estar influenciando na modulação dos sítios, então foi realizada uma segunda análise após a normalização dos sítios em relação aos dados obtidos na proteômica, ou seja, foi subtraído o valor de  $-\log_2$  da razão da intensidade leve/pesado das proteínas (obtido na Proteômica), do valor de  $-\log_2$  da razão da intensidade leve/pesado dos sítios de fosforilação (obtidos após o enriquecimento), então, após a normalização,

foram analisados separadamente os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D , e também, os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional.

#### 5.3.1. Sítios de fosforilação diferente expressos entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D

Foram considerados 135 sítios de fosforilação como diferencialmente expressos entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D, sendo que desses, 48 possuem mais de 50% de aumento na expressão, enquanto que 31 possuem mais de 50% de diminuição na expressão. Estes fosfossítios foram agrupados em 4 clusters (A a D).

##### 5.3.1.1.Cluster A

No cluster A foram agrupados 4 sítios de fosforilação que apresentam um aumento na expressão entre os pontos EPI-3D e EPI-5D, sendo que somente 3 fosfossítios possuem mais de 50% de aumento na expressão entre os dois pontos experimentais (Tabela 9).

Neste cluster estão agrupados os fosfossítios S-71 e S-2 das proteínas *Rab7 GTP-binding protein* (Tc00.1047053508461.270) e *Small GTP-binding protein Rab1* (Tc00.1047053503715.30), respectivamente. Ambas proteínas pertencem à família Rab, que tem sido relacionada à regulação do tráfego de vesículas em *T. cruzi* (DHIR; GOULDING; FIELD, 2004; LEAL et al., 2000).

##### 5.3.1.2.Cluster B

No cluster B foram agrupados 45 sítios de fosforilação, sendo que destes, 12 fosfossítios possuem mais de 50% de aumento na expressão entre EPI-3D e EPI-5D (Tabela 9), e 8 fosfossítios possuem mais de 50% de diminuição na expressão entre os dois pontos experimentais (Tabela 10).

Entre os sítios com expressão aumentada os sítios S-13 na proteína hipotética Tc00.1047053506221.70, S-538 na proteína hipotética Tc00.1047053506389.60, S-85 na proteína *Zinc finger* (Tc00.10470535007005.40), apresentam alteração na expressão, porém não

há como saber se esta a alteração se refere ao sítio ou a proteína, pois não foi obtido a intensidade da proteína em algum dos pontos experimentais. Já o sítio S-1056 na proteína hipotética Tc00.1047053507389.30, também não pode ser verificada se a alteração na expressão é no sítio ou na proteína pois a proteína não foi identificada na Proteômica.

Um grupo de sítios (S-410;83) em um grupo de proteínas calmodulina (Tc00.1047053506835.60; Tc00.1047053506945.10) apresentam-se aumentados em EPI-5D. Esta proteína está associada ao controle de vários processos celulares, como por exemplo, fosforilação e desfosforilação. Em *T. brucei* essa proteína está associada com a regulação do crescimento, já em *T. cruzi* foi associada à estimulação da fosfodiesterase dependente de cAMP, transdução de sinal na via do cGMP-óxido nítrico, além da atividade da proteína quinase dependente de calmodulina (revisto por GARCIA-MARCHAN et al., 2009).

Entre os sítios com expressão diminuída, os sítios T-39 e T-209 na proteína hipotética Tc00.1047053511807.160 apresentam alteração na expressão, porém não há como saber se esta a alteração se refere ao sítio ou a proteína, pois não foi obtida a intensidade da proteína em algum dos pontos experimentais. Os sítios S-124, S-484 e S-24 (Tc00.1047053508177.70, Tc00.1047053504933.30, Tc00.1047053504933.30, respectivamente) apresentam o mesmo perfil de expressão da proteína, portanto a alteração detectada não é na fosforilação.

#### 5.3.1.3.Cluster C

No cluster C foram agrupados 36 sítios de fosforilação que apresentam uma diminuição na expressão entre os pontos EPI-3D e EPI-5D, sendo que somente 23 fosfosítios possuem mais de 50% de diminuição na expressão entre os dois pontos experimentais (Tabela 10).

Os sítios S-378;378 e S-707;707 do grupo de proteínas hipotéticas Tc00.1047053506825.150;Tc00.1047053508175.50, S-308 da proteína hipotética Tc00.1047053506475.120, S-778 da proteína hipotética Tc00.1047053511753.110 apresentam alteração na expressão, porém não há

como saber se esta a alteração se refere ao sítio ou a proteína, pois não foi obtida a intensidade da proteína em algum dos pontos experimentais. Já os sítios T-204 na proteína hipotética Tc00.104705351717.30, T-169 no fator de iniciação de tradução eucariótico 4E (Tc00.1047053509037.40), S-277 na proteína hipotética Tc00.10470535116171.130, S-127 na proteína hipotética Tc00.1047053511717.40, S-378 na proteína hipotética Tc00.1047053511267.24, S-182 na proteína hipotética Tc00.1047053506949.30, não foram identificados na proteômica, portanto não há como saber se esta a alteração se refere ao sítio ou a proteína. Os sítios T-212, T-209, S-299 e S-296 da proteína hipotética Tc00.1047053509671.10 apresentam o mesmo perfil de expressão da proteína, portanto a alteração detectada não é no sítio de fosforilação.

Nesse cluster está inserido o sítio S-29 da proteína *calpain-like cystein peptidase* (Tc00.1047053509237.151) As calpaínas-like são uma família de calpaínas com alterações de aminoácidos no sítio ativo ou com ausência de domínios de ligação ao cálcio, resultando na perda da atividade catalítica em vários representantes desta família (GIESE et al., 2008) e, como já comentado anteriormente, o  $\text{Ca}^{2+}$  estimula a diferenciação.

