

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA FORMA AMASTIGOTA DE
POPULAÇÕES DE *Trypanosoma cruzi* SENSÍVEIS E RESISTENTES
AO BENZONIDAZOL**

por

Maíra Mazzoni Pucci

Belo Horizonte
Novembro/2009

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR M.M.PUCCI 2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ANÁLISE PROTEÔMICA DA FORMA AMASTIGOTA DE POPULAÇÕES DE
Trypanosoma cruzi SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL

por

Maíra Mazzoni Pucci

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

Orientação: Dr. Alvaro José Romanha

Co-orientação: Dra. Rosiane A. da Silva Pereira

Belo Horizonte
Novembro/2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P977a
2009

Pucci, Maíra Mazzoni

Análise proteômica da forma amastigota de populações de *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol / Maíra Mazzoni Pucci. – Belo Horizonte, 2009

XVIII, 101: il, 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 111 - 119

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Doença de Chagas/quimioterapia 2. *Trypanosoma cruzi*/parasitologia 3. Resistência a Medicamentos/efeitos de drogas 4. Proteoma/análise I. Título. II. Romanha, Alvaro José (Orientação). III. Pereira, Rosiane A. da Silva (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ANÁLISE PROTEÔMICA DA FORMA AMASTIGOTA DE POPULAÇÕES DE
Trypanosoma cruzi SENSÍVEIS E RESISTENTES AO BENZONIDAZOL

por

Maíra Mazzoni Pucci

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alvaro José Romanha (Presidente)

Prof^a. Dra. Renata Guerra Sá

Prof^a. Dra. Roberta Lima Caldeira

Suplente: Prof^a. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho

Dissertação defendida e aprovada em: 27/11/2009

COLABORADORES

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) – Rio de Janeiro/RJ

Dr. Alex Chapeaurouge – Laboratório de Toxinologia/Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica

Dr. Jonas Perales – Laboratório de Toxinologia/Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica

APOIO

CPqRR/FIOCRUZ/MG - Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz

SUPORTE FINANCEIRO

PDTIS: Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

“Sua perspectiva da experiência muda a lição que você aprende”

Gerald Griffin

Agradecimentos

Se fosse possível dividir uma experiência de vida em etapas, o meu mestrado seria dividido em três. No início, um mundo novo com inúmeras possibilidades. Eu não sabia nada sobre cultura de células e parasitos nem tão pouco sobre proteoma. Duas expressões resumem este momento: medo do desconhecido e vontade de aprender. Com o tempo, começaram a aparecer as dificuldades, normais de qualquer projeto de pesquisa. Contaminação, fungos, dificuldade com a produtividade da cultura, mais contaminação, otimização dos ensaios de transformação, “milhões” de parasitos a serem contados madrugada afora, problemas de saúde, persistência. Mas, parece mesmo que no final tudo dá certo! O que ficou desses dois anos e nove meses de muito trabalho foi a certeza de que se eu pudesse voltar no tempo, viveria tudo de novo. Sem dúvida alguma, essa foi uma experiência marcante, de muitos obstáculos e superação de limites, mas com inúmeros ganhos e aprendizados. E não seria possível ter chegado ao fim sem o apoio dos meus orientadores, de amigos, familiares e colegas de trabalho.

Agradeço a Deus por me acompanhar sempre. Aos meus amados pais pelo amor e força incondicional, ao Paulinho pelo apoio, cuidado e paciência (Amo você!), e a minha maravilhosa família que tanto torceu por mim!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Alvaro Romanha.

À Dra. Rosiane... impossível resumir em poucas palavras seu papel nessa caminhada... Obrigada por tudo!

Agradeço aos participantes da banca por terem aceito o convite para avaliar este trabalho.

Agradeço ao Departamento de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) por ter disponibilizado a matriz de células Vero utilizada neste estudo.

Agradeço a subunidade Espectrometria de Massa da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde, em especial aos Drs. Alex Chapeaurouge e Jonas Perales.

Agradeço ao CNPq, FAPEMIG e PDTIS/FIOCRUZ, pelo financiamento deste projeto.

Agradeço de forma muito especial a Rosana Alves, pelos inúmeros ensinamentos, mas principalmente pela força, preocupação e carinho.

Aos chefes e a todos os colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular pelas palavras de incentivo, convívio agradável, conversas e conselhos. Em especial, gostaria de agradecer a Marcilene, Kênia, Fátima, Joyce, Paola, Maureen, Flávio, Fabiano e a uma amiga muito especial, Fê Barbosa. Obrigada. Vocês fizeram a diferença!

Agradeço a Sara Lopes pelos ensinamentos na cultura de células e a Joyce Frade pelos inúmeros auxílios prestados em várias etapas deste trabalho.

A todos os colegas do René Rachou, em especial à Dra. Andrea Teixeira (LBDM), à Dra. Tânia Alves, à Patrícia Fernandes e à Daniela Maia (LQPN), à Maria Angélica de Oliveira (LATEC), à Dra. Catherine Ropert (LAIM), à Dra. Vanessa Pascoal (LPC) e às amigas Ana Carolina Peixoto e Kátia Teixeira (BIOT).

Agradeço aos colegas, professores e secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, em especial à antiga coordenadora do curso Dra. Cristiana Brito e o atual coordenador Dr. Paulo Pimenta.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Agradeço ao diretor do Centro de Pesquisa René Rachou, Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira.

Agradeço as secretárias Carolina Lara e Michelle Silva pela atenção e disponibilidade.

Agradeço a Fê Trindade pela amizade e apoio!

Agradeço a Corina e Danielle, amigas queridas, que apesar da distância estão sempre presentes.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista!

Sumário

Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e símbolos	xiv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A doença de Chagas	19
1.2 A diferenciação entre as formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.3 Quimioterapia e resistência a drogas	23
1.4 Genoma e regulação da expressão gênica no <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.5 Estudos do proteoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 Populações de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
4.2 Cultura de células hospedeiras das populações de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
4.3 Obtenção de tripomastigotas sanguíneos para a infecção das células	32
4.4 Cultura das formas tripomastigotas <i>in vitro</i>	32
4.5 Transformação das formas tripomastigotas em amastigotas axênicas	33
4.6 Lavagem das amastigotas transformadas para extração de proteínas totais	33
4.7 Extração de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
4.8 Eletroforese bidimensional (2DE) em gel de poliacrilamida	34

4.9	Análise das imagens dos géis bidimensionais	36
4.10	Excisão e digestão tríptica dos <i>spots</i> protéicos	37
4.11	Controle sobre a qualidade das culturas de células e parasitos	38
5	RESULTADOS	40
5.1	Transformação das formas tripomastigotas em amastigotas axênicas	40
5.2	Obtenção da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
5.3	Extração de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
5.4	Eletroforese bidimensional de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
5.5	Análise das imagens dos géis bidimensionais de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
5.6	Monitoramento das culturas de células e parasitos	73
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	85
8	ANEXOS	86
8.1	Anexo 1	87
8.2	Anexo 2	100
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas	19
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3. Transformação induzida por pH ácido das formas tripomastigotas da população BZR de <i>Trypanosoma cruzi</i> em formas amastigotas	41
Figura 4. Transformação induzida por pH ácido das formas tripomastigotas da população BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> em formas amastigotas	42
Figura 5. Controle dos ensaios de transformação induzida por pH ácido das formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> em formas amastigotas	43
Figura 6. Grau de pureza das amostras de amastigotas axênicas das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	45
Figura 7. Preparação de tripomastigotas e amastigotas axênicas da população BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Figura 8. Relação entre o número de parasitos e a quantidade de proteína total extraída	48
Figura 9. Eletroforese unidimensional dos extratos protéicos da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
Figura 10. Mini-géis bidimensionais das proteínas totais da forma amastigota representativos das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
Figura 11. Gel bidimensional em gradiente de pH 3-10NL das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZR de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
Figura 12. Gel bidimensional em gradiente de pH 3-10NL das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
Figura 13. Gel bidimensional em gradiente de pH 4-7 das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZR de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 14. Gel bidimensional em gradiente de pH 4-7 das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	55

Figura 15. Gel <i>master</i> da análise dos <i>spots</i> obtidos por separação em gradiente de pH 3-10NL de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
Figura 16. Gel <i>master</i> da análise dos <i>spots</i> obtidos por separação em gradiente de pH 4-7 de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 17. Análise dos produtos de PCR para o monitoramento de contaminação das culturas de células e parasitos por <i>Mycoplasma</i>	74

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** *Spots* indicados nos géis 2D de gradiente de separação de pH 3-10NL como diferencialmente ou exclusivamente expressos na forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* e identificados por Maldi-ToF-ToF MS **61**
- Tabela 2.** *Spots* indicados nos géis 2D de gradiente de separação de pH 4-7 como diferencialmente ou exclusivamente expressos na forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* e identificados por Maldi-ToF-ToF MS **66**
- Tabela 3.** Proteínas da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* identificadas por MS/MS e agrupadas em categorias funcionais com base no banco de dados *The Gene Ontology* **71**
-

Lista de abreviaturas e símbolos

BZ – Benzonidazol

BZR – População de *Trypanosoma cruzi* derivada da cepa Y selecionada *in vivo* com resistência ao benzonidazol (Murta & Romanha, 1998)

BZS – População de *Trypanosoma cruzi* susceptível ao benzonidazol e derivada da cepa Y (Murta & Romanha, 1998)

CHAPS – 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane Sulfonate

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

DC – doença de Chagas

DD – *Differential display*

D-MEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos

dpi – pontos por polegada (*dots per inch*)

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

FeSOD-A – Ferro superóxido dismutase A

GluDH – Glutamato desidrogenase

GO – *The Gene Ontology*

h - hora

HSP – *Heat shock protein*

IEF – Focalização isoeétrica (*isoelectric focusing*)

IPG – Gradiente de pH imobilizado (*immobilized pH gradient*)

KDa – Kilodaltons

LC – Cromatografia líquida

LC/MS/MS – Cromatografia líquida combinada à espectrometria de massa em *tandem*

M – Molar

MALDI – Desorção e ionização a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*)

Mb – Megabases

mg – miligrama

min – minutos

mL – mililitro

mM – milimolar

MM – marcador de massa molecular

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MS – Espectrometria de massa

MW – massa molecular

MW_t – massa molecular teórica

m/z – razão massa/carga

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

NFX – Nifurtimox

NL – não linear

NTRI – Nitroreductase do tipo I

OYE – *Old yellow enzyme*

PP – Proteína fosfatase

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGP – Fosfoglicoproteína de membrana

pH – Potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

pI_t – ponto isoelétrico teórico

pmoles - picomoles

RDE – *Representation of differential expression*

RNA – Ácido ribonucléico

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

SL – seqüência líder ou mini-exon (*Splice leader*)

TAT – Tirosina amino transferase

ToF – *Time of Flight*

Tris – Tris-hidroximetilaminoetano

TxNPx – Triparedoxina peroxidase

V – Volts

Vh – Volts/hora

WHO/OMS – *World Health Organization*/ Organização Mundial de Saúde

x g - gravidade

µg – micrograma

µL – microlitro

2D – Bidimensional

2DE – Eletroforese bidimensional

2DE/MS – Eletroforese bidimensional acoplada a espectrometria de massa

°C – Graus Celsius

Resumo

A Doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 8 - 11 milhões de indivíduos na América Latina. Há 30 anos, o tratamento da DC é feito pelos nitroderivados 2-nitroimidazol (benzonidazol) e 5-nitrofurano (nifurtimox). No entanto, tais drogas apresentam consideráveis efeitos colaterais e baixa eficácia de cura, especialmente na fase crônica da doença. Além disso, a resistência natural e cruzada aos nitroderivados foi descrita para algumas cepas do parasito, o que aumenta a falha terapêutica e limita as opções de tratamento. A análise proteômica, ideal para o estudo de mudanças globais na expressão de genes em tripanossomatídeos, pode auxiliar na busca de alvos bioquímicos para serem utilizados em novas abordagens quimioterápicas. O presente estudo teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente expressas na forma amastigota de duas populações de *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol, a população resistente, BZR, e seu par sensível, BZS. Para tal, formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *T. cruzi* foram mantidas em cultura de células Vero e transformadas em amastigotas após 18h de exposição ao pH 5,0. Os extratos de proteína total obtidos foram separados por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão, as proteínas foram separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico em fitas de gradiente de pH imobilizado de 17cm nas faixas de pH 3-10NL e pH 4-7. Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas por peso molecular em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e corados por Coomassie Blue G-250. As imagens dos géis foram digitalizadas em um densitômetro GS-800 (Bio-Rad) e analisadas através do programa PDQuest 7.3.0 (Bio-Rad). Cerca de 300 e 225 *spots* dos géis nas faixas de pH 3-10NL e pH 4-7, respectivamente, foram analisados. Os *spots* selecionados através de análise qualitativa ou quantitativa como diferencialmente ou exclusivamente expressos em uma das populações foram identificados por espectrometria de massa (MS) do tipo Maldi-ToF-ToF. Dos 114 *spots* submetidos a MS, 107 (94%) foram identificados, correspondendo a 63 proteínas diferentes. Dentre as proteínas identificadas estão aquelas envolvidas com a atenuação dos efeitos gerados pelo metabolismo de drogas, como algumas enzimas da via antioxidante, e outros alvos potenciais de drogas.

Abstract

Chagas' disease, which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 8 - 11 million people in Latin America. Only two drugs are clinically used for treatment of the disease in the last 30 years, the nitroimidazole benznidazole (BZ) and the nitrofurantoin nifurtimox (NFX). Both drugs have frequently side-effects and very low anti-parasitic activity in long-term chronic forms of the disease. Furthermore, the resistance to both drugs, already described from some populations of the parasite, has a considerable impact in the disease chemotherapy. Proteomic analysis has been reported as an ideal approach to study the global changes in the expression of genes in tripanosomatids and can assist in the search of biochemical targets to be used in new chemotherapeutic approaches. In this work our goal were to identify proteins differentially expressed in *T. cruzi* benznidazole resistant and susceptible amastigote forms. Trypomastigote forms from two *T. cruzi* populations selected *in vivo*, BZ resistant (BZR) and BZ susceptible (BZS), were maintained in Vero cell monolayers and induced to transform in amastigotes after 18h exposure at pH 5.0. The total protein extracts were analyzed by a two-dimensional electrophoresis. First, onto 17cm immobilized pH gradient (IPG) strips with a pH range 3-10 nonlinear (NL) and 4-7. In the second dimension, the proteins were separated in a 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue G-250. Two-dimensional gel images were digitized from stained gels using a GS-800 densitometer (Bio-Rad) and analyzed using the PDQuest 7.3.0 software (Bio-Rad). About 300 and 225 spots, separated onto strips with pH range 3-10NL and 4-7, respectively, were analyzed. The spots differentially or unique expressed in one of the *T. cruzi* populations were selected to be identified by Maldi-ToF-ToF mass spectrometry (MS). Of the 114 spots subjected to MS, 107 (94%) were identified as 63 different proteins. Among the identified polypeptides, there were some antioxidant defenses enzymes that have been associated with drug resistance and other targets for new chemotherapeutic approaches.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é endêmica na América Latina e está inserida no quadro das doenças tropicais negligenciadas (Figura 1). A doença e seu agente causador, o *Trypanosoma cruzi*, foram descobertos e descritos por Carlos Chagas em 1909. Atualmente, estima-se que cerca de 8-11 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* nos países endêmicos, e que aproximadamente 40 milhões vivam em áreas de risco (Schofield *et al*, 2006; CDC, 2009).



Figura 1. Distribuição geográfica da doença de Chagas (WHO/TDR,2003)

Apesar do seu caráter enzoótico natural, a doença de Chagas evoluiu para se estabelecer como uma antropozoonose, caráter fortemente relacionado ao desmatamento, a quebra dos ecótopos silvestres e a maneira como o homem se estabeleceu no ambiente desmatado, favorecendo a formação de um ciclo doméstico e se constituindo como um hospedeiro acidental da doença (De Lana & Tafuri, 2006; Dias, *et al*, 2008). Embora esteja relacionada à pobreza das zonas rurais, a epidemiologia da doença de Chagas tem se alterado ao longo do tempo através dos movimentos populacionais associados ao êxodo rural e emigrações para outras regiões do mundo (Bern *et al*, 2007; Bern *et al*, 2008; Dobarro *et al*, 2008).

A principal forma de transmissão da doença em áreas endêmicas é a vetorial, realizada pelo inseto triatomíneo hematófago da família Reduviidae. No entanto, a

doença também pode ser transmitida por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, transmissão congênita (CDC, 2009) e pela ingestão de alimentos contaminados (Benchimol Barbosa, 2006; Dias, 2006; CDC, 2009).

Em junho de 2006, o Brasil foi declarado livre da transmissão da doença de Chagas pelo seu principal vetor, o *Triatoma infestans*. O processo de eliminação da doença no Brasil foi intensificado a partir de 1991, através do estabelecimento dos programas de controle da Iniciativa dos Países do Cone Sul, formada, além do Brasil, por Argentina, Paraguai, Uruguai, Chile e Bolívia. Posteriormente, os países andinos e da América Central se engajaram na tentativa de reduzir a incidência da doença. Apesar dos avanços conseguidos com as iniciativas dos países endêmicos, a doença de Chagas ainda prevalece como um sério problema de saúde pública e ações permanentes de controle e/ou vigilância devem ser mantidas (Moncayo, 1999; Schofield *et al*, 2006; Dias *et al*, 2008).

O agente etiológico da doença de Chagas, o *T. cruzi*, é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae. Dois gêneros dessa família, formada por parasitos obrigatórios, apresentam grande importância médica: *Leishmania* e *Trypanosoma* (De Lana & Tafuri, 2006).

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico (Figura 2). O parasito, que apresenta três principais formas evolutivas, alterna entre uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e outra extracelular no hospedeiro invertebrado (De Lana & Tafuri, 2006).

Durante o seu repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas que, posteriormente, se diferenciam em epimastigotas. Na luz do intestino médio do inseto vetor, estas formas se multiplicam por divisão binária e, mediante a um estresse nutricional, já no intestino posterior, se diferenciam nas formas tripomastigotas metacíclicas infectantes. Estas formas são eliminadas juntamente com as fezes e urina do vetor hematófago durante o seu repasto sanguíneo e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado através da pele lesionada ou de mucosa permissiva. Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de invadir diferentes tipos celulares, tais como células do sistema fagocítico mononuclear e células musculares lisas ou estriadas. Após a sua entrada nas células, elas se transformam nas formas amastigotas que se multiplicam por sucessivas divisões binárias no citoplasma celular. O processo de diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas

inicia-se após um período de aproximadamente quatro dias e culmina com a ruptura da célula. Livres na circulação sanguínea, as formas tripomastigotas podem infectar outras células ou serem ingeridas pelo inseto vetor durante a sua alimentação, fechando assim o ciclo (De Lana & Tafuri, 2006; Teixeira *et al* , 2006).

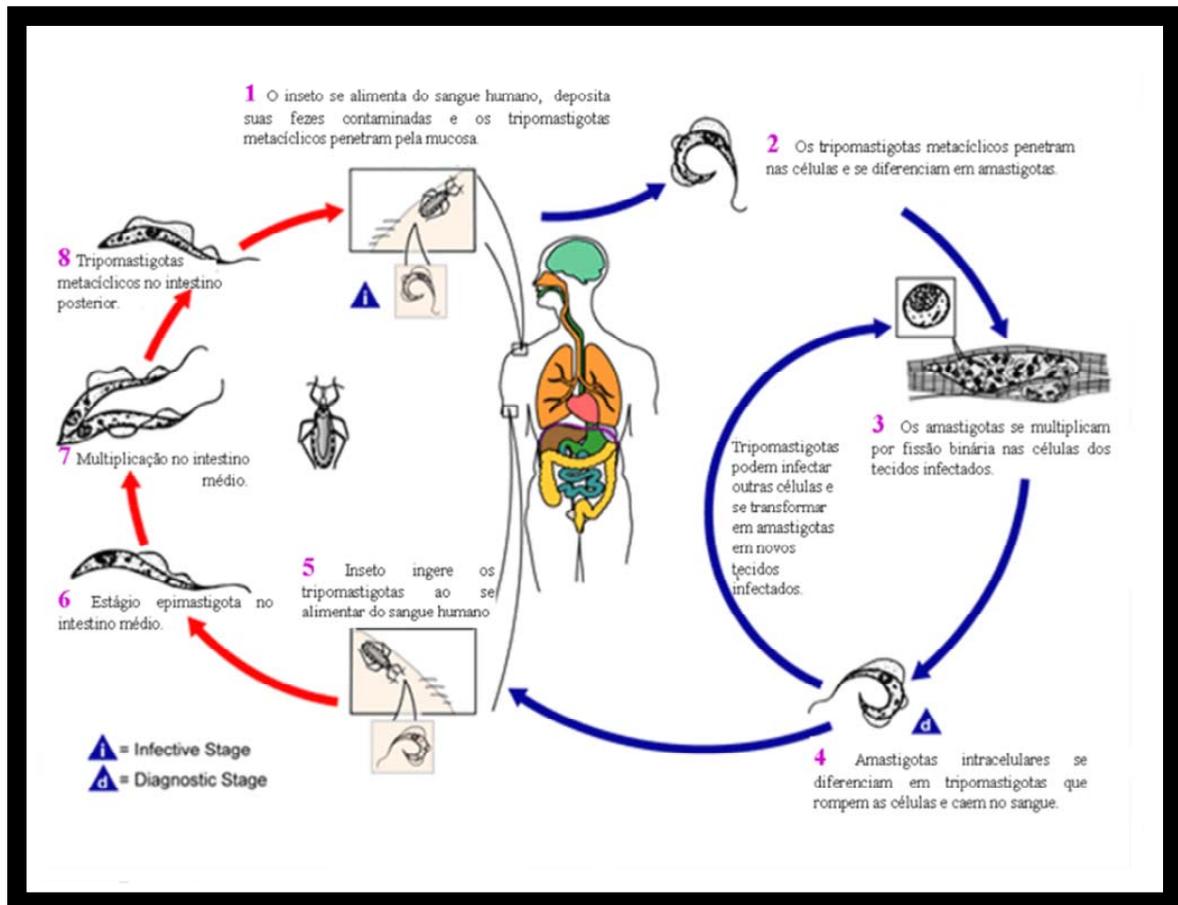


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (CDC, 2009)

A doença de Chagas apresenta duas fases características, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia e quando sintomática, por febre, mal-estar, cefaléia, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Uma reação inflamatória associada à porta de entrada do parasito no organismo também pode ser observada, sendo denominada “sinal de Romanã” ou “chagoma de inoculação”, dependendo da associação à conjuntiva ocular ou a outros locais da superfície corporal, respectivamente. Tais sintomas são normalmente confundidos com os de diversas outras infecções e a doença passa, por muitas vezes, despercebida nessa fase. Em geral, menos de 5% dos casos agudos evoluem para óbito, fato observado em pacientes que apresentam um quadro de encefalomielite ou insuficiência cardíaca associados. Após um período que varia de dois a quatro meses, a doença entra na fase crônica, inicialmente marcada por um estado de latência que pode durar por muitos anos ou por toda a vida do paciente. Este estado,

conhecido como a forma indeterminada da doença, é caracterizado pela ausência de sinais ou sintomas do ponto de vista clínico, embora por positividade em exames sorológicos e parasitológicos. Após um intervalo de tempo que varia de 10 a 30 anos, cerca de $\frac{1}{3}$ dos pacientes passam a apresentar manifestações clínicas associadas a determinados órgãos, tais como coração, esôfago, cólon e sistema nervoso, caracterizando as outras formas clínicas da doença (Prata, 2001; Teixeira *et al*, 2006).

1.2 A diferenciação entre as formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*

A diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese) no intestino posterior do triatomíneo ocorre provavelmente como uma resposta do parasito às mudanças ambientais, tais como a redução dos nutrientes disponíveis. Como consequência, esse processo envolve mudanças no padrão de expressão dos genes, o que resulta em diferenças morfológicas e funcionais entre esses estágios evolutivos (Yamada-Ogatta *et al*, 2004).

A mesma relação entre mudanças ambientais e ajuste da expressão dos genes pode ser observada durante a transformação das formas tripomastigotas em amastigotas (amastigogênese). De maneira geral, o processo que envolve a adesão do parasito à célula é seguido da concentração de íons cálcio no local da invasão e recrutamento de lisossomos. A formação de um vacúolo parasitóforo, principal maneira pela qual o parasito penetra na célula hospedeira, ocorre pela fusão dos lisossomos à membrana plasmática. O pH ácido do vacúolo estimula a secreção de uma proteína do tipo porina que favorece o escape do parasito para o citoplasma onde ele completará o processo de amastigogênese, iniciado pela sua exposição a um ambiente ácido (Andrade & Andrews, 2005; Yoshida, 2006). Alguns dados da literatura sugerem que os mecanismos que as formas tripomastigotas metacíclicas utilizam para invadir a célula alvo e para desencadear o processo de amastigogênese se diferem, em alguns pontos, daqueles utilizados pelas formas tripomastigotas sanguíneas (Navarro *et al*, 2003; Yoshida, 2006).

O processo de amastigogênese pode ser mimetizado *in vitro* através da exposição dos parasitos ao baixo pH e é um modelo que vem sendo utilizado tanto para o *T. cruzi* (Tomlinson *et al*, 1995; Navarro *et al*, 2003; Minning *et al*, 2003; Paba *et al*, 2004; Atwood *et al*, 2005; Magalhães *et al*, 2006; Minning *et al*, 2009) quanto para parasitos do gênero *Leishmania* (Burchmore & Barret, 2001).

1.3 Quimioterapia e resistência a drogas

As duas drogas atualmente disponíveis para tratamento da doença de Chagas são os nitroderivados 5-nitrofurano e 2-nitroimidazol conhecidos, respectivamente, como nifurtimox (NFX) e benzonidazol (BZ) e comercializados como Lampit[®] (Bayer) e Rochagan[®] ou Radanil[®] (Roche). Ambos fazem parte de uma mesma família, a dos nitroheterocíclicos, mas possuem diferentes grupos químicos e apresentam diferentes mecanismos de ação contra o *T. cruzi*. De maneira geral, o mecanismo de ação do NFX está associado à formação de radicais nitroânions instáveis que na presença de oxigênio produzem metabólitos altamente tóxicos para o parasito, que é deficiente em mecanismos de detoxificação. Embora ainda comercializado em alguns países da América Latina, o uso do NFX foi descontinuado no Brasil em decorrência da sua alta toxicidade para o paciente. O mecanismo de ação do BZ é pouco compreendido, mas acredita-se que ele esteja associado à ligação covalente de seus intermediários nitroreduzidos a componentes celulares do parasito (Coura e de Castro, 2002).

