



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

**TESE DE DOUTORADO**

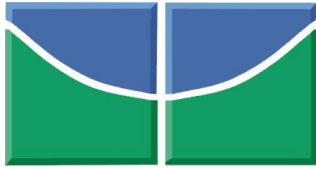
**Proteômica de *Trypanosoma cruzi*:  
variações em subproteomas  
durante a amastigogênese**

**Rayner Myr Lauterjung Queiroz**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart**

**Co-orientador: Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau**

**Brasília, Março de 2013**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA DE PROTEÍNAS

**Rayner Myr Lauterjung Queiroz**

**TESE DE DOUTORADO**

**Proteômica de *Trypanosoma cruzi*:  
variações em subproteomas durante a  
amastigogênese**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Patologia Molecular da Universidade de  
Brasília como requisito para obtenção do título de  
Doutor em Patologia Molecular

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

**Brasília, Março de 2013**

## *Agradecimentos*

Essa tese foi construída com os resultados obtidos no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP) e no Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro (LIPH), ambos da UnB, e *Protein Research Group* da Universidade do Sul da Dinamarca, em Odense, e foi fruto do apoio e colaboração de vários colaboradores e amigos os quais terão para sempre minha gratidão.

Primeiramente agradeço minha família, em especial meu pai Roger de Queiroz, pelo perene apoio e motivação, sem os quais não teria estrutura psicológica nem material para realizar qualquer coisa. Com o mesmo sentimento agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart e Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, que, mais que excelentes orientadores no campo científico, foram exemplo de tolerância e bom trato pessoal que guardarei para sempre comigo e sempre serão para mim os grandes amigos CA e Tião. Realmente posso afirmar que não tive simplesmente orientadores, mas sim um pai e um irmão mais velho.

Meu reconhecimento e gratidão também ao Prof. Dr. Peter Roepstorff por me receber em seu país e me inserir no *PR-group* como seu próprio doutorando e oferecendo todo suporte para a realização desse trabalho. Além de cientista de renome mundial, ele é um grande amigo e exemplo pela humildade, simplicidade e companheirismo desde para com o mais iniciante aluno ao mais renomado cientista. Não conheci a ninguém que houvesse se sentido diminuído ou desconfortável com a presença dele nem que não o admirasse primeiramente como pessoa e também como cientista.

As memórias desses quatro anos são felizes com a presença e companheirismo de grandes amigos como Adelson, Jaques e Alessandra que mesmo com minha personalidade difícil, jamais se indispuseram comigo. A eles minha gratidão, amizade e reconhecimento.

Agradeço a colaboração e amizade das "minhas estagiárias do LBQP" Priscila, Thaís, Mara, Siliana e Hialy pelo apoio e amizade, assim como agradeço aos "outros filhos do CA" Natália Milanezi, Thaís Carvalho, Rafael Guércio, Caroll, Diana, Samuel, Agenor, Agnelo "Navalhada", Nicolas pela amizade e momentos de descontração e, como eu, na hora do aperto também cantavam ou ainda cantam a oração "*o CA é meu orientador e nada nos faltará*".

Meu sincero reconhecimento e gratidão ao amigo Samuel Mandacarú que se prontificou a trabalhar várias semanas, às vezes também à noite, para preparar amostras para enviar para Dinamarca quando eu estraguei as que levei. Grande parte dessa tese existe somente devido ao apoio dele. Agradeço também a amizade e apoio da Micaella, Thuany, Rosa, Anne, Elaine, Aline, Marina, Carlos, Jéssica e demais membros do LBQP, assim como agradeço à Paula, Marta e demais membros do LIPH.

Agradeço as boas lembranças que grandes amigos como a Solange e o Hugo deixaram, especialmente nos nossos passeios pela Europa. Também lá estão pessoas dignas de reconhecimento como a Marcela Mogilska, Iuliana Nita, Elena Sokol, Gerda Hübner e meus grandes amigos Giuseppe Palmisano e Thiago Braga. Agradeço ao Veit Schwämmle pela amizade e análise estatística dos meus dados, à Ileana Leon, Marcela Braga, Gerard, Ahmed Mehadi, Prof. Dr. Martin Larsen, Melani Schulz e demais membros do *PR-group*.

Meu reconhecimento e gratidão aos técnicos Antônio Rufino e Nuno Manuel, de Brasília, e Lene Jakobsen, Sanah Shah e Kristina Egede Budtz, de Odense, cujo apoio e amizade são inestimáveis.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa.

## Resumo

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, uma enfermidade que afeta milhões de pessoas especialmente na América latina onde é endêmica. O parasito passa por diversos processos de diferenciação para adaptar-se a diferentes condições dentro dos seus hospedeiros mamíferos e triatomíneos. A respeito especialmente do hospedeiro mamífero, os tripomastigotas, a forma sanguínea infectiva do *T. cruzi*, diferencia-se intracelularmente em amastigotas replicativos após um período de incubação dentro de fagolisossomos ácidos, em um processo denominado amastigogênese. Aqui buscamos encontrar novas informações concernentes a esse processo através da análise do subproteoma de superfície celular dos estágios de vida presentes no homem e do repertório protéico secretado/excretado por tripomastigotas em pH fisiológico e também nas primeiras 3 horas de amastigogênese axênica. Também realizamos uma análise quantitativa do proteoma total e do fosfoproteoma durante a amastigogênese. Todos os subproteomas foram aqui analisados por LC-MS/MS com um espectrômetro de massas Orbitrap Velos. Primeiro utilizamos epimastigotas, o estágio do parasito encontrado no inseto vetor, para padronizar e avaliar o enriquecimento de proteínas da superfície celular por duas técnicas distintas: uma baseada na tripsinização da superfície de células intactas e a outra baseada na biotilação de proteínas expostas na superfície e seu enriquecimento por cromatografia de afinidade a estreptoavidina. Os resultados mostraram que essas abordagens ofereceram informações abrangentes e complementares sobre o subproteoma da membrana plasmática do parasito e, então, foram aplicadas na análise desse subproteoma nas formas amastigota e tripomastigota. A análise quantitativa do proteoma e fosfoproteoma usou parasitos diferenciados de forma axênica em quatro pontos do processo (0 min, 30 min, 2 h e 9 h) e os fosfopeptídeos foram enriquecidos com resina de TiO<sub>2</sub>. Finalmente, o secretoma de tripomastigotas foi obtido de uma maneira similar ao protocolo de aquisição de antígenos secretados/excretados, mas com cuidados adicionais para evitarmos lise mecânica das células. As análises renderam milhares de proteínas identificadas que eram comprovadamente ou preditas como associadas à membrana plasmática ou secretadas e são envolvidas na interação parasito-hospedeiro. Da mesma forma, várias proteínas e fosfopeptídeos relevantes possuíram expressão regulada durante a amastigogênese.

## Abstract

*Trypanosoma cruzi* is a protozoan that causes Chagas' disease, a neglected infectious illness that affects millions of people, mostly in the Latin America. The parasite undergoes several differentiation processes in order to adapt to different conditions inside both mammalian and triatomine hosts. Specially regarding mammalian hosts, the trypomastigote, an infective bloodstream life-form of the *T. cruzi*, differentiates intracellularly to the replicative amastigote stage after a period of incubation inside acidic phagolysosomes, in a process called amastigogenesis. Here we aim to bring further light to this process by analysing the cell surface subproteome of the mammalian hosted life-forms of the parasite and the secreted/excreted protein repertoire from trypomastigotes in physiological pH and also at the first 3 hours of the acidic pH induced amastigogenesis. Finally, we performed the quantitative proteome and phosphoproteome analysis of the amastigogenesis by iTRAQ labeling. All *T. cruzi* subproteomes were analysed by LC-MS/MS with Orbitrap Velos mass spectrometer. First we used *T. cruzi* epimastigotes, the insect hosted life-form, in order to prepare samples enriched in cell surface proteins by two distinct methodologies, which were optimized and evaluated. The first methodology was based on cell surface trypsinization (Shave) of intact living cells while the second approach used biotinylation of cell surface proteins followed by streptavidin affinity chromatography isolation of the labeled proteins. The results showed that the methodologies offered comprehensive and complementary information about the parasite's plasma membrane subproteome, which were applied afterwards in the trypomastigote and amastigote cells. The quantitative proteome and phosphoproteome analysis used the axenically differentiated parasites in four time points (0 min, 30 min, 2 h and 9 h) and the phosphopeptides were enriched using TiO<sub>2</sub> beads. Finally, the trypomastigote secretome were obtained in a similar way to the protocols of acquisition of secreted/excreted antigens, but with further care to avoid mechanical lysis. The results yielded thousands of protein identifications which were either proved or expected to be associated to the plasma membrane or secreted and are involved in host-parasite interaction and, in the same way, we found several proteins and phosphopeptides that have regulated expression during amastigogenesis.

## Sumário

<i>Abreviaturas</i> .....	5
<i>Prólogo</i> .....	7
<b>1. Introdução</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Doença de Chagas</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.1 Ciclo de vida</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.2 Formas de vida</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 Proteínas da membrana plasmática de <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 Diferenciação entre as formas de vida do <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>18</b>
<b>1.5 Fosforilação de proteínas e a amastigogênese de <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.6 Secretoma/exoproteoma e a infecção</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7 Proteômica de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	<b>24</b>
<b>1.8 Espectrometria de massas do tipo Orbitrap</b> .....	<b>27</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>35</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>36</b>
<b>3 Material e Métodos</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Cultivo</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2 Amastigogênese induzida <i>in vitro</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.3 Obtenção do secretoma</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 Tripsinização da superfície celular</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5 Biotinilação e cromatografia de afinidade</b> .....	<b>39</b>
<b>3.6 Preparo de amostras e digestão</b> .....	<b>40</b>
<b>3.7 Marcação com iTRAQ™</b> .....	<b>41</b>
<b>3.8 Enriquecimento de fosfopeptídeos por afinidade a TiO<sub>2</sub></b> .....	<b>41</b>
<b>3.9 LC-MS/MS</b> .....	<b>41</b>
<b>3.10 Análise de dados, bioinformática e estatística</b> .....	<b>43</b>
<b>4 O Subproteoma de Membrana Plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	<b>45</b>
<b>4.1 Desenho experimental</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2 Resultados e Discussão</b> .....	<b>47</b>

4.3.1	<i>Condições de incubação para tripsinização da superfície celular</i> .....	47
4.3.2	<i>Biotinilação da superfície celular e cromatografia de afinidade a estreptoavidina</i> .....	50
4.3.3	<i>Proteoma da superfície celular de epimastigotas</i> .....	52
4.3.4	<i>Conclusões a respeito das metodologias empregadas</i> .....	55
4.3.5	<i>Comparação do subproteoma de superfície celular das formas tripomastigota e amastigota</i> .....	56
4.3.6	<i>Reações catalisadas por proteínas da superfície celular</i> .....	60
4.3.7	<i>Hidrolases e Proteases da superfície celular</i> .....	64
4.3.8	<i>Conclusões gerais</i> .....	69
5	<i>Avaliação quantitativa da variação do proteoma e fosfoproteoma do T. cruzi durante a amastigogênese</i> .....	71
5.1	<i>Desenho experimental</i> .....	72
5.2	<i>Resultados e discussão</i> .....	73
5.4.1	<i>Identificação de proteínas e fosfopeptídeos por LC-MS/MS e análise estatística dos níveis de expressão relativos</i> .....	73
5.4.2	<i>Variações quantitativas no proteoma total durante a amastigogênese</i> ....	75
5.4.3	<i>Enzimas</i> .....	80
5.4.4	<i>Cinases, fosfatases e proteínas relacionadas à transdução de sinais e regulação de processos metabólicos</i> .....	83
5.4.5	<i>O fosfoproteoma da amastigogênese</i> .....	89
5.4.6	<i>Conclusões</i> .....	92
6	<i>Comparação qualitativa do secretoma de tripomastigotas incubados em pH fisiológico e do secretoma no início da amastigogênese</i> .....	93
6.1	<i>Desenho experimental</i> .....	94
6.2	<i>Resultados e discussão</i> .....	95
6.3.1	<i>Identificação e comparação dos exoproteomas</i> .....	95
6.3.2	<i>O estímulo de diferenciação causa grandes mudanças no repertório funcional do exoproteoma de tripomastigotas</i> .....	98
6.3.3	<i>Enzimas</i> .....	100
6.3.2	<i>Conclusões</i> .....	101
7	<i>Referências Bibliográficas</i> .....	103





## Abreviaturas

**2-DE** - Eletroforese bidimensional

**ACN** - Acetonitrila

**BSA** - *Bovine Serum Albumine* - Albumina sérica bovina

**CID** - *Collision-induced dissociation*

**DHB** - *2,5-dihydroxybenzoic acid*

**DMEM** - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

**EC** - *enzyme code*

**ESI** - *Electrospray ionization*

**FDR** - *False Discovery rate*

**GO** - *Gene ontology*

**HCD** - *Higher-energy collisional dissociation*

**HILIC** - *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*

**ICAT** - *isotope-coded affinity tag*

**IEF** - *Isoelectric focusing*

**iTRAQ** - *isobaric tag for relative and absolute quantitation*

**LC** - Cromatografia líquida

**LIT** - *Liver infusion tryptose* - Infusão de fígado triptose

**LTQ** - *Linear Trap Quadrupole*

**MALDI** - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

**MAPK** - *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MEM** - *Minimum Essencial Medium*

**MHC** - *Major Histocompatibility Complex*

**MS** - *Mass spectrometer*

**MS/MS** - Espectrômetro de massas em série

**NF- $\kappa$ B** - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**PBS** - Salina tamponada com fosfato

**PKA** - *Protein Kinase A*

**SFB** - Soro fetal bovino

**SL** - Sequência líder

**TAU3AAA** - *Triatomine Artificial Urine* enriquecido com prolina, glutamina, aspartato e glicose

**TBS** - Salina tamponada com Tris-HCl

**TCA** - Ácido tricloroacético

**TEAB** - Trietilamônio bicarbonato

**TESA** - *Trypomastigote secreted-excreted antigens*

**TFA** - Ácido trifluoroacético

**ToF** - *Time of flight*

**TOP** - Thimet oligopeptidase

**TS** - Trans-sialidase

## Prólogo

Devido à variedade de assuntos distintos tratados nesse trabalho, o corpo da tese está dividido em capítulos, sendo que o primeiro apresenta uma introdução geral sobre doença de Chagas e seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*, e sobre as metodologias e equipamentos usados na abordagem proteômica de *shotgun proteomics*, utilizados aqui nas análises dos subproteomas. Em seguida são apresentados objetivos da tese e posteriormente os materiais e as metodologias utilizados em cada vertente do trabalho. Os resultados e discussões foram separados em capítulos, em relação á cada subproteoma estudado, precedidos de breve introdução do contexto justificando a importância da análise daquelas amostras e uma descrição do desenho experimental. Por último, os apêndices com manuscritos publicados durante o doutorado sem relação com o tema da tese e o primeiro manuscrito, relacionado a um dos temas, submetido para publicação.

# **1. Introdução**

## 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é endêmica na América Latina onde atinge 21 países. Cem anos após sua descoberta e descrição pelo médico Carlos Chagas, a doença de Chagas é ainda considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde sendo estimado que oito milhões de pessoas estejam infectadas com o protozoário e 11.000 mortes em 2008, principalmente na América Central e na América do Sul (Who, 2008). Até o momento não existe vacina imunoprolática para a tripanossomíase americana, tampouco tratamento quimioterápico efetivo tendo em vista que as drogas normalmente usadas para tratar a infecção humana, benznidazol e nifurtimox, possuem alta toxicidade e não previnem a progressão de sua forma crônica (Urbina e Docampo, 2003).

O *T. cruzi*, seus vetores e reservatórios já existem na natureza desde há milhões de anos. Acredita-se que os tripanossomas primitivos eram parasitos monogenéticos de insetos, os quais não se alimentavam de sangue, e quando esses insetos adquiriram o hábito hematófago, os parasitos sofreram mudanças morfológicas e funcionais de forma que eles desenvolveram membranas ondulantes e flagelo para que pudessem circular no sangue de vertebrados (Hoare, 1972). Existem mais de 130 potenciais espécies de vetores do *T. cruzi*, sendo 52 espécies de triatomíneos já descritas no Brasil, das quais 5 são de especial importância epidemiológica por serem encontradas em ambiente doméstico: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*. As demais 47 espécies são selvagens e mantêm o ciclo natural do parasito somente com mamíferos selvagens. O *T. infestans*, que é a única espécie estritamente doméstica, foi praticamente eliminado no Brasil, Chile e Uruguai e sua erradicação ou controle em outros países do cone sul está em progresso (Wigodzinsky, 1979; Forattini, 1980; J.C.P. Dias, 1997; Jpc Dias, 2005; Coura, 2008; Who, 2008). A respeito dos reservatórios selvagens do parasito, mais de 100 espécies foram descritas entre marsupiais, xenartros, morcegos, carnívoros, lagomorfos, roedores e primatas não-humanos. Entre os reservatórios domésticos, é importante ressaltar os cães, gatos, ratos domésticos, camundongos e cobaias, nos países em que eles são criados em casa. Outros animais, como porcos e caprinos também podem ser infectados pelo *T. cruzi*, o que não ocorre com aves, répteis e peixes (Barretto, 1964; Deane, 1964; Jpc Dias, 2005; Coura, 2008).

Embora tenham sido encontradas múmias de 9000 anos com sinais da doença de Chagas (Aufderheide, Salo *et al.*, 2004), a doença endêmica se estabeleceu pelo desmatamento, devido à ação humana ao longo dos últimos dois ou três séculos (Aragao, 1983).

Os determinantes da doença de Chagas resultam da quantidade de parasitos na infecção inicial, das formas infectivas no inóculo inicial (número de tripomastigotas, a forma infectiva presente nos hospedeiros mamíferos), da linhagem do *T. cruzi*, reinfecção, da qualidade das linhagens e clones (biodema), dos receptores histotrópicos específicos do hospedeiro e da resposta imune inicial e tardia do paciente (Coura, 1988; Macedo e Pena, 1998; Andrade, 2005; Teixeira, Nascimento *et al.*, 2006; Coura, 2007). Os parasitos depositados nos ferimentos da pele ou em mucosas estimulam uma reação inflamatória local, o chamado chagoma de inoculação ou sinal de Romana (fig 1) com uma resposta linforeticular. Os tripomastigotas circulantes fagocitados por macrófagos são trazidos para o fígado, baço, gânglios linfáticos e músculos cardíacos e esqueléticos para formar pseudocistos de amastigotas (forma replicativa presente no hospedeiro vertebrado). Com a ruptura dos pseudocistos no miocárdio ou plexos mioentéricos, ocorre a miocardite aguda mediada por células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e interleucinas (principalmente IL-2 e IL4).



**Figura 1.** Edema palpebral, porta de entrada do *Trypanosoma cruzi* também denominado de chagoma de inoculação ou sinal de Romana  
([http://www.relampa.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=666](http://www.relampa.org.br/detalhe_artigo.asp?id=666))

É importante ressaltar que o inóculo inicial é um fator de grande importância no desenvolvimento da doença de Chagas. Todos os indícios de estudos experimentais mostram que esse inóculo é geralmente pequeno, por exemplo, uma faixa média de 51 a 276 parasitos por defecação foi encontrada em um estudo com oito espécies de triatomíneos, embora algumas vezes uma única defecação continha mais de 1500 parasitos (J. Borges-Pereira, 1988). A vasta maioria dos casos de forma aguda ou inicial da doença

de Chagas no Brasil apresenta pouco ou nenhum sintoma, possivelmente devido ao pequeno inóculo e as características biológicas das linhagens e clones do *T. cruzi*, e particularmente o tropismo de tecido certamente tem uma importante função como determinante da progressão da doença e da sua forma clínica. Diferentes linhagens do *T. cruzi* foram agrupadas de acordo com suas características biológicas e tropismos celular em ratos, formando três grupos (Andrade, 1976)

Dois mecanismos patogênicos são conhecidos para infecção por *T. cruzi*: o primeiro, descrito por Gaspar Vianna em 1911, consiste de uma reação inflamatória local com necrose, destruição de tecidos e formação de cicatriz com fibrose; e o segundo, o qual é mais complexo de compreender e provar, é o mecanismo imunológico (Teixeira, Teixeira *et al.*, 1975; Andrade, 1999).