#### 5.3.1.4.Cluster D

No cluster D foram agrupados 50 sítios de fosforilação que apresentam um aumento na expressão entre os pontos EPI-3D e EPI-5D, sendo que somente 33 fosfosítios possuem mais de 50% de aumento na expressão entre os dois pontos experimentais (Tabela 9).

Entre os sítios com expressão aumentada os sítios S-368 na proteína hipotética Tc00.1047053506559.540, S-133 na proteína hipotética Tc00.1047053511577.140, S-777;693 no grupo de proteínas hipotéticas Tc00.1047053509151.10;Tc00.1047053508175.280, S-231 na proteína de transporte de cátion (Tc00.1047053506445.30), S-259 na proteína hipotética Tc00.1047053511743.20, S-11 na proteína hipotética Tc00.1047053511023.19, apresentam alteração na expressão, porém não há como saber se esta a alteração se refere ao sítio ou a proteína, pois não foi obtida a intensidade da



proteína em algum dos pontos experimentais. Já o sítio S-506 na proteína hipotética Tc00.1047053510421.310, também não pode ser verificada se a alteração na expressão é no sítio ou na proteína pois a proteína não foi identificada na Proteômica. O sítio S-282 da proteína hipotética Tc00.1047053506327.60, S-71 do transportador de aminoácido Tc00.1047053504069.120, S-442 da proteína hipotética Tc00.1047053506399.30, S-214 da proteína rica em repetições de leucina Tc00.1047053511573.10, S-235 da *sterol 24-c-methyltransferase* Tc00.1047053505683.10, apresentam o mesmo perfil de expressão da proteína, portanto a alteração detectada não é referente à fosforilação.

Nesse cluster foram agrupados os sítios S-137 da *Dynein heavy chain* (Tc00.104753508831.4) e S-30 da *33kDa inner dynein arm light chain, axonemal* (Tc00.1047053507049.170). As Dineínas são proteínas relacionadas à motilidade e o axonema é a estrutura contrátil presente nos cílios e flagelos. Em *T. brucei*, o flagelo tem sido demonstrado como essencial na divisão celular e morfogênese das formas procíclicas (RALSTON; KISALU; HILL, 2011). Como mencionado anteriormente, proteínas associadas à haste paraflagelar também se apresentam alteradas.

O sítio S-21 da *casein kinase* (Tc00.1047053508541.225) também se apresenta aumentado. As *casein kinases* correspondem a uma família de proteíno serina/treonina quinases com habilidade de fosforilar diversas proteínas (SPADAFORA et al., 2002).

O sítio S-346 da *calpain cysteine peptidase* (Tc00.1047053505985.9) também está aumentado. Como já dito anteriormente, essas proteínas possuem um papel fundamental no processo de diferenciação do parasita (GOLDENBERG; AVILA, 2011).

### 5.3.2. Sítios de fosforilação diferente expressos entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H

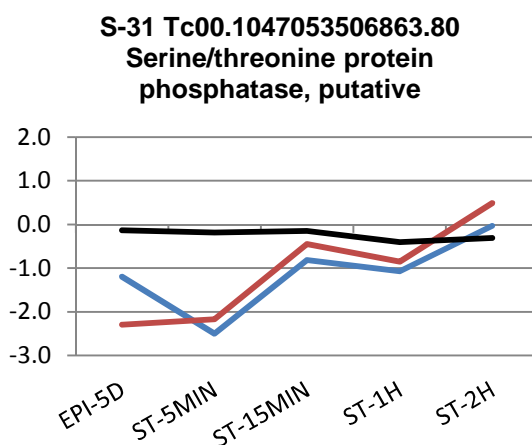
Foram considerados 72 sítios de fosforilação como diferencialmente expressas ao longo do estresse nutricional (EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-

1H, ST-2H, sendo que desses, 13 possuem mais de 50% de aumento na expressão, enquanto que 24 possuem mais de 50% de diminuição na expressão. Estes sítios foram agrupadas em 3 clusters (1 a 3).

### 5.3.2.1.Cluster 1

Nesse cluster, com aumento na expressão dos sítios de fosforilação está incluso o fosfósítio S-31 da proteína Tc00.1047053506863.80, uma fosfatase de Serina/Treonina (Figura 29). As fosfatases tem a função de remover o grupo fosfato de proteínas fosforiladas.

**Figura 29: Perfil de expressão do sítio S-31 da proteína *Serine/threonine protein phosphatase* (Tc00.1047053506863.80)**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

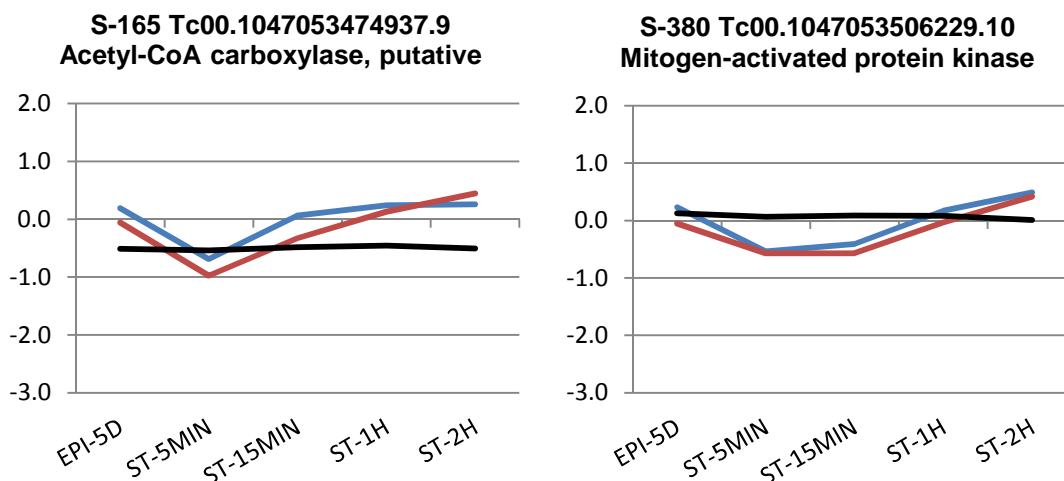
Com a expressão diminuída dos sítios de fosforilação estão inclusos neste cluster os fosfósítios S-24 da proteína hipotética Tc00.1047053504933.30, e T-209 da proteína hipotética Tc00.1047053511807.160. O sítio S-24 apresenta um perfil de expressão similar à proteína, portanto a alteração não se deve a fosforilação, e sim a proteína, já em relação ao sítio T-209, não pode ser realizada a comparação, pois não foi identificada a intensidade da proteína na Proteômica.