O tratamento com os nitroderivados é recomendado para casos agudos, crônicos de baixa idade, de transmissão congênita ou acidental e de reativação da doença (Prata, 2001; Coura e de Castro, 2002). Na fase aguda, o NFX e o BZ são capazes de reduzir a gravidade dos sintomas e encurtar o curso clínico e duração de parasitemia detectável, sendo a cura alcançada em cerca de 80% dos casos. Já o tratamento etiológico na fase crônica é bastante controverso, visto a sua baixa eficácia de cura, alcançando cerca de 8% (Prata, 2001; Cançado 2002). Apesar disso, alguns autores são favoráveis ao tratamento nessa fase, tendo por base alguns estudos que indicam que o mesmo pode melhorar o prognóstico do paciente e tornar o desenvolvimento e a progressão da cardiomiopatia mais lentos (Cançado, 2002; Viotti *et al*, 2006).

Além dos baixos índices de cura, o tratamento com os nitroderivados apresenta graves efeitos colaterais, que estão provavelmente relacionados aos danos causados por uma oxiredução nos tecidos do hospedeiro (Urbina, 1999).

Diferenças observadas na eficácia do tratamento de indivíduos infectados com o *T. cruzi* podem ser explicadas, em parte, pelas diferenças de susceptibilidade de cepas do parasito a drogas, algumas inclusive, são consideradas naturalmente resistentes e com resistência cruzada aos nitroderivados (Filardi & Brener, 1987).

Com o objetivo de elucidar as bases moleculares do mecanismo de resistência a drogas no *T. cruzi*, alguns grupos, inclusive o nosso, obtiveram cepas com resistência selecionada *in vivo* e *in vitro* aos nitroderivados (Nirdé *et al*, 1995; Murta & Romanha, 1998; Wilkinson *et al*, 2008) e as utilizam em estudos de expressão gênica diferencial. A superexpressão da fosfoglicoproteína de membrana PGP, por exemplo, foi associada a resistência a múltiplas drogas em *Leishmania* spp. (Oullete & Borst *apud* Murta *et al*, 2001), em *Plasmodium falciparum* (Wilson *et al apud* Murta *et al*, 2001) e em *Entamoeba histolytica* (Descoteaux *et al apud* Murta *et al*, 2001), embora essa relação não tenha sido observada para o *T. cruzi* (Murta *et al*, 2001). Além da PGP, outros possíveis alvos de drogas foram estudados pelo nosso grupo. A “Old Yellow Enzyme” (OYE) é uma NAD(P)H flavina redutase que está envolvida na síntese de prostaglandinas PGF₂ α e na redução de drogas tripanocidas. Foi observada uma associação entre a deleção de três cópias do gene da TcOYE e a resistência selecionada *in vitro* ao BZ (Murta *et al*, 2006). Nogueira e cols. (2006) verificaram uma relação entre o aumento da expressão de uma enzima envolvida na remoção de radicais superóxido, a ferro superóxido dismutase A (FeSOD-A), e o fenótipo de resistência *in vitro*. Além disso, foi verificada uma associação entre o aumento da expressão de outra enzima da via antioxidante, a triparedoxina peroxidase (TcTxNPx), e a resistência induzida *in vitro* ao BZ (Nogueira *et al*, 2009b). Rego e cols. (2008) observaram um aumento no nível da expressão do mRNA da enzima tirosina amino transferase (TAT) de populações com resistência selecionada *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, o aumento correspondente não foi verificado em níveis protéicos. Dessa forma, foi sugerido que a TcTAT não estava diretamente envolvida com o mecanismo primário de resistência a drogas, mas que poderia participar de um mecanismo secundário ou de ter sido produzida como um fator de resposta ao estresse. Murta e cols. (2008) avaliaram a expressão diferencial de genes em três pares de clones e populações de *T. cruzi* com resistência ao benzonidazol através das técnicas de *Differential display* (DD) e *Representation of differential expression* (RDE). Os resultados mostraram que dois dos três genes obtidos por DD foram superexpressos na população com resistência induzida *in vitro* e que quatro dos cinco genes identificados por RDE foram mais expressos em populações do parasito com resistência ao BZ.

Wilkinson e cols. (2008) sugeriram um mecanismo para a resistência cruzada dos tripanossomas aos nitroheterocíclicos ao verificarem que a ativação dos compostos NFX e BZ era feito por uma nitroredutase do tipo I (NTRI). De acordo

com estes autores, a redução dos níveis de expressão da NTRI estaria envolvida nesse processo.

1.4 Genoma e regulação da expressão gênica no *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta um genoma diplóide, cujo tamanho estimado está entre 106.4 a 110.7 megabases (Mb). O número de genes codificadores de proteínas foi inicialmente predito como sendo de 25.013, o qual foi manualmente refinado para um total de 22.570 genes. A anotação do genoma do *T. cruzi* contribuiu para um maior entendimento da biologia do parasito e da sua diversidade genética. (El-Sayed *et al*, 2005).

Mais de 50% do genoma nuclear deste tripanosomatídeo é composto por seqüências repetitivas que podem estar agrupadas em grandes *clusters* ou dispersas pelo genoma. Assim, genes que codificam para proteínas tais como tubulina, amastina, trans-sialidases e mucinas, por exemplo, estão presentes em múltiplas cópias no genoma do parasito. A tendência do *T. cruzi* em duplicar os seus genes e agrupá-los em *tandem* pode estar relacionada a um processo evolutivo de adaptação genética. Duplicar o número de cópias de um gene pode ter sido o modo com que o parasito compensou eventuais perdas gênicas ou uma forma de aumentar o nível de expressão de proteínas. Já a organização em *tandem* pode estar relacionada com a forma com que os genes são transcritos, em longos mRNAs policistrônicos (Silveira, 2000; El-Sayed *et al*, 2005).

Os mRNAs policistrônicos são processados a mRNAs maduros monocistrônicos através de um mecanismo de *trans-splicing*. Neste processo, há a adição de uma seqüência de 39 nucleotídeos denominada de *splice-leader* (SL), ou mini-êxon, na região 5' de cada mRNA. Adicionalmente, na porção 3' do mRNA ocorre o evento de poliadenilação. Após seu processamento, os mRNAs maduros estão prontos para saírem do núcleo e serem traduzidos (Clayton, 2002; Campbell *et al*, 2003).

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxênico e precisa se adaptar a mudanças ambientais impostas por essa condição. Assim, a adaptação a ambientes com temperaturas, nutrientes e defesas imunes distintas requer um ajuste nos níveis de expressão dos genes. Na maioria dos eucariotos esse controle é feito no início da transcrição. Nos tripanossomatídeos, no entanto, a regulação da expressão gênica ocorre em eventos pós-transcricionais, como por exemplo, através do controle da

estabilidade dos mRNAs maduros ou de seus produtos traduzidos. A consequência imediata dessa forma de regulação gênica é que, muitas vezes, o número de cópias de um gene ou de um transcrito de mRNA não tem correlação direta com os níveis de expressão protéica (Teixeira, 1998; Clayton, 2002; Campbell *et al*, 2003; Palenchar & Bellofatto, 2006).

1.5 Estudos do proteoma de *Trypanosoma cruzi*

O termo “proteoma” faz referência ao conjunto de proteínas expressas por um organismo, em um determinado momento ou em determinadas condições. Os ajustes de expressão gênica, que ocorrem como uma resposta adaptativa às mudanças do meio, fazem do proteoma de um organismo algo extremamente dinâmico e variável. Através de técnicas proteômicas é possível obter perfis de separação bidimensionais completos de uma amostra de proteína ou realizar um estudo comparativo entre duas ou mais amostras. As análises proteômicas são divididas basicamente em dois passos: a separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2DE) ou cromatografia líquida (LC) e a identificação por espectrometria de massa (MS) (Ashton *et al*, 2001; Huete-Pérez *et al*, 2005).

Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas com base em duas das suas propriedades, o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MW). A focalização isoelétrica é o procedimento utilizado para separar as proteínas de acordo com o seu pI, em uma primeira dimensão. Já a separação das proteínas em uma segunda dimensão, através da MW, é feita em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Cada mancha ou *spot* de um gel bidimensional corado corresponde a um polipeptídeo. O presença ou ausência de um determinado *spot* pode fornecer informações a respeito de proteínas estágio-específicas. A intensidade de um *spot*, por sua vez, fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial de proteínas em um estudo comparativo (Ashton *et al*, 2001).

A cromatografia líquida é um método de separação de proteínas sensível em detectar polipeptídeos de baixa massa molecular, básicos ou hidrofóbicos, embora apresente uma desvantagem para quantificar proteínas e identificar aquelas com modificações pós-traducionais (Garbis *et al*, 2005).

O processo de identificação das proteínas separadas por 2DE ou por cromatografia é realizado por espectrometria de massa, uma técnica utilizada para determinar massas moleculares com grande precisão. No caso de uma MS do tipo

MALDI-ToF-ToF, por exemplo, os peptídeos previamente digeridos com tripsina são plotados em uma placa, juntamente com uma matriz. A incidência de um laser sobre a placa faz com que os peptídeos sejam ionizados. Os íons formados são separados pelo primeiro analisador de massas (ToF) e, em seguida, os peptídeos correspondentes aos picos mais intensos são fragmentados em uma câmara de colisão pela ação de um gás e, posteriormente, acelerados em um campo elétrico a vácuo (ToF) até um detector que determina seus tempos de voo (*Time of Flight* – ToF) na razão massa/carga (m/z). Posteriormente, é feita uma busca de identidade utilizando a sequência dos peptídeos gerados por meio de ferramentas de bioinformática (Ashton *et al*, 2001; Veenstra, 2006).

A combinação das técnicas mencionadas vem sendo utilizada para estudar o perfil global de proteínas de diferentes espécies de tripanossomatídeos, tais como *Trypanosoma cruzi* (Parodi-Talice *et al*, 2004; Paba *et al*, 2004; Atwood *et al*, 2005; Magalhães *et al*, 2006; Souza *et al*, 2007; Parodi-Talice *et al*, 2007; Andrade *et al*, 2008; Magalhães *et al*, 2008; Sodré *et al*, 2009), *Trypanosoma brucei* (Foucher *et al*, 2006) e *Leishmania* ssp. (Drummelsmith *et al*, 2003; Cuervo *et al*, 2007).

O proteoma comparativo dos diferentes estágios evolutivos do *T. cruzi* foi estudado por eletroforese bidimensional acoplada a espectrometria de massa (2DE/MS) (Paba *et al*, 2004) e por cromatografia líquida combinada a espectrometria de massa em *tandem* (LC/MS/MS) (Atwood *et al*, 2005). Outros estudos realizaram a construção do mapa proteômico de epimastigotas visando determinar o perfil protéico desse estágio evolutivo e obter uma melhora na separação e resolução dos *spots* por 2DE (Parodi-Talice *et al*, 2004; Souza *et al*, 2007; Parodi-Talice *et al*, 2007; Sodré *et al*, 2009). Magalhães e *cols.* (2006) padronizaram a metodologia 2DE para faixas de pH alcalino utilizando formas epimastigotas do parasito, sendo essa metodologia também aplicada às formas tripomastigotas e amastigotas.

Uma abordagem proteômica aplicada ao estudo de resistência a drogas foi primeiramente realizada, pelo nosso grupo, por Andrade e *cols.* (2008). O extrato de proteínas totais de formas epimastigotas do *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* (par BZR e BZS) ou *in vitro* (par 17 LER e 17WT) e clones destas populações foram submetidas à 2DE/MS. Dentre as proteínas identificadas e associadas ao fenótipo de resistência/susceptibilidade ao BZ estão algumas das quais tem se sugerido serem potenciais alvos de drogas. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Santos e *cols.* (2008) trabalharam com as formas tripomastigotas de populações

com resistência selecionada *in vivo* (par BZR E BZS) e verificaram a relação entre a expressão diferencial de algumas das proteínas identificadas e o fenótipo de resistência.

2 JUSTIFICATIVA

O tratamento etiológico da doença de Chagas é pouco eficaz, especialmente na fase crônica da doença onde apresenta baixos índices de cura. Esse fato está associado, em parte, a diferença de susceptibilidade de cepas do parasito a drogas, sendo algumas consideradas naturalmente resistentes e com resistência cruzada aos nitroderivados. O aumento no número de falhas terapêuticas e a limitação nas opções de tratamento estão diretamente associados a este contexto. Além disso, as drogas atualmente utilizadas para tratar a doença apresentam sérios efeitos colaterais e não há vacinas disponíveis para a imunoprofilaxia. Dessa forma, a descoberta de novos alvos para o desenvolvimento de drogas mais eficazes e menos tóxicas faz-se necessário. Nesse contexto, o mecanismo de resistência do parasito às drogas deve ser considerado, e com ele, a importância de se melhor entender as bases moleculares envolvidas nesse processo.

As proteínas são os produtos finais da transcrição e da tradução de seqüências gênicas, e são elas as moléculas diretamente envolvidas nos processos biológicos de um organismo, sendo por isso, utilizadas para o desenho de drogas e vacinas. Uma vez que nos tripanossomatídeos o controle de expressão dos genes ocorre pós-transcricionalmente, nem sempre há uma correlação direta entre os níveis de mRNA e os de sua proteína correspondente. Nesse caso, a proteômica constitui-se como uma ferramenta ideal para estudos comparativos da expressão global de proteínas nesses organismos. Tais estudos, quando realizados com populações do parasito que exibem um fenótipo de resistência/susceptibilidade a drogas, podem fornecer indícios dos processos moleculares envolvidos no mecanismo de resistência e, eventualmente, na identificação de alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas.

O *T. cruzi* apresenta diferentes formas evolutivas, que estão submetidas a diferentes ambientes, sistemas de defesa, temperatura e nutrientes. Dessa forma, espera-se que haja diferenças no repertório protéico expresso por elas. O nosso grupo desenvolveu dois estudos de proteômica aplicada ao mecanismo de resistência ao BZ utilizando formas epimastigotas e tripomastigotas de populações com resistência selecionada *in vivo*. O trabalho com as formas amastigotas fecha este ciclo de estudos e é importante uma vez que trata-se da forma tecidual do parasito envolvida com a manutenção da infecção e a patogênese da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Indicar proteínas diferencialmente expressas na forma amastigota entre as populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* que possam estar envolvidas no mecanismo de resistência ao benzonidazol.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter formas tripomastigotas de cultura de tecidos das populações BZR e BZS de *T. cruzi*;
- Realizar a transformação induzida por pH ácido das formas tripomastigotas em amastigotas axênicas;
- Selecionar proteínas diferencialmente expressas na forma amastigota das populações de *T. cruzi* em estudo através de eletroforese bidimensional (2DE);
- Identificar as proteínas selecionadas através de espectrometria de massa do tipo Maldi-ToF-ToF.

4 METODOLOGIA

4.1 Populações de *Trypanosoma cruzi*

As populações de *T. cruzi* resistente (BZR) e sensível (BZS) ao benzonidazol utilizadas neste estudo foram selecionadas *in vivo* por Murta e Romanha (1998). A população resistente BZR foi obtida após 25 passagens sucessivas em camundongos, a partir da cepa Y (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953). Os animais infectados foram tratados com uma única e alta dose de benzonidazol no pico da parasitemia (500mg/Kg/camundongo), sendo que, decorridas 6 horas do tratamento, eles foram sangrados e o inóculo repassado para outro grupo de animais sadios. A população BZS foi obtida paralelamente, após 25 passagens sucessivas em camundongos que não foram submetidos ao tratamento com benzonidazol.

4.2 Cultura de células hospedeiras das populações de *Trypanosoma cruzi*

As células da linhagem Vero, utilizadas no estudo como hospedeiras dos parasitos, eram mantidas em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂ e em garrafas de 25cm² contendo 4mL de meio de cultura D-MEM (Gibco®) suplementado com soro bovino fetal (Gibco®) 10% e GlutaMAX™ (Gibco®) 2mM. Seu repique era feito após a formação de monocamada, a cada sete dias, através da adição de 500µL de Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25% e EDTA 1mM - Gibco®) e agitação leve para o total desprendimento das células, que eram então ressuspensas em 5mL de meio D-MEM suplementado. A contagem das células era feita em Câmara de Neubauer através da utilização do corante vital Azul de Tripán (Gibco®) 0,04%. As células destinadas a manutenção da linhagem em cultura eram semeadas em garrafas de 25cm² contendo 4mL de meio D-MEM suplementado (inóculo de aproximadamente 1 x 10⁵ células). Aquelas destinadas a infecção pelas populações de estudo eram semeadas em garrafas de 75cm² (aproximadamente 3 x 10⁵ células) ou 175cm² (aproximadamente 6 x 10⁵ células), contendo 8mL e 18mL de meio de cultura suplementado, respectivamente. Após um tempo mínimo de 12 horas para a adesão das células ao substrato, o meio de cultura era trocado para a retirada de células mortas e resíduos da solução de Tripsina-EDTA.

A matriz das células da linhagem Vero (CCL-81) utilizadas no estudo foi gentilmente cedida pelo Departamento de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

4.3 Obtenção de tripomastigotas sanguíneos para a infecção das células

A infecção inicial das células Vero foi feita a partir de formas tripomastigotas sanguíneas das populações BZR e BZS de *T. cruzi*. Estas foram obtidas por meio do sangramento infra-orbital de camundongos infectados no pico da parasitemia. O sangue coletado foi repassado para tubos de fundo redondo contendo pérolas de vidro e desfibrinado através de agitação leve. Ao sangue desfibrinado foi adicionado o dobro do seu volume de D-MEM suplementado com GlutaMAX™ 2mM, sulfato de gentamicina 100µg/mL e ciprofloxacino 100µg/mL. Após homogeneização, o sangue diluído foi transferido para um novo tubo de fundo redondo e centrifugado a 138 x g, 25°C por 10min. Os tubos centrifugados foram incubados por uma hora a 37°C para que as formas tripomastigotas sanguíneas migrassem e se concentrassem no sobrenadante. Após o tempo referido, o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo de fundo cônico e centrifugado a 551 x g, 10°C por 10min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento contendo os parasitos foi homogeneizado e as formas tripomastigotas foram contadas em Câmara de Neubauer. Uma parte destes parasitos foi preparada para ser congelada e a outra, utilizada para infecção de células em uma proporção de 20 parasitos/célula.

4.4 Cultura das formas tripomastigotas *in vitro*

As garrafas contendo as formas tripomastigotas sanguíneas foram mantidas por 24 horas em estufa a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂ para a infecção das células. Em seguida, as garrafas foram lavadas com D-MEM não suplementado, para descartar as formas tripomastigotas que não infectaram e os eritrócitos remanescentes, e tiveram seus meios trocados. No sétimo dia após a infecção, as tripomastigotas liberadas das células foram utilizadas na infecção de novas garrafas de cultura. Para isso, o sobrenadante de cultura das garrafas foi centrifugado a 861 x g, 10°C por 10min e o sedimento foi homogeneizado em 2mL de meio de cultura restante. Os parasitos foram contados em Câmara de Neubauer e o inóculo foi ajustado seguindo-se a proporção de 30 parasitos/célula para a nova infecção.

A manutenção da cultura de parasitos *in vitro* era feita semanalmente de acordo com os procedimentos acima descritos, sendo que, após seis passagens em cultura, as formas tripomastigotas liberadas das células eram coletadas para a sua transformação em amastigotas.

Ensaio de viabilidade celular realizados para determinar o nível de susceptibilidade do benzonidazol *in vitro* sobre as formas tripomastigotas das populações BZR e BZS indicaram que o fenótipo de resistência das populações de estudo é mantido mesmo após seis passagens em cultura de tecidos (Santos *et al*, 2008).

4.5 Transformação das formas tripomastigotas em amastigotas axênicas

O meio de cultura contendo as formas tripomastigotas liberadas entre o sexto e o décimo dias após a infecção das células era diariamente coletado e inicialmente centrifugado a 34 x g, 10°C por 10min em tubos de fundo cônico para a separação de células em suspensão dos parasitos. O sobrenadante era coletado e transferido para novos tubos de fundo cônico que eram centrifugados a 861 x g, 10°C por 10min. Após este procedimento, o sobrenadante era descartado, o sedimento era homogeneizado em aproximadamente 2mL de meio de cultura restante e as formas tripomastigotas eram contadas em Câmara de Neubauer. A indução da transformação das formas tripomastigotas em amastigotas axênicas era realizada de acordo com a adaptação da metodologia descrita por Tomlinson e *cols.* (1995). O termo axênico faz referência à forma de obtenção das amastigotas através da incubação *in vitro* de formas tripomastigotas em meios livres de células (axênicos) e que mimetizavam o pH ácido do vacúolo parasitóforo. Para tal, as formas tripomastigotas eram transferidas para garrafas de cultura e ressuspendidas em meio D-MEM pH 5,0 ou pH 7,5 (controle) suplementado com SBF (Gibco®)10% e GlutaMAX™ 2mM, seguindo-se a relação estabelecida de 5 x 10⁶ tripomastigotas para cada mL de meio de cultura. As garrafas de cultura eram incubadas em estufa a 37°C e com uma atmosfera de 5% de CO₂ por 18 horas

O tempo de 18 horas de transformação dos parasitos em meio D-MEM pH 5,0 ou pH 7,5 foi escolhido de acordo com os experimentos de otimização onde foi avaliada a porcentagem de amastigotas obtidas em função dos diferentes tempos de exposição testados (0, 2, 4, 6, 8 e 18 horas). Doze ensaios foram realizados, sendo que os tempos de incubação testados não foram os mesmos para todos eles.

4.6 Lavagem das amastigotas transformadas para extração de proteínas totais

Para finalizar o processo de obtenção das formas amastigotas axênicas, o meio de cultura contendo as amastigotas transformadas era coletado e centrifugado

em tubos de fundo cônico a 861 x g, 10°C por 10min. O sobrenadante era descartado e as formas amastigotas, intermediárias e tripomastigotas remanescentes presentes no sedimento eram contadas em Câmara de Neubauer. Posteriormente, era realizada a lavagem dos parasitos através da adição de meio RPMI 1640 não suplementado e sem vermelho de fenol (Gibco®), seguida de sua centrifugação a 1240 x g, 5°C por 10min. O sobrenadante era descartado, o sedimento transferido para tubos de 1,5mL e o procedimento de lavagem repetido por mais duas vezes. Imediatamente após a última lavagem, as amostras eram mergulhadas em nitrogênio líquido para congelamento rápido e posteriormente transferidas para um *freezer* a -70°C, onde permaneceram até a extração das proteínas.

Os procedimentos de obtenção de tripomastigotas e transformação em amastigotas em pH ácido foram feitos em triplicata. Os critérios estabelecidos para a seleção das amostras que seriam utilizadas nos experimentos de eletroforese bidimensional foram seu grau de pureza em relação à presença de outras formas evolutivas do parasito e a quantidade de parasitos, o que influenciaria na quantidade de proteína total a ser obtida. O termo coleta corresponde a obtenção de parasitos de sexta passagem em cultura de tecidos que foram liberados entre o sexto e décimo dias após a infecção das células.

4.7 Extração de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*

As proteínas totais das amastigotas purificadas foram extraídas através da adição direta aos parasitos de tampão de lise para 2DE (Tris 20M, Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%, DTT 50mM e inibidor de proteases) na proporção de 60µl para $3,5 \times 10^8$ parasitos. As amostras permaneceram sob agitação durante duas horas a temperatura ambiente, sendo posteriormente passadas por 10 vezes em seringa de insulina e centrifugadas a 16000 x g, 20-25°C por 40min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, dosado pelo Método de Bradford Modificado (1976) e armazenado a -70°C.

4.8 Eletroforese bidimensional (2DE) em gel de poliacrilamida

Após a dosagem de proteínas totais, 3µg de proteínas de cada extrato foram submetidos à separação eletroforética unidimensional em gel de poliacrilamida 12%,

como descrito por Ausubel e *cols.* (1995), a fim de avaliar a qualidade dos extratos obtidos. Tendo sido constatada a sua qualidade, as proteínas foram separadas por 2DE.

Na primeira dimensão foi feita a focalização isoeétrica das proteínas. Para tal, ao volume equivalente a 100µg (para fitas de IPG de 7cm) ou 500µg (para fitas de IPG de 17cm) das amostras de proteínas totais foi acrescentado tampão de rehidratação (Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%, Azul de bromofenol 0,5%, DTT 65mM e anfólitos 1x correspondente ao gradiente de pH da fita de IPG utilizada) para um volume final de 125µL ou 350µL, respectivamente. As amostras ficaram sob agitação por uma hora e foram centrifugadas a 16000 x g, 20-25°C por 30min para retirada de material não solubilizado, sendo o sobrenadante transferido para novos tubos. Em seguida, o conteúdo de 125µL ou de 350µL foi aplicado sobre as fitas de IPG com gradiente de pH 3-10 não linear (NL), para fitas de IPG de 7cm, e com gradiente de pH 3-10NL e pH 4-7, para fitas de IPG de 17cm (Bio-Rad). Após 10min, foram gotejados 750µL ou 1,5mL de óleo mineral nas fitas de IPG de 7cm ou 17cm, respectivamente. As fitas foram submetidas à rehidratação e focalização isoeétrica no equipamento Protean IEF Cell (Bio-Rad) a 50µA/gel e a uma temperatura de 20°C. Para as fitas de 7cm as condições de rehidratação e focalização isoeétrica foram: rehidratação passiva por 4h, rehidratação ativa a 50V por 12h e focalização isoeétrica a 500V por 30min, 1000V por 30min, 4000V por 1h e 4000V até acumular 16000V/h. Para as fitas de 17cm as condições de rehidratação e focalização isoeétrica foram: rehidratação passiva por 4h, rehidratação ativa a 50V por 12h e focalização isoeétrica a 500V por 1h, 1000V por 1h, 8000V por 2h e 8000V até acumular 40000V/h. Após o término da focalização isoeétrica, as fitas foram retiradas do aparelho, tiveram o excesso de óleo mineral removido e foram congeladas a -70°C.

Na segunda dimensão, as proteínas foram separadas por peso molecular em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As fitas de IPG de 7cm ou 17cm foram inicialmente equilibradas por 10min, sob agitação lenta, em 2,5mL ou 5mL, respectivamente, de tampão de equilíbrio I (Tris-HCl 50mM pH8.8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,5% e DTT 130mM), e posteriormente por 15min, também sob agitação lenta, em tampão de equilíbrio II (Tris-HCl 50mM pH8.8, Uréia 6M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,5% e Iodocetamida 135mM). O padrão de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad) foi aplicado em um

pedaço de papel filtro, colocado sobre o gel de poliacrilamida e selado com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol. As fitas de IPG foram lavadas em tampão de corrida (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%) antes de serem colocadas sobre os géis de poliacrilamida 12%. Da mesma forma que o padrão de peso molecular, elas foram seladas ao gel com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol para facilitar o acompanhamento da corrida eletroforética. Os sistemas utilizados para a eletroforese nos géis de 7cm e 17cm foram, respectivamente, o Mini-Protean II (Bio-Rad) não refrigerado e o Protean II XL Cells (Bio-Rad) conectado a um banho refrigerado a uma temperatura de 16°C (Multitemp II – Amersham Biosciences). A eletroforese dos géis de 7cm foi realizada a 50V por aproximadamente 10min e a 100V até o final da corrida, e a dos géis de 17cm a 50V por 30min e a 200V até o corante atingir a porção inferior do gel.