As lesões da fase aguda da doença são caracterizadas pela presença de reações inflamatórias localizadas, com predominância de células mononucleadas nos focos de ruptura de pseudocistos, ocasionalmente com a formação de granulomas localizados principalmente em músculos e tecido cardíaco.

A doença de Chagas apresenta uma fase inicial ou aguda com parasitemia evidente vista diretamente no exame do sangue. Na maior parte dos casos não existem sintomas, mas nos casos sintomáticos há os sinais no foco de entrada (como o sinal de Romana), com febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos severos. Essa fase é seguida pela fase crônica, a qual, na maioria dos casos, apresenta-se como uma forma indeterminada (assintomática, com resultados normais de eletrocardiograma e raios-X do coração, esôfago e cólon) que pode eventualmente evoluir para forma cardíaca, digestiva ou ambas.

A sensibilização de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> pelo *T. cruzi*, com o desenvolvimento de células anti-miocárdio, associado com a migração e ativação de macrófagos e liberação de fatores de agregação plaquetárias, desse modo respectivamente induzindo miocardite chagásica e lesões isquêmicas do miocárdio, podem explicar os resultados encontrados em casos de cardiopatia chagásica crônica (De Lourdes Higuchi, 1999).

Na fase crônica, a infecção pode apresentar-se como forma indeterminada, na qual aproximadamente 40% dos indivíduos permanecem totalmente assintomáticos, embora estes apresentem reações sorológicas positivas. A forma crônica cardíaca é o tipo de manifestação mais comum da doença de Chagas devido a sua frequência e severidade. Esta



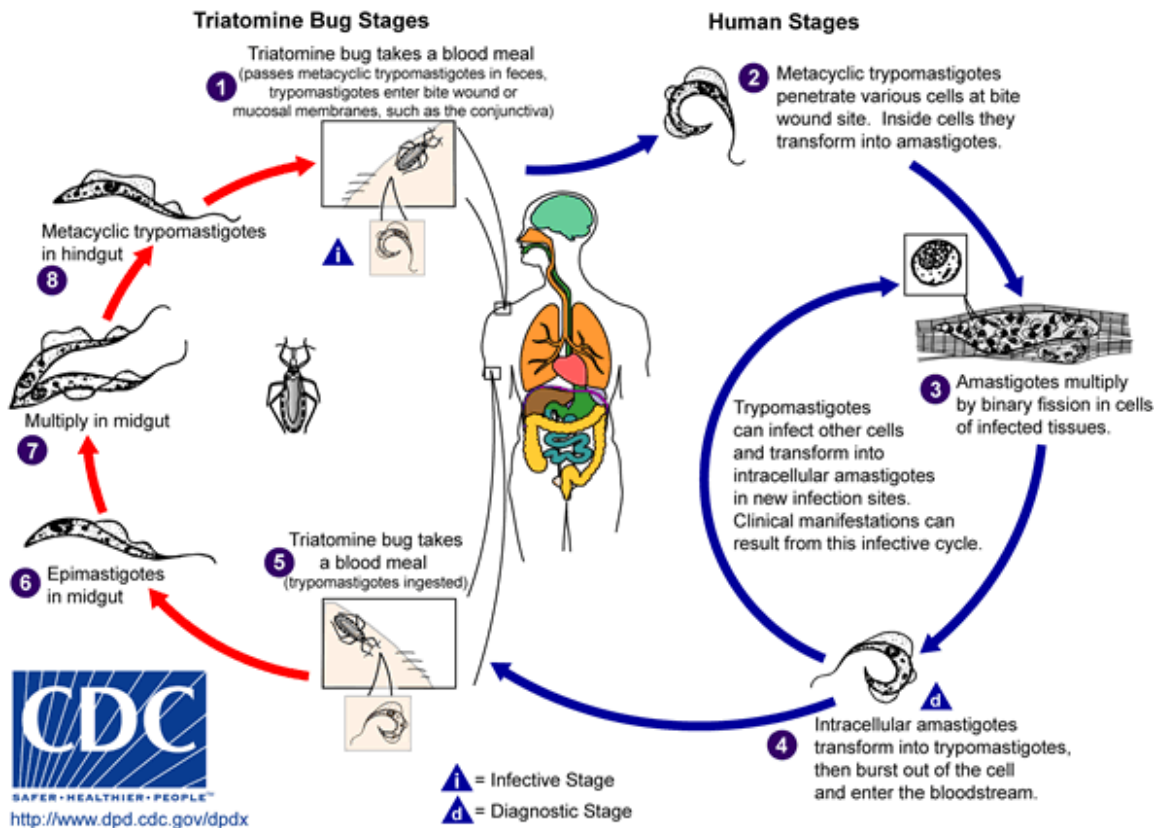
geralmente aparece entre a segunda e quarta década de vida, cinco a quinze anos após a infecção inicial.

## **1.2 O *Trypanosoma cruzi***

### **1.2.1 Ciclo de vida**

O ciclo de vida do *T. cruzi* ocorre dentro do inseto vetor hematófago e do hospedeiro mamífero. Durante seu ciclo de vida (fig 2), o parasito se diferencia em quatro estágios principais: epimastigota e tripomastigota metacíclico no inseto vetor, e tripomastigota sanguíneo e amastigota dentro do hospedeiro mamífero.

Os parasitos diferenciam-se pela primeira vez no estômago do inseto vetor onde as formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas poucas horas após sua ingestão. A segunda diferenciação do parasito ocorre quando os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos no tubo digestivo do vetor. Estes tripomastigotas metacíclicos são liberados durante o repasto sanguíneo através das fezes do hospedeiro invertebrado atingindo o hospedeiro vertebrado por uma ferida na pele ou através da mucosa. Os parasitos invadem diferentes tipos de células nucleadas no hospedeiro e rapidamente se diferenciam intracelularmente em amastigotas, sofrendo várias divisões no interior das células infectadas. Em seguida, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados para corrente sanguínea após o rompimento da membrana celular, iniciando o próximo ciclo de infecção de outras células ou ciclo biológico do parasito quando ingerido pelo inseto vetor (Coura e Dias, 2009).



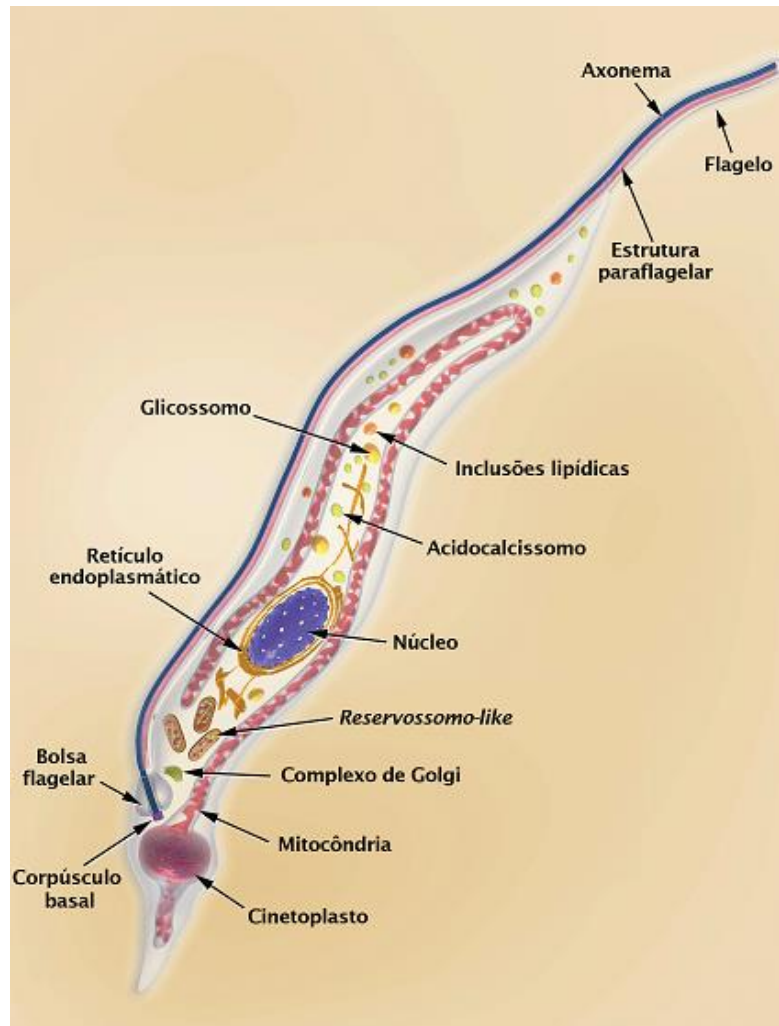
**Figura 2.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

(<http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>)

### 1.2.2 Formas de vida

#### *Trypomastigotas*

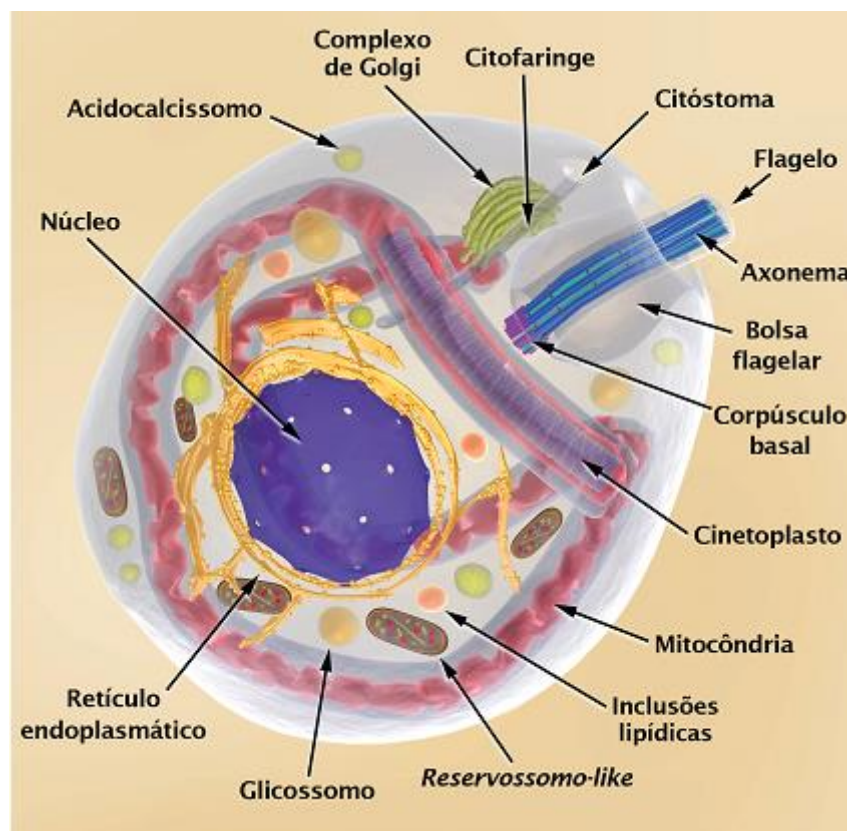
O parasito na forma tripomastigota é uma célula alongada e levemente achatada medindo cerca de 25 µm de comprimento e 2 µm de diâmetro. Apresenta cinetoplasto arredondado e localizado posteriormente ao núcleo na célula do parasito. O flagelo emerge de uma bolsa flagelar e se adere ao longo da extensão do corpo celular, tornando-se livre na região anterior. As formas tripomastigotas são altamente infectantes, sendo encontradas no hospedeiro mamífero na corrente sanguínea e espaço intercelular (tripomastigota sanguíneo) e no inseto vetor na região posterior do tubo digestório (tripomastigota metacíclico).



**Figura 3.** Esquema tridimensional da forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (Adaptado de (Dirceu Esdras Teixeira, 2011)).

## *Amastigotas*

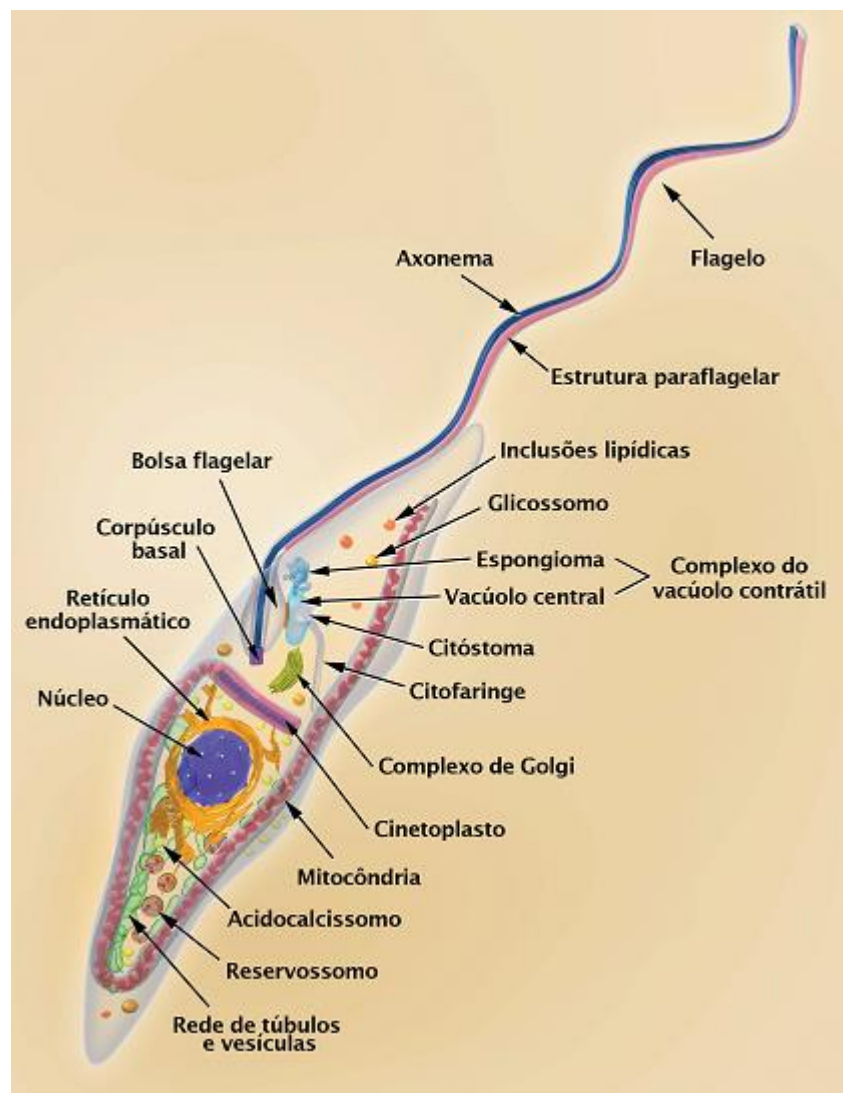
A forma amastigota é arredondada medindo cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro com flagelo reduzido, cinetoplasto em forma de bastonete situado entre o núcleo e a base da bolsa flagelar. O núcleo do parasito nessa forma de vida é relativamente grande e redondo. Os parasitos nessa forma de vida, embora ainda infectivos, são menos eficientes na infecção. Os amastigotas são encontrados preferencialmente no interior de células de mamíferos infectados, onde se multiplicam com um tempo médio de duplicação da população de 15 h e o ciclo intracelular de replicações e diferenciação completo dura quatro dias (Engel, Doyle *et al.*, 1985).



**Figura 4.** Esquema tridimensional da forma amastigota do *Trypanosoma cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (Adaptado de (Dirceu Esdras Teixeira, 2011)).

## *Epimastigotas*

A forma epimastigota é replicativa e não é considerada como infectiva. Essa forma de vida é encontrada no aparelho digestório dos vetores triatomíneos após o repasto com sangue contaminado com tripomastigotas, os quais se diferenciam para essa forma provavelmente devido a estresse nutricional. Mede entre 20 e 40  $\mu\text{m}$  e sua morfologia celular é fusiforme e possui o cinetoplasto em forma de bastão, localizado próximo à base da bolsa flagelar de onde emerge o flagelo alongado que, apesar de se aderir por toda a extensão da célula do parasito, possui a maior parte do flagelo desprendido do corpo.



**Figura 5.** Esquema tridimensional da forma amastigota do *Trypanosoma cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (Adaptado de (Dirceu Esdras Teixeira, 2011)).

### 1.3 Proteínas da membrana plasmática de *T. cruzi*

Antes do processo de invasão celular, os parasitos devem sobreviver, ganhar acesso à superfície de células hospedeiras e formar adesões estáveis a essas células. Uma gama de glicoproteínas de superfície protease-resistentes aderem-se às componentes de matriz, ligam-se a receptores de superfície celular ou possuem atividade proteolítica contra componentes da matriz extracelular. Proteínas de membrana também são essenciais para manutenção da integridade celular, assim como para processos de transdução de sinais em resposta a estímulos extracelulares, sendo que domínios citoplasmáticos de proteínas transmembranares podem ser reversivelmente fosforilados, e funcionando assim como transdutores de sinais.

Aproximadamente 50% do genoma funcional de *T. cruzi* é dedicado a codificar proteínas da superfície, divididas em várias famílias: as proteínas de superfície gp63, a superfamília gp85/trans-sialidase, as mucinas e as proteínas de superfície associadas a mucinas (El-Sayed, Myler *et al.*, 2005; Alves e Colli, 2008; Kulkarni, Olson *et al.*, 2009).

O resultado final das interações entre as proteínas de superfície do parasito e da célula hospedeira é o desencadeamento bidirecional (hospedeiro e parasito) de cascatas de sinalização que iniciam a invasão. Tanto na infecção de células hospedeiras quanto nas diferenciações do parasito, a liberação intracelular de cálcio é tida por fenômeno indispensável na coordenação dos eventos moleculares envolvidos nos processos, porém os mecanismos moleculares precisos responsáveis pelo controle deste fenômeno ainda não estão totalmente elucidados. Duas vias relacionadas à esse evento já foram identificadas: o engajamento da gp82 com um ligante desconhecido desencadeando uma cascata de sinalização em tripomastigotas metacíclicos envolvendo a fosforilação da proteína p175 (Favoreto, Dorta *et al.*, 1998), da proteína cinase C e a liberação dos reservatórios de cálcio do retículo endoplasmático mediado por IP<sub>3</sub> (Yoshida, Favoreto *et al.*, 2000).

Alguns micro-organismos, como leveduras e *Dictyostelium discoideum*, possuem seus processos de diferenciação celular coordenados por vias de sinalização mediadas por AMP cíclico e proteínas cinases e é provável que vias semelhantes também ocorram em *T. cruzi* e estejam envolvidas em várias transformações durante seu ciclo de vida (Thevelein e De Winde, 1999; Bao, Weiss *et al.*, 2008) e que a atividade de fosfatases também deva ser requerida para a diferenciação (Grellier, Blum *et al.*, 1999). Existem também evidências de que proteínas cinases A de *T. cruzi* interajam e fosforilem membros da superfamília das

trans-sialidases, o que de fato demonstra a presença dessas cinases relacionada à membrana plasmática de tripomastigotos (Bao, Weiss, Ma, Kahn *et al.*, 2010).

Desta forma, reconhecemos a relevância de estudos voltados à caracterização do proteoma da membrana plasmática do *T. cruzi*, não só devido à já referida importância biológica desse conjunto de proteínas, mas também em vista do fato de atualmente cerca de 70% dos agentes farmacêuticos aprovados agirem em proteínas da membrana plasmática (Wu e Yates, 2003) e que ainda não há um tratamento quimioterápico efetivo para a doença de Chagas.

Neste trabalho, foram otimizadas duas técnicas para acessar o subproteoma membranar do parasito: (1) biotinylation de proteínas expostas da membrana plasmática seguido por cromatografia de afinidade a estreptoavidina e (2) tripsinização de proteínas da superfície de parasitos intactos. Os métodos foram testados, modificados e validados com parasitos da forma epimastigota e os protocolos mais eficientes foram usados em amastigotas axênicos e tripomastigotas.