### 5.3.2.2.Cluster 2

Nesse cluster, entre os sítios com aumento na expressão está incluso o sítio S-52 da proteína hipotética Tc00.1047053509911.124, porém, não pode ser realizada a comparação, pois não foi identificada a intensidade da proteína.

Os outros quatro sítios com aumento na expressão incluídos neste cluster apresentam um perfil diferente da expressão da proteína, indicando que elas estão sendo moduladas. Na Figura 30 estão representados dois exemplos desses sítios de fosforilação.

**Figura 30: Perfil de expressão do sítio S-165 da proteína Acetyl-CoA carboxylase (Tc00.1047053474937.9) e do sítio S-380 da proteína Mitogen-activated protein kinase (Tc00.1047053506229.10)**



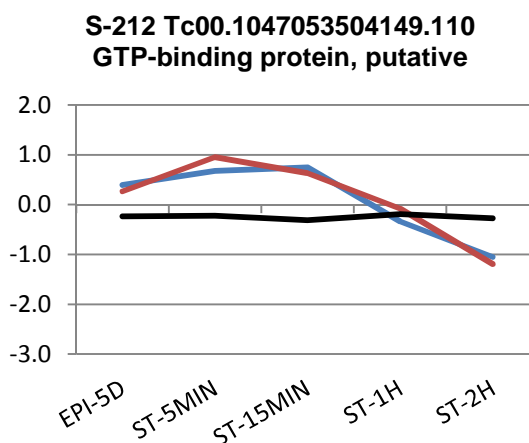
O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

Neste cluster também foram inclusos alguns sítios com expressão diminuída. Os sítios S-747 e T-748 da proteína *CYC2-like cyclin* (Tc00.1047053504021.10), S-268 da proteína hipotética Tc00.1047053511809.10, S-121 da proteína *Ubiquitin hydrolase* (Tc00.1047053507087.30) e S-224 da proteína hipotética Tc00.1047053506337.220, não pode ser realizada a comparação, pois não foi

identificada a proteína. Já os sítios T-169 da proteína *Eukaryotic translational initiation fator 4E* (Tc00.1047053509037.40) e S-90 da proteína *Pumilio* (Tc00.1047053507049.199) não pode ser realizada a comparação pois não foi identificado algum ponto experimental na proteômica.

O sítio S-212 da *GTP-binding protein* (Tc00.1047053504149.110) apresenta uma diminuição na fosforilação nos momentos finais do estresse (ST-1H e ST-2H) (Figura 31).

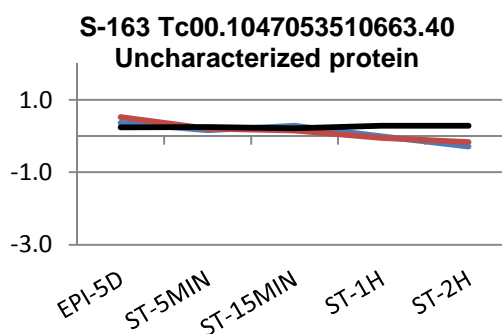
**Figura 31: Perfil de expressão do sítio S-212 da proteína *GTP-binding protein* (Tc00.1047053504149.110)**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

O sítio S-163 da proteína hipotética Tc00.104705310663.40 também se apresenta diminuída ao longo do estresse nutricional (Figura 32). Essa proteína hipotética possui um domínio *U2A'/phosphoprotein 32 family A* que é requerido para a montagem do spliceossomo e a adição eficiente de snRNP U2 no pré-mRNA.

**Figura 32: Perfil de expressão do sítio S-163 da proteína hipotética (Tc00.1047053510663.40)**

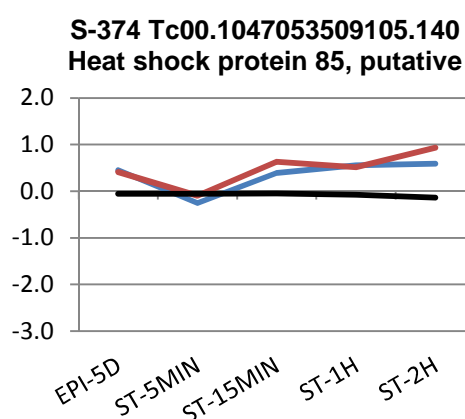


O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

### 5.3.2.3.Cluster 3

Neste cluster, com a expressão aumentada ao longo do estresse nutricional, foi incluso o sítio S-374 da *Heat shock protein 85* (Tc00.1047053509105.140) (Figura 33). Estas proteínas atuam como chaperonas e estão associadas ao dobramento e localização de proteínas, degradação de outras proteínas e respondem a uma variedade de estresses (FEDER; HOFMANN, 1999).

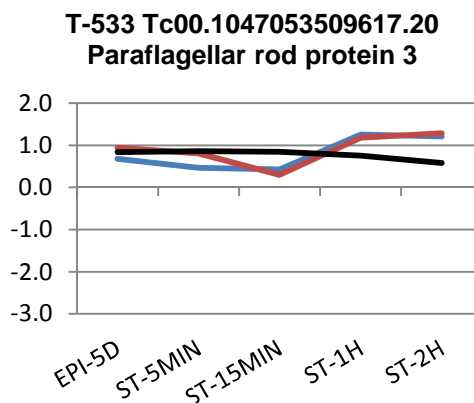
**Figura 33: Perfil de expressão do sítio S-153 da proteína hipotética (Tc00.1047053510663.40)**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

A proteína *paraflagellar rod 3* (Tc00.1047053509617.20) apresenta-se alterada entre a fase exponencial e a fase estacionária e também ao longo do estresse. Além disso, o sítio T-533 desta proteína apresenta um aumento na fosforilação ao longo do estresse (Figura 34).