Os géis foram corados pelo protocolo compatível com espectrometria de massa que utiliza o Azul de Coomassie Coloidal G-250 (Neuhoff *et al*, 1988). De acordo com este método, os géis são fixados em três soluções: Ácido ortofosfórico 2% e Etanol 30%; Ácido ortofosfórico 2%; Ácido ortofosfórico 2%, Etanol 18% e Sulfato de amônio 12%. Em seguida, são corados em Azul de Coomassie G-250 0,02%. Os géis 2D corados foram escaneados através do uso do densitrômetro GS-800 (Bio-Rad), a uma resolução de 300dpi, e em seguida foram armazenados a 4°C em solução de sulfato de amônio 25% até a realização dos procedimentos de excisão dos *spots* para espectrometria de massa.

4.9 Análise das imagens dos géis bidimensionais

As imagens das triplicatas dos géis 2D foram analisadas pelo *software* PDQuest 7.3.0 (Bio-Rad). Inicialmente foi feita a edição manual dos *spots* para retirada de artefatos do gel considerados erroneamente pelo programa como *spots*. Em seguida, as imagens foram agrupadas por população para que fosse realizado o pareamento do que o programa considera como sendo o mesmo *spot* em cada um dos membros de um grupo de análise com o mesmo *spot* do outro grupo, sendo a autenticidade deste pareamento validada por inspeção visual. Posteriormente, foi determinada e normalizada a intensidade de cada *spot* com base no valor da intensidade total de todos os *spots*. Em seguida, a média dos valores de intensidade para cada um dos *spots* da triplicata de uma mesma população foi calculada. Dessa forma, foi possível realizar uma análise quantitativa, que se baseia na razão entre as

médias de intensidade calculadas entre as duas populações analisadas, e também qualitativa, que inclui *spots* presentes somente em uma das populações.

Os critérios estabelecidos para a seleção dos *spots* foram que aqueles detectados pelo programa, mas não visualizados nos géis seriam eliminados da análise durante o processo de edição manual. Além disso, só seriam aceitos como diferencialmente expressos aqueles *spots* presentes em no mínimo dois dos três géis de cada população e cuja razão entre as médias de intensidade fosse de pelo menos duas vezes entre as populações estudadas.

4.10 Excisão e digestão tríptica dos *spots* protéicos

Os *spots* indicados na análise quantitativa como diferencialmente expressos entre as duas populações e também aqueles exclusivamente expressos em uma das populações foram selecionados para identificação por espectrometria de massa. Para tal, foram realizados os procedimentos de excisão dos *spots* protéicos dos géis de poliacrilamida, bem como a sua digestão tríptica em gel.

Inicialmente, o *spot* de interesse foi localizado, extraído do gel e transferido para tubos siliconados pré-lavados com Metanol P.A (Merck) e água MilliQ. Aos *spots* excisados foram adicionados 400µl de uma solução de Acetonitrila (Fisher Scientific) 50% e Bicarbonato de amônio (Sigma) 25mM pH 8,0 para descoloração. Este procedimento foi realizado em uma série de três lavagens de 15min cada, sob agitação constante. Em seguida, os pedaços de gel foram desidratados através da adição, por 5min, de 200µl de Acetonitrila (Fisher Scientific). A Acetonitrila foi removida e os géis foram completamente secos em *Speed Vac* por cerca de 15min. Foram adicionados 10µl de uma solução de Tripsina (Promega) 20µg/mL e posteriormente, cerca de 50µl de uma solução de Bicarbonato de amônio (Sigma) 25mM pH 8,0. Em seguida, os tubos foram transferidos para estufa a 37°C e incubados por cerca de 16 horas para que ocorresse a digestão tríptica dos *spots* protéicos. Passado este tempo, o conteúdo de cerca de 60µl de solução foi transferido para um novo tubo e ao antigo, contendo os pedaços de gel, foram adicionados 30µl de uma solução de Ácido fórmico (Merck) 5% e Acetonitrila (Fisher Scientific) 50% para a extração dos peptídeos trípticos. Este procedimento foi realizado por duas vezes sob agitação constante de 30min cada, sendo que, após o término do tempo referido, a solução de extração contendo os peptídeos foi transferida para o respectivo tubo contendo os 60µl iniciais. As amostras foram

concentradas em *Speed Vac* para um volume de cerca de 10µl e, em seguida, os peptídeos foram purificados em microcolunas de fase reversa *Zip Tip C₁₈* (Eppendorf®) de acordo com as instruções do fabricante.

A identificação das proteínas por espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF-ToF foi feita em um 4700 *Proteomics Analyzer*. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, em colaboração com os Drs. Jonas Perales e Alex Chapeaurouge.

4.11 Controle sobre a qualidade das culturas de células e parasitos

Alguns testes e procedimentos que visavam evitar e monitorar possíveis contaminações das culturas de células e parasitos por fungos e bactérias foram incorporados às atividades de rotina como parte integrante de um controle de qualidade.

Um procedimento único de fumegação da sala destinada ao manuseio das culturas foi realizado através do uso de pastilhas de NaOH (Vetec) e Formaldeído (Impex) 40%. Além deste, outros procedimentos diários visaram à prevenção de possíveis contaminações nas culturas, tais como a utilização de álcool 70% para a desinfecção da capela de segurança biológica e demais materiais a serem manipulados e a realização de testes de esterilidade nos meios e soluções, que antes de serem usados eram colocados em estufa a 37°C por 24 – 48 horas. Para a verificação da não contaminação do meio de cultura por fungos, o mesmo era testado em Agar Sabouraud. Além disso, a estufa utilizada para a manutenção das garrafas de cultura era mensalmente lavada com Lysoform® 0,5% e as culturas eram manuseadas utilizando-se equipamentos de proteção individual, como jaleco, luvas, máscara, gorro e pro-pé.

O monitoramento da contaminação das células e parasitos por bactérias do gênero *Mycoplasma* foi feito através da técnica de PCR. Os iniciadores utilizados foram descritos por Timenetsky e cols. (2006) e amplificam parte do gene da subunidade 16s do rRNA de qualquer espécie do gênero. Aproximadamente 100µL da suspensão de células Vero e do concentrado de tripomastigotas das duas populações de *T. cruzi* foram coletados e aquecidos a 70°C por 10min. As amostras foram centrifugadas a 15,7 x g por 5min, a temperatura ambiente, e o sobrenadante (DNA) coletado foi mantido a -20°C até o uso. Para a PCR foi utilizado kit contendo

Taq DNA polimerase 0,5U, tampão da enzima (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e KCl 50mM) e MgCl₂ 1,5mM (Invitrogen). Além disso, foram utilizados 200μM de cada dNTP (dTTP, dATP, dCTP e dGTP), 10 pmoles dos iniciadores MGSO [TGCACCATCTGTCACCTCTGTAAACCTC] e GPO3 [GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT] e 1μL da preparação de DNA das amostras para um volume final de 10μl. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, anelamento dos iniciadores a 55 °C por 30 seg e extensão a 72°C por 30 seg, e o último passo a 72°C por 5min para a extensão final. O produto da reação foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e corado pela prata. A contaminação da reação de PCR foi monitorada através da utilização de controles negativos (sem DNA).

5 RESULTADOS

5.1 Transformação das formas tripomastigotas em amastigotas axênicas

A indução da transformação em pH ácido das formas tripomastigotas em amastigotas foi realizada para obtenção de parasitos das populações BZR e BZS de *T. cruzi* na forma evolutiva de interesse e baseou-se na metodologia descrita por Tomlinson e cols. (1995). O protocolo de transformação citado acima foi adaptado após vários ensaios que tinham como objetivo estabelecer a melhor condição para indução da transformação e obtenção das formas amastigotas com o mínimo de contaminação com parasitos nas formas tripomastigotas e intermediárias. Estas caracterizadas por apresentarem um formato arredondado, semelhante ao das formas amastigotas, e um pequeno flagelo, ainda remanescente, similar ao das tripomastigotas.

Para acompanhar o processo de transformação, foi avaliada a porcentagem das diferentes formas evolutivas do parasito encontradas após um período de incubação a 37°C em meio de cultura com pH 5,0 em intervalos que variaram de 0 a 18 horas. Os resultados mostraram que, com o decorrer do tempo, houve uma diminuição no número de formas tripomastigotas seguido de um aumento concomitante no número de amastigotas. O maior percentual de transformação foi conseguido após exposição de tripomastigotas ao pH ácido por 18 horas, tanto para a população BZR (Figura 3) quanto para a BZS (Figura 4). No entanto, após oito horas de exposição ao meio ácido, já era possível observar um maior número de formas amastigotas em relação às demais, sendo esse número superior em aproximadamente duas vezes na população BZR. As populações demonstraram ter um comportamento diferente frente ao processo de indução da transformação. Em todos os experimentos realizados e, independente do número de formas amastigotas já encontradas no tempo inicial, os parasitos da população BZR demonstraram realizar o processo de transformação com maior eficiência (maior número de amastigotas em menor tempo) quando comparados aos resultados obtidos com os parasitos da população BZS.

Como controle, formas tripomastigotas das mesmas populações foram mantidas em meio com pH 7,5. Após 18 horas de incubação, o percentual de formas tripomastigotas se manteve praticamente inalterado indicando que, diferente do pH ácido, o pH neutro do meio é um fator que não tem influência sobre a transformação induzida de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em amastigotas (Figura 5).

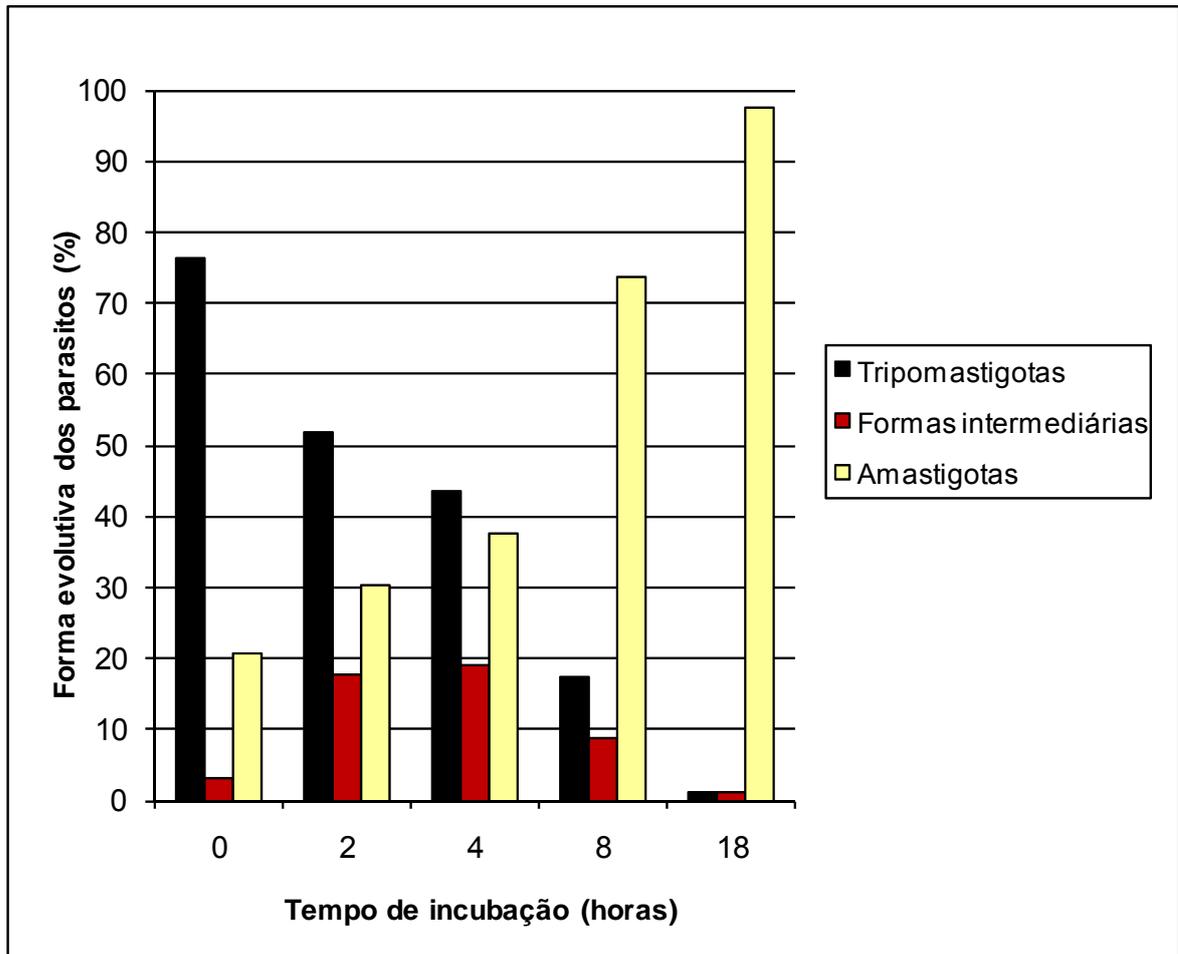


Figura 3. Transformação induzida por pH ácido das formas tripomastigotas da população BZR de *Trypanosoma cruzi* em formas amastigotas. As formas tripomastigotas ($5 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas a 37°C em meio D-MEM pH 5,0 suplementado com SBF (Gibco®) 10% e GlutaMAX™ 2mM. Nos tempos indicados, alíquotas da cultura foram coletadas para contagem, em Câmara de Neubauer, das diferentes formas do parasito encontradas. Este experimento foi repetido 2 vezes.

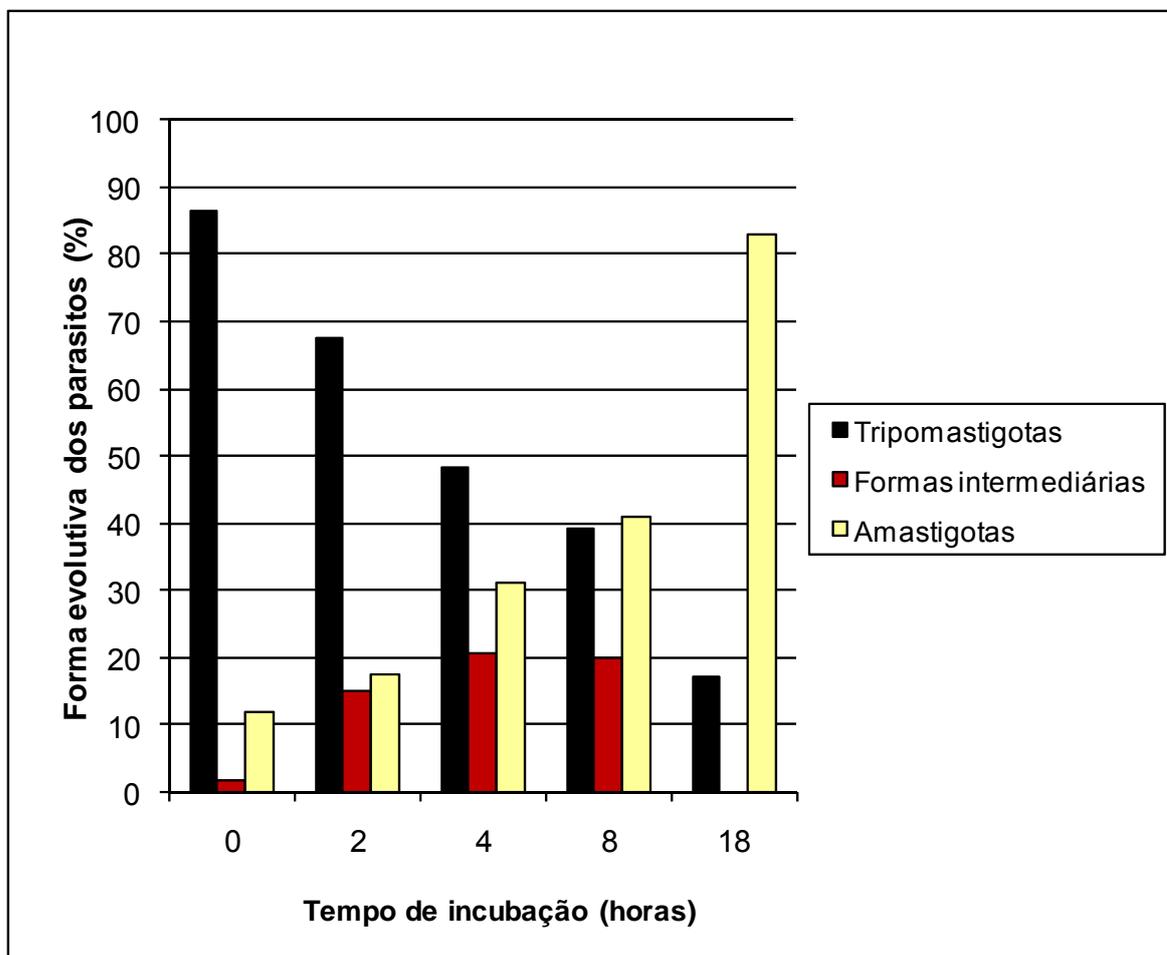


Figura 4. Transformação induzida por pH ácido das formas tripomastigotas da população BZS de *Trypanosoma cruzi* em formas amastigotas. As formas tripomastigotas ($5 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas a 37°C em meio D-MEM pH 5,0 suplementado com SBF (Gibco®) 10% e GlutaMAX™ 2mM. Nos tempos indicados, alíquotas da cultura foram coletadas para contagem, em Câmara de Neubauer, das diferentes formas do parasito encontradas. Este experimento foi repetido 2 vezes.

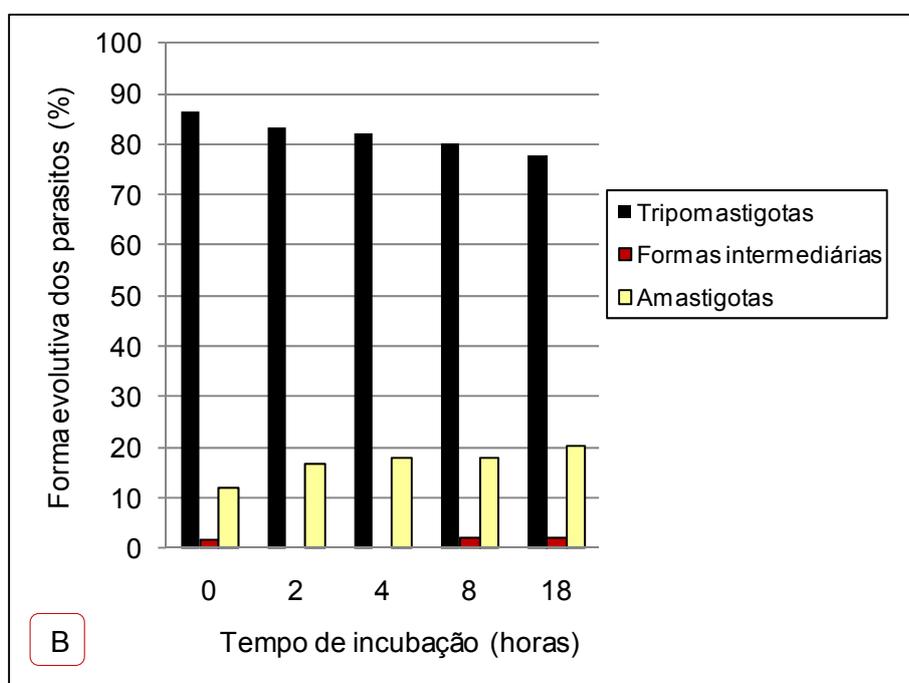
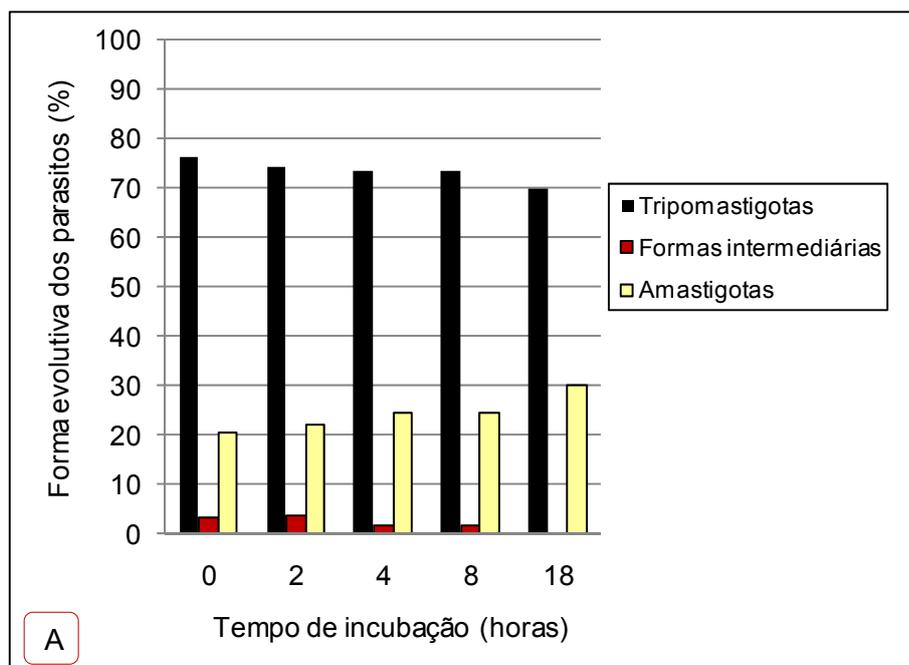


Figura 5. Controle dos ensaios de transformação induzida por pH ácido das formas tripomastigotas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* em formas amastigotas. As formas tripomastigotas (5×10^6 /mL) das populações **BZR** (A) e **BZS** (B) foram incubadas a 37°C em meio D-MEM pH 7,5 suplementado com SBF (Gibco®) 10% e GlutaMAX™ 2mM. Nos tempos indicados, alíquotas da cultura foram coletadas para contagem, em Câmara de Neubauer, das diferentes formas do parasito encontradas. Este experimento foi repetido 2 vezes.

5.2 Obtenção da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*

Formas tripomastigotas foram obtidas a partir de infecção de células da linhagem Vero e após seis passagens foram coletadas, purificadas, transformadas em amastigotas a partir da exposição por 18 horas ao baixo pH, como mostrado anteriormente, e concentradas para posterior extração das proteínas totais e separação em 2DE. As amostras foram obtidas a partir de três coletas independentes, realizadas em diferentes momentos, mas a partir de um mesmo congelamento de parasitos. Apenas preparações com altas porcentagens de formas amastigotas (>80% para BZS e >92% para BZR) foram selecionadas para uso.

Com o objetivo de certificar a qualidade do material biológico utilizado, o grau de pureza das amostras de amastigotas coletadas foi avaliado através da contagem, em Câmara de Neubauer, do número de amastigotas obtidas em relação às formas intermediárias e tripomastigotas, após a exposição dos parasitos ao baixo pH. A Figura 6 mostra os valores percentuais calculados a partir dos dados absolutos referentes a quantidade de amastigotas axênicas obtidas em cada uma das três diferentes coletas realizadas. Para a população BZR, a média desses valores percentuais foi de 94,4% de formas amastigotas e para a população BZS, de 84,8%.

A Figura 7 mostra imagens de microscopia óptica de preparações de parasitos da população BZS antes e após incubação de 18 horas em meio de pH ácido. Os resultados mostram a predominância de formas tripomastigotas antes dos parasitos serem expostos ao pH ácido e a prevalência de amastigotas axênicas após o período de incubação. Os mesmos resultados foram obtidos para a população BZR (dados não mostrados).

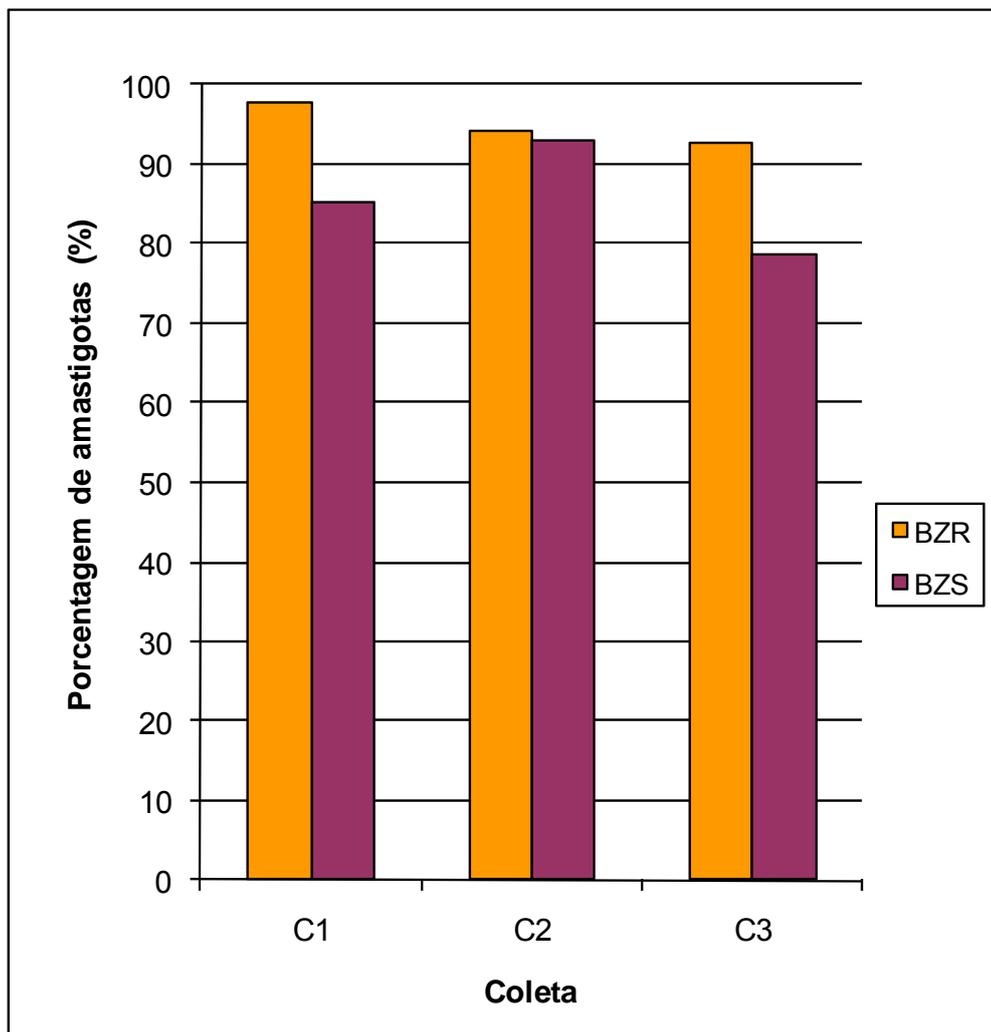


Figura 6. Grau de pureza das amostras de amastigotas axênicas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*. Após exposição de 18 horas ao meio com pH 5,0, os parasitos foram contados em Câmara de Neubauer e os percentuais referentes a cada um dos seus estágios foram calculados. O gráfico mostra os percentuais obtidos para as formas amastigotas das populações BZR e BZS, em cada uma das três coletas realizadas.