No nosso conhecimento, só existem dois trabalhos publicados relatando abordagens proteômicas direcionadas ao subproteoma membranar do *T. cruzi*, um usando fracionamento de fase hidrofílica/hidrofóbica (Cordero, Nakayasu *et al.*, 2009) e outro direcionado a proteínas GPI-ancoradas (Nakayasu, Yashunsky *et al.*, 2009), no entanto nenhuma dessas técnicas oferecem especificidade a proteínas da membrana plasmática e ao mesmo tempo uma visão abrangente dessa fração subcelular. Os métodos empregados por nós são direcionados para acessar o subproteoma de membrana plasmática do parasito de maneira eficiente. A técnica de tripsinização tem a vantagem de ser relativamente simples, uma vez que a maior preocupação é simplesmente manter a integridade celular durante a digestão enzimática para evitar a contaminação com proteínas citosólicas devida à lise e a biotinylation de proteínas da superfície celular tem o uso potencial no estudo de fosforilações de proteínas da membrana plasmática, já que as proteínas obtidas por esse processo têm sua estrutura primária e modificações pós-traducionais preservadas.

#### **1.4 Diferenciação entre as formas de vida do *T. cruzi***

Sendo um organismo digenético, *T. cruzi* segue uma diferenciação contínua dentro do inseto vetor para dentro do hospedeiro mamífero e vice e versa. Existem quatro momentos no ciclo de vida do parasito em que este sofre diferenciação morfológica e metabólica drásticas, sendo que duas delas têm sido mais freqüentemente objetos de

pesquisa científica: a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (metacicloogênese), a qual capacita o parasito para infectar células humanas, e a diferenciação das formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas em amastigotas (amastigogênese), forma replicativa presente no hospedeiro mamífero (De Souza, De Carvalho *et al.*, 2010).

A metacicloogênese ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor, provavelmente como uma resposta do parasito às mudanças ambientais, tal como a redução de nutrientes disponíveis e os mecanismos envolvidos no disparo deste processo ainda permanecem desconhecidos. A metacicloogênese em *T. cruzi* pode ser mimetizada *in vitro*, permitindo a seleção de parasitos em vários estágios de diferenciação. Foi desenvolvido, de forma pioneira, um meio quimicamente definido capaz de estimular a metacicloogênese pela simulação das condições físico-químicas encontradas na porção final do intestino do inseto triatomíneo (Contreras, Salles *et al.*, 1985), onde epimastigotas cultivados até a fase estacionária eram submetidos a um estresse nutricional e em seguida incubados em meio TAU3AAA (*triatomine Artificial Urine* enriquecido com prolina, glutamina, aspartato e glicose) a 28 °C. Esse processo de diferenciação envolve a transformação de uma forma replicativa não infectante do parasita em uma forma infectante não replicativa. As mudanças funcionais e morfológicas que ocorrem durante o processo de metacicloogênese resultam de importantes mudanças na expressão diferencial dos genes (Parodi-Talice, Monteiro-Goes *et al.*, 2007)

A amastigogênese é também um processo cujos mecanismos moleculares ainda não estão perfeitamente estabelecidos. A primeira amastigogênese ocorre quando o tripomastigota metacíclico se transforma em amastigota dentro das células do hospedeiro mamífero, e a segunda é observada quando tripomastigotas sanguíneas provenientes de tecido se diferenciam em amastigotas também em células nucleadas (Vanhamme e Pays, 1995). A amastigogênese ocorre *in vivo*, preferencialmente no interior das células hospedeiras, embora na fase aguda da infecção possam ocorrer formas amastigotas extracelulares (Brack, 1968).

Existe um sistema, desenvolvido por Contreras e colaboradores (Contreras, Navarro *et al.*, 2002), capaz de induzir a diferenciação de tripomastigotas metacíclicas em amastigotas sem a necessidade de células hospedeiras, com o uso de um meio MEMTAU, uma combinação de meio MEM (*Minimum Essencial Medium*) e o meio TAU3AAG, enriquecido com SFB e cultivado a 37 °C.



Através de outro processo, a produção *in vitro* de amastigotas axênicos pela incubação de tripomastigotas, derivados de culturas de tecidos, em meio ácido tem sido amplamente utilizada desde os primeiros relatos de Kanbara e colaboradores (Kanbara, 1990). Foi comprovado em outros trabalhos que os amastigotas axênicos não são apenas morfológicamente semelhantes aos amastigotas intracelulares, mas, compartilham com esses, várias características bioquímicas, expressão de antígenos de superfície estágio-específicos e a capacidade replicativa característica deste estágio e imprescindível para o ciclo de vida do parasito (Tomlinson, Vandekerckhove *et al.*, 1995). Os autores também comprovaram que a incubação em pH ácido não só acelera enormemente a diferenciação morfológica, mas também parece ser um fator chave para disparar a replicação do DNA.

Como vantagens do uso de sistemas axênicos de diferenciação, pode-se ressaltar a obtenção de maiores quantidades de amastigotas, os quais são livres de contaminantes oriundos de células hospedeiras.

### **1.5 Fosforilação de proteínas e a amastigogênese de *T. cruzi***

A fosforilação está entre as modificações pós-traducionais mais generalizadas na natureza e estima-se que mais de 30% das proteínas de uma célula de mamífero estejam fosforiladas em algum ponto durante sua expressão (Hubbard e Cohen, 1993). Esta modificação também regula um grande número de processos biológicos envolvendo transdução de sinais (Graves e Krebs, 1999), reconhecimento e interações moleculares e outros eventos celulares. Com o atual interesse em proteínas cinases como alvos moleculares para o tratamento de uma variedade de doenças (Force, Kuida *et al.*, 2004; Arslan, Kutuk *et al.*, 2006), a possibilidade que inibidores de cinases representem novos agentes antiparasitários vem sendo explorada (Doerig, 2004).

Estudos prévios com formas tripomastigotas expostas à drogas antifosfatases, como caliculina A, demonstraram que o *T. cruzi* inicia a diferenciação para formas arredondadas extracelulares *amastigota-like* (Grellier, Blum *et al.*, 1999) mesmo em pH fisiológico e inibidores de fosfatases, como o ácido ocadáico, reprime a diferenciação dos tripomastigotas em amastigotas (Gonzalez, Cornejo *et al.*, 2003) no pH de indução. Isso reforça a hipótese de que proteínas-alvo de fosforilação e desfosforilação estão implicadas na diferenciação do parasito.

Tendo em vista que cerca de 2% do genoma do *T. cruzi* codifica proteínas cinases, sugerindo um papel regulatório principal para essas proteínas no controle do

desenvolvimento e função do parasito (Parsons, Worthey *et al.*, 2005) e que o estudo comparativo dos cinomas (conjunto de proteínas cinases) de tripanossomatídeos mostrou que *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major* possuem 176, 190 e 199 cinases, respectivamente, com aproximadamente 12% delas sendo únicas de tripanossomatídeos (Naula, Parsons *et al.*, 2005; Parsons, Worthey *et al.*, 2005), torna-se relevante o estudo do fosfoproteoma dos estágios de vida do *T. cruzi*.

No presente trabalho, foi realizado o estudo comparativo quantitativo do fosfoproteoma de *T. cruzi* durante a amastigogênese axênica induzida por incubação de formas tripomastigotas em meio ácido (pH 5,0). Para isso, foram recolhidas amostras em quatro tempos do processo: os estágios completamente diferenciados (tripomastigotas = 0 min de indução e amastigotas = 9 h de indução) e os tempos de 30 min de indução, onde é esperado reconhecer os primeiros processos biológicos alterados na diferenciação e 2 h, visto que *in vivo* o parasito permanece esse período dentro do fagolisossomo em pH 5,0. No nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho a respeito da análise em larga escala do proteoma de *Trypanosoma cruzi* durante a amastigogênese, assim como das alterações do fosfoproteoma do parasito durante esse processo.

A tarefa de abordar quaisquer modificações pós-traducionais de proteínas, inclusive a fosforilação de resíduos de Ser, Thr e Tyr, em análises proteômicas em larga escala representa em si um grande desafio, dado a existência de diferentes tipos de modificações como diferentes tamanhos e propriedades químicas (revisado em (Jensen, 2006)). Aliado a isso, há o fato de que proteínas modificadas se apresentam nas células em quantidades sub-estequiométricas, portanto são necessárias estratégias para enriquecimento dos peptídeos/proteínas modificados e identificação confiável dos mesmos.

Para análise do fosfoproteoma do parasito durante a amastigogênese, utilizou-se enriquecimento de fosfopeptídeos pela técnica de cromatografia de afinidade a TiO<sub>2</sub> (Larsen, Thingholm *et al.*, 2005). Os primeiros trabalhos relatando o uso de TiO<sub>2</sub> no enriquecimento seletivo de fosfopeptídeos foram publicados em 2004 (Kuroda, Shintani *et al.*, 2004; Pinkse, Uitto *et al.*, 2004). Nos anos seguintes Larsen e colaboradores propuseram vários protocolos de maior seletividade e sensibilidade para o enriquecimento *off-line* de fosfopeptídeos (Larsen, Thingholm *et al.*, 2005; Thingholm, Jorgensen *et al.*, 2006; Jensen e Larsen, 2007; Thingholm e Larsen, 2009), onde demonstraram que a adição de um ácido orgânico (DHB ou ácido glicólico) na solução onde a amostra será diluída ou dissolvida para o experimento de enriquecimento minimiza consideravelmente a ligação

inespecífica de peptídeos ácidos não fosforilados à resina de TiO<sub>2</sub>. Também, reportaram o incremento na sensibilidade do método alcançada pela elevação do pH da solução de eluição de 9,0 para 11,3 com amônio. Esse método provou ser bastante resistente a variados tipos de sais, tampões e outros contaminantes comumente utilizados no preparo de amostras biológicas (Jensen e Larsen, 2007).

Deve-se ressaltar também que a fosforilação e desfosforilação de proteínas envolvidas em eventos de sinalização geralmente não operam como um processo "liga/desliga" com populações inteiras de proteínas sendo completamente fosforiladas ou desfosforiladas. Ao contrário, as fosforilações são finamente ajustadas por pequenas mudanças que mesmo assim levam à transdução de sinal. Com isso um sítio de fosforilação identificado pode representar um estado de fosforilação basal irrelevante e a identificação de milhares de fosfoproteínas e sítios de fosforilação podem ser úteis para identificar motivos de proteínas cinases ativas na célula, mas não oferecem nenhuma informação a respeito do contexto do sítio fosforilado se não estiverem associados a alterações no nível de fosforilação ou expressão dessas proteínas.

## **1.6 Secretoma/exoproteoma e a infecção**

Os processos de adesão e invasão são os primeiros passos na interação parasito-hospedeiro. Para cumprir seu ciclo de vida, os tripomastigotos devem penetrar a matriz extracelular de tecidos do hospedeiro mamífero e a membrana plasmática para poderem diferenciar-se intracelularmente na forma replicativa amastigota. O sucesso dos processos de infecção e virulência dependem de fatores protéicos secretados/excretados por parte do parasito, assim como da liberação de proteínas ligantes de membrana do hospedeiro.

Como já mencionado, alguns mecanismos da invasão de células pelo *T. cruzi* têm sido descritos no nível ultraestrutural e as estratégias bioquímicas envolvidas na interação parasito-hospedeiro também têm sido investigadas. (Osuna, Castanys *et al.*, 1990; Tardieux, Nathanson *et al.*, 1994; Di Noia, Pollevick *et al.*, 1996; Villalta, Smith *et al.*, 2001; Ferreira, Cortez *et al.*, 2006). Entre estes mecanismos, ocorre a liberação de depósitos intracelulares de cálcio (Osuna, Gamarro *et al.*, 1986; Rodriguez, Samoff *et al.*, 1996; Pollevick, Di Noia *et al.*, 2000), seguido da despolimerização de filamentos de actina e recrutamento de lisossomos para a membrana plasmática por um processo dependente de cinesina, que resulta em um remodelamento do citoesqueleto da célula hospedeira (Osuna, Gamarro *et al.*, 1986; Yoshida, Mortara *et al.*, 1989; Tardieux,

Nathanson *et al.*, 1994; Rodriguez, Samoff *et al.*, 1996; Villalta, Smith *et al.*, 2001; Tarleton, Reithinger *et al.*, 2007).

Nos últimos 20 anos, vários grupos se engajaram na identificação de componentes do parasito implicados na invasão celular. A imagem que emerge desses trabalhos é que a penetração da célula hospedeira pelo parasito é um processo composto de vários passos, envolvendo uma grande gama de moléculas tanto do hospedeiro quanto do próprio parasito, que culmina na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  em ambos os organismos (Burleigh e Andrews, 1998; Yoshida e Cortez, 2008).

Para invadir as células de mamíferos, os tripomastigotas metacíclicos empregam glicoproteínas de superfície como as gp82, gp35/50, ou gp30 (uma variante da gp82 expressa em isolados deficientes em gp82), mucinas e trans-sialidasas (Buscaglia, Campo *et al.*, 2006; Yoshida e Cortez, 2008; De Pablos, Gonzalez *et al.*, 2011). O *T. cruzi* também tira vantagem de componentes como proteínas secretadas da família SAP (proteínas ricas em serina, alanina e prolina) (Baida, Santos *et al.*, 2006). Tripomastigotas também usam uma série de componentes para atravessar a matriz extracelular e infeccionar, como as proteínas Tc-85, gp83, Tc-1, cruzipaína, oligopeptidase B (OPBTc) e proliloligopeptidase 80 kDa de *T. cruzi* (POP Tc80) (Burleigh e Andrews, 1998; Grellier, Vendeville *et al.*, 2001; Yoshida e Cortez, 2008). Com relação à essa última proteína, Santana e colaboradores (Santana, Grellier *et al.*, 1997) mostraram que a POP Tc80 é capaz de degradar fibras nativas de colágeno de mesentério de ratos e foi sugerido que essa protease é secretada mesmo não possuindo uma seqüência sinal de secreção por via clássica. Por outro lado foi demonstrado que a OPBTc é ativa na forma dimérica (Motta, Bastos *et al.*, 2012) e está envolvida na invasão por gerar agonistas moduladores de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridos para o recrutamento dos lisossomos para o sítio de adesão do parasito.

O termo secretoma foi primeiro introduzido em um estudo a respeito de proteínas secretadas por *Bacillus subtilis* baseado no genoma (Tjalsma, Bolhuis *et al.*, 2000). Os autores definiram o secretoma como o subconjunto do proteoma, que inclui as proteínas secretadas e os componentes da maquinaria celular usada na secreção protéica. A caracterização do secretoma de *B. subtilis* usando abordagem proteômica mostrou que a predição original identificou corretamente cerca de 50% das proteínas (Antelmann, Tjalsma *et al.*, 2001). Hoje em dia emprega-se o termo secretoma principalmente para definir o conjunto de proteínas secretadas por células para a região extracelular (Greenbaum, Luscombe *et al.*, 2001) e, neste trabalho, os termos *secretoma* e *exoproteoma*

serão considerados sinônimos para o *T. cruzi* e outros tripanosomatídeos e se referem ao conteúdo de proteínas presentes no meio extracelular provenientes do parasito por quaisquer vias de secreção, seja clássica ou não, ou por liberação enzimática de proteínas da membrana plasmática.

Alguns estudos a respeito do secretoma/exoproteoma das formas epimastigota e tripomastigota metacíclico do *T. cruzi* (Bayer-Santos, Aguilar-Bonavides *et al.*, 2012) assim como de outros membros da classe kinetoplastida (Geiger, Hirtz *et al.*; Silverman, Chan *et al.*, 2008; Cuervo, De Jesus *et al.*, 2009) já foram publicados. A análise proteômica desse subgrupo de proteínas deverá proporcionar valiosas contribuições para o conhecimento dos mecanismos da interação entre os organismos, dado que proteínas secretadas/excretadas têm papel biológico crucial na interface parasito-hospedeiro. Esses componentes incluem proteínas envolvidas em processos biológicos como migração celular, adesão, comunicação célula-célula, proliferação, diferenciação, morfogênese e regulação de respostas imunes (Soblik, Younis *et al.*, 2011). À respeito dessa última, deve-se ressaltar que, apesar dos mecanismos de manutenção da infecção envolvidos na fase crônica da doença ainda serem pouco conhecidos e que se postule que o parasito evite a vigilância do sistema imune inibindo a via de processamento de antígenos para o complexo MHC classe I, sabe-se que a infecção por *T. cruzi* possui efeito inibitório na formação do imunoproteossoma em células não fagocíticas (Faria, Lima *et al.*, 2008) e macrófagos (Bergeron, Blanchette *et al.*, 2008).

O presente trabalho procurou, portanto, identificar o repertório de proteínas secretadas/excretadas por tripomastigotas em pH fisiológico e em pH de indução da amastigogênese axênica. Para tanto, foi utilizada uma adaptação de um protocolo de produção de antígenos excretados-secretados de tripomastigotos (TESA) previamente descrito (Matsumoto, Cotrim *et al.*, 2002; Berrizbeitia, Ndao *et al.*, 2006), mas com um cuidado adicional para evitar a lise celular e a conseqüente contaminação extensiva com proteínas citosólicas.

## **1.7 Proteômica de *Trypanosoma cruzi***

Todos os genes codificadores de proteínas nesses organismos estão organizados em grandes unidades de transcrição policistrônicas que geram RNAs mensageiros policistrônicos precursores, os quais são processados em mRNA monocistrônicos através de um mecanismo chamado de *trans-splicing* (Vanhamme e Pays, 1995). O *trans-splicing* é

uma reação intermolecular da qual participam uma espécie doadora (RNA da seqüência líder) e um acceptor, que é o mRNA que está sendo sintetizado. A reação envolve a clivagem das duas espécies de RNAs e a transferência da seqüência líder para o mRNA. A seqüência líder confere estabilidade ao mRNA, impedindo sua degradação, auxiliando também a interação do mRNA com os ribossomos.

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

Em 2004, Paba, Ricart e colaboradores publicaram um dos primeiros estudos de análise proteômica do *T. cruzi* e o primeiro enfocando o processo de amastigogênese (conversão da do estágio tripomastigota em amastigota) usando-se 2-DE, análise computacional e espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (Paba, Santana *et al.*, 2004). Esse trabalho demonstrou que grande parte das proteínas identificadas apresentava expressão conservativa entre três formas evolutivas epimastigota, tripomastigota e amastigota. Contudo, foram detectadas proteínas exclusivas e diferencialmente expressas entre os estágios do parasito. Apesar do reduzido número de seqüências de *T. cruzi* disponíveis naquele tempo, foram identificadas várias proteínas, incluindo proteínas paraflagelares que mostravam expressão reduzida durante a amastigogênese. Este achado estava de acordo com as mudanças morfológicas do parasito.

A fração alcalina do proteoma de *T. cruzi* foi mais recentemente analisada pelo grupo da UnB utilizando-se um método otimizado de 2-DE (Magalhães, Charneau *et al.*, 2008). A motivação para o trabalho foi a de que, apesar de análises virtuais terem predito uma distribuição bimodal do pI das proteínas do parasito, resultados anteriores haviam indicado baixa resolução e pequeno número de spots em géis 2-DE de *T. cruzi* na faixa alcalina de pH. Foi desenvolvido então um protocolo otimizado para a IEF de proteínas na faixa de pH 6-11 que permitiu a visualização de mais de 700 spots nesta faixa de pH. O método foi utilizado juntamente com a metodologia *two-in-one gel* para a comparação dos proteomas das formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*.

Abordagens não baseadas em 2-DE também têm sido aplicadas para estudos proteômicos do *T. cruzi*. O grupo de pesquisas da UnB utilizou em um dos trabalhos

pioneiros de proteômica de *T. cruzi* uma análise comparativa quantitativa das proteínas das formas tripomastigota e amastigota utilizando a tecnologia ICAT, seguido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Paba, Ricart *et al.*, 2004). Assim, mesmo com poucas seqüências gênicas de *T. cruzi* disponíveis naquele momento, 41 proteínas foram identificadas com nível de expressão determinada sendo a maioria delas pertencentes a proteínas de organização celular, metabolismo e proteínas de destinação.

Usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), Atwood e colaboradores (Atwood, Weatherly *et al.*, 2005) abordaram a análise proteômica de *T. cruzi* obtendo a identificação de 2784 proteínas totais de amastigotas e tripomastigotas, encontrando 1008 correspondentes as seqüências gênicas anotadas como hipotéticas.