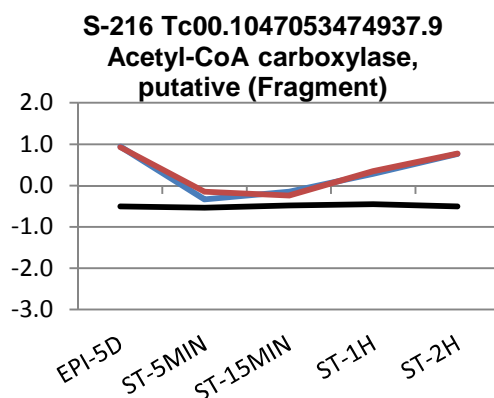
**Figura 34: Perfil de expressão do sítio S-533 da proteína *Paraflagellar rod protein 3* (Tc00.1047053509617.20)**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

O sítio S-216 da proteína *Acetyl-CoA carboxylase* (Tc00.10460535474937.9) apresenta uma diminuição na fosforilação nos momentos intermediários do estresse nutricional, porém não há alteração quando comparada somente a intensidade no ponto inicial (EPI-5D) e no ponto final (ST-2H) (Figura 35). As *Acetyl-CoA carboxylase* são enzimas da família das carboxilases dependentes de biotina e estão envolvidas na síntese de ácidos graxos (RAMAKRISHNAN et al., 2013). Para a síntese de ácidos graxos por elongases em *Trypanosoma brucei*, é necessária a síntese de Malonyl-CoA a partir de Acetyl-CoA, e para isso é necessária a enzima *Acetyl-CoA carboxylase* (VIGUEIRA; PAUL, 2011).

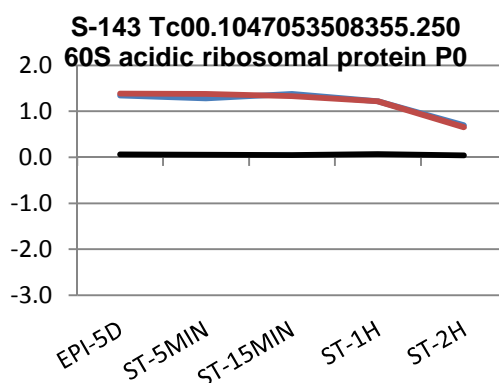
**Figura 35: Perfil de expressão do sítio S-153 da proteína hipotética (Tc00.1047053510663.40)**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

Ainda com um aumento na fosforilação ao longo do estresse, o sítio S-125 da proteína hipotética Tc00.1047053510861.125 e o sítio S-11 da proteína hipotética Tc00.1047053511023.19, não puderam ser comparados com a intensidade da proteína, pois não foi obtida a intensidade da proteína em algum ponto experimental. Já entre os sítios com uma diminuição na fosforilação ao longo do estresse nutricional, está o sítio S-143 da proteína *60S acidic ribosomal* (Tc00.1047053508355.250) (Figura 36).

**Figura 36: Perfil de expressão do sítio S-143 da proteína *60S acidic ribosomal* (Tc00.1047053508355.250)**

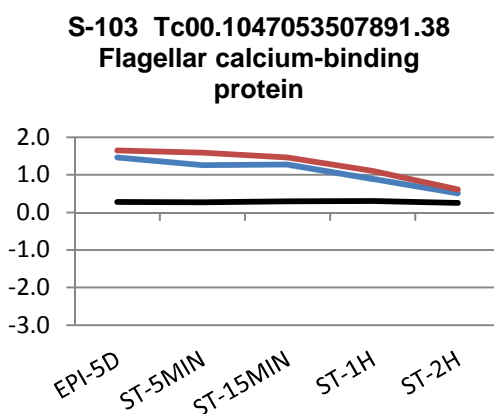


O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de

fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

Além deste, também foi observado a diminuição na fosforilação do sítio S-13 da proteína *Flagellar calcium-binding protein* (Tc00.1047053507891.38) (Figura 37). Essa proteína está localizada no flagelo de tripanosomas e são moduladas por cálcio, portanto é sugerido que o cálcio tenha um papel importante na flexão flagelar durante a motilidade da célula (PORCEL et al., 1996). Ao observar parasitas sob condições de estresse ao microscópico, percebe-se que há uma diminuição na motilidade dessas células.

**Figura 37: Perfil de expressão do sítio S-103 da proteína *Flagellar calcium-binding protein* (Tc00.1047053507891.3)**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente. A linha preta representa a média do valor da intensidade da proteína.

Ainda com uma diminuição na fosforilação ao longo do estresse, o grupo de sítios S-777;693 do grupo de proteínas hipotéticas Tc00.1047053508175.280; Tc00.1047053511865.10 não puderam ser comparados com a intensidade da proteína, pois não foi obtida a intensidade da proteína em algum ponto experimental. Já a proteína Tc00.1047053511671.130 não foi encontrada, não permitindo a comparação das alterações do sítio S-277, com a proteína.



### 5.3.3. Sítios de fosforilação considerados modulados após a etapa de normalização entre os pontos experimentais EPI-3D e EPI-5D

Como comentado anteriormente, com a normalização da razão L/P (leve/pesado) da intensidade da proteína, pela razão L/P da intensidade do sítio de fosforilação, é obtido à variação somente do sítio de fosforilação, desconsiderando a alteração na proteína. Como estamos trabalhando somente com as proteínas e sítios com a intensidade identificada em todos os pontos experimentais, nessa forma de analisar, é necessário que a proteína tenha sido identificada em todos os pontos experimentais da proteômica e da fosfoproteômica, reduzindo o número de sítios a serem analisados. Devido a isso, primeiro foi realizada a análise sem a normalização, para que pudessem ser contemplados mais sítios de fosforilação que apresentam alteração entre os pontos experimentais. Portanto, após a etapa de normalização, 17 sítios de fosforilação foram considerados diferencialmente expressos entre EPI-3D e EPI-5D (Tabela 13). Desses sítios, nove também foram considerados modulados na análise sem a etapa de normalização. Entre os restantes, 4 apresentaram um aumento na fosforilação, e 4 apresentaram uma diminuição na fosforilação.