Figura 7. Preparação de tripomastigotas e amastigotas axênicas da população BZS de *Trypanosoma cruzi*. Imagem de microscopia óptica dos parasitos da população BZS purificados, fixados com metanol e corados pelo Giemsa antes (A) e após (B) a transformação induzida pela exposição em pH ácido por 18 horas (400X).

5.3 Extração de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*

A extração de proteínas totais das preparações de amastigotas foi realizada utilizando-se a proporção de 60 µL de solução de lise para cada $3,5 \times 10^8$ parasitos. Uma relação linear foi observada entre o número de parasitos e a quantidade de proteína total obtida de cada amostra, indicando a boa reprodutibilidade do método de extração utilizado (Figura 8). A partir dos resultados de dosagem de proteína obtidos, foi possível inferir que foram necessários cerca de 2×10^8 parasitos para obtenção de 500 µg de proteína total, quantidade esta necessária para a realização de cada gel 2D de 17cm, se empregado o método de coloração por Coomassie Coloidal G-250.

Com o objetivo de avaliar a qualidade dos extratos protéicos obtidos, uma eletroforese unidimensional foi realizada antes de iniciar os experimentos de 2DE (Figura 9). A presença de bandas bem definidas de alto, médio e baixo peso molecular e a ausência de arraste foram indicativos da boa qualidade dos extratos protéicos, e conseqüentemente, da ausência de degradação das proteínas.

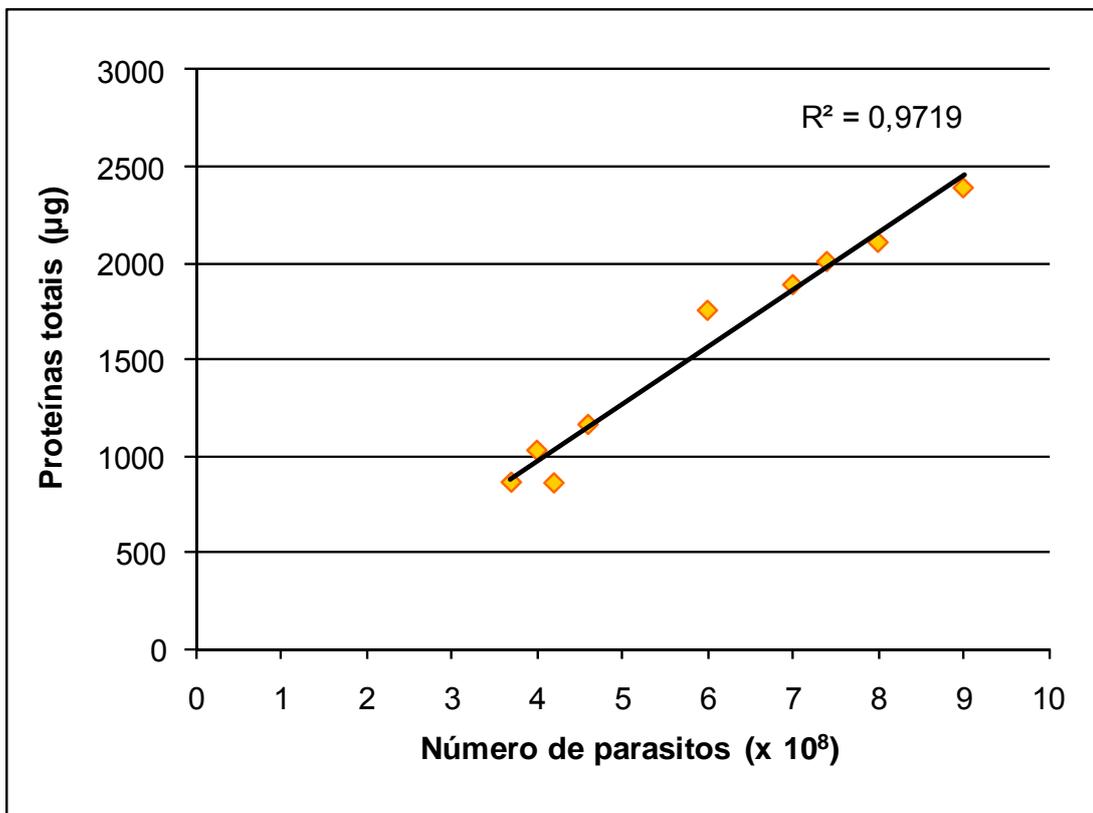


Figura 8. Relação entre o número de parasitos e a quantidade de proteína total extraída. As proteínas totais das preparações de amastigotas das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* foram extraídas diretamente em tampão de lise para 2DE e dosadas pelo Método de Bradford modificado.

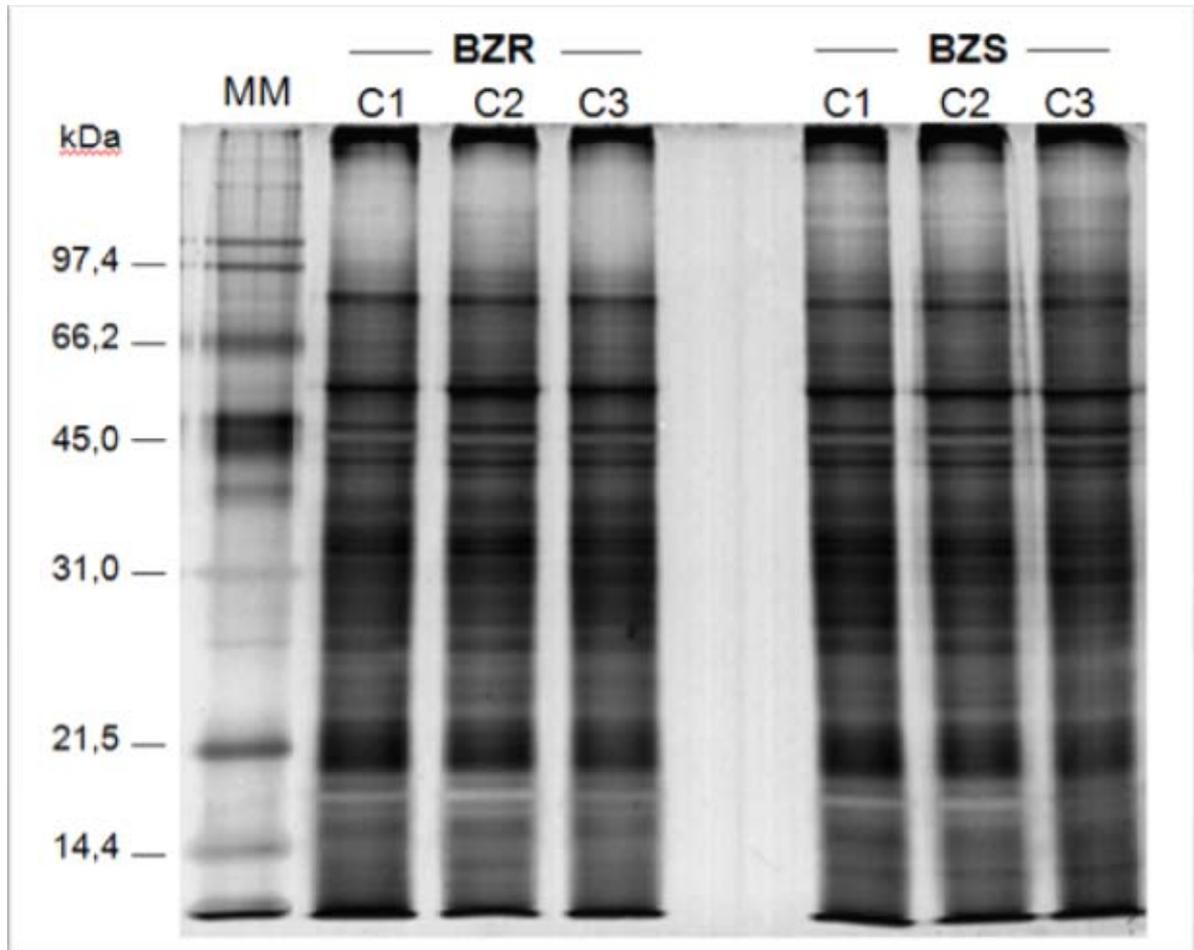


Figura 9. Eletroforese unidimensional dos extratos protéicos da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*. Foram aplicados 3µg de proteína total/canaleta de cada uma das três coletas das populações BZR e BZS em um gel de poliacrilamida 12%, posteriormente corado pela prata. MM: marcador de massa molecular Broad Range (Bio-Rad).

5.4 Eletroforese bidimensional de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*

Uma amostra representativa das populações BZR e BZS foi separada por 2DE utilizando fitas de IPG de 7cm. Tal procedimento foi realizado com o objetivo de verificar a eficiência de separação das proteínas bem como possíveis arrastes nos géis 2D gerados pela presença de sal ou de alguma partícula não solubilizada nas amostras. O perfil das proteínas totais de amastigotas das populações BZR e BZS, separadas por 2DE em gradiente de pH 3-10NL, pode ser observado na Figura 10, onde também é possível observar a presença de um grande número de *spots* bem definidos e a ausência quase total de arraste.

Após ter-se constatado, com o resultado dos géis 2D de 7cm, a eficiência da metodologia utilizada para extração, dosagem e separação das proteínas por 2DE, as amostras selecionadas foram submetidas à separação no formato de 17cm em gradiente não linear de pH 3-10. Uma vez que a maioria dos *spots* se localizaram na região de mais baixo pH, posteriormente, as amostras também foram separadas em gradiente de pH 4-7. Tal procedimento foi realizado com o objetivo de se obter uma melhor separação das proteínas nesta faixa de pH. As Figuras 11 e 12 exemplificam o perfil de um dos três géis 2D de 17cm de gradiente de separação de pH 3-10NL das populações BZR e BZS, respectivamente. O resultado referente aos géis 2D de gradiente de separação de pH 4-7 das populações BZR e BZS é representado, respectivamente, pelas Figuras 13 e 14. Os *spots* dos géis 2D mostraram-se bem separados e definidos ao longo de ambas as faixas de focalização e a ausência quase total de arraste também pôde ser verificada. Como esperado, a maioria dos *spots* da faixa de pH 4-7 se localizaram na região central dos géis. Além disso, pequenas diferenças entre os perfis das proteínas das replicatas foram observadas (dado não mostrado). Já as diferenças entre os géis das populações BZR e BZS foram avaliadas através da análise das imagens pelo programa PDQuest 7.3.0.

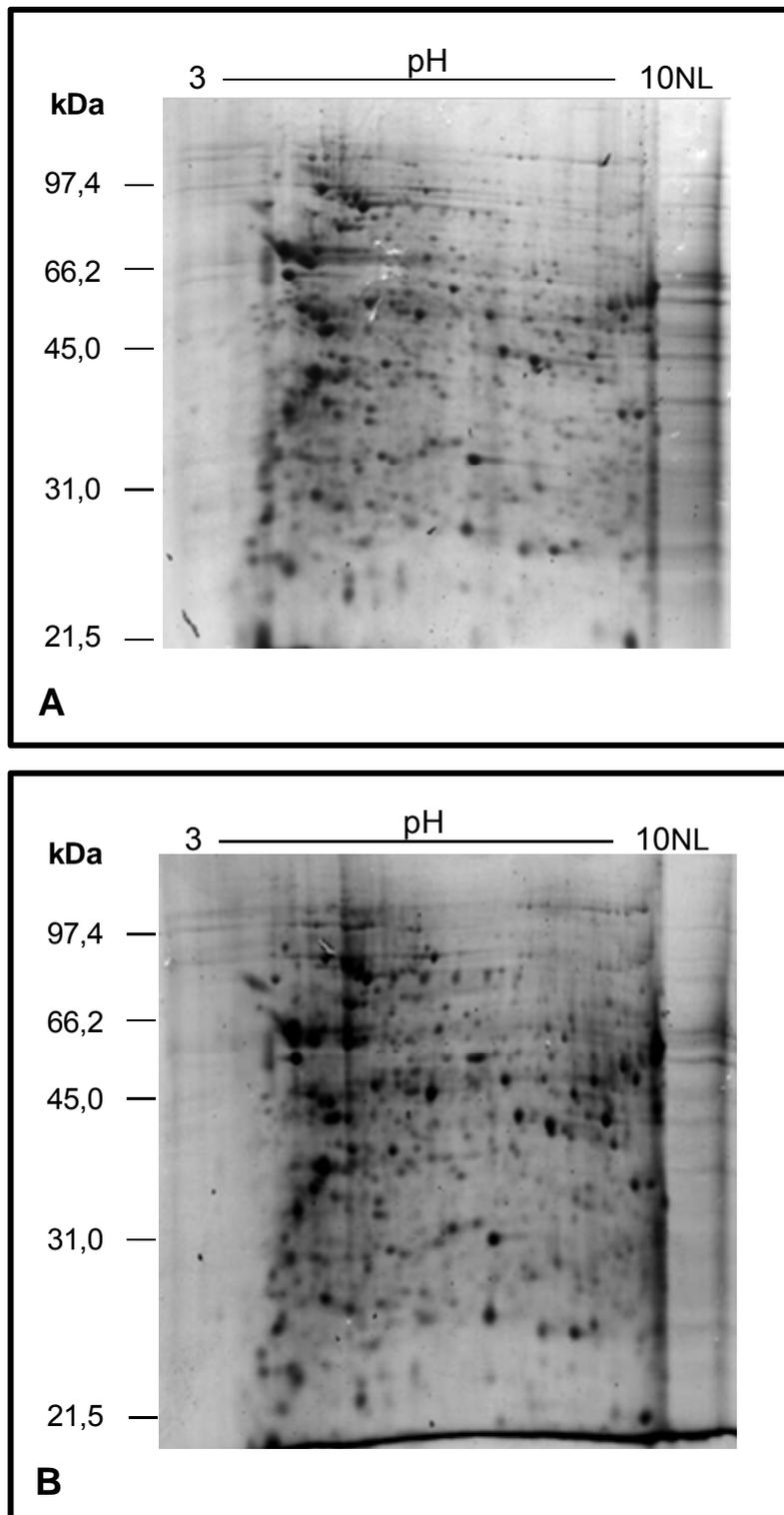


Figura 10. Mini-géis bidimensionais das proteínas totais da forma amastigota representativos das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*. Para a focalização isoeétrica, 100µg de proteínas totais da forma amastigota das populações **BZR** (A) e **BZS** (B) de *T. cruzi* foram aplicados em fitas de IPG de 7cm com gradiente de separação não linear de pH 3-10. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% e coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal G-250. Peso molecular em kDa (BroadRange;Bio-Rad).

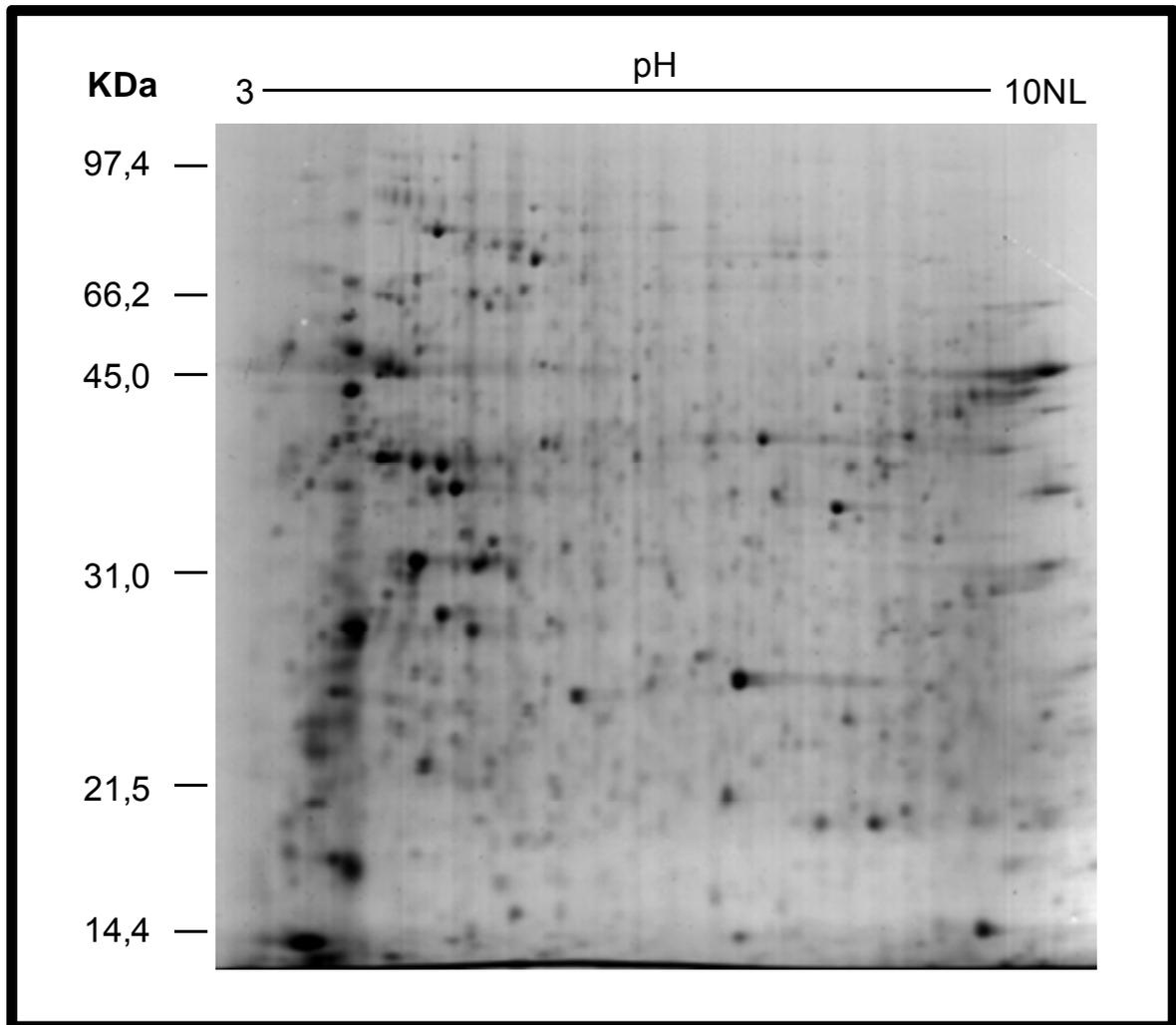


Figura 11. Gel bidimensional em gradiente de pH 3-10NL das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZR de *Trypanosoma cruzi*. Para a focalização isoeétrica, 500µg de proteínas totais da forma amastigota da população BZR de *T. cruzi* foram aplicadas em fitas de IPG de 17cm com gradiente de separação não linear de pH 3-10. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas na segunda dimensão por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% e coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal G-250. O padrão de peso molecular utilizado foi o Broad Range (Bio-Rad).

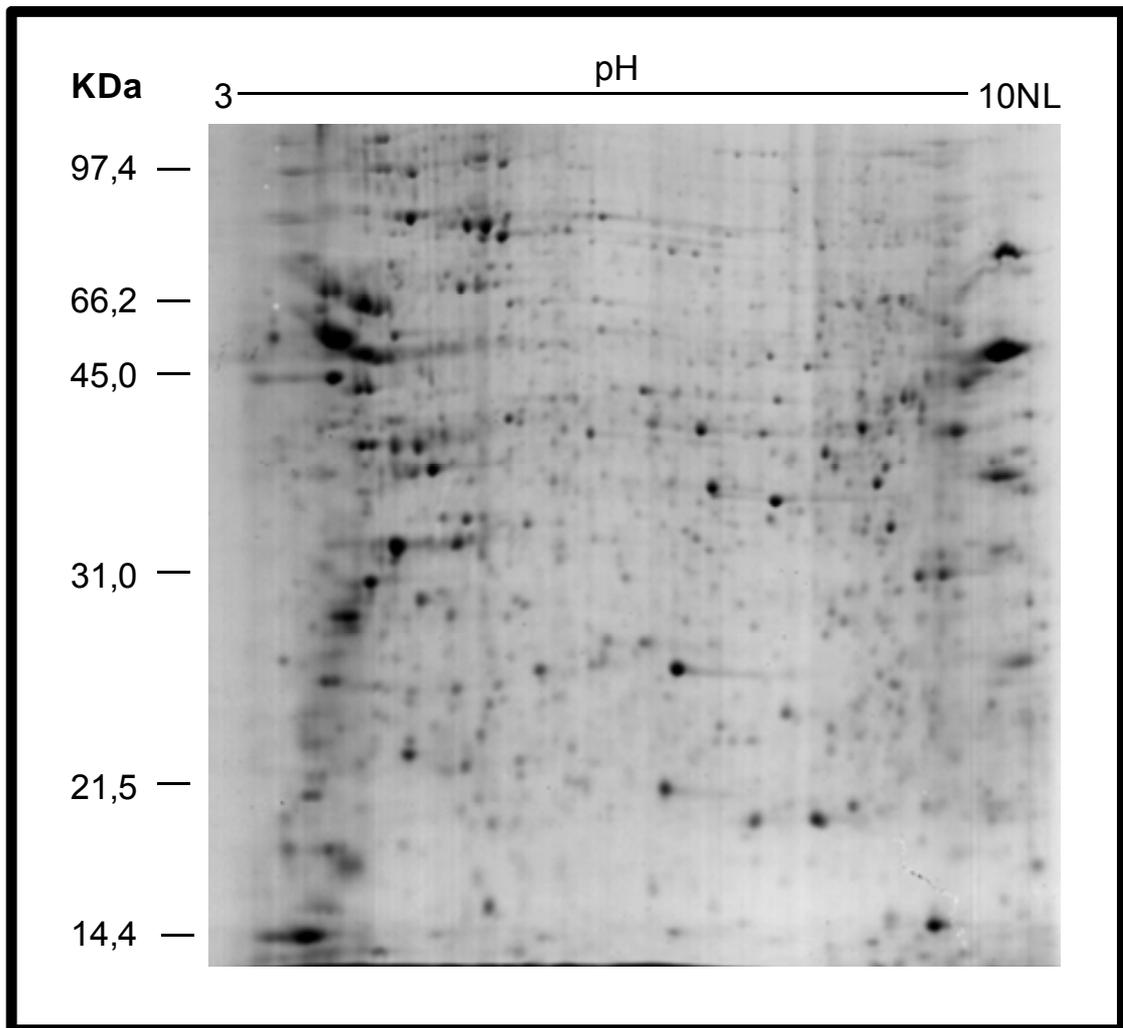


Figura 12. Gel bidimensional em gradiente de pH 3-10NL das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZS de *Trypanosoma cruzi*. Para a focalização isoeétrica, 500µg de proteínas totais da forma amastigota da população BZS de *T. cruzi* foram aplicadas em fitas de IPG de 17cm com gradiente de separação não linear de pH 3-10. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas na segunda dimensão por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% e coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal G-250. O padrão de peso molecular utilizado foi o Broad Range (Bio-Rad).

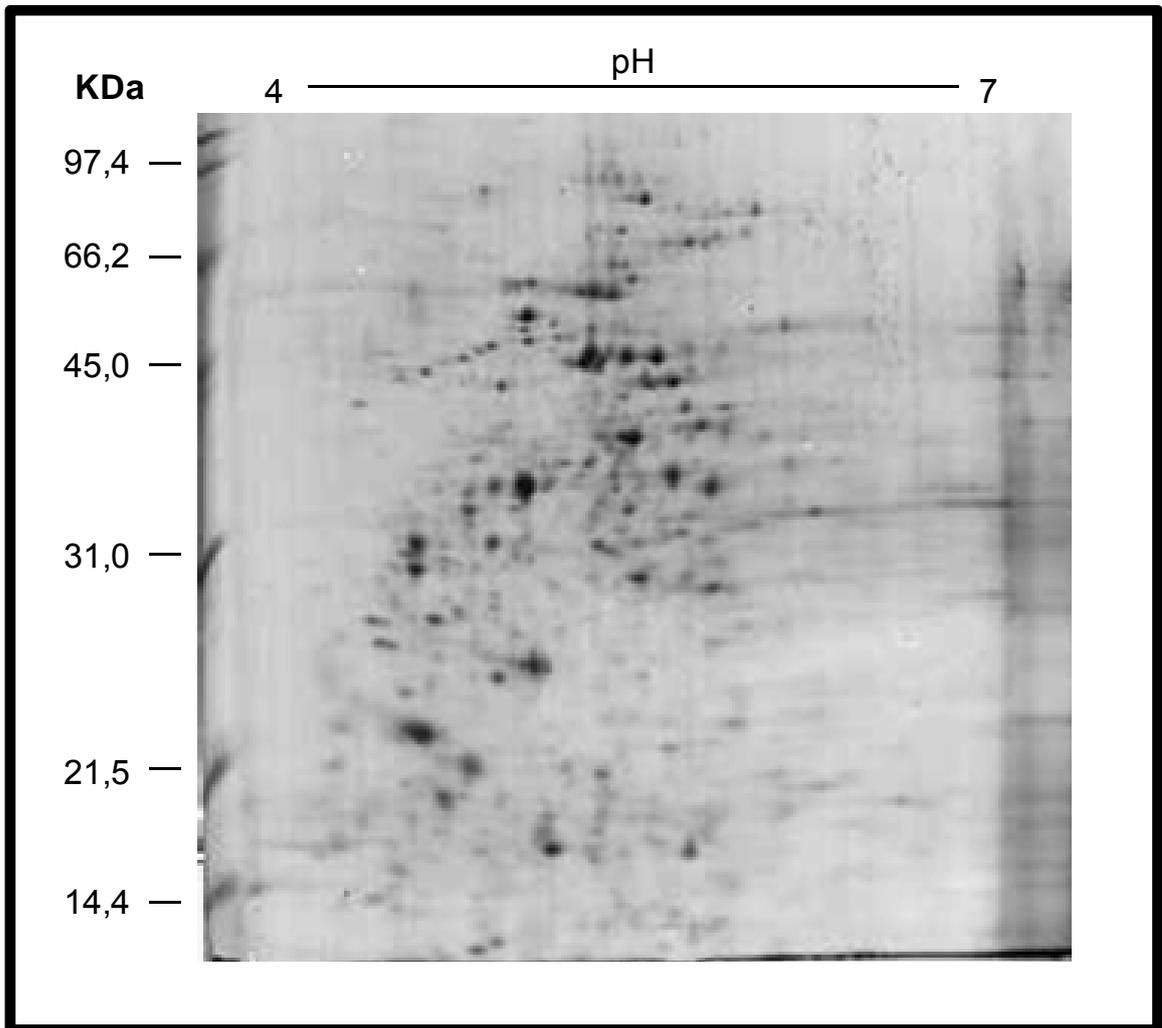


Figura 13. Gel bidimensional em gradiente de pH 4-7 das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZR de *Trypanosoma cruzi*. Para a focalização isoeétrica, 500µg de proteínas totais da forma amastigota da população BZR de *T. cruzi* foram aplicadas em fitas de IPG de 17cm com gradiente de separação de pH 4-7. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas na segunda dimensão por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% e coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal G-250. O padrão de peso molecular utilizado foi o Broad Range (Bio-Rad).