Desde então, tem havido a tendência da análise de subproteomas do parasito, por exemplo após isolamento de uma determinada fração celular. Uma vantagem da análise de um subproteoma é a redução da complexidade da amostra, o que permite que proteínas presentes em pequenas quantidades no proteoma total sejam reveladas. Esse foi o caso do estudo proteômico de um enriquecido organelar onde foram identificadas 396 proteínas por LC-MS/MS (Ferella, M, Nilsson, D *et al.*, 2008), sendo 138 anotadas como hipotéticas com 38 proteínas não descritas anteriormente. Usando uma abordagem semelhante, Sant'anna e colaboradores (Sant'anna, Nakayasu *et al.*, 2009) trabalharam com o subproteoma da fração de reservossomas de *T. cruzi* e identificaram 709 proteínas, sendo 456 proteínas com funções conhecidas e 253 classificadas como hipotéticas e desta forma foi possível a identificação de novas proteínas de diferentes classes como enzimas, proteínas transportadoras, dentre outras. Ferella e colaboradores (Ferella, M., Nilsson, D. *et al.*, 2008) usaram eletroforese uni e bidimensionais seguidas de nanoLC-MS/MS para analisar uma fração subcelular enriquecida de acidocalcinomas e glicossomas de epimastigotos e outro trabalho com a mesma forma de vida do parasito abordou a análise de uma fração ribossomal obtida por um eficiente protocolo de purificação (Ayub, Atwood *et al.*, 2009). Neste pode-se observar que proteínas ribossomais de *T. cruzi* têm perto de 50% de identidade de seqüência com as proteínas de leveduras, no entanto algumas das proteínas do parasito são mais longas devido à presença de várias extensões N ou C-terminais que são exclusivas de tripanossomatídeos.

O grupo do professor Igor Almeida está engajado há vários anos no estudo do *T. cruzi* e já publicou vários trabalhos de análises proteômicas e subproteômicas do

parasito, entre as quais queremos citar a análise de frações enriquecidas de proteínas hidrofóbicas (Cordero, Nakayasu *et al.*, 2009), proteínas GPI-ancoradas (Nakayasu, Yashunsky *et al.*, 2009), fosfoproteoma da forma epimastigota (Nakayasu, Gaynor *et al.*, 2009), proteínas-alvo de SUMOilação (Bayona, Nakayasu *et al.*, 2011), abordagem proteômica para descoberta potenciais alvos de vacinas (Nakayasu, Sobreira *et al.*, 2012) e o secretoma das formas epimastigota e tripomastigota metacíclicos (Bayer-Santos, Aguilar-Bonavides *et al.*, 2012).

Recentemente, abordagens proteômicas comparativas e/ou quantitativas da diferenciação do parasito também foram publicadas (Parodi-Talice, Monteiro-Goes *et al.*, 2007; De Godoy, Marchini *et al.*, 2012), assim como análise proteômica de epimastigotos sujeitos a choque por calor (Perez-Morales, Lanz-Mendoza *et al.*, 2012), uma nova análise do fosfoproteoma do parasito com metodologias e equipamentos de maior sensibilidade e precisão (Marchini, De Godoy *et al.*, 2011) e a identificação de proteínas do vacúolo contrátil (Ulrich, Jimenez *et al.*, 2011), provando que o estudo de proteomas e subproteomas do parasito ainda têm muito a oferecer ao conhecimento científico e que o que está estabelecido e relatado na literatura ainda não elucida toda a biologia desse organismo.

## **1.8 Espectrometria de massas do tipo Orbitrap**

O estudo dos proteomas depende fundamentalmente da identificação de proteínas presentes nas amostras biológicas de interesse. Classicamente, a identificação protéica era realizada por detecção imunológica ou por métodos de sequenciamento químico e/ou enzimático, dentre os quais o principal era o sequenciamento automático por degradação de Edman (Edman, 1949), onde polipeptídios de uma proteína digerida são sequenciados por meio de uma degradação química onde um aminoácido era removido por vez da região N-terminal do peptídeo e detectado espectroscopicamente. No entanto, essa técnica exige bastante tempo, peptídeos puros e seqüência somente um peptídeo de tamanho limitado por vez.

Nas últimas décadas a espectrometria de massas emergiu como o melhor método para análise e identificação de proteínas de identidade desconhecidas em amostras biológicas. A espectrometria de massas é uma técnica analítica que mede a massa/carga ( $m/z$ ) de compostos ionizados e, assim, existem somente duas exigências para

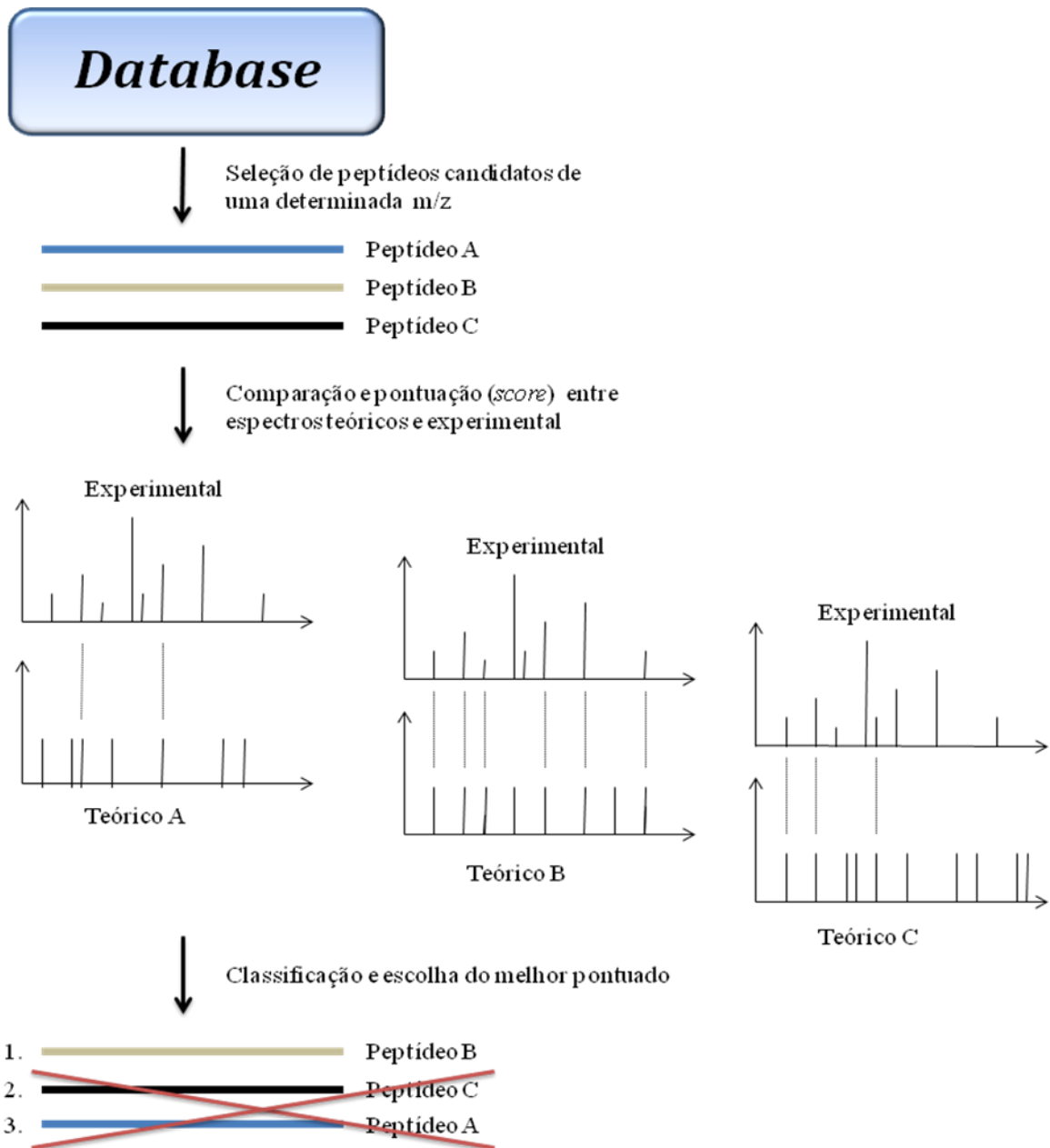


que um composto possa ser por ela analisado: ele deve estar carregado/ionizado e deve encontrar-se em fase gasosa.

Historicamente, a espectrometria de massas data de 1899 com o primeiro espectrômetro de massas inventado pelo físico Sir J. J. Thompson que lhe rendeu o Prêmio Nobel de Física em 1906, mas a grande explosão no uso desta técnica na biologia molecular, especialmente de proteínas, ocorreu com o desenvolvimento de técnicas de ionização "brandas" que pudessem manter intacta, ao menos parcialmente, a estrutura primária da cadeia peptídica. A esse respeito, especial relevância deve ser dada às técnicas de MALDI (Tanaka, Waki *et al.*, 1988) e ESI (Fenn, Mann *et al.*, 1989).

A aplicabilidade da técnica para análise em larga escala de proteínas tem grande apoio nos avanços na genômica, uma vez que as seqüências protéicas por ela disponibilizadas são fundamentais para os algoritmos de identificação de proteínas usados na proteômica (fig 6). Aliado aos avanços na instrumentação, agora é possível a análise de misturas protéicas extremamente complexas usando a chamada abordagem proteômica *bottom-up* ou *shotgun* (Wu e Maccoss, 2002), na qual as amostras biológicas são inicialmente digeridas enzimaticamente, sendo a tripsina a principal escolha, e então os peptídeos são separados por cromatografia líquida de fase reversa e gradualmente eluídos, ionizados e fragmentados via MS/MS. A informação combinada das massas dos fragmentos e dos íons precursores facilita a identificação dos peptídeos e, com isso, das proteínas usando a já citada busca por banco de dados.

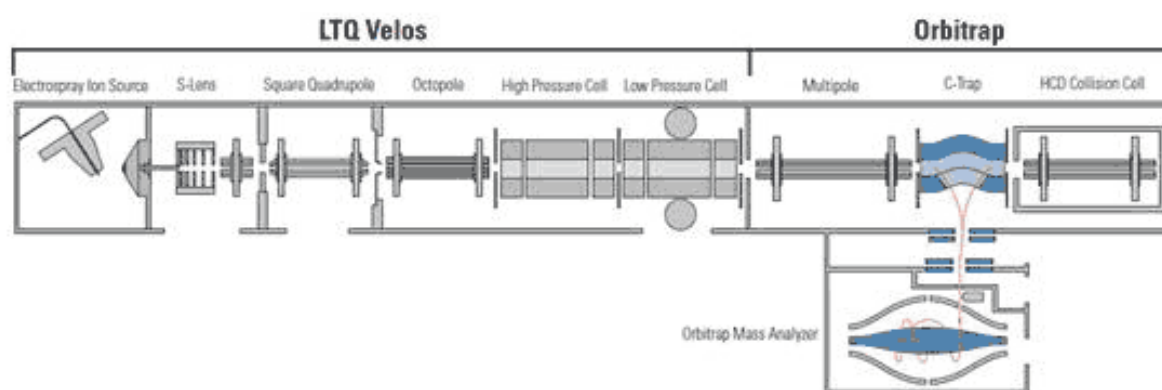
Um espectrômetro de massas consiste basicamente de uma fonte de íons, onde a molécula de interesse é ionizada; um analisador de massas, onde os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ); e um detector de íons, onde estes geram um sinal elétrico que é processado de modo à gerar um espectro de massas. Para a maioria das aplicações em proteômica, dois tipos de analisadores de massa são combinados em um único equipamento (instrumentos híbridos), o que permite a combinação das qualidades complementares de cada analisador incrementando, assim, a versatilidade do instrumento. Os equipamentos mais utilizados na proteômica atual são os que possuem a configuração MALDI/ESI- QToF MS ou ESI-LTQ/Orbitrap MS. Em nosso trabalho usamos um espectrômetro de massas *Orbitrap Velos* da empresa Termo Fisher Scientific.



**Figura 6.** Princípio da busca e identificação com banco de dados. As massas teóricas dos fragmentos dos peptídeos com potencial de pareamento baseado na massa do precursor são comparadas com as massas experimentais e é selecionado o melhor candidato.

Este equipamento é um híbrido ESI-LTQ/Orbitrap MS (fig 7) de última geração e é capaz de analisar uma enorme quantidade de peptídeos em uma única aplicação.

Em um analisador de massa do tipo orbitrap, os íons são aprisionados em um campo eletrostático entre os eletrodos (Makarov, 2000). Enquanto os íons giram em torno do eletrodo interno, eles vibram ao longo do eixo com uma frequência característica de sua razão massa/carga. A aquisição desse transiente e a transformada de Fourier daqueles sinais produz dados de frequências e suas intensidades. Uma simples relação converte frequências em valores de  $m/z$ . O espectrômetro híbrido LTQ-Orbitrap é um analisador de alta acurácia e alta resolução capaz de atingir um poder de resolução superior a 100000 com acurácia na medição da massa menor ou igual à 5 ppm (Makarov, Denisov *et al.*, 2006) no analisador orbitrap e análises mais rápidas, mas de menor resolução e acurácia no LTQ. Empregar um simples esquema *lock-mass* pode reduzir o erro para menos de 2 ppm (Olsen, De Godoy *et al.*, 2005). O método de *higher energy C-trap dissociation*, ou colisão de alta energia, (HCD) foi introduzido como um processo de fragmentação para superar duas deficiências do uso do CID (Dissociação Induzida por Colisão) no analisador *LTQ ion trap*: a baixa resolução e acurácia e as perdas devidas ao chamado *low-mass cutoff* (Olsen, Macek *et al.*, 2007), o qual consiste no fato que geralmente o terço menor dos fragmentos não serem encontrados na fragmentação por CID. Além disso, o desempenho desse equipamento no estudo de modificações pós-traducionais como a fosforilação de resíduos de aminoácidos nas proteínas é bastante satisfatório assim como na quantificação relativa de peptídeos.



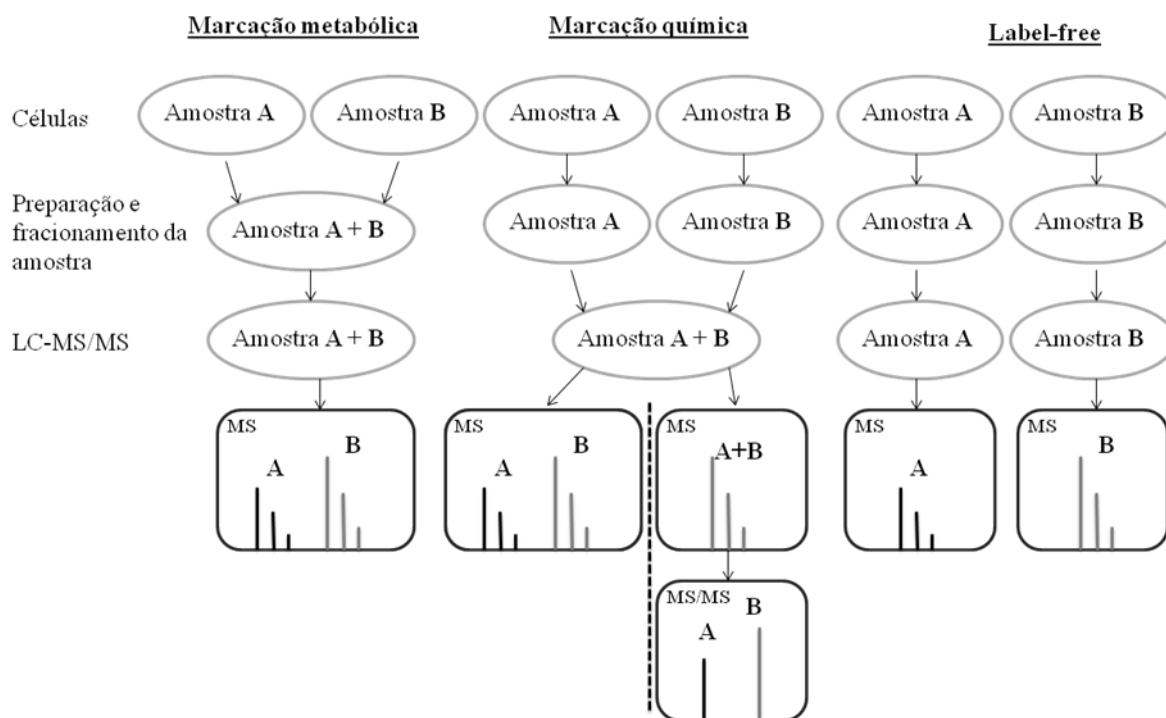
**Figura 7.** Esquema representando os componentes do *Orbitrap Velos*. ([http://biomed.brown.edu/epscor\\_proteomics/ltq-orbitrap-velos](http://biomed.brown.edu/epscor_proteomics/ltq-orbitrap-velos))

Até agora tratamos a proteômica meramente como um disciplina voltada para a identificação de proteínas em uma amostra biológica, mas o objetivo fundamental da biologia celular é investigar como células respondem a perturbações ou estímulos ou como mantêm a homeostase e, para isso, caracterizar e comparar o nível de expressão de certas proteínas é primordial.

Como a espectrometria de massas não é, em si, uma técnica quantitativa, dado que as intensidades de íons observadas são dependentes de vários parâmetros, dentre os quais a eficiência de desorção e ionização e o desempenho do LC são provavelmente os mais influentes, vários procedimentos foram concebidos para permitir a quantificação relativa de peptídeos em amostras diferentes (fig 8). Embora a abordagem sem marcação (*label-free*) esteja constantemente sendo melhorada (Podwojski, Eisenacher *et al.*, 2010) a maior parte dos estudos atualmente emprega a marcação química com isótopos estáveis pra a quantificação relativa devido a uma melhor acurácia oferecida por essas técnicas (Bantscheff, Schirle *et al.*, 2007). O conceito básico dessa abordagem é que peptídeos de mesma seqüência e marcação, mas isotopicamente distintos, comportam-se igualmente durante o LC e a análise por MS, porém podem ser distinguidas pela mudança de massa transmitida pela diferente composição isotópica dos marcadores. Assim, a razão entre as intensidades dos marcadores é diretamente proporcional às quantidades relativas dos peptídeos nas amostras (Ong e Mann, 2005).

Em nosso trabalho utilizamos a marcação com o reagente iTRAQ<sup>TM</sup> para investigar a abundância relativa de proteínas do extrato total do parasito durante a amastigogênese induzida por incubação em pH 5,0 e, concomitantemente, a dinâmica de fosforilações de proteínas.

Esse reagente é covalentemente ligado em aminas primárias dos peptídeos (resíduos laterais de lisinas ou N-terminal) e existem as opções iTRAQ 4-plex (4 marcadores isobáricos) e iTRAQ 8-plex (8 marcadores isobáricos). Nós nos ateremos aqui ao iTRAQ 4-plex por ter sido nossa escolha para o trabalho.



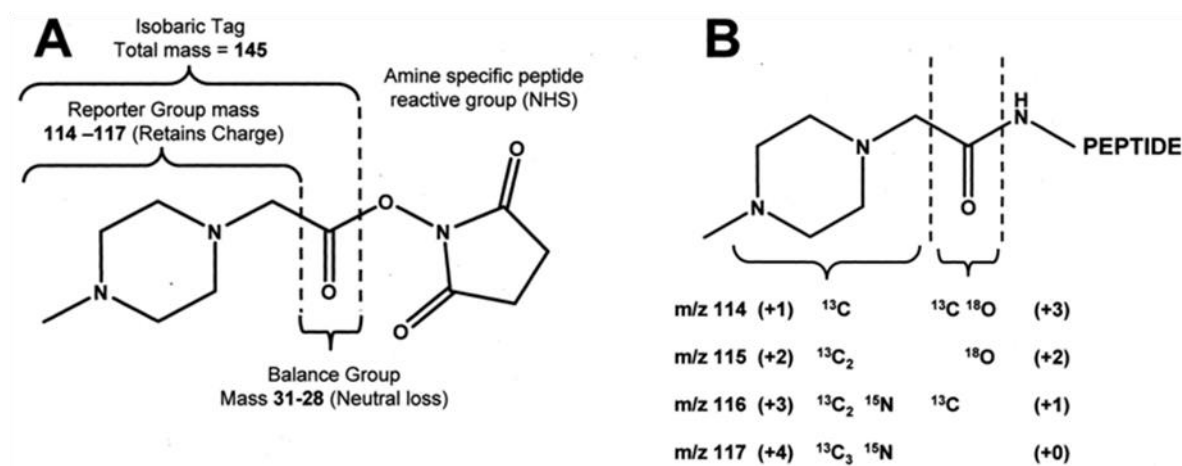
**Figura 8.** Abordagens proteômicas para quantificação relativa de peptídeos por espectrometria de massas. (Adaptado de (Ong e Mann, 2005)).