Os sítios S-11 da proteína *phosphatidate cytidyl transferase* (Tc00.1047053511237.40), S-59 da proteína *eukaryotic translational initiation factor 1A* (Tc00.1047053503945.10), S-38 da proteína hipotética Tc00.1047053412943.9, e S-825 da proteína hipotética Tc00.1047053509247.30, apresentam um aumento na fosforilação em EPI-5D. A proteína hipotética Tc00.1047053412943.9 apresenta um domínio DnaJ. As DnaJ são membros da família das HSP70, elas se ligam ao kDNA e estimulam a atividade de ATPase (TIBBETTS et al., 1998). Já a proteína hipotética Tc00.1047053509247.30 possui um domínio *CCR4-Not complex component, Not1, C-terminal* e um domínio *CCR4-Not complex, Not1 subunit, domain of unknown function DUF3819*, ambos reguladores da expressão gênica global.

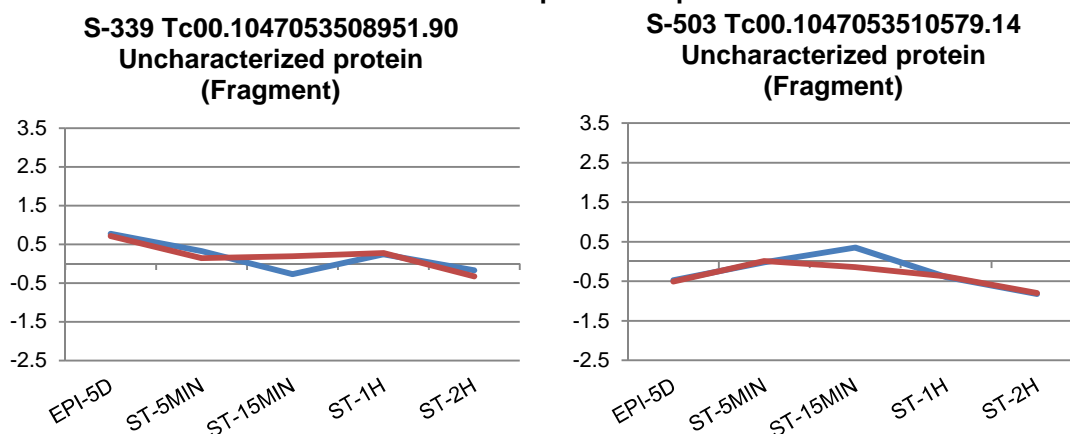
Já entre os sítios que apresentam diminuição na fosforilação está o S-1166 da proteína *calpain-like cystein peptidase* (Tc00.1047053506721.30). Outra proteína pertencente à mesma classe foi considerada diferencialmente expressa com um aumento na expressão em EPI-5D. O sítio T-3816 da

proteína hipotética Tc00.1047053508837.80, o sítios S-124 da proteína hipotética Tc00.1047053510301.30 e o sítio S-2723 da proteína hipotética Tc00.1047053508899.20 também apresentam uma diminuição na fosforilação.

#### 5.3.4. Sítios de fosforilação considerados modulados após a etapa de normalização entre os pontos experimentais ao longo do estresse nutricional EPI-5D, ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H

Após a etapa de normalização, 5 sítios de fosforilação foram considerados diferencialmente expressos ao longo do estresse nutricional (Tabela 14). Os sítios S-216 da *Acetyl-CoA carboxylase* (Tc00.1047053474937.9), S-212 da *GTP-binding protein* (Tc00.1047053504149.11) e S-143 da *60S acidic ribosomal protein P0* (Tc00.1047053508355.250), foram incluídos na análise sem a etapa de normalização e foram comentados anteriormente. O sítio S-339 da proteína hipotética Tc00.1047053508951.90, que diminui a fosforilação ao longo do estresse (Figura 38). Essa proteína possui um domínio *EF-hand*, que está associado à transdução e modulação de sinal de  $Ca^{2+}$ , e como mencionado anteriormente a presença de  $Ca^{2+}$  pode estimular a diferenciação (NELSON et al., 2002). Por fim, também foi considerado modulado ao longo do estresse nutricional o sítio S-503 da proteína hipotética Tc00.1047053510579.14, que diminui a fosforilação ao longo do estresse (Figura 38).

**Figura 38: Perfil de modulação do sítio S-339 da proteína hipotética Tc00.1047053508951.90 e do sítio S-503 da proteína hipotética Tc00.1047053510579.14**



O eixo y representa os valores log da intensidade das proteínas. EPI-5D – Epimastigotas cultivados por 5 dias; ST-5MIN, ST-15MIN, ST-1H e ST-2H – Epimastigotas submetidos a estresse nutricional em meio TAU por 5 minutos, 15 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente. As linhas azul e vermelha representam a intensidade dos sítios de fosforilação, réplica 1 e 2, respectivamente.

## 6. CONCLUSÃO

Obtivemos uma grande cobertura do proteoma e do fosfoproteoma de *T. cruzi* ao longo do estresse nutricional, uma importante fase para a diferenciação do parasita na metaciclogênese.

Com a análise do proteoma e do fosfoproteoma durante o estresse nutricional da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, juntamente com os resultados obtidos a partir de diferentes metaciclogêneses *in vitro*, observa-se que existem inúmeras diferenças de expressão das proteínas e modulação dos sítios de fosforilação entre a fase exponencial (EPI-3D) e a fase estacionária (EPI-5D). Na literatura, a fase estacionária vem sendo proposta como um estágio pré-diferenciação, e neste trabalho várias proteínas e sítios de fosforilação apresentam uma diferença de expressão entre EPI-3D e EPI-5D.