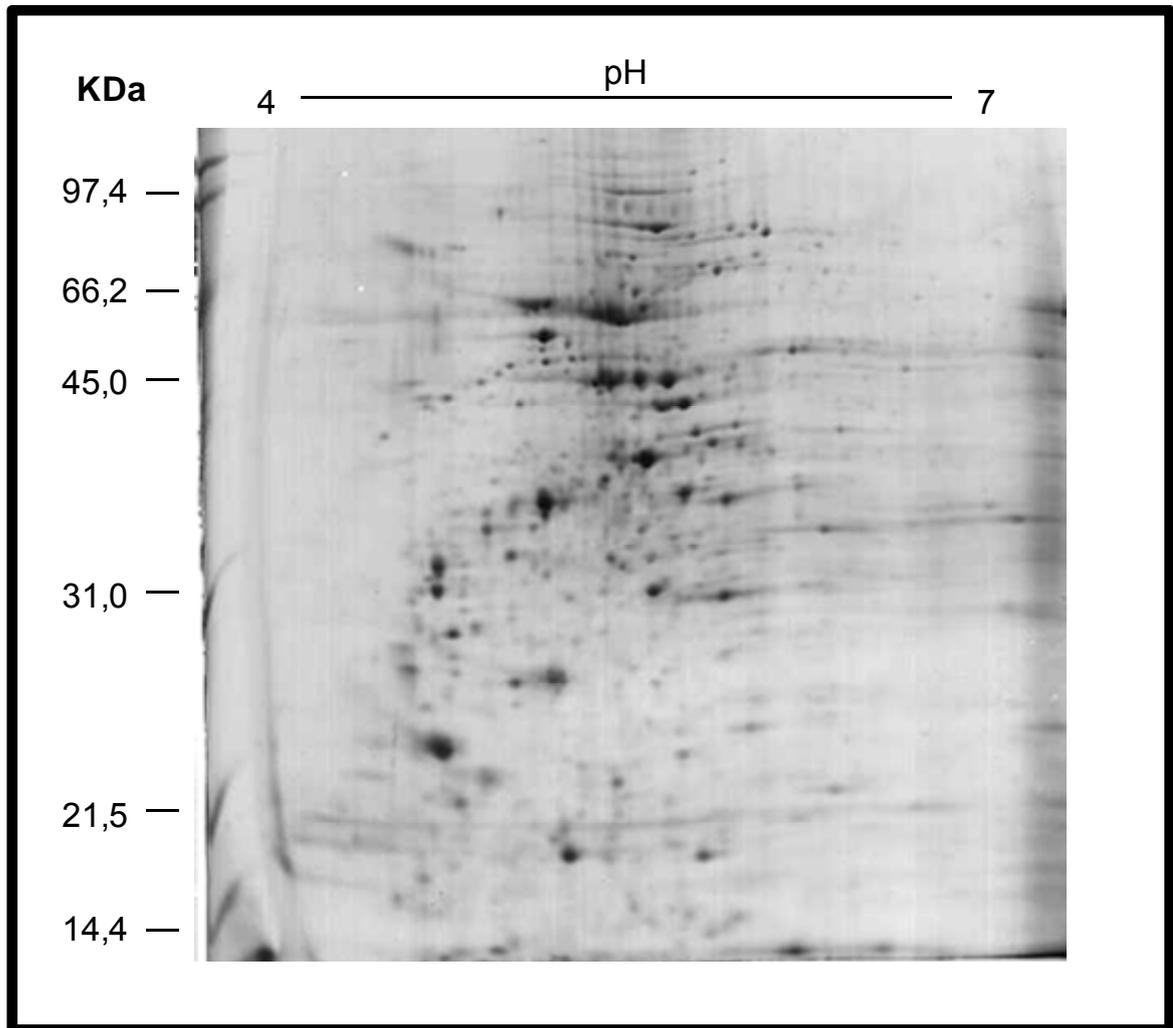


Figura 14. Gel bidimensional em gradiente de pH 4-7 das proteínas totais da forma amastigota representativo da população BZS de *Trypanosoma cruzi*. Para a focalização isoeétrica, 500µg de proteínas totais da forma amastigota da população BZS de *T. cruzi* foram aplicadas em fitas de IPG de 17cm com gradiente de separação de pH 4-7. Posteriormente, as proteínas focalizadas foram separadas na segunda dimensão por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% e coradas pelo Azul de Coomassie Coloidal G-250. O padrão de peso molecular utilizado foi o Broad Range (Bio-Rad).

5.5 Análise das imagens dos géis bidimensionais de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*

As imagens dos géis 2D de 17cm, triplicatas de cada população, foram analisadas pelo *software* PDQuest 7.3.0 (Bio-Rad). Como critério para a seleção dos *spots* ficou estabelecido que aqueles detectados pelo programa, mas não visualizados nos géis seriam eliminados da análise durante o processo de edição manual, uma vez que não seria possível excisá-los do gel. Além disso, só seriam considerados como diferencialmente expressos aqueles *spots* cuja razão entre as médias de intensidade da triplicata de cada população fosse pelo menos dois, e que aparecessem em, no mínimo, dois dos três géis.

Na análise das triplicatas em que foi utilizado um gradiente de separação de pH 3-10NL, o *software* PDQuest 7.3.0 (Bio-Rad) detectou, após edição manual, um total de 296 e 317 *spots* pertencentes às populações BZR e BZS, respectivamente. Em seguida, foram feitas as análises quantitativa, que se baseia na razão entre as médias de intensidade dos *spots* da triplicata de cada uma das populações, e a análise qualitativa, que indica os *spots* exclusivos de cada população. Feito isso, 60 *spots* foram selecionados para identificação por espectrometria de massa. Destes, 7 foram encontrados somente na população BZR e 16 foram encontrados apenas na população BZS. Os 37 *spots* restantes apresentaram uma diferença de intensidade de, no mínimo, duas vezes entre as populações de estudo, sendo 20 deles mais expressos na população BZR e 17 mais expressos na população BZS.

Os dados referentes à análise das triplicatas em que foi utilizado um gradiente de separação de pH 4-7 mostraram um total de 222 e 227 *spots* das populações BZR e BZS, respectivamente. Foram selecionados para identificação por espectrometria de massa 54 *spots*. Destes, 8 foram encontrados somente na população BZR e 10 foram encontrados apenas na população BZS. Os 36 *spots* restantes foram apontados como diferencialmente expressos, sendo 33 deles mais expressos na população BZR e 3 mais expressos na população BZS.

As Figuras 15 e 16 representam o gel *master* referente a análise das triplicatas em que foram utilizados os gradientes de separação de pH 3-10NL e pH 4-7, respectivamente. A imagem de um gel *master* é construída a partir da média de intensidade de cada *spot* pareado. Nela, todos os *spots* analisados estão representados, sendo que aqueles com valores de diferença de intensidade de pelo menos duas vezes entre as populações BZR e BZS foram marcados com um

quadrado azul. Dentre os *spots* exclusivos, aqueles encontrados apenas na população BZR foram marcados com um círculo vermelho e os encontrados apenas na população BZS foram marcados com um círculo verde. Os números correspondem aos *spots* identificados por MS/MS e listados nas Tabelas 1 e 2.

Dos 114 *spots* submetidos à espectrometria de massa, 107 (94%) foram identificados e correspondem a 63 proteínas diferentes. Este processo foi realizado através da busca de identidade entre a sequência dos peptídeos obtidos e o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) por meio do programa MASCOT (Perkins *et al*, 1999). As Tabelas 1 (pH 3-10NL) e 2 (pH 4-7) apresentam o código dos *spots* selecionados, a proteína identificada, seu número de acesso no NCBI, a massa molecular e pI teóricos, a porcentagem de cobertura da sequência pelos peptídeos obtidos, o *score* total indicado pelo programa MASCOT e a razão entre as médias de intensidade dos *spots* das populações BZR/BZS. Em anexo, as Tabelas A1 e A2 apresentam, respectivamente para as faixas de pH 3-10NL e pH 4-7, os peptídeos utilizados pelo programa MASCOT na busca por identificação.

A massa molecular das proteínas identificadas variou de 10 a 93 KDa, sendo a maioria encontrada entre a faixa de 20-50 KDa. Com relação ao ponto isoelétrico, a maioria das proteínas estavam presentes na faixa de pH 5-6.

Das 63 proteínas identificadas, 31 estavam presentes na faixa de separação de pH 3-10NL, 18 na de pH 4-7 e 14 em ambas as faixas de pH. Com relação ao perfil de expressão apresentado por tais proteínas na faixa de separação de pH 3-10NL, 5 mostraram-se exclusivas da população BZR e 3 apresentaram-se como mais expressas nesta população. Ainda neste mesmo gradiente de pH, 10 proteínas mostraram-se exclusivas da população BZS e 9 foram mais expressas nesta população. No gradiente de pH 4-7, 4 e 6 proteínas, respectivamente, apresentaram-se como exclusiva e diferencialmente expressas na população BZR e 9 foram exclusivamente expressas na população BZS. Das 20 proteínas restantes, 4 foram identificadas em ambas as faixas de separação como mais expressas em BZR e 16 foram identificadas em mais de um *spot* e não mantiveram o seu perfil de expressão.

Os mapas protéicos da forma amastigota das populações BZR e BZS de *T. cruzi* podem ser visualizados nas Figuras 15 (pH 3-10NL) e 16 (pH 4-7). As proteínas identificadas foram agrupadas em dez categorias funcionais (Tabela 3) com base em busca realizada no banco de dados *The Gene Ontology – GO*

(www.geneontology.org). A maioria delas (24%) foram associadas à atividades metabólicas. Dentre as proteínas pertencentes a esta categoria estão enzimas envolvidas no metabolismo de geração de energia, como a enolase e a malato desidrogenase, na defosforilação como a *serine/threonine protein phosphatase*, e na biossíntese do glutamato, como a glutamato desidrogenase. As proteínas associadas à via de defesa antioxidante, triparedoxina peroxidase, ferro superóxido dismutase A, tripanotiona redutase e espermidina sintase, perfizeram um total de 6%. Além destas, estão aquelas categorizadas como chaperonas moleculares (14%) bem como as associadas a processos fisiológicos (5%), de tradução (6%) e de proteólise (9,5%). As demais (24%) foram divididas entre as categorias de proteínas hipotéticas, organização do citoesqueleto, transporte transmembrana e processamento do RNA. Onze por cento das proteínas não foram enquadradas em nenhuma das categorias funcionais, uma vez que não foram encontradas na busca pelo banco de dados utilizado.

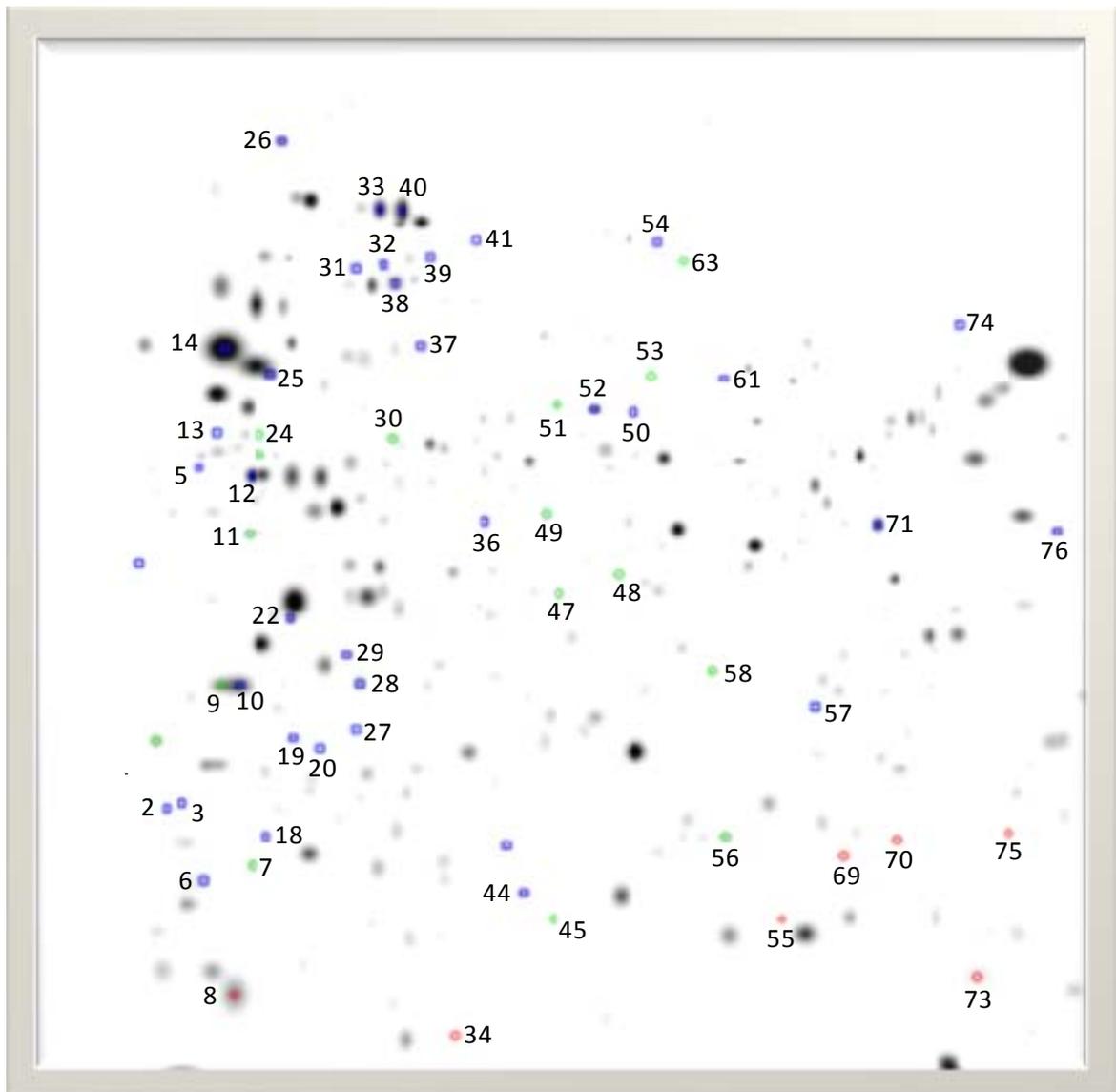


Figura 15. Gel *master* da análise dos *spots* obtidos por separação em gradiente de pH 3-10NL de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*. Os *spots* utilizados nas análises quantitativa e qualitativa pelo *software* PDQuest 7.3.0 estão representados no gel *master*. Os *spots* marcados em azul (□) apresentaram uma diferença de intensidade de no mínimo duas vezes entre as populações BZR e BZS. Dentre os *spots* exclusivos, os encontrados apenas na população BZR foram marcados de vermelho (○) e os encontrados apenas na população BZS foram marcados de verde (○). Os números correspondem aos *spots* identificados por MS/MS e listados na Tabela 1.

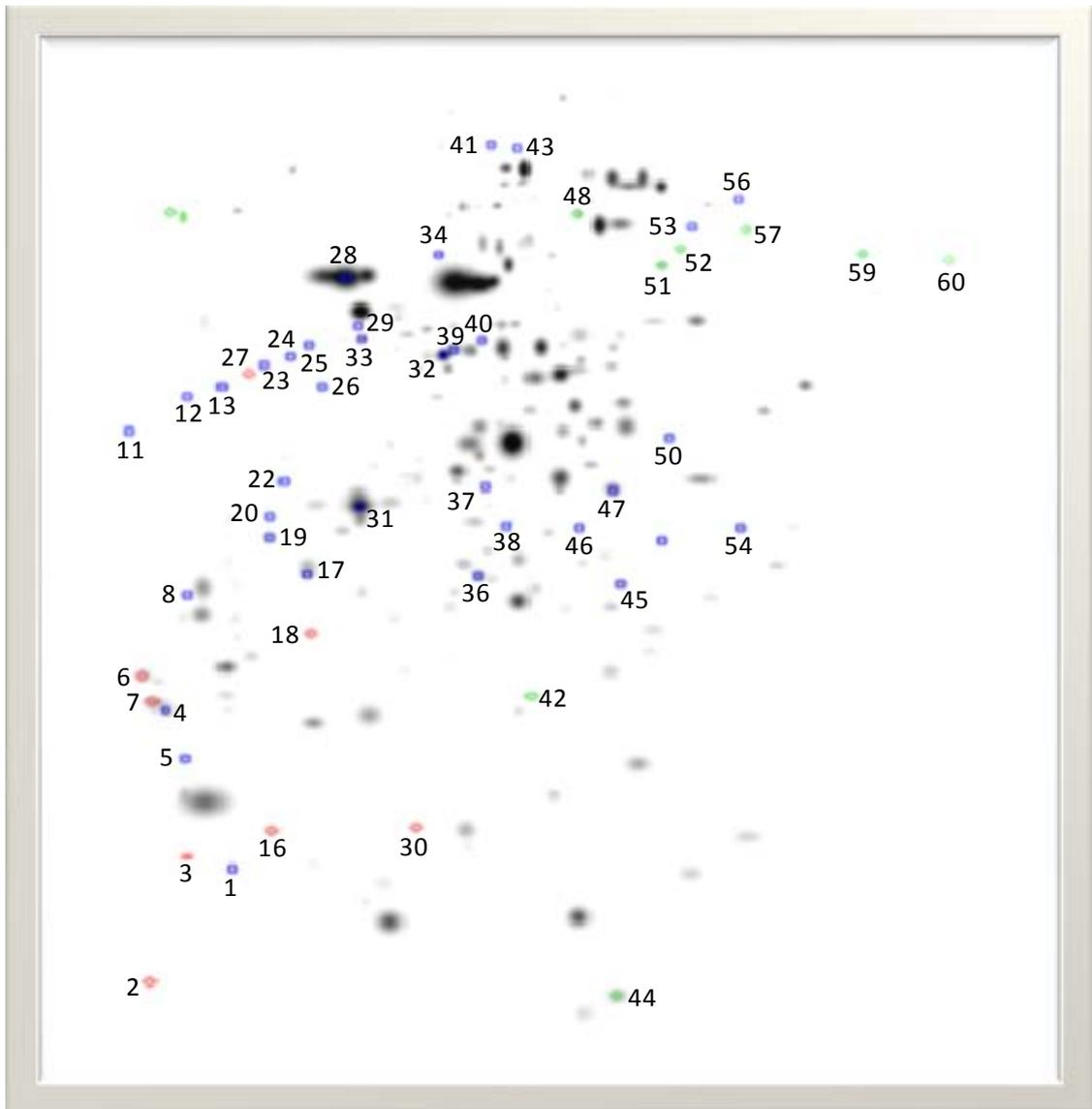


Figura 16. Gel *master* da análise dos *spots* obtidos por separação em gradiente de pH 4-7 de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi*. Os *spots* utilizados na análise quantitativa e qualitativa pelo *software* PDQuest 7.3.0 estão representados no gel *master*. Os *spots* marcados em azul (□) apresentaram uma diferença de intensidade de no mínimo duas vezes entre as populações BZR e BZS. Dentre os *spots* exclusivos, os encontrados apenas na população BZR foram marcados de vermelho (●) e os encontrados apenas na população BZS foram marcados de verde (●). Os números correspondem aos *spots* identificados por MS/MS e listados na Tabela 2.

Tabela 1. Spots indicados nos géis 2D de gradiente de separação de pH 3-10NL como diferencialmente ou exclusivamente expressos na forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* e identificados por Maldi-ToF-ToF MS.

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR/BZS
2	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	2.61
	<i>heat shock protein 70</i> ou	gi 50659756 ou	71.33	5.06	17%	1012	
	<i>glucose regulated protein 78</i>	gi 71415505					
3	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	2.43
5	<i>heat shock protein 70</i> ou	gi 50659756 ou	71.33	5.06	17%	1012	5.14
	<i>glucose regulated protein 78</i>	gi 71415505					
6	<i>hypothetical protein</i>	gi 71662317	22.21	4.67	13%	201	0.46
7	<i>proteasome beta 3 subunit</i>	gi 71650132	22.36	5.00	10%	150	S
8	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	R
	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	
9	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	S
10	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	2.14
11	<i>hypothetical protein</i>	gi 71401896	28.45	4.65	16%	296	S
12	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	2.79
13	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	2.10
	<i>heat shock protein</i>	gi 71650757	93.46	5.28	8%	373	

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR/BZS
14	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	0.48
	<i>protein disulfide isomerase</i>	gi 71658893	53.51	4.87	1%	67	
18	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	gi 71665068	59.12	5.38	18%	721	2.23
	<i>peroxiredoxin</i>	gi 4388655	25.50	7.62	15%	251	
19	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	2.08
20	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	2.21
	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	
22	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	4.11
	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	
24	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	S
25	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	2.67
26	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	0.49
27	<i>seryl-tRNA synthetase</i>	gi 71421977	53.34	5.55	17%	489	2.33
	<i>25 kDa translation elongation factor 1-beta</i>	gi 71402893	24.43	5.43	15%	265	
28	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	2.29
29	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	2.26
	<i>spermidine synthase</i>	gi 71656655	33.15	5.16	18%	322	
30	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	S
31	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	gi 71407515	70.94	5.75	14%	863	2.55

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR _t /BZS
32	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	gi 71407515	70.94	5.75	14%	863	2.07
33	<i>heat shock protein 70</i>	gi 205278868	71.19	5.32	25%	1246	0.42
34	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	R
36	<i>alpha tubulin</i> <i>3,2-trans-enoyl-CoA isomerase</i> ou <i>3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	0.40
		gi 71403972	39.48	6.63	10%	283	
		gi 71405843	45.05	7.12	9%	283	
37	<i>alpha tubulin</i> <i>hypothetical protein</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	2.39
		gi 71400380	48.72	5.33	5%	114	
38	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	gi 71665068	59.12	5.38	18%	721	0.43
39	<i>2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase</i>	gi 71666782	60.32	5.59	14%	416	0.34
40	<i>heat shock protein 70</i>	gi 205278868	71.19	5.32	25%	1246	0.43
41	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	gi 71407515	70.94	5.75	14%	863	2.40
44	<i>co-chaperone GrpE</i> <i>tryparedoxin peroxidase</i>	gi 71401098	24.35	8.49	14%	103	0.38
		gi 17224953	22.24	5.96	19%	251	
45	<i>glutamate dehydrogenase</i>	gi 71414987	45.02	8.04	8%	186	S
47	<i>enolase</i> <i>succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit β</i>	gi 71665461	46.41	5.92	21%	624	S
		gi 71398764	34.51	5.71	7%	136	

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR/BZS
48	<i>aromatic L-alpha-hydroxyacid dehydrogenase</i>	gi 7109725	33.77	6.82	21%	345	S
	<i>activated protein kinase C receptor</i>	gi 71661424	35.00	5.73	7%	112	
49	<i>40 kDa cyclophilin</i>	gi 71659642	38.34	5.69	13%	196	S
50	<i>enolase</i>	gi 71665461	46.41	5.92	21%	624	0.34
	<i>TC38</i>	gi 2384556	37.61	6.22	9%	166	
	<i>phosphoglycerate kinase</i>	gi 71411859	44.44	6.19	7%	87	
51	<i>enolase</i>	gi 71665461	46.41	5.92	21%	624	S
52	<i>enolase</i>	gi 71665461	46.41	5.92	21%	624	0.40
53	<i>trypanothione reductase</i>	gi 136620	53.83	6.25	8%	270	S
54	<i>stress-induced protein sti1</i>	gi 71664854	63.07	6.23	16%	464	0.49
55	<i>isocitrate dehydrogenase</i>	gi 71659757	46.83	7.66	14%	385	R
	<i>tryparedoxin peroxidase</i>	gi 17224953	22.25	5.96	19%	251	
	<i>iron superoxide dismutase A</i>	gi 13488615	23.15	9.26	4%	68	
56	<i>proteasome activator protein PA26</i>	gi 71411031	24.65	5.46	22%	372	S
57	<i>mitochondrial malate dehydrogenase</i> ou	gi 71414199	31.49	7.62	23%	544	2.17
	<i>malate dehydrogenase</i>	gi 71664243	33.33	8.44	22%		
58	<i>protein kinase</i>	gi 71422892	30.07	6.41	10%	125	S
	<i>RNA-binding protein</i>	gi 71413449	31.08	9.40	7%	106	
61	<i>succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor</i>	gi 71667967	52.76	7.94	7%	211	0.45

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	^{BZR} / _{BZS}
63	<i>carnitine/choline acetyltransferase</i>	gi 71652512	66.95	6.20	13%	362	S
69	<i>seryl-tRNA synthetase</i>	gi 71421977	53.34	5.55	17%	489	R
70	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	gi 71665068	59.12	5.38	18%	721	R
	<i>protein disulfide isomerase</i>	gi 71425268	41.78	6.69	7%	233	
	<i>enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor</i>	gi 71396207	28.78	8.83	13%	146	
71	<i>aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	gi 71412236	46.01	8.57	14%	571	0.41
73	<i>hypothetical protein</i>	gi 71398774	29.63	9.14	13%	242	R
	<i>universal minicircle sequence binding protein</i>	gi 71416083	14.32	9.00	28%	212	
74	<i>hypothetical protein</i>	gi 71401181	56.32	8.68	16%	499	0.45
75	<i>hypothetical protein</i>	gi 71398774	29.63	9.14	13%	242	R
	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	gi 71422448	39.01	8.99	15%	397	
76	<i>hypothetical protein</i>	gi 71398774	29.63	9.14	13%	242	0.45
	<i>RNA-binding protein</i>	gi 71409156	36.35	9.24	10%	254	

a) massa molecular teórica;

b) ponto isoelétrico teórico;

R – spots exclusivos de BZR;

S – spots exclusivos de BZS.

Tabela 2. Spots indicados nos géis 2D de gradiente de separação de pH 4-7 como diferencialmente ou exclusivamente expressos na forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* e identificados por Maldi-ToF-ToF MS.