O marcador isobárico iTRAQ 4-plex consiste de um grupo NHS éster reativo com peptídeos, um grupo "reporter" (baseado em uma N-metilpiperazina) com massa de 114 a 117 Da e um grupo balanceador (carbonil) com variadas quantidades de isótopos pesados  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^{18}\text{O}$  gerando massas entre 31 e 28 Da (fig 9) (Ross, Huang *et al.*, 2004). Esse sistema de grupo reporter-balanceador assegura uma um incremento de massa igual para o peptídeo, independente do marcador escolhido, que no caso do iTRAQ 4-plex é de 145 kDa. No caso de peptídeos trípticos contendo grupamentos  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisinas, o incremento será o dobro, pois ele reagirá com ambas as aminas primárias livres.

Durante a análise por MS/MS, os peptídeos marcados com iTRAQ têm a massa do precursor idêntica devido à natureza isobárica dos diferentes marcadores. Isso resulta no isolamento e fragmentação em condições idênticas para todos os precursores de diferentes amostras e a fragmentação por HCD produção íons da séries b e y igualmente para os peptídeos marcados. No entanto, as intensidades dos íons fragmento do grupo *reporter* (m/z 114, 115, 116 e 117) correspondem à contribuição de cada peptídeo marcado oriundo de uma amostra diferente, portanto a razão relativa entre a intensidade dos marcadores corresponde à abundância relativa entre cada peptídeo marcado. Resumindo, este reagente

permite a identificação e a quantificação relativa em um mesmo experimento de análise por MS/MS.

Entre as vantagens dessa metodologia estão a minimização das variações técnicas entre as diferentes amostras pelo fato que, após a marcação, as amostras são combinadas e processadas em uma única análise e o incremento de sinal também conseqüente dessa combinação, levando a melhores chances de seleção dos peptídeos para fragmentação e melhor qualidade dos espectros. Além do mais, a quantificação por esse método tem uma reduzida complexidade de peptídeos quando comparado com outras metodologias que abordam a questão no nível de MS. No entanto existe a desvantagem que energias de colisão maiores na fragmentação devem ser utilizadas para obterem-se sinais satisfatórios dos íons *reporter* e essas energias não são as melhores escolhas para gerar fragmentos das séries b e y.



**Figura 9.** Representação da estrutura química do reagente iTRAQ 4-plex (A) e a ligação deste a peptídeos (B). Adaptado de (Ross, Huang *et al.*, 2004).

Além de todos os detalhes já mencionados, a análise dos dados gerados em experimentos de larga escala como na abordagem *shotgun* ainda carrega desafios especialmente no que concerne à validação dos peptídeos identificados. Como já dito, a identificação é baseada na qualidade do pareamento de massas de fragmentos seqüência específicos de dados teóricos e experimentais (fig. 6). Essa qualidade varia significativamente, mesmo para identificações corretas de peptídeos, devido à baixa intensidade de sinal ou tipo de fragmentação imprevista do peptídeo, por exemplo. Por isso nenhum limite fixo pode ser estabelecido para diferenciar identificações verdadeiras de falso-positivos e a validação manual das identificações não mais é factível, dado a

quantidade de peptídeos identificados. Assim, estratégias para controlar o número de falso-positivos são cruciais para limitar a inclusão desses nas publicações e banco de dados (White, 2011)

O método mais comum e amplamente aceito para medir a confiabilidade estatística de resultados de proteômica de larga escala é o cálculo do *false discovery rate* (FDR) para todos os pareamentos de peptídeos identificados, o qual não elimina os falso-positivos, mas dá uma estimativa da taxa de erro nos resultados. Uma abordagem simples para o cálculo do FDR é a determinação empírica feita usando um banco de dados concatenado consistindo das seqüências originais das proteínas, assim como uma versão "isca" (Moore, Young *et al.*, 2002; Elias e Gygi, 2007), sendo esta "isca" gerada pelas seqüências originais invertidas, embaralhadas ou randomizadas. Assumindo-se que as seqüências da "isca" não sendo expressas biologicamente, todos os peptídeos pareados com esse banco de dados são falso-positivos e baseado na quantidade de falso-positivos identificados, assim como no número de verdadeiros positivos (as identificações do banco de dados correto), o FDR pode ser calculado e o limite mínimo comumente estabelecido e aceito é de até 1%.

## **2. Objetivos**



## 2 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho consiste do estudo do processo de amastigogênese do *Trypanosoma cruzi* por meio da análise dos proteomas totais e de subproteomas das formas tripomastigota e amastigota e de estágios intermediários da diferenciação celular. Esse estudo justifica-se não somente pelo fato que os mecanismos moleculares responsáveis por esse processo de diferenciação são pouco conhecidos e que não existem estudos proteômicos de larga escala direcionados a esse respeito, mas também que os subproteomas aqui abordados têm grande relevância para elencar potenciais alvos de fármacos. Para realizarem-se essas análises se fez necessário cumprir as seguintes etapas:

1<sup>a</sup>. Padronização, com parasitos da forma epimastigota, dos métodos de tripsinização da superfície de células intactas e de biotinylação de proteínas da membrana plasmática seguida por purificação das mesmas por cromatografia de afinidade e comparação dos resultados obtidos por estes métodos visando à análise do subproteoma da superfície celular do parasito.

2<sup>a</sup>. Comparação qualitativa do subproteoma de superfície celular de tripomastigotas e amastigotas por dois métodos complementares.

3<sup>a</sup>. Análise quantitativa do proteoma e do fosfoproteoma do *T. cruzi* durante a amastigogênese.

4<sup>a</sup>. Comparação qualitativa do secretoma de tripomastigotas incubados em pH fisiológico e do secretoma no início da amastigogênese.

# **3 Material e Métodos**

### **3.1 Cultivo**

Formas epimastigotas da linhagem Berenice foram obtidas por cultura em meio LIT suplementado com 5% de SFB (Soralí, Campo Grande, Brasil) incubados a 28 °C. As formas tripomastigotas foram coletadas a partir de cultura de monocamada de células HeLa (Andrews e Colli, 1982), infectadas com parasitos da linhagem Y, e mantida em meio DMEM (Sigma), pH 7,5, suplementado com 5% de SFB, 100 µg/mL de gentamicina a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.2 Amastigogênese induzida *in vitro***

O ensaio de amastigogênese e a produção de amastigotas axênicos foram realizados pela incubação de tripomastigotas em meio DMEM sem SFB, pH 5,0, durante 9 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> conforme descrito anteriormente (Tomlinson, Vandekerckhove *et al.*, 1995; Hernandez-Osorio, Marquez-Duenas *et al.*, 2010). Para os experimentos quantitativos da variação dos proteomas durante a diferenciação, foram coletados parasitos também em estágios intermediários da amastigogênese nos tempos de 30 e 120 min de incubação.

### **3.3 Obtenção do secretoma**

Tripomastigotas foram lavados três vezes por centrifugação a 2,000 ×g por 10 min com DMEM, pH 7,5, sem SFB. Então, 10<sup>9</sup> parasitos lavados foram ressuspensos em 5 mL de DMEM sem SFB, pH 7,5, (2.1×10<sup>8</sup> células/mL) e incubados em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C por 3h, sendo suavemente agitados a cada 20 min. Após incubação, a mobilidade dos parasitos foi checada e a amostra foi coletada somente se o meio não foi acidificado e cerca de no mínimo 95% das células permanecessem móveis. Para remover as células após a incubação, o meio foi centrifugado por 5 min a temperatura ambiente em três ciclos para assegurar a completa remoção das células e evitar lise mecânica: primeiramente a 2000 ×g, então a 4000 ×g e por último a 6000 ×g, sendo os sobrenadantes transferidos para novos tubos depois de cada centrifugação. Após a remoção das células, as proteínas presentes no meio de cultura foram precipitadas com TCA (10% v/v) por 1 hora a -20 °C e lavadas três vezes com acetona gelada a 14.000 ×g, 15 min, a 4 °C.

A amostra de secretoma de tripomastigotas no início da diferenciação foi obtida recolhendo-se o sobrenadante do meio de indução da amastigogênese (DMEM sem SFB, pH 5.0) após 3 a 4 horas de indução, removendo-se as células conforme supracitado.

### **3.4 Tripsinização da superfície celular**

Foram recolhidos  $2 \times 10^9$  parasitos e lavados três vezes com meio DMEM sem SFB por centrifugação a  $2000 \times g$  por 5 min a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em meio DMEM sem SFB, a  $28^\circ\text{C}$  para epimastigotas e  $37^\circ\text{C}$  para tripomastigotas e amastigotas, e separadas em dois tubos com 4 mL cada e a um dos tubos (amostra denominada Shave) foi adicionado 20  $\mu\text{g}$  de tripsina (Sigma). Ambos os tubos foram incubados a  $28^\circ\text{C}$  ou  $37^\circ\text{C}$  por 30 min e centrifugados a  $2000 \times g$  (5 min) cujos sobrenadantes foram recolhidos e centrifugados a  $4000 \times g$  (5 min) e novamente recolhidos a novos tubos e centrifugados a  $6000 \times g$  (5 min). Ao tubo sem tripsina, foi adicionado 20  $\mu\text{g}$  da enzima e incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min (amostra Controle). Finalmente estes sobrenadantes foram liofilizados constituindo-se o tubo da amostra Controle de proteínas secretadas/excretadas pelo parasito e o tubo com enzima (Shave), de digestos de proteínas da membrana plasmática e secretadas/excretadas.

### **3.5 Biotinilação e cromatografia de afinidade**

Baseando-se no protocolo do fabricante com modificações, foram recolhidos  $5 \times 10^9$  epimastigotas ou  $10^9$  tripomastigotas ou amastigotas, lavados três vezes com 50 mL de PBS por centrifugação a  $2000 \times g$  por 5 min e ressuspensos em 10 mL de PBS, pH 8,0, contendo 10 mg de *Sulfo-NHS-LC-Biotin* (PIERCE) e incubados a  $28^\circ\text{C}$ , para epimastigotas, e  $37^\circ\text{C}$ , para as demais formas, por 10 min. O reagente remanescente foi neutralizado por adição de Tris-HCl, pH 7,5, concentração final de 50 mM, e em seguida, as células foram lavadas uma vez com 50 mL de TBS com centrifugação a  $2000 \times g$  por 5 min. Os parasitos biotinilados e lavados foram ressuspensos em 5 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q contendo coquetel completo de inibidores de proteases e fosfatases (Roche) e lisados com três ciclos de congelamento e descongelamento em N<sub>2</sub> líquido. Este lisado foi centrifugado a  $15000 \times g$  (20 min a  $4^\circ\text{C}$ ) e o sobrenadante (extrato de proteínas solúveis em água) descartado. O pellet foi ressuspendido novamente com 5 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q com coquetel completo de inibidores, centrifugado a  $15000 \times g$  (20 min a  $4^\circ\text{C}$ ) e o sobrenadante também descartado. O pellet, agora, foi ressuspendido com 5 mL de 2% Triton X-100 em TBS e

incubado no gelo por 1 h com agitação eventual e, então, centrifugado a 10000 x g (20 min a 4 °C) e o sobrenadante (extrato membranar biotinilado) recolhido e armazenado a -20 °C até a etapa de cromatografia.

Para a cromatografia de afinidade a estreptoavidina foi usada uma coluna pré-empacotada de 1 mL de estreptoavidina imobilizada em bilhas de agarose (PIERCE). Todas as soluções e a coluna foram deixadas à temperatura ambiente e esta foi equilibrada com 10 mL de 1% Triton X-100 em TBS imediatamente antes recircular o extrato membranar pela coluna por 1h com um fluxo de cerca de 7 mL/min. A coluna foi, então, lavada com 15-20 mL de 1% Triton X-100 em TBS e, em seguida, com 10 mL de 1% Triton X-100 em 1 M NaCl. Finalmente as proteínas biotiniladas foram eluídas com 5 mL de 8 M guanidina-HCl, pH1,5, o qual foi coletado e imediatamente neutralizado adicionando-se o mesmo volume de TBS. Esta amostra foi concentrada para um volume inferior a 500 µL usando-se filtro Amicon™ com *cut-off* de 3 kDa e armazenada a -20 °C.

### **3.6 Preparo de amostras e digestão**

As amostras de proteínas expostas da superfície celular das formas epimastigota, tripomastigota e amastigota, obtidas pelo método de biotinição seguido por cromatografia de afinidade a estreptoavidina, assim como as proteínas do extrato total do parasito durante a amastigogênese (tempos 0 min, 30 min, 2h e 9h de indução da diferenciação) foram precipitados com etanol/ acetona. Resumidamente, cada amostra foi diluída quatro vezes etanol gelado. Então foi adicionado o mesmo volume de acetona gelada, agitados vigorosamente e incubados *overnight* a -20 °C Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g a 4 °C por 15 min e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado outras três vezes com solução gelada de 40% etanol/ 40% acetona..

Tanto as amostras precipitadas com etanol/acetona quanto as da tripsinização da superfície celular foram ressuspensas para 100 µL de 20mM TEAB, reduzidas com 20 mM DTT por 1 hora a 56 °C e, então, alquiladas com 40 mM iodoacetamida por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada tripsina na proporção final de 1:50 e incubados a 37 °C por 12 a 15 horas. Após isso, a solução foi acidificada com concentração final de TFA a 0,1% (v:v) e dessalinizada com microcolunas *home-made* de resina Poros Oligo R3 (Perseptive Biosystems)

### 3.7 Marcação com iTRAQ™

A marcação com iTRAQ™ seguiu as instruções do fabricante com pequenas modificações. Brevemente, 100 µg do digesto dessalinizado e seco de cada amostra de cada tempo de diferenciação foram ressuspensos em 30 µL de 300 mM TEAB e adicionadas a um frasco do reagente iTRAQ™ já ressuspensado em 70 µL de etanol. Os frascos já com as amostras foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 1-2 horas e em seguida foram misturados na proporção de 1:1:1:1 (tempos de diferenciação, 0 min marcado com 114, 30 min com 115, 2h com 116 e 9h com 117). O equivalente a 20 µg da amostra marcada e misturada foi encaminhada para o fracionamento automático com coluna TSKGel Amide 80 HILIC HPLC (comprimento: 15 cm, diâmetro: 2 mm, tamanho de partícula: 3 µm) em um equipamento Agilent com coletor automático de frações. As amostras da amastigogênese foram analisadas em triplicata biológica com duas repetições técnicas (dois fracionamentos por HILIC) de cada replicata biológica.

### 3.8 Enriquecimento de fosfopeptídeos por afinidade a TiO<sub>2</sub>

Os fosfopeptídeos foram purificados com TiO<sub>2</sub> em *batch* segundo (Jensen e Larsen, 2007) com pequenas modificações. Resumidamente, as amostras dos quatro tempos da amastigogênese já marcadas com iTRAQ™ e misturadas foram ressuspensas para 1M ácido glicólico em ACN 80% / TFA 5% (v/v) e foi adicionado 0,6 mg de TiO<sub>2</sub> para cada 100 µg de amostra e incubadas a temperatura ambiente sob agitação vigorosa por 10-15 min. Em seguida o microtubo foi centrifugado brevemente para descer o TiO<sub>2</sub> com os fosfopeptídeos ligados e o sobrenadante, contendo peptídeos não fosforilados foi transferido para outro tubo. Este procedimento foi repetido com o sobrenadante recolhido anteriormente por mais dois ciclos de purificação de fosfopeptídeos utilizando em cada um desses ciclos metade da quantidade de TiO<sub>2</sub>. O TiO<sub>2</sub> de todos os ciclos foram combinados e lavados com ACN 80%/TFA 1% (v/v) e, depois, com ACN 10%/TFA 0,1% (v/v) para remoção de peptídeos não-fosforilados ligados ao TiO<sub>2</sub> por uma interação hidrofílica. Após as incubações e lavagens, os fosfopeptídeos foram eluídos com solução de amônia pH 11.

### 3.9 LC-MS/MS

As amostras foram analisadas com um sistema EASY-nano LC (ProxeonBiosystems) acoplado online com um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap

Velos (ThermoScientific). Para as amostras das metas **1**, **2** e **4**, um máximo de 2 µg de cada foi carregado em uma coluna capilar de sílica de 18 cm (diâmetro interno de 75 µm) empacotada pelo usuário com resina de fase reversa ResiproSil-Pur C18-AQ 3 µm (Dr. Maisch GmbH, Alemanha) e eluída usando um gradiente de 100% fase A (0.1% ác. fórmico) até 26% fase B (0.1% ác. fórmico, 95% ACN) por 180 min, 26% até 100% fase B por 5 min e 100% fase B por 8 min (um total de 193 min a 200 nL/min). Após cada corrida, a coluna foi lavada com 90% fase B e reequilibrada com fase A. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo aplicando-se *data-dependent automatic survey MS scan* e aquisição de espectros de massas em tandem (MS/MS). Cada *MS scan* no orbitrap (amplitude de massa: m/z 350-1800 e resolução: 60000) foi seguida por MS/MS dos quinze íons mais intensos no LTQ. A fragmentação no LTQ ocorreu por CID e as seqüências de íons selecionados foram excluídas dinamicamente por 30 segundos. Para as amostras da meta **3**, primeiramente 20 µg de cada uma das três replicatas biológicas foram separadas em 10 frações em um HPLC com coletor automático de amostras e com uma coluna TSKGel Amide 80 HILIC (comprimento: 15 cm, diâmetro: 2 mm, partícula: 3 µm) essencialmente como descrito em (Mcnulty e Annan, 2008). A aplicação e análise no espectrômetro de massas foram feitas basicamente como descrita acima, exceto que o gradiente de 26% até 100% fase B durou 77 min (total de 90 min), a fragmentação se deu por HCD dos sete picos mais intensos. O processamento dos dados foi feito com *Proteome Discoverer v.1.3 beta* (ThermoScientific). A busca e identificação das proteínas também usou o programa *Proteome Discoverer* com algoritmo Mascot v.2.3 contra um banco de dados de *Trypanosoma cruzi* instalado no servidor do laboratório, gerados usando a ferramenta *Database on Demand* (Reisinger e Martens, 2009) contendo as 12574 proteínas encontradas no UniProt/SWISS-PROT e UniProt/TrEMBL. Proteínas contaminantes (diversos tipos de queratinas humanas, BSA e tripsina porcina) foram adicionadas ao banco de dados e removidas manualmente das listas de identificações. As buscas foram feitas com os seguintes parâmetros: precisão no MS de 10 ppm, no MS/MS de 0.5 Da para espectros de fragmentação por CID e MS de 10 ppm e MS/MS de 0,05 ppm para espectros de fragmentação por HCD, até 2 sítios de clivagem perdidos, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação da metionina, acetilação N-terminal da proteína como modificações variáveis. Em amostras da meta **3**, as modificações variáveis N-terminal iTRAQ *tagging* e fosforilação de S, T e Y também foram aceitas e para as amostras biotiniladas, NHS-LC biotinilação do N-terminal da proteína e NHS-LC

biotinilação de resíduos de lisinas (incremento de 339.16 Da). O número de proteínas, grupo de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com uma taxa de detecção de falsos positivos (FDR) menor que 1% e peptídeos com *rank* 1 e mínimo de 2 peptídeos por proteínas (este exceto em frações enriquecidas para fosfopeptídeos) foram aceitos para identificação com *Proteome Discoverer*.

### 3.10 Análise de dados, bioinformática e estatística

O software *ProteinCenter* (ThermoScientific) foi usado para interpretar os resultados a nível de proteínas (Gene Ontology, peptídeo sinal e domínio transmembranar). Anotação de proteínas de *T. cruzi* foi adquirida também usando o software *Blast2GO* (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) (Conesa, Gotz *et al.*, 2005) com os parâmetros básicos. Os *softwares* SignalP v.4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e SecretomeP v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) foram usados para prever as proteínas secretadas por vias clássica e não-clássica, respectivamente.