De forma geral, foram identificadas várias proteínas associadas à haste paraflagelar com um aumento na expressão e são observadas modificações no flagelo entre parasitas na fase exponencial e na fase estacionária. Também foram observadas diversas proteínas alteradas que estão associadas à síntese de ácidos graxos. Assim como em outros trabalhos, foi percebido um aumento na expressão de proteínas que estão associadas à resposta ao estresse oxidativo. Também se observa uma diminuição na expressão de proteínas associadas à maquinaria de transcrição e tradução.

Foi identificado um grande número de proteínas diferencialmente expressas e também sítios de fosforilação alterados associados à sinalização por cAMP-PKA, sugerindo que essa forma de sinalização celular é importante para o processo de diferenciação.

Dentre as proteínas hipotéticas consideradas diferencialmente expressas, várias possuem domínios associados à transdução e modulação de sinal de  $Ca^{2+}$ . Com isso, também é sugerido que a sinalização por  $Ca^{2+}$  desempenha um papel importante na diferenciação.

Vários sítios de fosforilação foram encontrados modulados entre a fase exponencial e a fase estacionária. As fosfoproteínas correspondentes a estes

sítios estão associadas ao tráfego de vesículas, motilidade, síntese de lipídeos, degradação de proteínas.

Os sítios que se apresentam modulados ao longo do estresse podem ser os responsáveis por ativar cascatas desencadeadoras da diferenciação, ou ainda, contribuir para as modificações que levam o parasita a aderir ao substrato e, portanto, são alvos para estudos posteriores.

A análise do perfil de expressão destas proteínas e sítios ao longo durante as demais etapas do processo de metaciclogênese pode fornecer maiores informações sobre o papel destas proteínas e sítios na diferenciação. Portanto serão selecionados algumas proteínas e alguns sítios de fosforilação, com maior variação ao longo do estresse nutricional, para que sejam caracterizados e então, forneçam maiores informações sobre o processo de diferenciação.

## 7. REFERÊNCIAS

ABU-ELNEEL, K.; KAPPELLER, I.; SHLOMAI, J. Universal Minicircle Sequence-binding Protein, a Sequence-specific DNA-binding Protein That Recognizes the Two Replication Origins of the Kinetoplast DNA Minicircle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 19, p. 13419–13426, 7 maio 1999.

ALLOATTI, A.; TRIPODI, K. E. J.; UTTARO, A. D. Synergistic effect of inhibitors of fatty acid desaturases on *Trypanosoma* parasites. **Parasitology research**, v. 112, p. 3289–3294, 25 jun. 2013.

ALLOATTI, A.; UTTARO, A. D. Highly specific methyl-end fatty-acid desaturases of trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 175, n. 2, p. 126–32, fev. 2011.

ALVAREZ, V. E. et al. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3454–64, 8 fev. 2008.

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

ATWOOD III, J. A et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 473–6, 15 jul. 2005.

ÁVILA, A. R. et al. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 159–168, 2003.

BALLESTEROS-RODEA, G. et al. Flagellar motility of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 520380, jan. 2012.

BANDINI, G. et al. Phosphoglucomutase is absent in *Trypanosoma brucei* and redundantly substituted by phosphomannomutase and phospho-N-acetylglucosamine mutase. **Molecular microbiology**, v. 85, n. 3, p. 513–34, ago. 2012.

BAO, Y. et al. Protein kinase A catalytic subunit interacts and phosphorylates members of trans-sialidase super-family in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 10, p. 716–726, 2010.

BARSNES, H. et al. OMSSA Parser: an open-source library to parse and extract data from OMSSA MS/MS search results. **Proteomics**, v. 9, n. 14, p. 3772–4, jul. 2009.

BODENMILLER, B. et al. PhosphoPep--a phosphoproteome resource for systems biology research in *Drosophila* Kc167 cells. **Molecular systems biology**, v. 3, n. 139, p. 139, jan. 2007.

BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 106, n. 4, p. 1349–58, abr. 1988.

BONALDO, M. C. et al. Characterization and Expression of Proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Experimental parasitology**, v. 51, n. 191, p. 44–51, 1991.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Rev Microbiol**, v. 27, p. 347–382, 1973.

BURGESS, M. W. et al. Simplified and efficient quantification of low-abundance proteins at very high multiplex via targeted mass spectrometry. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 13, n. 4, p. 1137–49, abr. 2014.

BUSCHIAZZO, A. et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002474, jan. 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 1, p. 159–218, 1909.

CHOUDHARY, C.; MANN, M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 6, p. 427–39, jun. 2010.

CIEŚLA, J.; FRĄCZYK, T.; RODE, W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins : important but easily missed. v. 58, n. 2, 2011.

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

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease . What is known and what should be improved : a systemic review Doença de Chagas . O que é conhecido e o que deve ser melhorado : uma visão sistêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.

COX, J. et al. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **Journal of proteome research**, v. 10, n. 4, p. 1794–805, 1 abr. 2011.

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, v. 130, n. 3, p. 395–8, 10 ago. 2007.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates , individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, 2008.

CUPELLO, M. P. et al. The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. **Acta Tropica**, v. 120, n. 3, p. 211–218, 2011.

DE ANDRADE, A. F. B. et al. Changes in cell-surface carbohydrates of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis under chemically defined conditions. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 12, p. 2845–2849, 1 dez. 1991.

DE GODOY, L. M. F. et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2694–703, ago. 2012.

DE PAULA LIMA, C. V et al. LM14 defined medium enables continuous growth of *Trypanosoma cruzi*. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 238, 10 set. 2014.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, p. 642502, 2009.