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR/BZS
1	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i> <i>beta tubulin</i>	gi 71665068	59.13	5.38	17%	600	2.17
		gi 18568139	49.66	4.74	20%	790	
2	<i>Centrin</i>	gi 71425751	16.51	4.35	27%	213	R
3	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	20%	790	R
4	<i>hypothetical protein</i>	gi 71651746	19.52	4.30	20%	181	0.39
5	<i>heat shock protein 70 ou</i> <i>glucose regulated protein 78</i>	gi 50659756 ou gi 71415505	71.33	5.06	17%	1012	2.69
6	<i>hypothetical protein</i>	gi 71651746	19.52	4.30	14%	219	R
7	<i>hypothetical protein</i>	gi 71651746	19.52	4.30	14%	219	R
8	<i>beta tubulin</i> <i>heat shock protein 70 ou</i> <i>glucose regulated protein 78</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	2.53
		gi 50659756 ou gi 71415505	71.33	5.06	17%	1012	
11	<i>calreticulin</i>	gi 71423784	46.18	4.77	11%	250	2.28
12	<i>calreticulin</i>	gi 71423784	46.18	4.77	11%	250	2.25
13	<i>calreticulin</i>	gi 71423784	46.18	4.77	11%	250	2.28
16	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	R

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR/BZS
17	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	20%	790	2.96
	<i>translation elongation factor 1-beta</i>	gi 71663355	21.85	4.73	9%	71	
	<i>hypothetical protein</i>	gi 71404579	26.03	4.86	20%	254	
18	<i>heat shock protein 70</i>	gi 205278868	71.19	5.32	16%	858	R
19	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	20%	790	2.80
20	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	gi 71665068	59.13	5.38	17%	600	2.37
	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	20%	790	
	<i>nascent polypeptide associated complex subunit</i>	gi 71422974	19.56	4.66	15%	229	
22	<i>heat shock protein 70</i>	gi 205278868	71.19	5.32	16%	858	3.79
	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	20%	790	
23	<i>calreticulin</i>	gi 71423784	46.18	4.77	11%	250	3.40
24	<i>calreticulin</i>	gi 71423784	46.18	4.77	11%	250	2.84
25	<i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	gi 50659756 ou gi 71415505	71.33	5.06	17%	1012	2.90
26	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	2.75
27	<i>calreticulin</i>	gi 71423784	46.18	4.77	11%	250	R
28	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	0.18
29	<i>heat shock protein</i>	gi 71650757	93.46	5.28	8%	373	3.34

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR ^{c)} /BZS
30	<i>alpha tubulin serine/threonine protein phosphatase, catalytic subunit</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	R
		gi 71653940	34.39	5.49	7%	108	
31	<i>beta tubulin</i>	gi 18568139	49.66	4.74	26%	1074	2.32
32	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	2.04
33	<i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	gi 50659756 ou gi 71415505	71.33	5.06	17%	1012	2.31
34	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	gi 71665068	59.13	5.38	17%	600	0.43
36	<i>beta tubulin enolase</i>	gi 18568139	49.66	4.74	20%	790	2.19
		gi 5566209	37655	5.59	13%	293	
37	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit β</i>	gi 71665068	59.13	5.38	17%	600	2.68
		gi 71398764	34.51	5.71	16%	449	
38	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	14%	763	4.90
39	<i>heat shock protein 85</i>	gi 71403337	80.67	5.07	14%	763	3.91
40	<i>heat shock protein 85 DNAK protein</i>	gi 71403337	80.67	5.07	22%	1403	3.11
		gi 71408185	27.13	4.84	21%	330	
41	<i>Trans-sialidase</i>	gi 71409205	76.68	6.11	11%	538	2.39
42	<i>hypothetical protein</i>	gi 71402242	21.36	5.20	23%	374	S

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	BZR ^R /BZS
43	<i>Trans-sialidase</i>	gi 71409205	76.68	6.11	11%	538	2.17
44	<i>hypothetical protein</i>	gi 71414645	10.35	5.33	15%	81	S
	<i>hypothetical protein</i>	gi 71650453	16.99	9.41	25%	310	
45	<i>hslvu complex proteolytic subunit-like</i>	gi 71416273	22.87	6.77	17%	312	2.11
46	<i>heat shock protein 70</i>	gi 205278868	71.19	5.32	25%	1246	2.50
	<i>25 kDa translation elongation factor 1-beta</i>	gi 71402893	24.43	5.43	15%	265	
	<i>hypothetical protein</i>	gi 71655060	34.13	5.75	4%	58	
47	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	2.56
48	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	gi 71407515	70.94	5.75	14%	863	S
	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	gi 71665068	59.12	5.38	18%	721	
50	<i>alpha tubulin</i>	gi 71397525	49.76	4.94	44%	1650	2.69
	<i>succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit β</i>	gi 71398764	34.51	5.71	7%	136	
51	<i>hypothetical protein</i>	gi 71400380	48.72	5.33	7%	135	S
52	<i>vacuolar ATP synthase subunit B</i>	gi 71409103	55.50	5.43	20%	476	S
53	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase precursor</i>	gi 71665855	49.66	6.29	16%	331	3.46
	<i>seryl-tRNA synthetase</i>	gi 71421977	53.34	5.55	5%	115	
54	<i>heat shock protein 70</i>	gi 205278868	71.19	5.32	16%	858	2.31

Spot	Proteína	Número de acesso (NCBI)	MW _t ^{a)}	pI _t ^{b)}	Cobertura da sequência (%)	MASCOT score	^{BZR} / _{BZS}
56	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i> <i>2,3-bisfosfoglicerato-independente fosfoglicerato mutase</i>	gi 71407515	70.94	5.75	14%	863	2.36
		gi 71666782	60.32	5.59	14%	416	
57	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase precursor</i> <i>seryl-tRNA synthetase</i>	gi 71665855	49.66	6.29	3%	77	S
		gi 71421977	53.34	5.55	17%	489	
59	<i>T-complex protein 1, beta subunit</i>	gi 71415978	58.05	5.78	7%	178	S
60	<i>aminopeptidase</i>	gi 71665688	55.86	6.06	7%	89	S

a) massa molecular teórica;

b) ponto isoelétrico teórico;

R – spots exclusivos de BZR;

S – spots exclusivos de BZS.

Tabela 3. Proteínas da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* identificadas por MS/MS e agrupadas em categorias funcionais com base no banco de dados *The Gene Ontology* .

Categoria Funcional (%)	Proteína
Processos metabólicos (24%)	<p><i>3,2-trans-enoyl-CoA isomerase</i></p> <p><i>enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor</i></p> <p><i>succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor</i></p> <p><i>Trans-sialidase</i></p> <p><i>aspartate aminotransferase, mitochondrial</i></p> <p><i>dihydrolipoamide acetyltransferase precursor</i></p> <p><i>glutamate dehydrogenase</i></p> <p><i>isocitrate dehydrogenase</i></p> <p><i>carnitine/choline acetyltransferase</i></p> <p><i>mitochondrial malate dehydrogenase ou malate dehydrogenase</i></p> <p><i>succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit β</i></p> <p><i>Enolase</i></p> <p><i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i></p> <p><i>serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit</i></p> <p><i>activated protein kinase C receptor</i></p>
Proteína Hipotética (17%)	<p>Proteína hipotética gi 71662317</p> <p>Proteína hipotética gi 71401896</p> <p>Proteína hipotética gi 71400308</p> <p>Proteína hipotética gi 71398774</p> <p>Proteína hipotética gi 71401181</p> <p>Proteína hipotética gi 71651746</p> <p>Proteína hipotética gi 71404579</p> <p>Proteína hipotética gi 71402242</p> <p>Proteína hipotética gi 71414645</p> <p>Proteína hipotética gi 71650453</p> <p>Proteína hipotética gi 71655060</p>
Chaperonas moleculares (14%)	<p><i>calreticulin</i></p> <p><i>40 kDa cyclophilin</i></p> <p><i>co-chaperone GrpE</i></p> <p><i>heat shock protein</i></p> <p><i>heat shock protein 70</i></p> <p><i>heat shock protein 85</i></p> <p><i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i></p> <p><i>T-complex protein 1, beta subunit</i></p>

Categoria Funcional (%)	Proteína
	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>
Catabolismo/proteólise (10%)	<i>hslvu complex proteolytic subunit-like</i> <i>2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase</i> <i>proteasome activator protein PA26</i> <i>Aminopeptidase</i> <i>proteasome beta 3 subunit</i> <i>glucose regulated protein 78</i>
Organização do citoesqueleto (3%)	<i>alpha tubulin</i> <i>beta tubulin</i>
Defesa antioxidante (6%)	<i>spermidine synthase</i> <i>iron superoxide dismutase A</i> <i>trypanothione reductase</i> <i>tryparedoxin peroxidase</i>
Tradução (6%)	<i>25 kDa translation elongation factor 1-beta</i> <i>nascent polypeptide associated complex subunit</i> <i>seryl-tRNA synthetase</i> <i>translation elongation factor 1-beta</i>
Processos fisiológicos (5%)	<i>Centrin</i> <i>stress-induced protein sti1</i> <i>universal minicircle sequence binding protein (UMSBP)</i>
Processamento do RNA (2%)	<i>RNA-binding protein</i>
Transporte transmembrana (2%)	<i>vacuolar ATP synthase subunit B</i>
Outras proteínas (11%)	<i>aromatic L-alpha-hydroxyacid dehydrogenase</i> <i>phosphoglycerate kinase</i> <i>peroxiredoxin</i> <i>DNAK protein</i> <i>protein kinase</i> <i>TC38</i> <i>protein disulfide isomerase</i>

5.6 Monitoramento das culturas de células e parasitos

A qualidade das culturas de células e parasitos era garantida pelas medidas de limpeza e desinfecção da sala e de seus equipamentos, pelo uso de EPI's como jaleco, gorro, luvas, pró-pé e máscara e por outros procedimentos diários tais como a utilização de álcool 70% para a desinfecção da capela de segurança biológica e demais materiais a serem manipulados e a realização de testes de esterilidade nos meios e soluções.

Os métodos utilizados para a detecção de contaminação de culturas por bactérias do gênero *Mycoplasma* se diferem dos usuais, uma vez que não ocorre turvação do meio de cultura e nem alterações morfológicas nas células e parasitos contaminados que sejam visíveis ao microscópio óptico. Dessa forma, o monitoramento de possíveis contaminações das culturas por *Mycoplasma* foi feito através da técnica de PCR, padronizada em nosso laboratório. Esse monitoramento foi fundamental para garantir que os extratos de proteínas totais separados em gel 2D contivessem apenas proteínas do protozoário de estudo, não havendo nenhuma contaminação das amostras por proteínas de *Mycoplasma*.

Os produtos amplificados pela PCR foram separados em gel de poliacrilamida 8% corado por prata (Figura 17). Na canaleta 1 foi aplicado produto da PCR de uma amostra de células Vero. Nas canaletas de 2 a 7 foram aplicados os produtos da PCR referentes às amostras de tripomastigotas das populações BZR e BZS utilizadas nos experimentos de transformação. O controle positivo (CP) da reação corresponde a uma amostra de cultura de células Vero sabidamente contaminada por *Mycoplasma*. O controle negativo (CN) não continha preparação de DNA. Os iniciadores utilizados foram descritos por Timenetsky e *cols.* (2006) e amplificam parte do gene da subunidade 16s do rRNA de qualquer espécie do gênero *Mycoplasma*. O tamanho do fragmento esperado é de 270 pb. Esta banda foi observada apenas no controle positivo, indicando que as amostras de cultura analisadas não estavam contaminadas. Os arrastes observados no gel correspondem às proteínas carregadas da amostra para a reação de PCR, uma vez que o método de extração utilizado não separa as proteínas do DNA. Outro indicador da ausência de contaminação das culturas está no fato de nenhum dos *spots* submetidos a MS terem sido identificados como proteínas pertencentes a bactérias do gênero *Mycoplasma* após busca de identidade realizada pelo MASCOT contra todas as sequências de proteínas depositadas no NCBI.

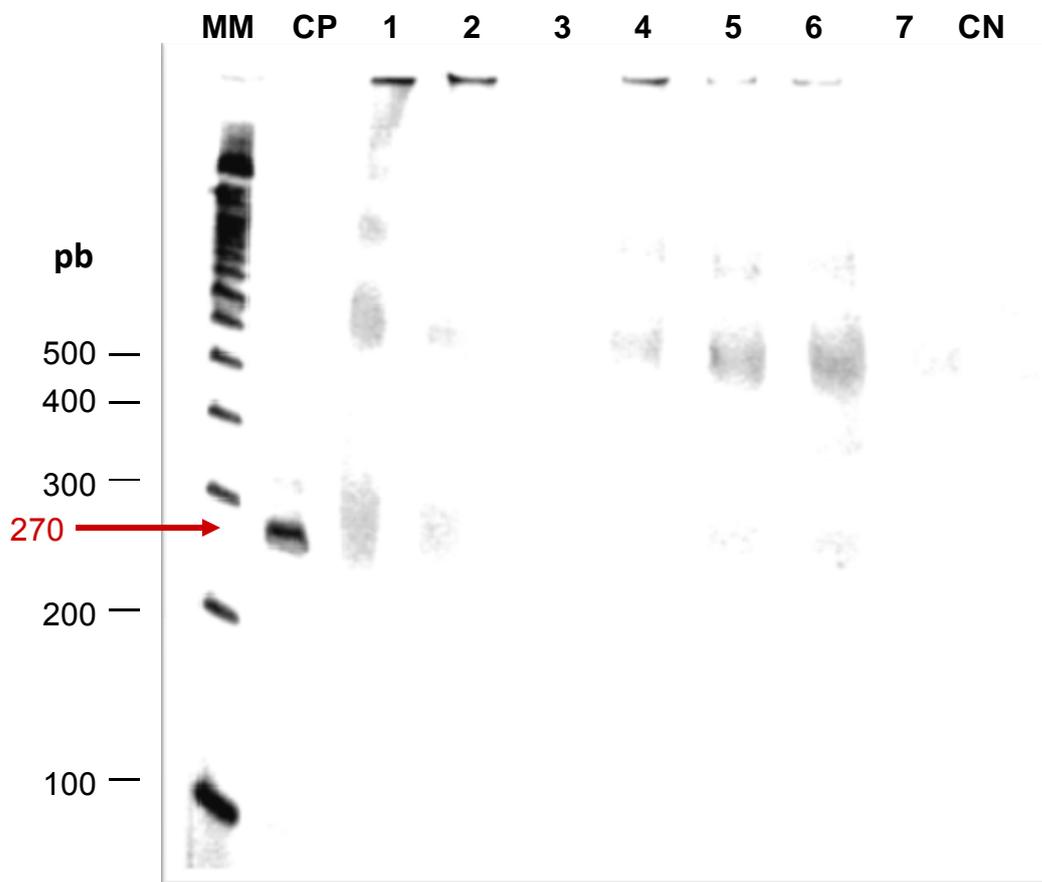


Figura 17. Análise dos produtos de PCR para o monitoramento de contaminação das culturas de células e parasitos por *Mycoplasma*. Os produtos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata. MM: marcador molecular de 100 pb. Canaleta 1: produto da PCR de amostra de células Vero. Canaletas 2 a 7: produtos da PCR de amostras de tripomastigotas das populações BZR e BZS utilizadas nos experimentos de transformação. CP: controle positivo. CN: controle negativo.

6 DISCUSSÃO

O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas distintas, mas apenas as amastigotas e tripomastigotas são as encontradas no hospedeiro vertebrado. Ambas podem ser obtidas *in vitro*. As formas tripomastigotas são facilmente mantidas em laboratório através da infecção de células em cultura. Entretanto, a obtenção de formas amastigotas depende de processos mais trabalhosos como a ruptura de células infectadas, seguida de purificação, ou de processos que induzam a amastigogênese.

A primeira metodologia para obtenção das amastigotas consiste na lise das células infectadas, seja por processo mecânico, químico ou natural; este último facilitado pelo tipo celular usado e pelo alto inóculo utilizado para infecção. Em todos esses casos, o sobrenadante da cultura, contendo as amastigotas intracelulares liberadas, é coletado e seus constituintes purificados em gradientes de percoll ou metrizamida (Sanderson *et al*, 1980; De Carvalho & De Souza, 1983; Gamarro *et al*, 1985). Além de serem laboriosos, tais métodos apresentam um baixo rendimento e possibilidade de contaminação com restos celulares. Além disso, o tratamento químico pode interferir nas propriedades naturais do parasito, como por exemplo, induzindo uma alteração no perfil das proteínas expressas na sua superfície.

O método mais utilizado para obtenção de formas amastigotas de *T. cruzi* tem como base os eventos desencadeadores da amastigogênese. Este processo é iniciado quando as formas tripomastigotas penetram na célula, por intermédio do vacúolo parasitóforo. O ambiente ácido do vacúolo estimula o escape do parasito para o citoplasma e o início do processo de transformação. A indução da transformação de formas tripomastigotas em amastigotas por sua exposição ao pH ácido tem sido mimetizada *in vitro* como forma de obtenção destas formas replicativas do parasito. Tomlinson e cols. (1995) foram os primeiros a descreverem uma metodologia com base nesse princípio. Após a exposição dos parasitos em meio de cultura de pH 5,0, os autores avaliaram o grau de transformação morfológica, ultraestrutural e na expressão de epítomos de superfície, constatando que as formas transformadas se assemelhavam, em todos estes aspectos, àquelas obtidas intracelularmente. Minning e cols. (2003 e 2009) fizeram uso dessa metodologia para obter as amastigotas axênicas utilizadas em dois estudos de expressão gênica realizados por *microarray*. Os trabalhos já realizados que envolvem estudos relacionados ao proteoma das formas amastigotas de *T. cruzi*

também se basearam nesta metodologia para a obtenção destas formas do parasito (Paba *et al*, 2004; Atwood *et al*, 2005; Magalhães *et al*, 2006). No entanto, o tempo de exposição dos parasitos ao baixo pH sofreu alterações nos trabalhos descritos por Paba e cols. (2004) e Magalhães e cols. (2006). No presente estudo, o tempo utilizado para a transformação dos parasitos foi de 18 horas, maior do que aquele utilizado pelos outros autores. Este tempo foi escolhido com base em ensaios de otimização que avaliaram a porcentagem de amastigotas obtidas em função de diferentes tempos de exposição. Além disso, o percentual de parasitos transformados foi maior na população resistente (BZR) quando comparado ao do seu par sensível (BZS). Cepas e clones do *T. cruzi* apresentam uma grande variabilidade genética (Silveira, 2000; Manoel-Caetano & Silva *et al*, 2007), o que poderia explicar esta diferença no comportamento das populações BZR e BZS frente a sua exposição ao baixo pH e, por conseguinte, ao tempo gasto para se concluir o processo de transformação.



Os tripanossomatídeos apresentam mudanças na expressão de genes e proteínas entre os diferentes estágios do seu ciclo de vida. Para compreender melhor esse processo, estudos comparativos de expressão diferencial de genes podem ser direcionados para a análise dos níveis de mRNA (transcriptoma) e de proteínas (proteoma). Minning e colaboradores utilizaram a técnica de *microarray* para determinar a abundância relativa dos mRNAs durante a amastigogênese e entre os principais estágios do parasito (Minning *et al*, 2003 e 2009). Esse tipo de abordagem auxilia no monitoramento das mudanças na expressão relativa dos genes. Entretanto, para organismos cuja regulação da expressão gênica é mediada em níveis pós-transcricionais (Teixeira, 1998; Clayton, 2002; Campbell *et al*, 2003; Palenchar & Bellofatto, 2006), como o que ocorre no *T. cruzi*, a abundância dos mRNAs nem sempre está diretamente correlacionada aos níveis de proteína. Sendo assim, as mudanças na expressão dos genes nestes organismos podem ser melhor avaliadas através de estudos de proteômica.

No presente trabalho, extratos de proteínas totais da forma amastigota das populações BZR e BZS, obtida em cultura axênica, foram separadas por 2DE e identificados por MS/MS do tipo Maldi-ToF-ToF com o objetivo de indicar proteínas

diferencialmente expressas entre as populações de estudo. Uma vez identificadas e submetidas a outros estudos, tais proteínas poderão ser utilizadas como alvos para o desenho de drogas e/ou auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos de resistência do *T. cruzi* ao benzonidazol.

O número de *spots* encontrados por Paba e *cols.* (2004), que também estudaram o perfil protéico de amastigotas por 2DE/MS utilizando *strips* de IPG de 17cm, foi maior quando comparado ao resultado obtido no presente estudo, em ambos os gradientes de pH utilizados. No entanto, além de ter sido utilizada outra cepa do parasito, o método de coloração dos géis também foi diferente. Embora o método de coloração pela prata seja mais sensível, e por isso, capaz de detectar um número maior de *spots*, a coloração por Azul de Coomassie Coloidal, empregada no nosso estudo, é mais indicada nos protocolos de identificação de proteínas por Maldi-ToF-ToF.

Atwood e *cols.* (2005) utilizaram o método de LC/MS/MS para separar e identificar proteínas dos diferentes estágios evolutivos do *T. cruzi*, dentre eles, o de amastigotas. Através desta metodologia, capaz de identificar um número maior de proteínas quando comparada a 2DE/MS, os autores realizaram um número grande de identificações. Entretanto, o objetivo do trabalho não era comparar a expressão protéica entre as diferentes fases do parasito, e sim, identificar o maior número possível de proteínas.

Os mapas proteômicos comparativos que utilizam a metodologia de 2DE/MS tem a capacidade de detectar mudanças quantitativas na expressão de proteínas ou suas modificações pós-traducionais. No entanto, a separação de proteínas por 2DE oferece algumas limitações. Proteínas de membrana, em pequenas quantidades, com valores extremos de pI ou de massa molecular, não são eficientemente separadas e, conseqüentemente, detectadas. Assim, quando comparada com metodologias como a LC/MS, por exemplo, a 2DE/MS apresenta um número menor de proteínas identificadas (Garbis *et al*, 2005). Além da técnica, esse número pode estar relacionado ao organismo ou cepa utilizada, ao método de coloração empregado e a faixa de pH em que as proteínas foram separadas.

Dois estudos de proteômica correlacionados ao mecanismo de resistência a drogas foram desenvolvidos pelo nosso grupo. Andrade e *cols.* (2008) utilizaram formas epimastigotas de diferentes clones e cepas do parasito, dentre elas as das populações BZR e BZS. Foram analisados 137 *spots* por Maldi-ToF-ToF MS, sendo

identificadas 56 proteínas distintas. Com relação aos resultados descritos para as populações BZR e BZS, foram encontrados uma média de 200 *spots* por gel de 17cm. Dos *spots* selecionados pelo programa de análise como diferencialmente ou exclusivamente expressos em uma das populações, 13 foram identificados por MS como proteínas do tipo *heat shock proteins* (HSPs), peroxiredoxina e tirosina aminotransferase. Santos e cols. (2008) verificaram que formas tripomastigotas, pertencentes às populações BZR e BZS, também apresentaram expressão diferencial em alguns dos *spots* protéicos analisados. Uma média de 238 *spots* foram analisados nos géis, sendo que destes, 23 foram considerados como tendo uma diferença quantitativa de pelo menos duas vezes entre as populações de estudo. Dentre as proteínas identificadas por MS e que apresentaram diferença de expressão entre as populações BZR e BZS estavam a treonina desidrogenase, enzima málica, fator de alongação 1-alfa, tirosina aminotransferase e subunidade beta da ATPase. Em ambos os estudos, o gradiente de separação utilizado foi o de pH 3-10NL, sendo o de pH 4-7 posteriormente utilizado para as formas tripomastigotas do parasito. No presente estudo, uma média de 300 e 225 *spots* foram encontrados nos géis de gradientes de separação de pH 3-10NL e pH 4-7, respectivamente, em *strips* de 17cm. Comparando esses resultados com os obtidos com epimastigotas e tripomastigotas, o número de *spots* encontrado foi semelhante entre eles. Apesar de utilizarem diferentes formas evolutivas, todos os três estudos foram realizados com as mesmas populações do parasito. Além disso, a metodologia empregada foi a mesma. Quatro das proteínas identificadas nas formas epimastigotas e tripomastigotas das populações BZR e BZS também foram detectadas como diferencialmente expressas entre estas populações na forma amastigota (HSP 70, HSP 70 precursor mitocondrial, ciclofilina e calreticulina). No entanto, seus perfis de expressão não se mantiveram entre as diferentes formas evolutivas, possivelmente como resultado das diferenças inerentes aos estágios de vida do parasito.

De acordo com Paba e cols. (2004), proteínas como tubulinas e HSP são usualmente identificadas em análises proteômicas devido ao elevado nível de expressão de tais proteínas nas células. No presente estudo, foi identificado um grande número de *spots* correspondentes a alfa ou beta tubulinas distribuídas ao longo do gel 2D, tanto na região de 50KDa (MW_t) e pI_t 5 quanto em regiões do gel cuja massa molecular e pI não correspondem aos valores teóricos. Em outros

estudos realizados com outros tripanossomatídeos também foi verificada esta ocorrência (Drummel-Smith *et al*, 2003; Parodi-Talice *et al*, 2004; Paba *et al*, 2004; Parodi-Talice *et al*, 2007). Parodi-Talice e *cols.* (2004) sugeriram que *spots* localizados em regiões de baixa massa molecular identificados como tubulinas podem ser o produto de proteólise pós-traducional para a formação de estruturas microtubulares que poderiam ter algum papel funcional *in vivo*. Além das tubulinas, as HSPs identificadas também se encontraram distribuídas em diferentes *spots* ao longo do gel 2D. No entanto, dois modelos de ocorrência dessas proteínas puderam ser observados. As HSPs 70 exemplificam o primeiro modelo. Apesar de identificadas em diferentes pontos do gel 2D com três diferentes números de acesso, as HSPs 70 detectadas na faixa de separação de pH 3-10NL apresentaram um padrão no seu perfil de expressão com valores de razão entre as médias de intensidade entre as populações BZR e BZS muito próximos. Este padrão se repetiu independentemente entre as proteínas com os três números de acesso, sendo duas delas mais expressas na população BZR e uma na população BZS. Dessa forma, é possível que tais *spots* se refiram a isoformas de uma mesma proteína depositada com diferentes números de acesso no NCBI. O mesmo padrão pode ser observado na faixa de separação de pH 4-7 para a HSP cujo número de acesso é gi|50659756. No entanto, não pode ser descartada a possibilidade de que alguns *spots* possam ser resultantes de proteólise natural ou decorrente do processo de extração ocorrida em uma ou outra amostra das diferentes populações. Este fato ilustra o segundo modelo de ocorrência das HSPs e poderia explicar a identificação de *spots* cujas proteínas apresentam massas moleculares muito inferiores às preditas e a ausência de um padrão no perfil de expressão diferencial para uma mesma proteína que foi identificada em diferentes *spots*, fato observado para as HSPs 60 e 85.

A ocorrência de proteínas que apareceram em diferentes *spots*, com massas moleculares similares e pequenas variações em seus pontos isoelétricos, também puderam ser observadas e são provavelmente resultado de modificações pós-traducionais. Como exemplo tem-se a calreticulina (*spots* 11, 12, 13, 23, 24 e 27 da faixa de separação de pH 4-7).