A análise estatística da expressão relativa quantificada com iTRAQ<sup>TM</sup> foi feita com o software R onde os dados consistiam de três replicatas biológicas contendo as frações de peptídeos e fosfopeptídeos marcados com iTRAQ. Os valores da intensidade do íon *reporter* de cada amostra e de cada fração transformados em log<sub>2</sub> e normalizados pela mediana. Medidas múltiplas do mesmo peptídeo foram mescladas usando-se a função *RRollup* do pacote DanteR (Taverner, Karpievitch *et al.*, 2012), onde foi permitido somente um peptídeo por medida e foi escolhida a opção média ao invés de mediana. Os valores de peptídeos não fosforilados foram convertidos em quantificação de proteínas (*RRollup*, "média") onde foi modificada a função original para exigir no mínimo 3 peptídeos por proteína.

Regulações estatisticamente significantes requerem ferramentas mais sofisticadas que apenas o teste-t padrão. Os testes Limma (Smyth, 2005) e rank products (Breitling, Armengaud *et al.*, 2004; Koziol, 2010) oferecem poder suficiente para lidar com baixo número de replicatas e adicionais *missing-values* (Schwämmle, comunicação pessoal). Desta forma foram realizadas ambos os testes estatísticos em todos os fosfopeptídeos e proteínas contra a amostra marcada com iTRAQ 114 Da. e corrigimos para teste múltiplo. Todas as proteínas com valor-q (em ambos os testes) abaixo de 0,05 (5% *false discovery rate*) foram consideradas como reguladas.



Para a análise de *clusters*, foi calculado a média sobre todas as 3 replicatas para cada condição. Fosfopeptídeos e proteínas foram mescladas em um único conjunto de dados. *Fuzzy c-means clustering* (Futschik e Carlisle, 2005) foi aplicado após determinar-se o valor do parâmetro *fuzzifier* e o número de *clusters* de acordo com Schwämmle e colaborador (Schwammle e Jensen, 2010)

## **4 O Subproteoma de Membrana Plasmática de *Trypanosoma cruzi***

#### 4.1 Desenho experimental

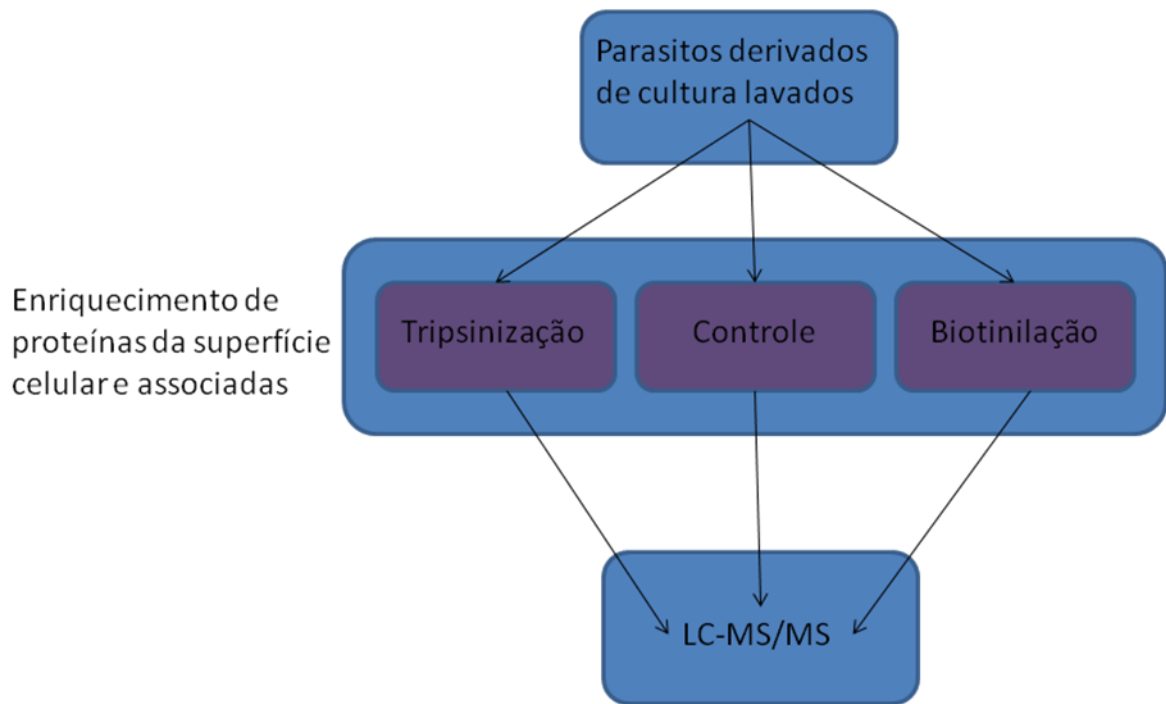
Visando a abordagem de proteínas associadas a membrana plasmática do *T. cruzi*, nosso primeiro passo foi padronizar, com epimastigotas, os protocolos de (i) biotinylação de parasitos intactos seguida por extração de proteínas e enriquecimento da amostra marcada por cromatografia de afinidade a estreptoavidina e de (ii) tripsinização de proteínas da superfície celular.

Primeiramente foram testados tampões, tempos e condições de incubação apropriadas para os experimentos, os quais mantivessem intactos os parasitos na ausência da enzima tanto quanto possível e estipulamos o limite adequado como aquele onde a motilidade das células fossem mantidas. Depois de encontradas as condições e tempo mais propícios, incubações de células com tripsina foram realizadas, assim como sem a enzima, de forma a obter uma amostra controle que mostrasse as proteínas cuja presença e exposição à enzima não podemos evitar por serem provavelmente constitutivamente excretadas pelas células.

Em seguida, baseados no que é sugerido pelo fabricante dos reagentes, ajustamos o protocolo para a marcação com biotina das proteínas de interesse e, principalmente, o protocolo de enriquecimento das amostras marcadas, de forma a obter uma amostra tão livre de contaminação com proteínas citosólicas quanto possível, a qual foi em seguida validada por *immunoblotting*.

Uma vez obtidos protocolos eficazes para enriquecimento da nossa fração subcelular de interesse, seguimos para identificação por LC-MS/MS e comparamos a eficiência e características das proteínas obtidas por cada metodologia. O fluxograma encontra-se ilustrado na figura 10.

De posse da validação das abordagens na forma epimastigota, analisamos qualitativamente o proteoma da superfície celular de tripomastigotas e amastigotas axênicos obtido pela identificação por LC-MS/MS de alto rendimento.



**Figura 10.** Abordagem experimental para as análises do subproteoma de proteínas da superfície celular

## 4.2 Resultados e Discussão

### 4.3.1 Condições de incubação para tripsinização da superfície celular

Dado o objetivo de analisarmos especificamente o subproteoma da superfície celular de *T. cruzi* obtida pela incubação de células vivas com tripsina, e para evitarmos a contaminação devida à lise celular, várias condições de incubação dessas células foram testadas. A observação sistemática de amostras de epimastigotas incubados em uma solução com 20 µg de tripsina para 10<sup>9</sup> parasitos revelou que todas as células mantiveram sua motilidade após 30 min de incubação e até alguns eventos de replicação puderam ser observados neste tempo. No entanto, a 45 min de incubação alguns parasitos não se moviam e após 60 min estavam todos imóveis.

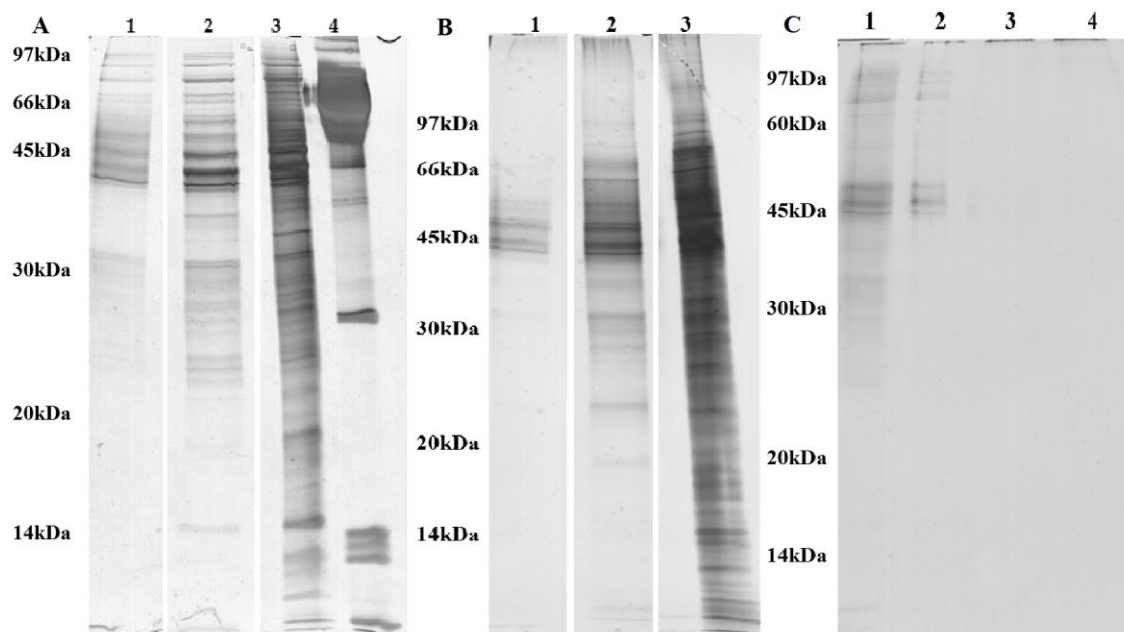
Em seguida o efeito das lavagens das células assim como dos tempos de incubação em diferentes tampões sem tripsina foram testados. As condições testadas estão resumidas na tabela 1, sendo que as células foram lavadas três vezes no mesmo tampão de incubação já a 28 °C e a remoção dos parasitos ocorreu da mesma forma descrita no protocolo final presente no **Material e Métodos**.

**Tabela 1.** Condições de incubação de epimastigotas sem tripsina

Condição	Tampão	Tempo de retirada dos parasitos	Concentração celular
<b>A</b>	TBS	imediatamente após ressuspensão	$1 \times 10^9$ células/mL
<b>B</b>	TBS	após 30 min de incubação	$1 \times 10^9$ células/mL
<b>C</b>	DMEM	imediatamente após ressuspensão	$1 \times 10^9$ células/mL
<b>D</b>	DMEM	após 30 min de incubação	$1 \times 10^9$ células/mL
<b>E</b>	DMEM	imediatamente após ressuspensão	$2,5 \times 10^8$ células/mL
<b>F</b>	DMEM	após 30 min de incubação	$2,5 \times 10^8$ células/mL

A análise por SDS-PAGE dos sobrenadantes de cultura de todas as condições testadas em TBS sem tripsina versus o meio LIT apresentam perfis distintos. A figura 11A mostra que as lavagens anteriores à incubação foram suficientes para remover as proteínas presentes no meio de cultura, no entanto os perfis eletroforéticos dos sobrenadantes se assemelhavam bastante ao extrato de proteínas solúveis em água do parasito, indicando uma porcentagem significativa de lise celular na incubação em TBS mesmo nas células removidas quase que imediatamente após a ressuspensão (**condição A**). Para testar a hipótese de que a lise é devida ao esgotamento de nutrientes, foram testadas as incubações em meio DMEM sem SFB (**condições C e D**), que mostraram também perfis semelhantes ao do extrato solúvel (figura 11B). Durante o experimento, o indicador de pH presente no meio DMEM mostrou uma rápida acidificação dentro de 60 min de incubação, sugerindo uma alta atividade metabólica dos parasitos e um conseqüente esgotamento nutricional do meio. Para evitar qualquer estresse metabólico, os parasitos foram incubados nas condições **E e F**, onde a concentração celular é quatro vezes menor. Assim, amostras das condições **C a F** foram submetidas a SDS-PAGE e coradas com prata (figura 11C) não mostrando qualquer banda protéica nas condições de menor concentração celular.

Baseados no resultado acima, para minimizarmos a lise celular e/ou estresse metabólico nos experimentos de tripsinização, parasitos na concentração de  $2,5 \times 10^8$  células/mL em DMEM foram incubados com tripsina por 30 min antes da identificação dos peptídeos trípticos liberados no meio.



**Figura 11.** Efeito de diferentes meios e concentração celular no perfil de proteínas liberados por epimastigotas. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12% e coradas com prata. **A)** incubação com TBS: **(1)** sobrenadante recolhido imediatamente após ressuspensão de parasitos lavados, **(2)** após incubação de parasitos ( $1 \times 10^9$  cels/mL) a  $28^\circ\text{C}$  por 30 min, **(3)** extrato de proteínas solúveis em água e **(4)** meio LIT com 5% SFB; **B)** incubação em DMEM: **(1)** sobrenadante recolhido imediatamente após ressuspensão de parasitos lavados, **(2)** incubação de parasitos ( $1 \times 10^9$  cels/mL) a  $28^\circ\text{C}$  por 30 min, **(3)** extrato de proteínas solúveis em água; **C)** Incubação em DMEM: sobrenadante recolhido imediatamente após ressuspensão com **(1)**  $1 \times 10^9$  cels/mL e com **(3)**  $2.5 \times 10^8$  cells/mL e após incubação a  $28^\circ\text{C}$  por 30 min com **(2)**  $1 \times 10^9$  cels/mL e **(4)**  $2.5 \times 10^8$  cels/mL.

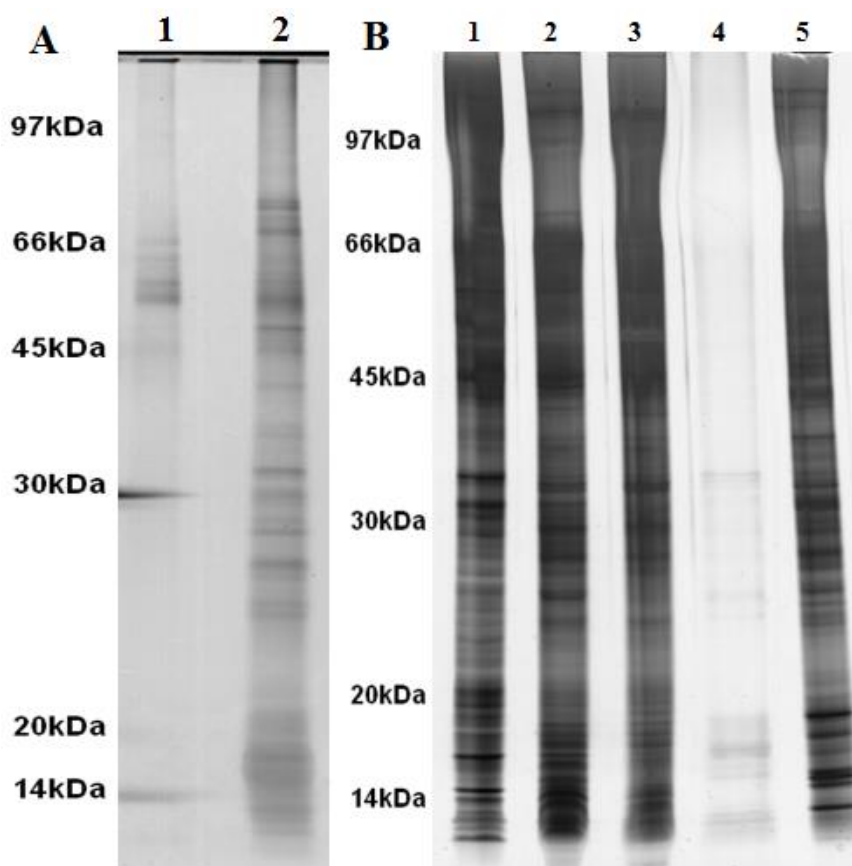
### ***4.3.2 Biotinilação da superfície celular e cromatografia de afinidade a estreptoavidina***

Para enriquecer proteínas intactas da membrana plasmática com seus domínios transmembrana ou âncoras, foi realizada uma cromatografia de afinidade de proteínas, quimicamente biotiniladas, da membrana plasmática em uma coluna de estreptoavidina imobilizada em bilhas de agarose. Para tentar manter intacta a estrutura terciária das proteínas, o que possibilitaria a realização de testes de atividades enzimáticas com as amostras, foi testada a eluição branda das proteínas biotiniladas por competição com moléculas livres de biotina. O perfil eletroforético (fig. 12A) mostra que essa abordagem não foi eficiente para eluir as proteínas da coluna, se comparado com a eluição com a solução de 8 M guanidina-HCl. De fato, o perfil eletroforético desta segunda eluição apresentou mais bandas protéicas e, portanto, foi mais eficiente. (fig. 12A).

Para a otimização do experimento, iniciamos com um protocolo baseado nas instruções do fabricante dos reagentes. Basicamente é o protocolo descrito no **Material e Métodos** exceto que a lise dos parasitos já biotinilados ocorreu diretamente na solução com 2% Triton X-100, portanto sem a remoção prévia do excesso de proteínas solúveis em água. Após o experimento, as frações cromatográficas foram analisadas por SDS-PAGE. Os perfis eletroforéticos mostraram padrões pouco distintos entre o extrato de proteínas solúveis em água, a fração de eluição com guanidina-HCl e o extrato de proteínas não ligadas à coluna, em especial acima de 45 kDa. No entanto, não foram observadas diferenças consideráveis entre a eluição com guanidina-HCl e a fração de proteínas não ligadas nas massas inferiores a 45 kDa. Assumindo que a pouca especificidade na cromatografia foi devida à alta complexidade da amostra e à baixa proporção de proteínas biotiniladas dentro do lisado, e tendo em mente que as proteínas da membrana plasmática podem ter baixa solubilidade em água, nós desenvolvemos um segundo protocolo de biotinilação e cromatografia (descrito em **Material e Métodos**). Neste protocolo foi adicionada uma etapa de lise das células marcadas em H<sub>2</sub>O milli-Q com inibidores de proteases e fosfatases seguido por duas lavagens também com H<sub>2</sub>O milli-Q para remoção do excesso de proteínas solúveis em água. A fração de proteínas eluídas com guanidina-HCl obtida por esse protocolo produziu um perfil distinto da fração de proteínas não ligadas à coluna (figura 12B), assim como das lavagens. Também é importante ressaltar que a presença de bandas na segunda lavagem demonstra a relevância das lavagens

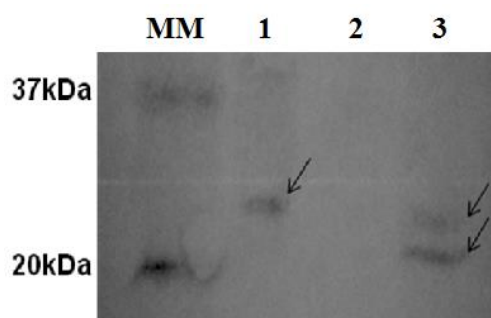
extensivas. O rendimento obtido por este método com  $5 \times 10^9$  parasitos foi em média 340  $\mu\text{g}$  de proteínas (quantificado com o kit *MicroBCA*).

Para validar a remoção do excesso de proteínas citosólicas por esse método, o extrato de proteínas solúveis em água, o eluído com guanidina-HCl e a fração de proteínas não ligadas à coluna foram submetidas a um *western blotting* com um anticorpo contra MTAP, uma conhecida proteínas citosólica solúvel em água (Neves, 2006) (figura 13). Este não mostrou qualquer banda na fração eluída com guanidina-HCl e confirma, assim, a habilidade do protocolo para remover as proteínas citosólicas



**Figura 12.** Frações da cromatografia de afinidade a estreptoavidina submetidas a SDS-PAGE 8-15%. **A)** Proteínas de epimastigotas ligadas à coluna e eluídas com **(1)** 5 mM biotina em 1% (v/v) Triton X-100 e com **(2)** 8 M guanidina-HCl; **B)** SDS-PAGE 8-15% das **(1)** proteínas solúveis em água de epimastigotas, **(2)** fração não ligada à coluna de estreptoavidina, **(3)** fração de lavagem com 1% (v/v) Triton X-100 em TBS, **(4)** lavagem com 1 M NaCl em 1% (v/v) Triton X-100 e **(5)** fração eluída com 8 M guanidine-HCl.