DHIR, V.; GOULDING, D.; FIELD, M. C. TbRAB1 and TbRAB2 mediate trafficking through the early secretory pathway of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 137, n. 2, p. 253–65, out. 2004.

DIAS, J. C. P. Globalização , iniquidade e doença de Chagas. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23 Sup 1, p. 13–22, 2007.

DIGIROLAMO, F. A. et al. La Vía de Transducción de Señales tor de Mamíferos Está Presente en *Trypanosoma Cruzi*. Reconstrucción In Silico y Posibles Funciones. **Medicina (Argentina)**, v. 72, p. 221–226, 2012.

DUNN, J. D.; REID, G. E.; BRUENING, M. L. Techniques for Phosphopeptide Enrichment prior to analysis by Mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, p. 29–54, 2010.

EL-SAYED, N. M. et al. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi* , Etiologic Agent of Chagas Disease. **The Trypanosomatid Genomes**, v. 4975, n. July, p. 409–415, 2005.

ENG, J. K. et al. A fast SEQUEST cross correlation algorithm. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 10, p. 4598–602, out. 2008.

ERSFELD, K. et al. Characterization of the Tubulin-Tyrosine Ligase. v. 120, n. 3, p. 725–732, 1993.



ESTEVEZ, M. G. et al. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 59, n. 1-2, p. 31–34, maio 1989.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual review of physiology**, v. 61, p. 243–82, jan. 1999.

FERNÁNDEZ-MOYA, S. M.; ESTÉVEZ, A. M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 1, p. 34–46, 2010.

FIGUEIREDO, R. C.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1213–8, dez. 2000.

GARCIA-MARCHAN, Y. et al. *Trypanosoma cruzi* calmodulin: Cloning, expression and characterization. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 4, p. 326–333, 2009.

GIESE, V. et al. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. September, p. 598–601, 2008.

GOLDENBERG, S.; AVILA, A. R. **Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2011. v. 75p. 285–305

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Experimental parasitology**, v. 66, n. 2, p. 205–12, ago. 1988.

GRIMSRUD, P. A et al. Phosphoproteomics for the masses. **ACS chemical biology**, v. 5, n. 1, p. 105–19, 15 jan. 2010.

GYGI, S. P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nat Biotech**, v. 17, n. 10, p. 994–999, out. 1999.

HERNÁNDEZ, R. et al. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 509–14, ago. 2012.

HOLETZ, F. B. et al. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, p. 1062–1067, 2007.

HUANG, H. et al. Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1107–1115, 2002.

HUANG, H. et al. Molecular cloning and characterization of the protein kinase A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, p. 242–245, 2006.

IDRISS, H. T. Man to trypanosome: The tubulin tyrosination/detyrosination cycle revisited. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 45, n. September 1999, p. 173–184, 2000.

ISHIHAMA, Y.; RAPPSILBER, J.; MANN, M. Modular stop and go extraction tips with stacked disks for parallel and multidimensional Peptide fractionation in proteomics. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 4, p. 988–94, abr. 2006.

JENSEN, B. C. et al. The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60 S ribosomal subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 32204–32211, 2003.

KESSLER, R. L. et al. *Trypanosoma cruzi* Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

KOLLIEN, A.; SCHAUB, G. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, n. 9, p. 381–387, set. 2000.

KRASSNER, S. M. et al. Action of exogenous potassium and calcium ions on in vitro metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of protozoology**, v. 38, n. 6, p. 602–608, 1991.

LEAL, S. T. et al. *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of a RAB7 gene. **Experimental parasitology**, v. 96, n. 1, p. 23–31, set. 2000.

LEE, S. H. et al. Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 691–9, 25 ago. 2006.

LEE, S. H.; STEPHENS, J. L.; ENGLUND, P. T. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 287–97, abr. 2007.

LIVORE, V. I.; TRIPODI, K. E. J.; UTTARO, A. D. Elongation of polyunsaturated fatty acids in trypanosomatids. **The FEBS journal**, v. 274, n. 1, p. 264–74, jan. 2007.

LOROCH, S. et al. Phosphoproteomics--more than meets the eye. **Electrophoresis**, v. 34, n. 11, p. 1483–92, jun. 2013.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 4, n. March, p. 1–16, 2002.

MALDONADO, R. A et al. Trypanosoma cruzi oleate desaturase: molecular characterization and comparative analysis in other trypanosomatids. **The Journal of parasitology**, v. 92, n. 5, p. 1064–74, out. 2006.

MANN, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. v. 7, n. December, p. 952–958, 2006.

MANN, M. et al. The coming age of complete, accurate, and ubiquitous proteomes. **Molecular cell**, v. 49, n. 4, p. 583–90, 21 fev. 2013.

MARCHINI, F. K. et al. Profiling the Trypanosoma cruzi phosphoproteome. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25381, jan. 2011.

MARCHINI, F. K. et al. Towards the Phosphoproteome of Trypanosomatids. In: SANTOS, A. L. S. et al. (Eds.). . **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma SE - 15**. Subcellular Biochemistry. [s.l.] Springer Netherlands, 2014. v. 74p. 351–378.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 525241, jan. 2010.

NAKAYASU, E. S. et al. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen. **Proteomics**, v. 9, n. 13, p. 3489–3506, 2009.

NELSON, M. R. et al. The EF-hand domain: A globally cooperative structural unit. **Protein Science**, v. 11, p. 198–205, 2002.

NES, W. D. et al. Sterol 24-C-methyltransferase: an enzymatic target for the disruption of ergosterol biosynthesis and homeostasis in Cryptococcus neoformans. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 481, n. 2, p. 210–8, 15 jan. 2009.

NILSSON, C. L. Advances in Quantitative Phosphoproteomics. **American Chemical Society**, v. 84, p. 735–746, 2011.

NÓBREGA, A. A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–5, abr. 2009.

OLSEN, J. V et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 635–48, 3 nov. 2006.

ONG, S.-E. et al. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 5, p. 376–386, 20 maio 2002.

ONG, S.-E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature chemical biology**, v. 1, n. 5, p. 252–62, out. 2005.