Alguns *spots* foram identificados como duas ou mais proteínas diferentes. É possível que duas ou mais proteínas se coloquem no mesmo *spot*, sendo quantificadas como uma única proteína. Em concordância a esta hipótese, foi observado que proteínas que foram identificadas juntamente com outras no mesmo

spot tiveram o seu perfil de expressão alterado. Por exemplo, quando identificada isoladamente em um *spot*, a *2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase* foi apontada como mais expressa na população BZS (*spot* 39 na faixa de separação de pH 3-10NL). No entanto, quando colocalizada com a HSP 70 (gi|71407515) a quantificação foi alterada e o seu perfil de expressão se inverteu para mais expressa na população BZR (*spot* 56 na faixa de separação de pH 4-7). Dessa forma, os dados de quantificação são prejudicados como resultado dessas associações entre proteínas. Uma outra hipótese seria que ambas as proteínas pudessem compartilhar alguns dos peptídeos utilizados na identificação.

Proteínas envolvidas com a via de defesa antioxidante e sugeridas por alguns autores como potenciais alvos de drogas, tais como, triparedoxina peroxidase, ferro superóxido dismutase A, tripanotiona redutase e espermidina sintase foram identificadas. No metabolismo oxidativo, radicais livres como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ânion hidroxila são produzidos por processos endógenos do parasito, pela resposta imune do hospedeiro e pelo metabolismo de drogas. Nesse contexto, as enzimas antioxidantes são essenciais para a sobrevivência da célula, uma vez que promovem a sua proteção contra os danos oxidativos causados por essas espécies reativas de oxigênio (Nogueira *et al*, 2009a) e podem, por isso, estar envolvidas no mecanismo de resistência do parasito a drogas. Dessa forma, uma vez que o perfil de expressão das proteínas da via antioxidante identificadas neste trabalho pode ter sofrido interferência devido a associações com outras proteínas, estudos devem ser realizados a fim de confirmar os perfis de expressão dessas enzimas. A expressão gênica da triparedoxina peroxidase e da ferro superóxido dismutase A em epimastigotas das populações BZR e BZS foi avaliada por Nogueira e *cols.* (2006 e 2009b). Entretanto, não foi observada relação direta entre o fenótipo de resistência e a expressão dessas enzimas. Já a possível relação entre o fenótipo de resistência e a expressão diferencial das enzimas tripanotiona redutase e espermidina sintase nas populações BZR e BZS ainda não foi determinada. A espermidina sintase, por exemplo, participa da via do metabolismo antioxidante que converte as poliaminas putrescina em espermidina para a formação de tripanotiona. As poliaminas são fundamentais para o crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular no parasito, além de terem o papel adicional de manter o equilíbrio redox endógeno através da tripanotiona. Análogos de poliaminas e as enzimas biossintéticas envolvidas em seus metabolismos têm sido

sugeridas como alvos promissores para o desenho de drogas. Um análogo da putrescina, o 1,4-diamino-2-butanona (DAB) inibiu a proliferação de epimastigotas de *T. cruzi in vitro* e produziu uma notável destruição mitocondrial e desorganização na arquitetura celular (Menezes *et al*, 2006). No caso da espermidina, alguns autores sugerem que o uso de inibidores seletivos da espermidina sintase no *T. cruzi* não resultaria em grandes danos para o parasito, apesar da ausência de estudos que avaliem o efeito dessa inibição no seu crescimento e sobrevivência. Isso porque além de ser produzida pela espermidina sintase, a espermidina pode ser também captada por um sistema de transporte de alta afinidade do meio extra e intracelular do hospedeiro (Heby *et al*, 2007). No entanto, a expressão aumentada da espermidina sintase em parasitos com o fenótipo de resistência pode ser um indicativo de que outras enzimas da via também estejam superexpressas nestes parasitos.

A subunidade catalítica de uma fosfatase de resíduos de serina/treonina foi também identificada em associação à outra proteína. Entretanto, assim como a espermidina sintase, ela deve ser alvo de estudos futuros a fim de que o seu perfil de expressão seja confirmado. Em eucariotos, quatro grandes classes de proteínas fosfatases (PP) foram identificadas: PP1, PP2A, PP2B e PP2C. A PP2A é um importante componente de vias regulatórias em eucariotos superiores e controla uma ampla variedade de processos intracelulares. No *T. cruzi*, foi verificado que a PP2A está envolvida no processo de amastigogênese. Ao serem incubadas na presença de ácido ocadaico, um potente inibidor de PP2A, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram incapazes de se transformarem em amastigotas. Além disso, foi demonstrado que a enzima exibe um baixo grau de homologia com a PP2A de humanos, o que a faz ser considerada um bom candidato para alvo de drogas (González *et al*, 2003). Durante os experimentos de indução da transformação das formas tripomastigotas em amastigotas foi observado que os parasitos da população resistente exibiram melhor eficiência de transformação quando comparados com os parasitos da população sensível ao benzonidazol (Figura 6). Se o perfil de expressão da proteína fosfatase identificada for confirmado como sendo mais expressa na população BZR e a proteína for classificada como PP2A, os resultados estarão em concordância com os dados que indicam que a população resistente ao benzonidazol apresenta uma maior eficiência de transformação quando comparada com seu par sensível.

Quinze *spots* foram identificados como proteínas hipotéticas, sendo que onze apresentaram diferentes números de acesso. Destas, cinco foram encontradas isoladamente em um *spot*, sendo mais ou exclusivamente expressas na população BZS. As demais foram identificadas juntamente com outra proteína e não apresentaram um padrão em seu perfil de expressão. Tais identificações podem se referir a proteínas diferentes ou a isoformas de uma mesma proteína depositada com diferentes números de acesso no NCBI.

Divergências, tanto no perfil de expressão quanto no repertório de proteínas identificadas, puderam ser detectadas quando comparado os resultados obtidos entre as faixas de separação de pH 3-10NL e pH 4-7. Uma possível explicação para a diferença no perfil de expressão está na interferência que a colocação de proteínas pode causar no processo de quantificação. Além disso, algumas proteínas identificadas na faixa de pH 4-7 não foram detectadas na de pH 3-10NL. A região de pH 4-7 apresenta uma alta concentração de proteínas que não são bem separadas quando utilizada *strips* de pH na faixa de separação de 3-10. A proteína trans-sialidase, correspondente aos *spots* 41 e 43, por exemplo, foi identificada apenas na faixa de separação de pH 4-7. Possivelmente, os *spots* referentes a esta proteína não foram bem separados na faixa de pH 3-10 e com isso, não foram detectados como diferencialmente expressos na análise do programa PDQuest.

Algumas enzimas que fazem parte de vias essenciais do parasito apresentaram-se como exclusivamente expressas em uma das populações de estudo, como por exemplo, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*spot* 75 no gradiente de pH 3-10NL). Nesses casos, o *spot* da outra população pode não ter sido detectado pelo programa de análise, uma vez que pelo Azul de Coomassie Coloidal não é possível detectar pequenas concentrações de proteína. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de que a proteína que foi encontrada como exclusiva em uma população possa ser uma isoforma única daquela população, ou ainda porque sofreu modificações pós-traducionais que não ocorreram na outra população de estudo.

Dentre as proteínas que foram identificadas isoladamente em um *spot* e que se constituem como bons alvos para estudos futuros estão aquelas encontradas como mais ou exclusivamente expressas na população BZR, tais como malato desidrogenase, trans-sialidase e centrina, e aquelas quantificadas como mais ou exclusivamente expressas na população BZS, como *stress-induced protein sti1*,

aspartato aminotransferase, *2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase*, carnitina/colina acetiltransferase, tripanotiona redutase e glutamato desidrogenase.

A proteína denominada centrina, por exemplo, foi identificada como exclusivamente expressa na população BZR. Tais proteínas foram descritas em *T. brucei* e *Leishmania* spp. como envolvidas em eventos relacionados à divisão celular, tais como cariocinese, citocinese, duplicação e segregação de organelas (Shi *et al*, 2008). Os autores observaram que parasitos de *T. brucei* cujos genes da centrina foram silenciados apresentaram acúmulo de células anormais multinucleadas e/ou com ausência de núcleo. Shaha (2006) relatou que este silenciamento em parasitos do gênero *Leishmania* resultou em falha no crescimento e indução de apoptose. De acordo com o autor, recentes observações sugerem que a apoptose poderia ser usada pelos tripanossomatídeos para maximizar suas capacidades biológicas. Assim, além de eliminar células inaptas a serem transmitidas para um próximo hospedeiro, a apoptose também poderia auxiliar no controle do número de parasitos, evitando que a integridade do inseto ou do macrófago fosse colocada em risco. Se, como sugerido, a apoptose for uma via envolvida com a sobrevivência e propagação das espécies de tripanossomatídeos, a elucidação desses eventos moleculares seria útil para identificar alvos farmacológicos potenciais para o controle das doenças transmitidas por esses protozoários. Além disso, o aumento dos níveis de expressão da centrina nos parasitos com o fenótipo de resistência poderia explicar a maior produtividade na cultura de tecidos observada para essa população.

As glutamato desidrogenases (GluDH) são enzimas essenciais no metabolismo do nitrogênio e catalizam a deaminação reversível dependente de NADP- e/ou NAD- de L-glutamato a alfa-oxoglutarato. Esta enzima foi identificada como exclusivamente expressa na população BZS. Em concordância com o resultado, Murta e *cols.* (2008) verificaram a redução nos níveis de mRNA do gene TcGluDH em populações de epimastigotas resistentes ao benzonidazol. Ferraz e *cols.* (2009) verificaram que os níveis de expressão da proteína estavam reduzidos nas populações naturalmente resistentes e com resistência induzida *in vitro* ao benzonidazol. Zuniga e *cols* citado por Ferraz e *cols.* (2009) verificaram que anticorpos da classe IgM de pacientes chagásicos reconhecem com especificidade a

GluDH. Dessa forma, os autores sugerem que a enzima seria um antígeno candidato a testes diagnósticos e vacinas.

Algumas das proteínas identificadas no presente estudo, tais como as enzimas da via antioxidante e a glutamato desidrogenase, já foram consideradas como alvos potenciais de drogas por outros autores, principalmente por fazerem parte de vias essenciais no parasito, por apresentarem diferenças significativas com as proteínas da mesma via em humanos e por terem sido indicadas em estudos de genômica e transcriptômica como tendo expressão diferencial entre populações que exibiam um fenótipo de resistência ou susceptibilidade a drogas. Em alguns destes estudos foi verificada uma expressão diferencial em níveis protéicos entre populações que exibiam um fenótipo de resistência e susceptibilidade a drogas; o que ocorreu para cepas do parasito com resistência induzida *in vitro* (Nogueira *et al*, 2006; Nogueira *et al*, 2009b; Ferraz *et al*, 2009). De acordo com Villareal e cols (2005), os mecanismos envolvidos na sensibilidade natural a drogas devem ser diferentes daqueles envolvidos na quimioresistência induzida, motivo pelo qual alguns resultados obtidos com cepas com resistência induzida *in vitro* se diferem daqueles obtidos com cepas naturalmente resistentes e/ou com resistência selecionada *in vivo*. Outras proteínas detectadas neste estudo, tais como a centrina, a fosfatase de resíduos de serina/treonina e outras que foram identificadas isoladamente em um *spot*, ainda não foram alvos de estudos de expressão diferencial no *T. cruzi*. No entanto, por terem sido indicadas como diferencialmente expressas entre as populações BZR e BZS, tais proteínas devem ser alvos de estudos futuros, a fim de que o perfil de expressão encontrado seja confirmado para estas populações e avaliado em outras. De uma maneira geral, proteínas superexpressas ou que apresentam uma diminuição da expressão em populações de parasitos resistentes a drogas podem se constituir como alvos para o desenho de inibidores, caso sejam essenciais para a sobrevivência do parasito e apresentem diferenças significativas com a enzima em humanos. Já as proteínas envolvidas direta ou indiretamente com o metabolismo da droga no parasito e/ou com a atenuação de seus efeitos, além de possíveis alvos, podem auxiliar no entendimento das bases moleculares envolvidas no mecanismo de resistência a drogas. Dentre as proteínas identificadas, as enzimas da via antioxidante se enquadram nesta categoria.

7 CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada para obtenção de formas amastigotas das populações BZR e BZS de *T. cruzi*, através da exposição de formas tripomastigotas ao pH ácido, mostrou-se satisfatória e permitiu obter parasitos com qualidade e quantidade suficientes para serem utilizados nos experimentos de eletroforese bidimensional.
- A proteômica demonstrou ser uma ferramenta adequada para este estudo, permitindo que fosse realizada uma análise comparativa de expressão diferencial de proteínas entre parasitos das populações BZR e BZS, na forma amastigota.
- A busca por proteínas diferencialmente expressas entre as populações BZR e BZS de *T. cruzi*, na forma amastigota, possibilitou identificar proteínas pertencentes a diferentes categorias funcionais, tais como: espermidina sintase, fosfatase de resíduos de serina/treonina, centrina e glutamato desidrogenase. Estas devem se tornar alvos de estudos que serão realizados futuramente pelo nosso grupo.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1

Lista de peptídeos utilizados pelo programa MASCOT na identificação das proteínas da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* separadas na faixa de pH 3-10NL.

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	Sequência dos peptídeos identificados
2	<i>beta tubulin</i> <i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A R.AVLIDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M)
3	<i>beta tubulin</i>	K.FELSGIPPAPR.G R.NSLESVAYSLR.N
5	<i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	K.FELSGIPPAPR.G R.NSLESVAYSLR.N
6	<i>hypothetical protein</i>	R.LAPPYILFDEK.K R.LAPPYILFDEKK.A R.GADPVNEELTVLSEK.Y
7	<i>proteasome beta 3 subunit</i>	R.FRNELYK.L R.DSLSGYGAVAAIVTR.D
8	<i>alpha tubulin</i> <i>beta tubulin</i>	K.YMACCLMYR.G + 2 Carbamidomethyl (C) K.YMACCLMYR.G + 2 Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) R.TIQFVDWSPTGFK.C R.YLTASALFR.G R.VGEQFTAMFR.R R.VGEQFTAMFR.R + Oxidation (M)

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
9	<i>beta tubulin</i>	K.LREEYPDR.I K.LAVNLVPFPR.L R.FPGQLNSDLR.K R.FPGQLNSDLR.K R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A R.AVLIDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) K.LREEYPDR.I
10	<i>beta tubulin</i>	K.LAVNLVPFPR.L R.FPGQLNSDLR.K R.KLAVNLVPFPR.L R.FPGQLNSDLRK.L R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A R.AVLIDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M)
11	<i>hypothetical protein</i>	K.LVQHNEAR.R K.GQPEDLYVR.L R.SETLNLALLR.H R.LDDEESEVFLQIQR.R
12	<i>heat shock protein 85</i>	K.AELVNNLGTIAR.S K.RAPFDMFEPK.K K.DVTKEEYAAFYK.A K.AISNDWEEPLSTK.H R.YQSLTNQAVLGDESHLR.I
13	<i>beta tubulin</i>	R.INVYFDEATGGR.Y

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
13	<i>heat shock protein</i>	R.RVELTVTPR.L K.MEHITTEELR.A K.NELESYILDNRPR.I R.DKKNELESYILDNRPR.I
14	<i>beta tubulin</i>	R.YLTASALFR.G K.LAVNLVPFPR.L R.FPGQLNSDLR.K R.VGEQFTAMFR.R R.FPGQLNSDLRK.L R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A K.YPAFVIAR.G
18	<i>protein disulfide isomerase</i>	R.AVGVILQSVAEQSR.K R.AAVQEGIVPGGGVALLR.A
18	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	R.VVQAFQYVDK.N R.HITVNDLPVGR.N R.DYGVLIIEEQGISLR.G
19	<i>peroxiredoxin</i>	R.VVQAFQYVDK.N R.HITVNDLPVGR.N R.DYGVLIIEEQGISLR.G
19	<i>heat shock protein 85</i>	K.HKPLWTR.D K.RAPFDMFEPK.K K.HFSVEGQLEFR.A K.DVTKEEYAAFYK.A R.IVLHLKEDQQEYLEER.R
20	<i>heat shock protein 85</i>	K.HFSVEGQLEFR.A
20	<i>alpha tubulin</i>	K.EIVDLCLDR.I + Carbamidomethyl (C) R.QLFHPEQLISGK.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QLFHPEQLISGK.E R.AVFLDLEPTVVDEIR.T

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	Sequência dos peptídeos identificados
20		R.QLFHPEQLISGKEDAANNYAR.G
22	<i>beta tubulin</i>	K.LAVNLVPFPR.L R.FPGQLNSDLR.K R.KLAVNLVPFPR.L R.FPGQLNSDLR.K.L R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A
	<i>heat shock protein 85</i>	K.FYEQFGK.N K.LETSPFIEQAR.R K.KLETSPFIEQAR.R K.KKLETSPFIEQAR.R
24	<i>heat shock protein 85</i>	K.HKPLWTR.D K.AELVNNLGTIAR.S K.HFSVEGQLEFR.A K.DVTKEEYAAFYK.A R.YQSLTNQAVLGDESHLR.I
25	<i>alpha tubulin</i>	K.YMACCLMYR.G + 2 Carbamidomethyl (C) K.YMACCLMYR.G + 2 Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) R.QLFHPEQLISGK.E R.LIGQVVSALTASLR.F R.AVFLDLEPTVVDEIR.T R.IHFVLTSYAPVISAEEK.A R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I + Carbamidomethyl (C) R.QLFHPEQLISGKEDAANNYAR.G
26	<i>heat shock protein 85</i>	K.FYEQFGK.N K.LGIHEDSANR.K K.AELVNNLGTIAR.S K.KLETSPFIEQAR.R R.GVVDEDLPLNISR.E R.YQSLTNQAVLGDESHLR.I

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
26		K.AELVNNLGTIAR.S K.RAPFDMFEPSK.K K.HFSVEGQLEFR.A R.IVLHLKEDQQEYLEER.R
27	<i>seryl-tRNA synthetase</i> <i>25 kDa translation elongation factor 1-beta</i>	R.TSEEFCESLGLPYR.T + Carbamidomethyl (C) R.ELVSCSNCTDYQAR.G + 2 Carbamidomethyl (C) K.LVPVAFGVK.K K.LFNELLGAENTSLYR.W
28	<i>alpha tubulin</i> <i>alpha tubulin</i>	K.EIVDLCLDR.I + Carbamidomethyl (C) R.QLFHPEQLISGK.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QLFHPEQLISGK.E R.LIGQVVSALTASLR.F R.AVFLDLEPTVVDEIR.T K.TIGVEDDAFNTEFFSETGAGK.H R.FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR.I R.AVFLDLEPTVVDEIR.T
29	<i>spermidine synthase</i>	K.QHFPQISR.S + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.VEDGLAFVR.Q K.QHFPQISR.S R.VLIIGGGDGGVLR.E M.PGSELISGGWFR.E K.FQHLTIFESDPK.G
30	<i>beta tubulin</i>	R.YLTASALFR.G K.LAVNLVPFPR.L R.FPGQLNSDLR.K R.FPGQLNSDLRK.L R.INVYFDEATGGR.Y

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
31	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	K.DAGTIAGLN VIR.V K.YVSDAEKENVR.T K.EISEVVLVGGMTR.M K.EISEVVLVGGMTR.M + Oxidation (M) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C) R.KVSNAVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C)
32	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	K.DAGTIAGLN VIR.V K.EISEVVLVGGMTR.M K.EISEVVLVGGMTR.M + Oxidation (M) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C)
33	<i>heat shock protein 70</i>	R.AVHDVVLVGGSTR.I R.LVSHLTDEFKR.K K.GDDKPVIQVQFR.G R.TTPSYVAFTDTER.L R.ARFEELCGDLFR.G + Carbamidomethyl (C) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q K.KAVVTVPAYFNDSQR.Q K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G + Carbamidomethyl (C)
34	<i>alpha tubulin</i>	K.EIVDLCLDR.I + Carbamidomethyl (C) R.QLFHPEQLISGK.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QLFHPEQLISGK.E R.AVFLDLEPTVVDEIR.T K.TIGVEDDAFNFFSETGAGK.H R.QLFHPEQLISGKEDAANNYAR.G
36	<i>alpha tubulin</i>	R.AVFLDLEPTVVDEIR.T
	<i>3,2-trans-enoyl-CoA isomerase ou 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor</i>	R.FMAIPQQSR.W R.FMAIPQQSR.W + Oxidation (M) R.IGLVDAVVEEQRLR.E R.MLQLGETPTADEALR.I

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
36		R.MLQLGETPTADEALR.I + Oxidation (M)
	<i>alpha tubulin</i>	R.AVFLDLEPTVVDEIR.T
37	<i>hypothetical protein</i>	R.KTFVLQNAIASR.A R.TAELQDSANVITR.Q
		R.GLIDGETSDYNR.E R.AVGVILQSVAEQSR.K R.YVNMFEAGIIDPAR.V
38	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	R.AAVQEIVPGGGVALLR.A K.ALDSLLGDSSLTADQR.T K.VLENNDVTVGYDAQR.D K.VSSIHTILPALNHVVR.T
		R.LHVLYDGR.D R.YLHGAFSQPGR.T R.AFEEEDFDKFN.R.V
39	<i>2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase</i>	R.YDGD LGIPNNFLVPPR.L K.AIGPIEDGDAVLCFNFR.G + Carbamidomethyl (C) R.SGKLDEEHETFFEIPSDR.V
		K.GDDKPVIQVQFR.G R.TTPSYVAFTDTER.L
40	<i>heat shock protein 70</i>	R.ARFEELCGDLFR.G + Carbamidomethyl (C) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q K.KAVVTVPAYFNDSQR.Q K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G + Carbamidomethyl (C) R.IINEPTAAAIAVGLDKVEDGKER.N K.SQIFSTYADNQPVGHIQVFEGER.A

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
41	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	K.QFFGRDPFR.G K.DAGTIAGLNVIR.V K.EISEVVLVGGMTR.M K.EISEVVLVGGMTR.M + Oxidation (M) R.RFEDSNIQHDIK.N R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C) R.KVSNAVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C)
44	<i>co-chaperone GrpE</i>	R.ILRAPQVGVAGEGE.- K.TPASSEFPSPGHISIVLK.V
	<i>tryparedoxin peroxidase</i>	R.QITVNDLPVGR.D + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QITVNDLPVGR.D K.SYGVLKEEDGVAYR.G K.HGEVCPANWKPGDK.A + Carbamidomethyl (C)
45	<i>glutamate dehydrogenase</i>	K.GLGLQYYAGK.R R.LSWTAEVEEQK.L R.GCVHDAEGFTPEK.L + Carbamidomethyl (C)
47	<i>enolase</i>	K.AGSFNEALR.M K.AQVVGDDLTVTNVSR.I K.HAGNALPFQEFMIAPVK.A + Oxidation (M)
	<i>succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit β</i>	K.LSFDDNAEFR.Q R.ILQESGLPLHPAR.N
48	<i>aromatic L-alpha-hydroxyacid dehydrogenase</i>	K.NAAIFSEHGR.L R.AELMDCAFPLDR.V + Carbamidomethyl (C) R.AELMDCAFPLDR.V + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) K.VVVSGAAGQVGYALLPLIAGGR.M K.NCIWGNHSGTQVPDVNSATVR.G + Carbamidomethyl (C)
	<i>activated protein kinase C receptor</i>	R.GAHTDWWSCVR.F + Carbamidomethyl (C) K.DVLSVTFSPDNR.Q

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
49	<i>40 kDa cyclophilin</i>	K.LGQWSEAR.N K.ILLELFDDITPK.T R.IIAGFMIQGGDFTK.H + Oxidation (M) K.LIACYNNTAACAIK.L + 2 Carbamidomethyl (C)
50	<i>enolase</i> <i>TC38</i> <i>phosphoglycerate kinase</i>	K.AGSFNEALR.M K.AQVVGDDLTVTNVSR.I K.YYVLEIDR.I K.GGSSLSFADVVR.R R.IVEESVNLPPR.T K.LSPGGVVLLENVR.F K.VLGSPARPLVAIVGGAK.V
51	<i>enolase</i>	K.AGSFNEALR.M K.AQVVGDDLTVTNVSR.I K.INQIGTITEAIEASK.F R.SAVPSGASTGIHEACELR.D + Carbamidomethyl (C) K.HAGNALPFQEFMIAPVK.A K.HAGNALPFQEFMIAPVK.A + Oxidation (M)
52	<i>enolase</i>	K.AGSFNEALR.M K.AQVVGDDLTVTNVSR.I K.INQIGTITEAIEASK.F R.SAVPSGASTGIHEACELR.D + Carbamidomethyl (C) K.HAGNALPFQEFMIAPVK.A K.HAGNALPFQEFMIAPVK.A + Oxidation (M) R.FAICMDSAASETYDENKK.Q + Carbamidomethyl (C)
53	<i>trypanothione reductase</i>	K.SYEEMFR.D K.DGQVTLCYR.G + Carbamidomethyl (C) R.ESAGFGWEFDR.T R.TNVSNIYAIGDVTNR.V

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
54	<i>stress-induced protein sti1</i>	R.RGHAFWTK.Q K.INTLISAGIIR.F R.RYEEAAAAYNK.G K.LGAYSQALADAEK.C K.LSLFLLQPDYVR.M K.SDKFPEAVEAYTEAIKR.N R.SACHAALHQYPNALQDAEK.C + Carbamidomethyl (C)
55	<i>isocitrate dehydrogenase</i>	K.AGIWYEHR.L K.SEGGYVWACK.N + Carbamidomethyl (C) R.TVEEAAHGTVTR.H R.SDYLNTQEFIHK.L K.GEETSTNPVASIFAWTR.G
	<i>tryparedoxin peroxidase</i>	K.SYGVLKEEDGVAYR.G
	<i>iron superoxide dismutase A</i>	K.DGCAPVFSR.Q + Carbamidomethyl (C)
56	<i>proteasome activator protein PA26</i>	K.AQAGVFSR.E K.SPSVLELR.Q R.IYYDAEVIR.T R.WATNLVSQVAK.I R.DAFPEEESCGVVER.W + Carbamidomethyl (C)
57	<i>mitochondrial malate dehydrogenase ou malate dehydrogenase</i>	R.LFGVTTLDLVR.A R.DDLFNTNASIVR.D K.ALDGAELVLIPAGVPR.K K.NNPLVSALSCYDLR.G + Carbamidomethyl (C) R.GAPGVAADLSHICSPAK.V + Carbamidomethyl (C)
58	<i>protein kinase</i>	K.LADFDQAK.I K.LAHENIIR.Y R.NVAERPDAATLLK.-
	<i>RNA-binding protein</i>	R.SQQVNEFGR.K R.ETFQQVGNVER.A

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
61	<i>succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor</i>	R.NFNVPVGCGR.T + Carbamidomethyl (C) K.GPGGAMDLVASGTR.V K.ITGAQFLACDVK.T + Carbamidomethyl (C)
63	<i>carnitine/choline acetyltransferase</i>	R.LPIPSIQQAER.Y R.EVWAGAYAEVLR.T R.APLPVNTNPAILIK.K R.HIIVLHDGHLAVR.V K.WVLSTSNVSPWVER.F K.LAPTYEAATTSCFFHGR.T + Carbamidomethyl (C)
69	<i>seryl-tRNA synthetase</i>	R.TFGDVKR.A M.GLDVQLFR.D K.LNHVTIMER.L M.GLDVQLFRDEK.G K.EADGDTSDIPESIR.A
70	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i> <i>protein disulfide isomerase</i>	K.AIFGQPEIR.I R.IGTIPGAGGTQR.L K.ALETTLAQGMAYEQR.T
	<i>enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor</i>	R.SLEELVEYVNER.T K.AAADLTGVEAVHYPR.I K.KAADLTGVEAVHYPR.I
71	<i>aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	K.AIFGQPEIR.I R.IGTIPGAGGTQR.L K.ALETTLAQGMAYEQR.T K.NFGLYGLR.C R.VLSQYALLIR.T R.VASCHTLGGTGALR.I + Carbamidomethyl (C) R.DDANRPFVLESVK.R R.DDANRPFVLESVKR.S K.ELGECGSVLDWSHIER.Q + Carbamidomethyl (C)

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
73	<i>hypothetical protein</i> <i>universal minicircle sequence binding protein (UMSBP)</i>	K.FSVDVEYAPR.C R.YAHAGYALAVR.T R.ECPNRPAGGFR.G + Carbamidomethyl (C) R.ACYNCGQPGHLSR.E + 2 Carbamidomethyl (C) R.GACYHCQQEGHLAR.D + 2 Carbamidomethyl (C)
74	<i>hypothetical protein</i>	R.FLAGEEER.Y K.YAVEYVAR.E K.LLGDVVVICGR.T + Carbamidomethyl (C) R.QMFFCAAGGSR.T + Carbamidomethyl (C) K.GTLTACNAGLALER.A + Carbamidomethyl (C) R.HTPGGGGAGGMSGFFR.F R.HTPGGGGAGGMSGFFR.F + Oxidation (M) K.DGGSEPLTTPFTGDDLER.L
75	<i>hypothetical protein</i> <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	K.FSVDVEYAPR.C R.YAHAGYALAVR.T K.CPHHVLVGAEVVCGR.G + 2 Carbamidomethyl (C) K.TVDGVSVDWR.G R.DTSIQEIDAALKR.A R.VPTPDVSVVDTFTAAR.D K.IVSWYDNEWGYSHR.V
76	<i>hypothetical protein</i> <i>RNA-binding protein</i>	K.FSVDVEYAPR.C R.YAHAGYALAVR.T R.QTGYAEIDGR.R + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QTGYAEIDGR.R K.SAQQLVDFFR.Q R.YSNHQELTATQHTSK.T

8.2 Anexo 2

Lista de peptídeos utilizados pelo programa MASCOT na identificação das proteínas da forma amastigota das populações BZR e BZS de *Trypanosoma cruzi* separadas na faixa de pH 4-7.