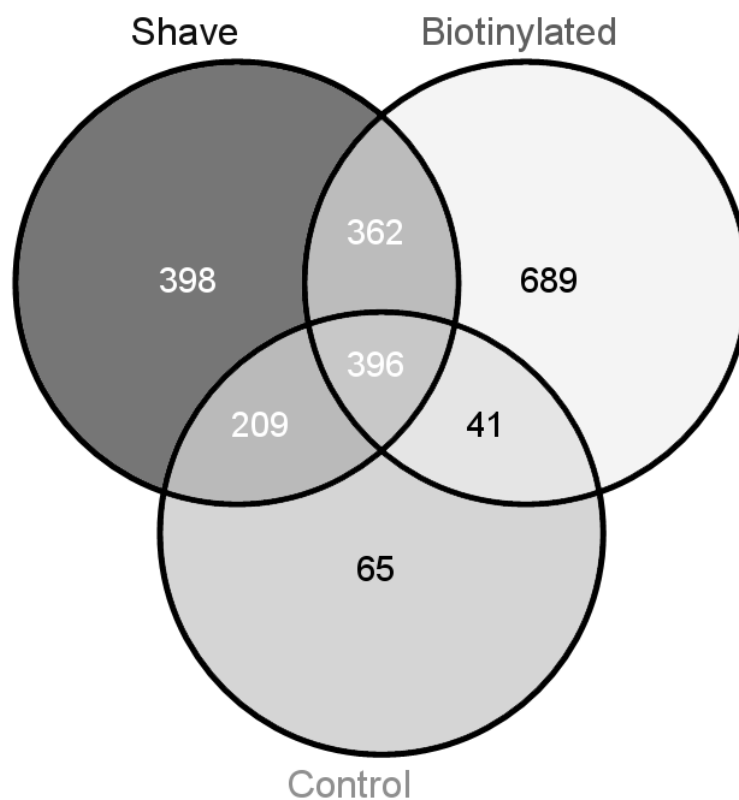


**Figura 13.** *Immunoblot* com soro anti-TcMTAP. (1) extrato solúvel em água, (2) Eluição com 8 M guanidine-HCl e (3) fração não ligada à coluna de estreptoavidina.

### 4.3.3 *Proteoma da superfície celular de epimastigotas*

Usando um espectrômetro de massas de última geração para abordagem proteômica, foram identificadas um total de 1488 proteínas da forma epimastigota usando o método de biotilação seguida de cromatografia de afinidade a estreptavidina, 1365 proteínas com de tripsinização da superfície celular (Shave) e 711 proteínas na amostra Controle. A figura 14 mostra a sobreposição entre as identificações por cada método.

Por meio de análise estatística da categoria de *Componente Celular* do *Gene Ontology* (GO), somente os termos *membrane*, *membrane part*, *integral to membrane* e *intrinsic to membrane* estavam estatisticamente super-representados na amostra Shave comparado com o Controle (tabela 2), o que prova que o método oferece de fato um enriquecimento significativo de proteínas de membrana. Além do mais, puderam ser detectadas 643, 550 e 239 proteínas com domínio transmembrana (predito *in silico*) nas amostras Biotinilada, Shave e Controle, respectivamente. Esta proporção surpreendente de proteínas transmembranares no Controle (~33%) pode ser em parte explicada pela já conhecida secreção de exossomas pelo parasito (Goncalves, Umezawa *et al.*, 1991; Trocoli Torrecilhas, Tonelli *et al.*, 2009). Nesta amostra, mais da metade das proteínas identificadas estão comumente associadas a esse tipo de vesícula, segundo a literatura (Olver e Vidal, 2007). Tais proteínas (*Clathrin heavy chain*, *enolase*, *Rab7*, *ubiquitin*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *hsp70* e *90*, *14-3-3 proteins*, *cyclophilin A*, *pyruvate kinase*, *tubulin  $\alpha$  e  $\beta$*  e *histones H2A, H2B, H3 e H4*) foram também identificadas no secretoma de *Trypanosoma brucei* (Geiger, Hirtz *et al.*), mas é importante notar que a proporção de proteínas secretadas naquele organismo, que possuem domínios transmembrana, é de cerca de 5%, significativamente inferior à encontrada por nós na amostra Controle em *T. cruzi*.



**Figura 14.** Diagrama de Venn das proteínas identificadas em cada conjunto de amostras de epimastigotas

**Tabela 2.** Termos GO super-representados no Shave de epimastigotas comparado com Controle

	Descrição	Count <sup>a</sup>	Ref. Count <sup>b</sup>	Raw p-value <sup>c</sup>	FDR p-value <sup>d</sup>
Componentes Celulares	<i>Membrane</i>	514	197	1.62E-8	8.83E-6
	<i>membrane part</i>	508	196	3.63E-8	8.83E-6
	<i>integral to membrane</i>	495	190	4.68E-8	8.83E-6
	<i>intrinsic to membrane</i>	495	190	4.68E-8	8.83E-6
Funções moleculares	<i>protein binding</i>	199	68	1.21E-4	1.82E-2

*a* número de vezes que esta característica ocorre no conjunto de dados de análise.

*b* número de vezes que esta característica ocorre no conjunto de dados de referência.

*c* o valor-p não tratado indicando a significância desta diferença na ocorrência dessas características entre os conjuntos de dados.

*d* a versão corrigida por FDR do valor-p não tratado.

É conhecido que epimastigotas podem sofrer morte celular programada e também apresentação de componentes autofágicos induzidos por privação de soro (Jimenez, Paredes *et al.*, 2008). A presença de histonas indica que vesículas apoptóticas podem estar sendo liberadas, mesmo que em condições de incubação que mantiveram a integridade celular durante os 30 min de incubação em DMEM. Mais ainda, a quantificação de proteínas por análise de aminoácidos revelou que a quantidade de proteínas na amostra Shave foi quatro vezes maior que na Controle nas duas replicatas biológicas.

Assim, os resultados mostram a necessidade de realizar ambos os experimentos (Shave e Controle) em paralelo para identificar seguramente a composição do proteoma da superfície celular, embora não possamos excluir a possibilidade de que proteínas presentes em ambas as amostras sejam, de fato, parte do repertório de proteínas da superfície celular. Um bom exemplo disso é a enolase. Esta proteína é anotada em banco de dados como citosólica e envolvida no metabolismo de carboidratos, mas foi encontrada na superfície celular de vários organismos procariotos e eucariotos (Pancholi e Fischetti, 1998; Ramajo-Hernandez, Perez-Sanchez *et al.*, 2007; Vanegas, Quinones *et al.*, 2007; Bhowmick, Kumar *et al.*, 2009), no secretoma/exoproteoma de organismos patogênicos (Geiger, Hirtz *et al.*; Hurmalainen, Edelman *et al.*, 2007; Jones e Holt, 2007; Ringqvist, Palm *et al.*, 2008; Silverman, Chan *et al.*, 2008; Liu, Cui *et al.*, 2009; Atyame Nten, Sommerer *et al.*, 2010; Silverman, Clos *et al.*, 2010) onde tem papel na virulência e possivelmente também em parasitos tripanosomatídeos (revisado em (Avilan, Gualdron-Lopez *et al.*, 2011)). Esta proteína não tem peptídeo sinal nem região de âncora, mas pode ser secretada por vias não-clássicas (Geiger, Hirtz *et al.*, 2010).

Um grande número de proteínas na amostra Biotinilada não foi encontrado no Shave, portanto o uso de ambos os métodos oferece uma visão mais abrangente do conjunto de proteínas da superfície celular. A sobreposição entre as identificações das amostras Controle e Biotinilada reforça o argumento que algumas proteínas presentes no Controle (portanto supostamente excretadas) são também encontradas na membrana plasmática ou fortemente associadas a esta, já que na amostra Biotinilada, as células foram lavadas após a marcação com biotina, a maioria das proteínas solúveis em água foi removida depois da lise e as proteínas marcadas e ligadas à coluna foram extensivamente lavadas com uma solução de alta força iônica (1 M NaCl). Estas lavagens têm o propósito de remover proteínas fracamente ligadas a proteínas biotiniladas assim como aquelas ligadas inespecificamente à própria coluna.

Como vários passos de lavagem foram incluídos para remover proteínas que se ligam fracamente às proteínas marcadas com biotina, assim como para remover aquelas ligadas inespecificamente à própria coluna, nós realizamos um *immunoblotting* com um soro contra a proteína citosólica TcMTAP para testar a eficiência dos procedimentos de lavagem na remoção desse grupo de proteínas. A ausência de bandas marcadas na fração purificada (figura 14) validou o procedimento.

Um trabalho prévio usou o nível de expressão relativa da histona H2B entre duas condições, usando SILAC, para separar o conjunto de proteínas a serem consideradas, naquele caso, secretadas dentre aquelas que estão presentes devido à lise (Silverman, Chan *et al.*, 2008). No entanto, a histona H2B já foi detectada no proteoma da superfície celular de linhagens de melanomas metastáticos humanos e tiveram sua localização confirmada por análise imunocitoquímica (Qiu e Wang, 2008). Nós também identificamos diferentes tipos de histonas nas amostras Shave e Biotinilada, mas o papel que essas proteínas podem ter na membrana plasmática de epimastigotas é desconhecido.

Na comparação dos termos do GO das proteínas das amostras Shave e Biotinilada, somente os termos *molecular function* e *binding* estão estatisticamente subrepresentados na amostra Biotinilada e ambas as amostras compartilham 85 KEGG pathways, mas somente 3 (*Phosphonate and phosphinate metabolism*, *Biotin metabolism* e *Porphyrin and chlorophyll metabolism*) e 5 (*Ether lipid metabolism*, *Vitamin B6 metabolism*, *Peptidoglycan biosynthesis*, *Riboflavin metabolism* and *Other glycan degradation*) pathways exclusivamente encontrados em Shave e Biotinilada, respectivamente. Portanto, não foi evidenciada qualquer tendência de algum dos métodos para algum grupo de proteínas.

#### **4.3.4 Conclusões a respeito das metodologias empregadas**

Embora usadas condições ideais de incubação nos experimentos de tripsinização, que a nosso ver preveniram a contaminação extensiva com proteínas citosólicas devido a lise celular e/ou estresse metabólico, a amostra Controle ainda apresentou um grande número de proteínas das quais mais de um terço tem domínios transmembranares preditos. Existem evidências de que essas proteínas sejam devidas à secreção/excreção vesicular natural do parasito e/ou em resposta fisiológica à privação de soro, o qual não pode ser evitado, uma vez que não foram observados parasitos mortos ao microscópio. De qualquer forma, o rendimento na amostra Shave foi quatro vezes maior que na amostra Controle em ambas replicatas biológicas e os termos GO relacionados a componentes de membrana

celular são estatisticamente super-representados. Portanto, provavelmente a grande maioria das proteínas identificadas na amostra Shave nessas condições estão presentes na membrana plasmática do parasito ou associadas a ela, mas é aconselhável analisar a amostra Controle em paralelo e excluir as identificações em comum, se existir interesse apenas no conjunto de proteínas da membrana plasmática que não são secretadas.

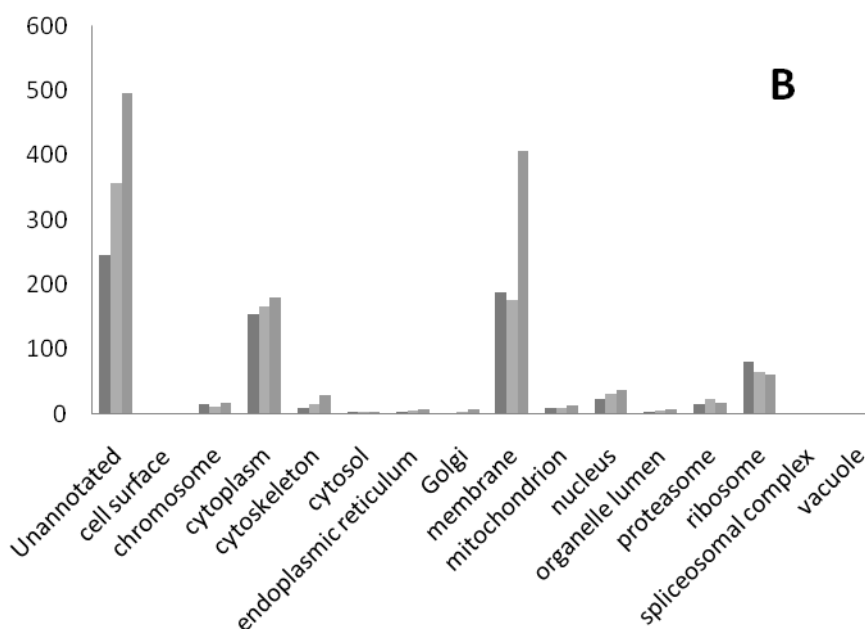
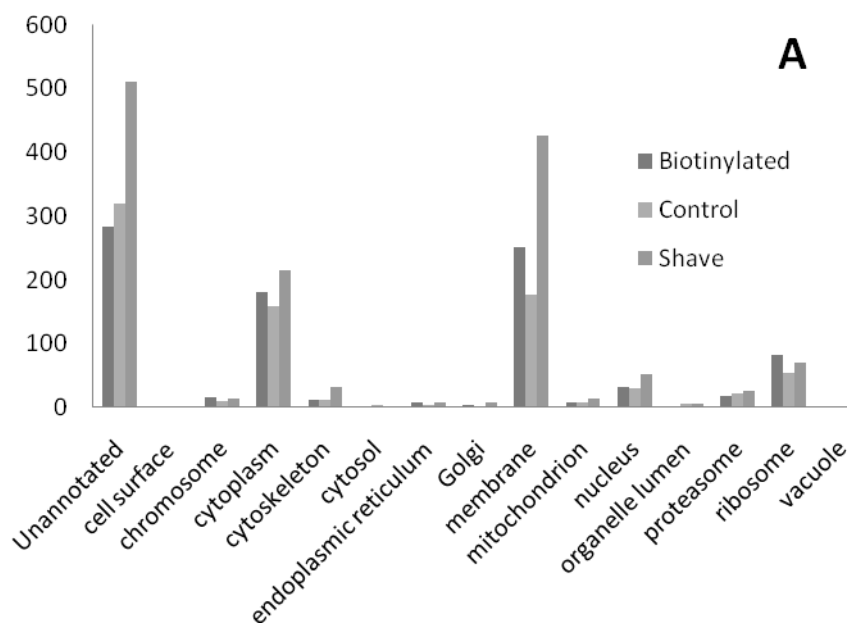
O processo de biotinylação seguido por cromatografia de afinidade a estreptoavidina foi comprovadamente bem sucedido no enriquecimento de proteínas da superfície celular e manteve a estrutura primária dessas proteínas, o que torna a abordagem bastante aconselhável àqueles interessados na análise, por exemplo, do fosfoproteoma da membrana plasmática. Contudo, a necessidade de remoção dos detergentes e sais, necessários na solubilização e eluição, levaram a significativas perdas na quantidade de amostra. Também é importante mencionar que esta técnica requer uma grande quantidade inicial de células, portanto pode não ser a melhor opção com amostras escassas.

As duas abordagens foram bem sucedidas para acessar o proteoma da superfície celular de epimastigotas e fornecem visão complementares desse subproteoma e nenhuma delas mostrou uma tendência a qualquer grupo funcional de proteínas. Desta forma, foi realizado, no nosso conhecimento, pela primeira vez uma análise proteômica abrangente das proteínas relacionadas à membrana plasmática.

#### ***4.3.5 Comparação do subproteoma de superfície celular das formas tripomastigota e amastigota***

As técnicas de biotinylação de proteínas da superfície celular seguido por purificação por cromatografia de afinidade e de tripsinização de parasitos intactos sob as mesmas condições padronizadas e validadas com epimastigotas (exceto a temperatura de incubação de 37 °C ao invés de 28 °C, por razões fisiológicas), foram usadas para estudar o proteoma da superfície celular das formas tripomastigotas e amastigotas presentes no hospedeiro mamífero.

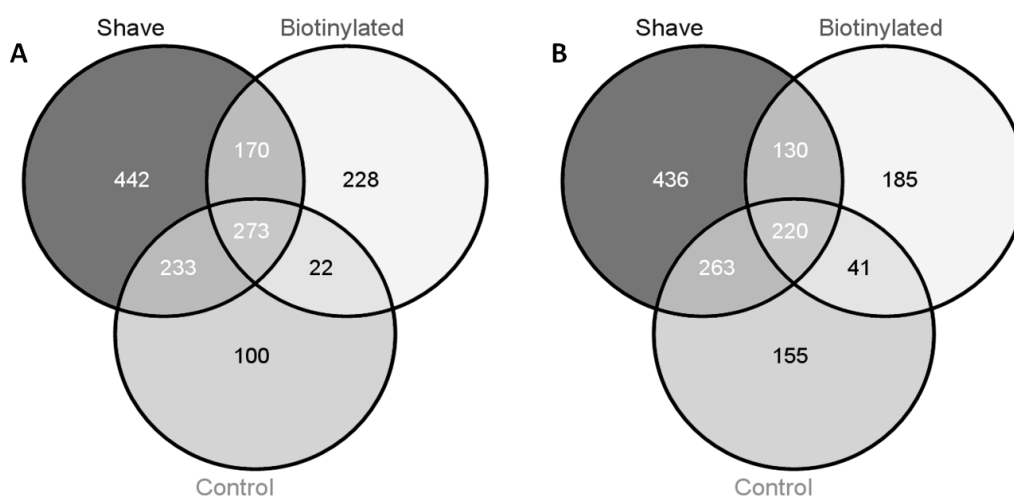
A análise dos termos GO das identificações de tripomastigotas e amastigotas pelas metodologias de tripsinização e biotinylação de proteínas da superfície celular também demonstraram o enriquecimento de proteínas membranares por estas metodologias para ambas as formas de vida do parasito (fig. 15)



**Figura 15.** Termos GO slim de componente celular das proteínas identificadas na forma amastigota (A) e tripomastigota (B). Eixo Y representa o número de grupos de proteínas.

Para as formas tripomastigota e amastigota, respectivamente, foram identificados pela técnica de tripsinização da superfície (Shave) 1049 e 1118 grupos de proteínas distintos e nas respectivas amostras Controle, 679 e 626 proteínas. A biotilação das proteínas da superfície celular seguido da purificação por cromatografia de afinidade forneceu, respectivamente, 576 e 693 identificações em cada forma do parasito. As amostras de Shave e Controle foram analisadas em duplicata biológica.

Do mesmo modo que em epimastigotas, houve pouca sobreposição entre as identificações obtidas por cada metodologia (figura 16). A porcentagem de proteínas com domínio transmembrana predito presentes em cada amostra também foi bastante significativa em ambas as formas de vida (tabela 3).



**Figura 16.** Diagrama de Venn das proteínas identificadas em cada conjunto de amostras de amastigotas (A) e tripomastigotas (B)

**Tabela 3.** Quantidade de proteínas com domínio transmembrana preditos.

Amostra de origem	Amastigotas	Tripomastigotas
<i>Biotinylated</i>	268 (38,7 %) <sup>a</sup>	200 (34,7 %) <sup>a</sup>
<i>Shave</i>	455 (40,7 %) <sup>a</sup>	427 (40,7 %) <sup>a</sup>
<i>Control</i>	213 (34,0 %) <sup>a</sup>	202 (29,7 %) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> porcentagem em relação ao número total de identificações em cada amostra.

A alta porcentagem de proteínas com domínios transmembrana na amostra Controle corrobora dados da literatura que relatam a liberação de vesículas por tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas derivados de cultura de células, sendo que tais vesículas carregam fatores de virulência como membros da família TS e que tais vesículas aumentam o parasitismo e inflamação (Goncalves, Umezawa *et al.*, 1991; Trocoli Torrecilhas, Tonelli *et al.*, 2009; Bayer-Santos, Aguilar-Bonavides *et al.*, 2012). A respeito da forma amastigota, ainda está para ser determinado se também ocorre liberação de vesículas semelhantes, seja pela forma intracelular ou pela forma axênica, mas a grande porcentagem de proteínas com domínios transmembrana identificadas em nossa amostra consiste em uma forte evidência.