ONG, S.-E.; MANN, M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2650–60, jan. 2006.

PARODI-TALICE, A. et al. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 8, p. 881–6, jul. 2004.

PARSONS, M. et al. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC genomics**, v. 6, p. 127, jan. 2005.

PEREIRA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* Arginine Kinase Characterization and Cloning: A NOVEL ENERGETIC PATHWAY IN PROTOZOAN PARASITES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 1495–1501, 14 jan. 2000.

PEREIRA, C. A. et al. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. **FEBS Letters**, v. 554, p. 201–205, 2003.

PEREIRA, P. C.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 19 dez. 2013.

PORCEL, B. M. et al. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of genes encoding putative calcium-binding proteins, highly conserved in trypanosomatids. **Experimental parasitology**, v. 84, p. 387–399, 1996.

PORTAL, P. et al. Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi*. Suggested role on drug resistance. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, p. 42–51, 2008.

PREUSSE, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4-5, p. 221–224, 2012.

QUEIROZ, R. M. L. et al. Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Amastigogenesis. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 13, n. 12, p. 3457–72, dez. 2014.

RALSTON, K. S.; KISALU, N. K.; HILL, K. L. Structure-function analysis of dynein light chain 1 identifies viable motility mutants in bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 7, p. 884–94, jul. 2011.

RAMAKRISHNAN, S. et al. Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 4, p. 488–512, out. 2013.

RESPUELA, P. et al. Histone Acetylation and Methylation at Sites Initiating Divergent Polycistronic Transcription in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 23, p. 15884–15892, 6 jun. 2008.

RIGBOLT, K. T. G.; BLAGOEV, B. Quantitative phosphoproteomics to characterize signaling networks. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 23, n. 8, p. 863–71, out. 2012.

ROSS, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 3, n. 12, p. 1154–69, dez. 2004.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms☆. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1–21, mar. 2002.

SALAS CLAVIJO, N. A et al. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. **Acta tropica**, v. 124, n. 1, p. 87–91, out. 2012.

SÁNCHEZ-LUQUE, F. J. et al. Identification of an hepatitis delta virus-like ribozyme at the mRNA 5'-end of the L1Tc retrotransposon from *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 18, p. 8065–8077, 2011.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of Kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 117–43, 1995.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Emerging Infections**, v. 54, n. 6, p. 845–52, mar. 2012.

SOARES, M. J. et al. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 75, p. 522–527, 1989.

SOARES, M. J. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 139–41, jan. 1999.

SOARES, N. C. et al. Associating growth-phase-related changes in the proteome of *Acinetobacter baumannii* with increased resistance to oxidative stress. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 1951–1964, 2010.

SOUFI, B. et al. Characterization of the *E. coli* proteome and its modifications during growth and ethanol stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. February, p. 1–11, 2015.

SPADAFORA, C. et al. Two casein kinase 1 isoforms are differentially expressed in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 124, p. 23–36, 2002.

SPREHE, M. et al. Structure of the *Trypanosoma brucei* p22 Protein, a Cytochrome Oxidase Subunit II-specific RNA-editing Accessory Factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18899–18908, 11 jun. 2010.

STASYK, T.; HUBER, L. A. Mapping in vivo signal transduction defects by phosphoproteomics. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 1, p. 43–51, jan. 2012.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 9, p. 699–711, set. 2004.

TAN, C. S. H. Sequence, Structure, and Network Evolution of Protein Phosphorylation. **Science Signaling**, v. 4, n. 182, p. mr6–mr6, 2011.

TIBBETTS, R. S. et al. The DnaJ family of protein chaperones in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 319–326, 1998.

TONELLI, R. R. et al. TONELLI, 2011 - Protein Synthesis Attenuation by Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  IS Required for the Differentiation of *Trypanosoma cruzi* into Infective Forms. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 1–10, 2011.

TRIPODI, K. E. J. et al. Functional characterization of front-end desaturases from trypanosomatids depicts the first polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway from a parasitic protozoan. **The FEBS journal**, v. 273, n. 2, p. 271–80, jan. 2006.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. March, p. 193–197, 2003.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. Flagellar Elongation Induced by Glucose Limitation Is Preadaptive for *Trypanosoma cruzi* Differentiation. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 278, n. February, p. 269–278, 2000.

URBINA, J. A et al. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes by delta 24(25)-sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 73, p. 199–210, 1995.

VIGUEIRA, P. A.; PAUL, K. S. Requirement for Acetyl-CoA Carboxylases in *Trypanosoma brucei* is Dependent Upon the Growth Environment. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 117–132, 2011.

WALTHER, T. C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **The Journal of cell biology**, v. 190, n. 4, p. 491–500, 23 ago. 2010.

WANG, M. et al. Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 7, n. 5, p. 329–39, set. 2008.

WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC genomics**, v. 10, p. 255, jan. 2009.

WESTENBERGER, S. J. et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC genomics**, v. 7, p. 60, jan. 2006.

WILKINSON, S. R. et al. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13453–8, 15 out. 2002.

WISNIEWSKI, J. R. Mass Spectrometry – Based Proteomics Principles , Perspectives , and Challenges. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 132, n. October, p. 1566–1569, 2008.

WISNIEWSKI, J.; ZOUGMAN, A.; MANN, M. Combination of FASP and StageTip-Based Fractionation Allows In-Depth Analysis of the Hippocampal Membrane Proteome. **Journal of proteome research**, n. 8, p. 5674–5678, 2009.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 11, p. 49–79, jan. 2009.

YE, R. W.; ZIELINSKI, N. A.; CHAKRABARTY, A. M. Purification and Characterization of Phosphomannomutase / Phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* Involved in Biosynthesis of Both Alginate and Lipopolysaccharide. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 4851–4857, 1994.

ZHU, L. et al. Dynamic Proteome Changes of *Shigella flexneri* 2a During Transition from Exponential Growth to Stationary Phase. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 111–120, 2007.