Spot	Proteína	Sequência dos peptídeos identificados
	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	K.VLENNDTVGYDAQR.D
1	<i>beta tubulin</i>	K.LREEYPDR.I R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A R.AVLIDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) R.EIVCVQAGQCGNQIGSK.F + 2 Carbamidomethyl (C)
2	<i>Centrin</i>	K.GLFGDLPR.D K.AFQLFDLKK.G K.GLFGDLPRDEVER.M R.TMSTDSNGLIGYGEFER.V R.TMSTDSNGLIGYGEFER.V + Oxidation (M)
3	<i>beta tubulin</i>	R.INVYFDEATGGR.Y
4	<i>hypothetical protein</i>	K.FTENTISITGK.G K.VLGVAIQCAVK.K + Carbamidomethyl (C) K.ASEPHGLNDKITLLK.E
5	<i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	R.NSLESVAYSLR.N K.VYQSGGGADGDERPEPMDDL.- + Oxidation (M)
6	<i>hypothetical protein</i>	K.FTENTISITGK.G K.ASEPHGLNDKITLLK.E
7	<i>hypothetical protein</i>	K.ASEPHGLNDK.I K.FTENTISITGK.G K.ASEPHGLNDKITLLK.E
8	<i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	K.FELSGIPPAPR.G R.NSLESVAYSLR.N

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
8	<i>beta tubulin</i>	K.VYQSGGGADGDERPEPMDDL.- + Oxidation (M) K.LREEYPDR.I R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A
11	<i>calreticulin</i>	R.QIPNPAYK.G + Gln->pyro-Glu (N-term Q) K.GQLDGDWTLLPPR.E K.AKGQLDGDWTLLPPR.E
12	<i>calreticulin</i>	K.GQLDGDWTLLPPR.E
13	<i>calreticulin</i>	R.QIPNPAYK.G + Gln->pyro-Glu (N-term Q) K.GQLDGDWTLLPPR.E K.AKGQLDGDWTLLPPR.E
16	<i>alpha tubulin</i>	R.IDHKFDLMYSK.R R.TIQFVDWSPTGFK.C R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I + Carbamidomethyl (C) R.AVCMIANSTAIAEVFAR.I + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) R.IDHKFDLMYSKR.A R.IDHKFDLMYSKR.A + Oxidation (M) K.RTIQFVDWSPTGFK.C K.CGINYQPPTVVPGGDLAK.V + Carbamidomethyl (C)
	<i>beta tubulin</i>	R.INVYFDEATGGR.Y
17	<i>translation elongation factor 1-beta</i>	R.LSSQPYVSGYCPSEQEDAK.I + Carbamidomethyl (C)
	<i>hypothetical protein</i>	R.LYWQEPAK.V K.LMDQSLPVYDDVVTGSGR.L + Oxidation (M) K.AYPVQPHSLNELQQPPDTWR.K
18	<i>heat shock protein 70</i>	R.NQIVITNDKGR.L K.NGLENYAFSMK.N + Oxidation (M)

Spot	Proteína	Sequência dos peptídeos identificados
19	<i>beta tubulin</i>	K.LREEYPDR.I R.FPGQLNSDLR.K R.FPGQLNSDLRK.L R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A R.AVLIDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) K.GHYTEGAEIIDSVDVCR.K + Carbamidomethyl (C) K.GHYTEGAEIIDSVDVCRK.E + Carbamidomethyl (C)
20	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i> <i>beta tubulin</i> <i>nascent polypeptide associated complex subunit</i>	R.YVNMFEAGIIDPAR.V R.AAVQEGIVPGGGVALLR.A K.ALDSLLGDSSLTADQR.T K.VLENNDVTVGYDAQR.D R.INVYFDEATGGR.Y R.AVSGVVPETEPR.V K.HGSLSFVNQPELYR.F R.KHGSLSFVNQPELYR.F
22	<i>heat shock protein 70</i>	R.DFFGGKEPNR.G K.FELSGIPPAPR.G R.NSLESVAYSLR.N R.LLGKFELSGIPPAPR.G K.VYQSGGGADGDERPEPMDDL.- + Oxidation (M) K.SQVFSTYQDNQPGVLIQVYEGER.Q R.GINPDEAVAYGAAVQAAVLTGESEVGGR.V
23	<i>beta tubulin</i> <i>calreticulin</i>	R.INVYFDEATGGR.Y K.YWLMFGPDR.C K.GQLDGDWTLLPPR.E K.LLPSMDPEKFGHGETK.Y + Oxidation (M)
24	<i>calreticulin</i>	K.GQLDGDWTLLPPR.E K.LLPSMDPEKFGHGETK.Y + Oxidation (M)

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
25	<i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	R.DFFGGKEPNR.G K.FELSGIPPAPR.G R.NSLESVAYSLR.N K.SDIHEIVLVGGSTR.V R.LLGKFELSGIPPAPR.G K.KSDIHEIVLVGGSTR.V R.VEVDLSTEGDFDFSEK.I R.GINPDEAVAYGAAVQAAVLGSEVGGGR.V
26	<i>heat shock protein 85</i>	K.HKPLWTR.D K.AELVNNLGTIAR.S K.EDQQEYLEER.R K.HFSVEGQLEFR.A K.DVTKEEYAAFYK.A K.VKEVTQEFVVQNK.H R.YQSLTNQAVLGDESHLR.I R.IVLHLKEDQQEYLEER.R
27	<i>calreticulin</i>	K.YWLMFGPDR.C + Oxidation (M) K.GQLDGDWTLPPR.E K.LLPSMDPEKFHGETK.Y + Oxidation (M)
28	<i>beta tubulin</i>	R.YLTASALFR.G K.LAVNLVPPFR.L R.FPGQLNSDLR.K R.VGEQFTAMFR.R R.FPGQLNSDLRK.L R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A K.GHYTEGAEIIDSVLVDCR.K + Carbamidomethyl (C)
29	<i>heat shock protein</i>	R.RVELTVTPR.L K.MEHITEEELR.A K.MEHITEEELR.A + Oxidation (M)

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
29		K.NELESYILDNRPR.I R.IADGGILAEYVTK.E R.DKKNELESYILDNRPR.I K.QVNVTSVNAVVKRPAPPKPK.E
30	<i>alpha tubulin</i>	R.QLFHPEQLISGK.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QLFHPEQLISGK.E R.AVFLDLEPTVVDEIR.T R.QLFHPEQLISGKEDAANNYAR.G
	<i>serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit</i>	R.KHEFDLIVR.A R.GVSYTFGQDIVEK.F
31	<i>beta tubulin</i>	R.FPGQLNSDLR.K R.KLAVNLVPPFR.L R.FPGQLNSDLRK.L R.INVYFDEATGGR.Y R.AVLIDLEPGTMDSVR.A K.GHYTEGAEIIDSVLVCR.K + Carbamidomethyl (C) R.AGPYQQIFRPDNFIFGQSGAGNNWAK.G
32	<i>heat shock protein 85</i>	K.HKPLWTR.D K.AELVNNLGTIAR.S K.RAPFDMFEPK.K K.HFSVEGQLEFR.A K.DVTKEEYAAFYK.A R.YQSLTNQAVLGDESHLR.I R.IVLHLKEDQQEYLEER.R
33	<i>heat shock protein 70 ou glucose regulated protein 78</i>	R.DFFGGKEPNR.G K.FELSGIPPAPR.G R.NSLESVAYSLR.N K.SDIHEIVLVGGSTR.V R.LLGKFEISGIPPAPR.G K.KSDIHEIVLVGGSTR.V

Spot	Proteína	Sequência dos peptídeos identificados
34	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	R.GLIDGETSDYNR.E R.GYISPYFVTDAAK.A R.AVGVILQSVAEQSR.K R.YVNMFEAGIIDPAR.V R.AAVQEGIVPGGGVALLR.A K.ALDSLLGDSSLTADQR.T K.VLENNDVTVGYDAQR.D
36	<i>beta tubulin</i> <i>enolase</i>	K.LAVNLVPFPR.L K.AQVVGDDLTVTNVSRI K.INQIGTITEAIEASK.F R.FAICMDSAASETYDENKK.Q + Carbamidomethyl (C); Oxidation (M)
37	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i> <i>succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit β</i>	R.AAVQEGIVPGGGVALLR.A K.VLENNDVTVGYDAQR.D K.LSFDDNAEFR.Q R.CDIIAEGIVAASR.E + Carbamidomethyl (C) R.ILQESGLPLHPAR.N R.INVQEGISHDNCVAFKA.E + Carbamidomethyl (C)
38	<i>heat shock protein 85</i>	K.HKPLWTR.D K.RAPFDMFEPSK.K K.HFSVEGQLEFR.A K.DVTKEEYAAFYK.A K.VKEVTQEFVVQNK.H
39	<i>heat shock protein 85</i>	K.HKPLWTR.D K.AELVNNLGTIAR.S K.RAPFDMFEPSK.K K.HFSVEGQLEFR.A K.DVTKEEYAAFYK.A R.YQSLTNQAVLGDESHLR.I R.IVLHLKEDQQEYLEER.R

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
40	<i>heat shock protein 85</i> <i>DNAK protein</i>	R.YQSLTNQAVLGDESHLR.I R.NAVENYTFSLR.A K.SQTFSTNADNQR.N K.MVHEAEQFANEDR.L R.ATLSEPDVETGITLED.R.Q
41	<i>Trans-sialidase</i>	R.LWTSEPNPR.G K.WNAHTVFDR.E K.LLIVVSCTGGR.K + Carbamidomethyl (C) K.ANALYLWVTDNSR.A K.WNAHTVFDRETPK.D R.LLHSNNMLYLLHER.R + Oxidation (M) K.QLGLHHVSGAGGSGIVLER.G + Gln->pyro-Glu (N-term Q) K.QLGLHHVSGAGGSGIVLER.G
42	<i>hypothetical protein</i>	R.ARQDSVFR.F K.KLELLFEQR.Q R.KKLELLFEQR.Q R.SNMFAEQGTIYR.E + Oxidation (M) K.FLQTETESQANQTR.I
43	<i>Trans-sialidase</i>	R.LWTSEPNPR.G K.WNAHTVFDR.E K.LLIVVSCTGGR.K + Carbamidomethyl (C) K.ANALYLWVTDNSR.A R.LLHSNNMLYLLHER.R + Oxidation (M) K.QLGLHHVSGAGGSGIVLER.G + Gln->pyro-Glu (N-term Q) K.QLGLHHVSGAGGSGIVLER.G
44	<i>hypothetical protein</i>	K.ATHKFFV.R.A K.LCGSNANVHDYDK.A + Carbamidomethyl (C) K.LNDVLPGACTTTNTGK.V + Carbamidomethyl (C) K.LCGSNANVHDYDKATHK.F + Carbamidomethyl (C)

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
44	<i>hypothetical protein</i>	R.VISIAEEAPLTAVLR.F
45	<i>hslvu complex proteolytic subunit-like</i>	R.LEASLIVCGR.E + Carbamidomethyl (C) K.VGEFPQQLTR.A
	<i>heat shock protein 70</i>	R.RLEASLIVCGR.E + Carbamidomethyl (C) R.ALIDVDGYDAEK.I K.LENKVGEFPQQLTR.A
46	<i>25 kDa translation elongation factor 1-beta</i>	R.TTPSYVAFTDTER.L K.LVPVAFGVK.K K.HMASFTEAER.K K.LFNELLGAENTSLYR.W
	<i>hypothetical protein</i>	R.DSTGPLQQVDYYVR.N
47	<i>alpha tubulin</i>	K.EIVDLCLDR.I + Carbamidomethyl (C) R.QLFHPEQLISGK.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) R.QLFHPEQLISGK.E R.LIGQVVSALTASLR.F R.NLDIERPTYTNLNR.L K.TIGVEDDAFNTEFFSETGAGK.H R.QLFHPEQLISGKEDAANNYAR.G
48	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	K.QFFGRDPFR.G K.DAGTIAGLNVR.V K.EISEVVLVGGMTR.M R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G
	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C) R.KVSNVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C) R.AVGVILQSVAEQSR.K R.AAVQEGIVPGGGVALLR.A

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Sequência dos peptídeos identificados</i>
50	<i>alpha tubulin</i> <i>succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta</i>	K.EIVDLCLDR.I + Carbamidomethyl (C) R.QLFHPEQLISGK.E R.NLDIERPTYTNLNR.L R.IHFVLTSYAPVISAEEK.A R.QLFHPEQLISGKEDAANNYAR.G K.LSFDDNAEFR.Q R.ILQESGLPLHPAR.N
51	<i>hypothetical protein</i>	K.SILSLEVR.L R.KTFVLQNAIASR.A R.TAELQDSANVITR.Q
52	<i>vacuolar ATP synthase subunit B</i>	R.DIQGIPINPR.A K.FICQGFYESR.D + Carbamidomethyl (C) R.AVNGPLVILGDVR.L R.QLYPPINILPSLSR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) K.TVLFMNLANDPTIER.I K.AIQSGYSVKPHLEYTTIR.A K.IPLFSGAGLPHNEIAAQIVR.Q
53	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase precursor</i> <i>seryl-tRNA synthetase</i>	K.NWHAEGAAPSR.A R.ANILVPEANSSWQGDVIR.Q K.LTPAVNENYTDIPVSNMR.A R.AEEPSAAAASPSTGPAAPIPTSPSTSGGR.V R.TSEEFCESLGLPYR.T + Carbamidomethyl (C) R.ELVSCSNCTDYQAR.G + 2 Carbamidomethyl (C)
54	<i>heat shock protein 70</i>	K.DAGTIAGMEVLR.I R.LVSHLTDEFKR.K K.GDDKPVIQVQFR.G R.TTPSYVAFTDTER.L K.AVVTVPAYFNDSQR.Q

Spot	Proteína	Sequência dos peptídeos identificados
54		K.KAVVTPAYFNDSQR.Q R.IINEPTAAAIAYGLDKVEDGKER.N
	<i>heat shock protein70, mitochondrial precursor</i>	K.DAGTIAGLN VIR.V K.YVSDAEKENVR.T K.EISEVVLVGGMTR.M K.EISEVVLVGGMTR.M + Oxidation (M) R.RFEDSNIQHDIK.N
56		K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C) R.KVSNVVTCPAYFNDAQR.Q + Carbamidomethyl (C)
	<i>2,3-bisfosfoglicerato-independente fosfoglicerato mutase</i>	R.YLHGAFSQPGR.T
	<i>dihydrolipoamide acetyltransferase precursor</i>	R.ANILVPEANSSWQGDVIR.Q
57		M.GLDVQLFR.D M.GLDVQLFRDEK.G R.TSEEFCESLGLPYR.T + Carbamidomethyl (C) R.ELVSCSNCTDYQAR.G + 2 Carbamidomethyl (C) K.YLIATSEMPIAAYHR.G
	<i>seryl-tRNA synthetase</i>	
59		K.HDINCFINR.Q + Carbamidomethyl (C) R.FSGLPQGEACTIVVR.G + Carbamidomethyl (C) K.LLDQSIHPQTIIEGYR.L
	<i>T-complex protein 1, beta subunit</i>	
60		R.VLVGEVPSEASR.T R.LVTLSYKPKDETR.K K.ELPFYCPAVAEAIQR.V + Carbamidomethyl (C)
	<i>aminopeptidase</i>	

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 Oct;3(10):819-23.

Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(6):2357-67.

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

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

Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology*. 2006;112(1):132-3.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA: the Journal of the American Medical Association*. 2007 Nov 14;298(18):2171-81.

Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. *Current Opinion in Infectious Disease*. 2008 Oct;21(5):476-82.

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

Burchmore RJ, Barrett MP. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*. 2001 Oct;31(12):1311-20.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes and Infection*. 2003 Nov;5(13):1231-40.

Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2002;44(1):29-37.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Epidemiology & Risk Factors*. 2009 [cited: 2009 10]. Available from: URL: [http:// www.cdc.gov/chagas](http://www.cdc.gov/chagas).

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

Coura JR, De Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3-24.

Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonça-Lima L, González LJ, Betancourt L, Grimaldi G Jr, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2007 Jul;154(1):6-21.

De Carvalho TU, De Souza W. Separation of amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured cells. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1983;69(5):571-5.

De Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RW. *Parasitologia Humana*. 11ed. Atheneu, 2006. Cap11, p.85-90.

Dias JC. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006 Jul-Aug;39(4):370-5.

Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008 Mar-Apr;41(2):193-6.

Dobarro D, Gomez-Rubin C, Sanchez-Recalde A, Olias F, Bret-Zurita M, Cuesta-Lopez E, Robles-Marhuenda A, Fraile-Vicente JM, Paño-Pardo JR, Lopez-Sendon J. Chagas' heart disease in Europe: an emergent disease? *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown)*. 2008 Dec;9(12):1263-7.

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

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005;15:309(5733):409-15.

Ferraz, Marcela Lencine. Caracterização de potenciais alvos moleculares e teste de fármacos candidatos ao tratamento da doença de Chagas experimental. Orientação: Dr. Alvaro José Romanha. Belo Horizonte: sn, 2010. 1. 175 p. Tese (Doutorado em Ciências área de concentração Biologia Celular e Molecular)-Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_18.pdf. Acesso: 10 ago. 2009. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>.

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81:755-759.

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

Gallagher SR. Analysis of Proteins. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JG, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1995. Cap10, Unit 10.1.

Gamarro F, Osuna A, Castanys S, Pérez-López MI, Ruiz-Pérez LM. Isolation and purification of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured vero cells. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1985;71(1):15-7.

Garbis S, Lubec G, Fountoulakis M. Limitations of current proteomics technologies. *Journal of Chromatography. A*. 2005 Jun 3;1077(1):1-18.

González J, Cornejo A, Santos MR, Cordero EM, Gutiérrez B, Porcile P, Mortara RA, Sagua H, Da Silveira JF, Araya JE. A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is

involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. The Biochemical Journal. 2003 Sep 15;374(Pt 3):647-56.

Heby O, Persson L, Rentala M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. Amino Acids. 2007 Aug;33(2):359-66.

Huete-Pérez JA, Flores-Obando RE, Ghedin E, Caffrey CR. Genomic and proteomic approaches for Chagas' disease: critical analysis of diagnostic methods. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2005 Jul;5(4):521-30.

Magalhães AD, *et al.* Análise proteômica de *Trypanosoma cruzi*: construção de mapas bidimensionais em pH alcalina. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular. Acesso em: 10 ago. 2009. Disponível em: <http://bdt.d.bce.unb.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1126>

Magalhães AD, Charneau S, Paba J, Guércio RA, Teixeira AR, Santana JM, Sousa MV, Ricart CA. *Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. Proteome Science. 2008 Sep 8;6:24.

Manoel-Caetano F, Silva AE. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cadernos de Saúde Pública. 2007 Oct;23(10):2263-74.

Menezes D, Valentim C, Oliveira MF, Vannier-Santos MA. Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Research. 2006 Jan;98(2):99-105.

Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 2003 Sep;131(1):55-64.

Minning TA, Weatherly DB, Atwood J 3rd, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. BioMed Central Genomics. 2009 Aug 7;10:370.

Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:401-4.

Murta SMF, Romanha AJ. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 1998;116:165-171.

Murta SMF, Dos Santos WG, Anacleto C, Nirdé P, Moreira ESA, Romanha AJ. Drug resistance in *Trypanosoma cruzi* is not associated with amplification or overexpression of phosphoglycoprotein (PGP) genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001;117:223-228.

Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, *et al*. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with *in vitro*-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2006;146(2):151-62.

Murta SM, Nogueira FB, Dos Santos PF, Campos FM, Volpe C, Liarte DB, Nirdé P, Probst CM, Krieger MA, Goldenberg S, Romanha AJ. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Tropica*. 2008 Jul;107(1):59-65.

Navarro MC, De Lima AR, Askue J, Contreras VT. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003 Jan;98(1):83-91.

Nirdé P, Larroque C, Barnabé C. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *Comptes rendus de l' Académie des Sciences. Série III, Sciences de la vie*. 1995 Dec;318(12):1239-44.

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

Nogueira, Fernanda Barbosa. Estudo dos genes que codificam as proteínas antioxidantes em populações do *Trypanosoma cruzi* sensíveis e resistentes ao benzonidazol. Orientação: Dra. Silvane M. Fonseca Murta, Co-Orientação: Dr. Alvaro

José Romanha. Belo Horizonte: S.N, 2009a. 151p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde na área de concentração: Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/T_9.pdf. Acesso: 10 ago. 2009. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>.

Nogueira FB, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SM. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitology Research*. 2009b Mar;104(4):835-44. Epub 2008 Nov 19.

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

Palenchar JB, Bellofatto V. Gene transcription in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2006 Apr;146(2):135-41.

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

Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, Dallagiovanna B, Cayota A, Krieger M, Goldenberg S, Robello C. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007 Nov;42(11):1422-32.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999 Dec;20(18):3551-67.

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

Rego JV, Murta SM, Nirdé P, Nogueira FB, de Andrade HM, Romanha AJ. *Trypanosoma cruzi*: characterisation of the gene encoding tyrosine aminotransferase

in benzimidazole-resistant and susceptible populations. *Experimental Parasitology*. 2008 Jan;118(1):111-7.

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

Santos, Sara Lopes dos. Análise proteômica da forma tripomastigota de uma população de *Trypanosoma cruzi* susceptível e outra resistente ao benzonidazol. Orientação: Dr. Alvaro José Romanha, Co-Orientação: Dra. Rosiane da Silva Pereira. Belo Horizonte, 2008. xvii, 72p. Capa dura, 29cm., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde na área de concentração: Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Disponível em: <<http://netra.cpqrr.fiocruz.br/download/Dissertacao%20Sara%20Lopes%20dos%20Santos.pdf>>. Acesso: 10 ago. 2009. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*. 2006 Dec;22(12):583-8.

Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *The Indian Journal of Medical Research*. 2006 Mar;123(3):233-44.

Shi J, Franklin JB, Yelinek JT, Ebersberger I, Warren G, He CY. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in *T. brucei*. *Journal of Cell Science*. 2008 Sep 15;121(Pt 18):3062-70.

Silveira JF. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: Brener, Z., Andrade, ZA., Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro, 2000. Cap 8, p.127-147.

Sodré CL, Chapeaurouge AD, Kalume DE, de Mendonça Lima L, Perales J, Fernandes O. Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Archives of Microbiology*. 2009 Feb;191(2):177-84.

Souza RA, Henriques C, Alves-Ferreira M, Mendonça-Lima L, Degraive WM. Investigation of a protein expression profile by high-resolution bidimensional

electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Analytical Biochemistry. 2007 Jun 1;365(1):144-6.

Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. Postgraduate Medical Journal. 2006 Dec;82(974):788-98.

Teixeira SM. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1998 Dec;31(12):1503-16.

Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2006 Jul;39(7):907-14.

Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology. 1995 Jun;110 (Pt 5):547-54.

Urbina JA. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. Journal of Molecular Medicine. 1999 Mar;77(3):332-8.

Veenstra TD. Mass spectrometry: the foundation of proteomics. In: Veenstra TD, Yates JR. Proteomics for Biological Discovery. New Jersey, 2006. Cap1,p.1-18.

Villarreal D, Nirdé P, Hide M, Barnabé C, Tibayrenc M. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005;49:2701-9.

Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. Annals of Internal Medicine. 2006 May 16;144(10):724-34.

World Health Organization (WHO) / The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Chagas Disease: Distribution. 2003 [cited 2009 11]. Available from: URL: <http://www.who.int/tdroid/dw/chagas2003.htm>.

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America. 2008;105(13):5022-7.

Yamada-Ogatta SF, Motta MC, Toma HK, Monteiro-Goes V, Avila AR, Muniz BD, Nakamura C, Fragoso SP, Goldenberg S, Krieger MA. *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. *Acta Tropica*. 2004 Apr;90(2):171-9.

Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2006 Mar;78(1):87-111.