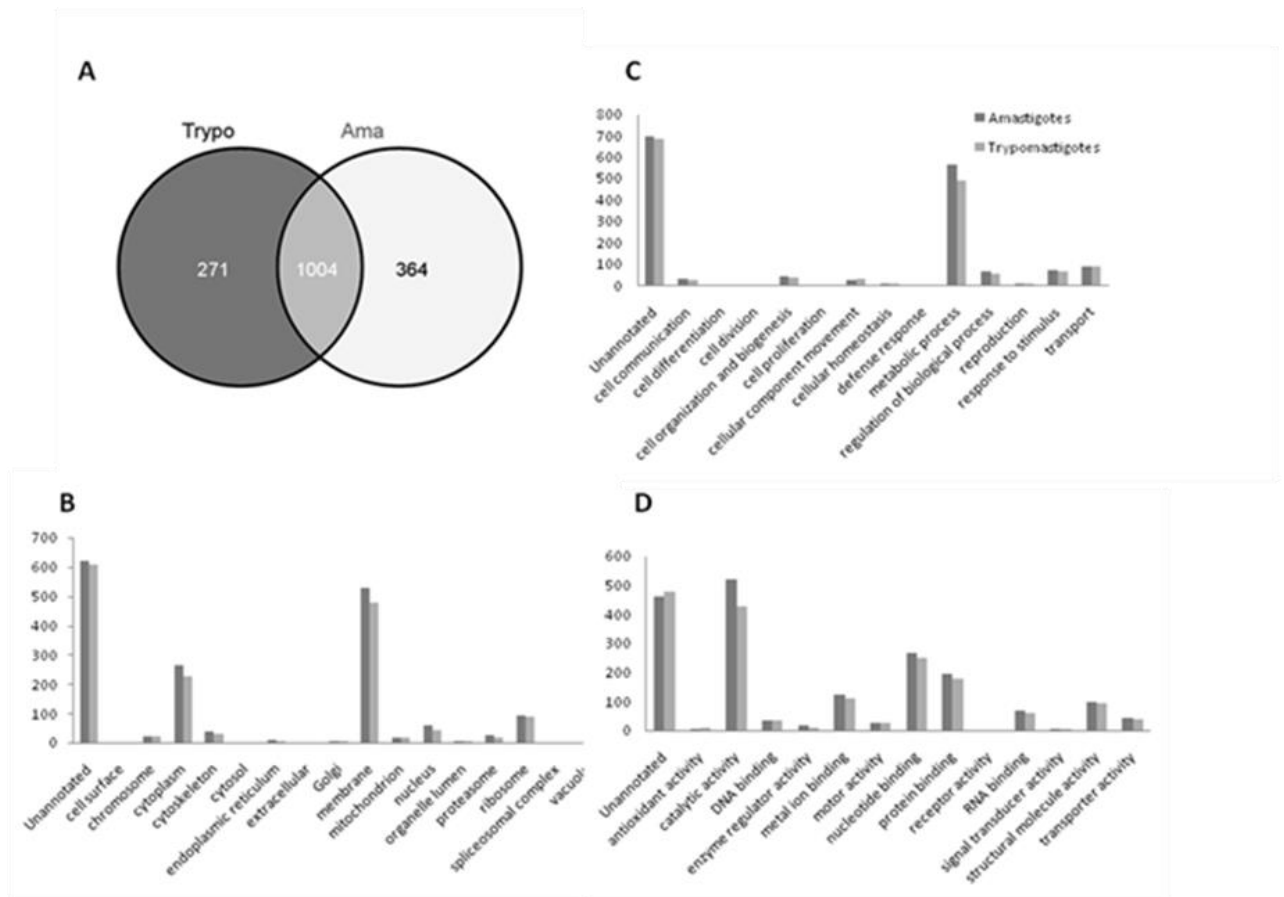
Como o âmbito de nossas análises agora não mais se refere às características e diferenças entre as identificações obtidas por cada metodologia, como o foi no tópico anterior com a forma epimastigota, nós agrupamos as identificações presentes na amostra Shave e Biotinilada denominando-as daqui por diante como Proteínas de Superfície, independente se algumas das proteínas também estejam presentes na amostra Controle.

Conforme mostrado na figura 17A, as formas tripomastigota e amastigota compartilham a vasta maioria das proteínas da superfície celular e nenhuma das categorias possui qualquer componente estatisticamente super-representado entre as duas formas de vida do parasito. Dentre as proteínas anotadas, o componente celular de membrana e proteínas relacionadas a processos metabólicos são as mais abundantes.

É sabido que a importância das proteínas da superfície celular vai muito além da regulação de processos metabólicos e homeostase celulares. Para parasitos como o *T. cruzi*, a adesão aos tecidos de hospedeiros e a degradação de componentes extracelulares para garantir acesso às células e aumentar a eficiência na infecção são também questões primordiais. A proeminente abundância de proteínas classificadas na categoria de Função Molecular (fig. 17D) com os termos *protein binding* e *catalytic activity* mostram o grande engajamento do subproteoma da superfície nos processos supracitados e a quantidade de proteínas ligantes de nucleotídeos sugere um alto gasto energético dispensado a eles.

Devido ao significativo número de proteínas não anotadas, foi empregado o *software* Blast2GO para obtermos um maior e mais abrangente detalhamento de nossas amostras, as quais serão tratadas em assuntos específicos nos tópicos seguintes.



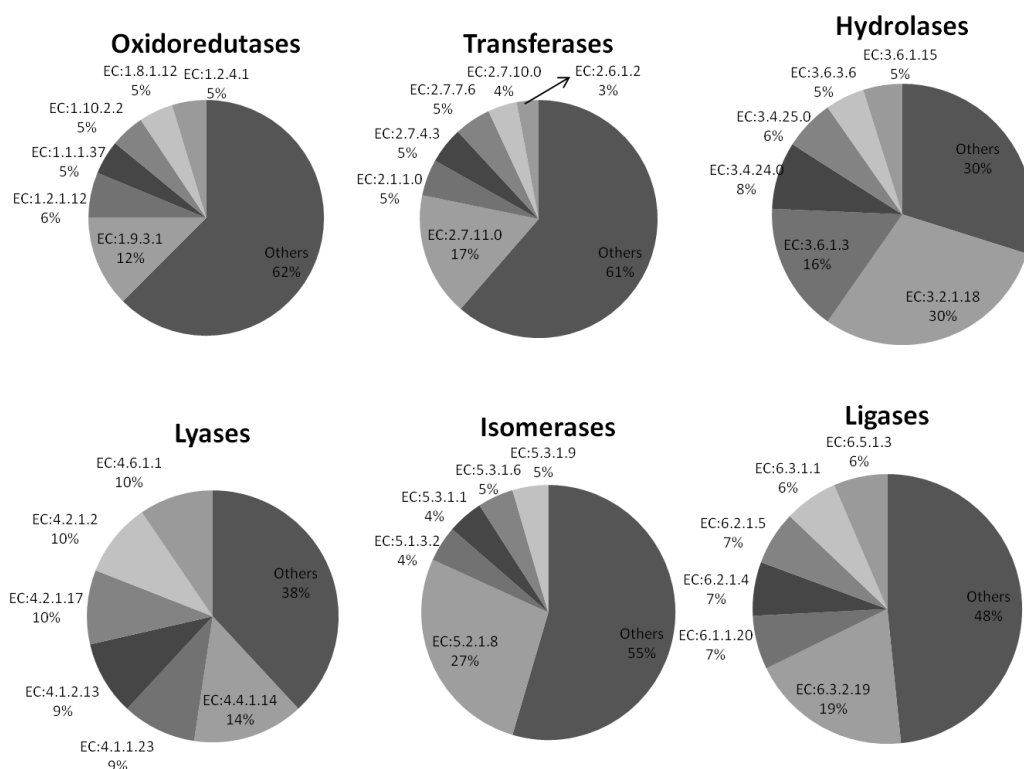


**Figura 17.** Comparação entre os proteomas da superfície celular de tripomastigotas e amastigotas. Diagrama de Venn das identificações em cada forma de vida (A) e termos GO slim (software ProteinCenter) de componente celular (B), processo biológico (C) e função molecular (D) das proteínas identificadas. Eixo Y representa o número de grupos de proteínas.

#### 4.3.6 Reações catalisadas por proteínas da superfície celular

Cada uma das formas de vida do *T. cruzi* presentes em humanos possui representantes de todos os seis grandes grupos de atividade catalítica de enzimas, com a forma amastigota possuindo o maior número de classes e representantes de cada classe enzimática. Numa visão geral (fig. 18), o grupo de atividade hidrolásica (EC:3) é o mais representativo, com 144 proteínas identificadas abrangendo 29 classes, cuja mais freqüente é a exo- $\alpha$ -sialidase (EC:3.2.1.18). Porém as transferases (EC:2) são o grupo mais diversificado, com 101 representantes e 57 classes de atividade catalítica. Nesse grupo, as proteínas Ser/Thr-cinases (EC:2.7.11) são as mais abundantes com 17 representantes dos quais 4 e 3 proteínas foram identificadas exclusivamente em amastigotas e tripomastigotas,

respectivamente. Adenilato cinases (EC:2.7.4.3), que têm um papel importante na homeostase energética da célula, possuem 5 representantes identificados todos em ambas as formas de vida do parasito. Tyr-cinases (EC:2.7.10), cuja atividade regula funções celulares primordiais como a divisão celular e transdução de sinais, vêm em seguida com seus 4 representantes dos quais a MAPK putativa (gi|407834743) foi exclusiva de amastigotas possuindo um domínio transmembranar predito, mas também foi identificada no controle.



**Figura 18.** Abundância relativa das classes enzimáticas mais frequentes em cada um dos principais grupos de classificação presentes no proteoma da superfície celular de tripomastigotas e amastigotas.

Diversas classes de atividade catalítica foram encontradas exclusivamente em uma das formas de vida do parasito, sendo que a forma amastigota possui 39 classes e tripomastigotas, 13 classes (tabela 4).

A maior parte dessas enzimas catalisa reações de vias metabólicas, especialmente de lipídeos e de carboidratos. Dessa grande diversidade de enzimas envolvidas em reações de diversos pontos de vias metabólicas apresentadas pelos amastigotas, podemos inferir

que o parasito encontra-se preparado para interferir ativamente no metabolismo da célula hospedeira e possivelmente dispõe, devido a isso, de variadas fontes nutricionais. Também é importante ressaltarmos que enzimas ligadas ao metabolismo de lipídeos têm sido descritas como participantes fundamentais no processo de amastigogênese, como, por exemplo, um tipo de fosfolipase C ancorada a membrana e específica para fosfoinosítídeos (Nozaki, Toh-E *et al.*, 1999; Furuya, Kashuba *et al.*, 2000), que participa da via de ativação por  $Ca^{2+}$  liberando os mensageiros intracelulares diacilglicerol e inositol-3-fosfato. E já foram descritas mudanças nos perfis lipídicos durante a amastigogênese, como aumento na produção e remodelação de inositolfosfoceramida e fosfatidilinositol, pela ação de fosfolipases e transferases, e o aumento nos níveis de ceramida livre na forma amastigota, um dos principais constituintes da âncora do antígeno de superfície amastigota-específico Ssp-4 (Bertello, Andrews *et al.*, 1996; Salto, Bertello *et al.*, 2003).

Tripomastigotas apresentaram enzimas membranares envolvidas na glicólise, respiração e biosíntese de fosfolipídeos como a glicerol-3-fosfato putativa (gi|407859729, EC:1.1.5.3). Também enzimas superóxido dismutase (EC:1.15.1.1) já descritas como um antígeno secretado soro-prevalente (Lopez-Cespedes, Longoni *et al.*, 2012), cuja atividade protege o parasito contra o estresse oxidativo, o ataque com radicais superóxido por parte de células sanguíneas do hospedeiro (Mateo, Marin *et al.*, 2008) e representa um fator de virulência e potencial alvo de drogas anti-parasitárias (Piacenza, Peluffo *et al.*, 2012).

**Tabela 4.** Tipos de enzimas encontradas exclusivamente no proteoma da superfície celular de amastigotas ou tripomastigotas.

Enzyme Nomenclature	Enzyme Codes	Life Form
phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	EC:1.1.1.44	A
sterol 14-demethylase	EC:1.14.13.70	T
acyl-CoA dehydrogenase	EC:1.3.99.3	A
hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)	EC:1.1.1.34	T
glucose-6-phosphate dehydrogenase	EC:1.1.1.49	A
glycerol-3-phosphate dehydrogenase (quinone)	EC:1.1.5.3	T
glutathione peroxidase	EC:1.11.1.9	T
squalene monooxygenase	EC:1.14.99.7	A
superoxide dismutase	EC:1.15.1.1	T
aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+)	EC:1.2.1.5	T
pyrroline-5-carboxylate reductase	EC:1.5.1.2	A

peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	EC:1.8.4.11	A
Transferring groups other than amino-acyl groups	EC:2.3.1.0	A
cysteine synthase	EC:2.5.1.47	A
hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase	EC:2.1.1.114	T
3-demethylubiquinone-9 3-O-methyltransferase	EC:2.1.1.64	T
fatty-acid synthase	EC:2.3.1.85	A
glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase	EC:2.3.1.97	T
adenine phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.7	A
uracil phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.9	T
methionine adenosyltransferase	EC:2.5.1.6	A
tyrosine transaminase	EC:2.6.1.5	A
glucokinase	EC:2.7.1.2	A
pyruvate kinase	EC:2.7.1.40	A
Nucleotidyltransferases	EC:2.7.7.0	T
mannose-1-phosphate guanylyltransferase	EC:2.7.7.13	A
mannose-1-phosphate guanylyltransferase (GDP)	EC:2.7.7.22	A
diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase	EC:2.7.8.1	T
Serine proteases	EC:3.4.21.0	A
acetylornithine deacetylase	EC:3.5.1.16	A
calf thymus ribonuclease H	EC:3.1.26.4	A
fructose-bisphosphatase	EC:3.1.3.11	A
Sulfuric Ester Hydrolases	EC:3.1.6.0	A
Metallocoxy-peptidases	EC:3.4.17.0	A
guanine deaminase	EC:3.5.4.3	A
kynureninase	EC:3.7.1.3	A
cystathionine b-synthase	EC:4.2.1.22	A
urocanate hydratase	EC:4.2.1.49	A
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	EC:4.2.99.18	A
histidine ammonia-lyase	EC:4.3.1.3	A
UDP-glucose 4-epimerase	EC:5.1.3.2	A
triose-phosphate isomerase	EC:5.3.1.1	A
ribose-5-phosphate isomerase	EC:5.3.1.6	A
glucose-6-phosphate isomerase	EC:5.3.1.9	A
phosphoglucomutase	EC:5.4.2.2	A
phosphomannomutase	EC:5.4.2.8	A
phosphoenolpyruvate mutase	EC:5.4.2.9	A
DNA topoisomerase	EC:5.99.1.2	T

aspartate-tRNA ligase	EC:6.1.1.12	A
acetate-CoA ligase	EC:6.2.1.1	A
biotin carboxylase	EC:6.3.4.14	A
acetyl-CoA carboxylase	EC:6.4.1.2	A

---

#### 4.3.7 Hidrolases e Proteases da superfície celular

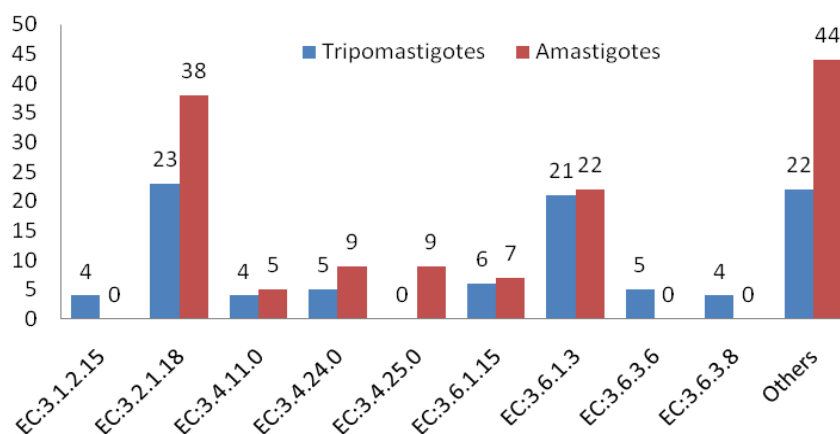
Aqui as proteínas classificadas como Hidrolases (EC:3.) e também, mais especificamente, as Proteases (EC:3.4.) foram analisadas mais profundamente devido à já mencionada importância das mesmas na interação parasito-hospedeiro e na infecção.

Surpreendentemente a forma amastigota apresentou a maior diversidade e quantidade de hidrolases e proteases. Dentre as classes mais abundantes (fig. 19), enzimas treonina endopeptidases (EC:3.4.25.0) foram identificadas exclusivamente em amastigotas, ao passo que enzimas ubiquitina tiosesterases (EC:3.1.2.15), ATPases exportadoras de prótons (EC:3.6.3.6) e ATPases transportadoras de cálcio (EC:3.6.3.8), somente em tripomastigotas.

Enzimas exo- $\alpha$ -sialidases (EC:3.2.1.18) representam a classe mais representativa em ambos subproteomas e são quase duas vezes mais abundantes em amastigotas que em tripomastigotas. Tal representatividade é largamente devida às trans-sialidases e glicoproteínas com sítio ativo de sialidase identificadas nesses parasitos. As ATPases (EC:3.6.1.3) são também bastante abundantes, embora sejam em quase sua totalidade compartilhadas por ambas as formas de vida do *T. cruzi*, exceto a *Ribonuclease L inhibitor, putative* (gi|322830647) detectada somente em amastigotas.

A respeito das proteínas exclusivamente identificadas em amastigotas (tabela 5) e tripomastigotas (tabela 6), ambas são dominadas por diversas TS e glicoproteínas, as quais possivelmente consistem nos conhecidos antígenos exclusivos de cada forma, porém várias dessas proteínas não possuem domínio transmembranar predito. Além do mais, algumas também foram identificadas nos controles, sendo estas componentes não confiáveis do repertório de proteínas da superfície celular, apesar de poderem estar associadas não-covalentemente à proteínas da membrana ou à própria bicamada lipídica.

Curiosamente, amastigotas apresentaram proteínas inibidoras de ribonucleases putativas (gi|322830647) provavelmente presas à superfície por um domínio transmembrana e também ribonucleases HIII putativas (gi|407843696), estas também com atividade serino proteásica (EC:3.4.21.0), porém os motivos da expressão de proteínas com atividades aparentemente antagônicas permanecem desconhecidos.



**Figura 19.** Comparação entre as subclasses de atividade enzimática hidrolásica (EC 3) presentes no proteoma da superfície celular de tripomastigotas e amastigotas.

**Tabela 5.** Hidrolases identificadas exclusivamente na superfície de amastigotas.

ID (Uniprot)	Descrição	TM <sup>a</sup>	Enzyme Codes
Q71MD6	80 kDa prolyl oligopeptidase	0	EC:3.4.21.0
A0PGB9	85 kDa surface glycoprotein	1	EC:3.2.1.18
E7L0Q3	acetylornithine deacetylase-like, putative	0	EC:3.5.1.16
Q8ITG1	amastigote cytoplasmic antigen	1	EC:3.2.1.18
E7LIQ6	aminopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MG, Family M24, putative	0	EC:3.4.11.0
P25779	Cruzipain	0	EC:3.4.22.0
E7L0T6	Glutamamyl carboxypeptidase, putative	0	EC:3.5.1.16
E7LCS9	guanine deaminase, putative	1	EC:3.5.4.3
E7LJR0	hypothetical protein TCSYLVI0_006396	1	EC:3.1.3.16
O61097	hypothetical protein, conserved	4	EC:3.1.6.0
E7LA29	kynureninase, putative	2	EC:3.7.1.3
Q2VLK7	metacaspase 3	2	EC:3.4.22.0
Q6ZXC0	Metalloprotease	1	EC:3.4.17.0
E7LB45	mitochondrial ATP-dependent zinc metalloprotease	2	EC:3.6.1.15
E7L7V0	Peptidase, putative	2	EC:3.4.24.0
E7LF15	phosphomannomutase, putative	0	EC:3.1.3.11, EC:5.4.2.8
E7LH12	proteasome alpha 1 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0
E7KWU5	proteasome alpha 2 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0, EC:3.4.24.0
E7KWW2	proteasome alpha 5 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0
E7KYQ4	proteasome alpha 7 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0
E7LLV5	proteasome beta-1 subunit, putative	1	EC:3.4.25.0
E7KWY5	Proteasome subunit alpha type	1	EC:3.4.25.0

E7L503	Proteasome subunit alpha type	0	EC:3.4.25.0
P92188	Proteasome subunit alpha type-1	0	EC:3.4.25.0
E7L5A7	Putative uncharacterized protein	2	EC:3.1.3.0
E7L129	ribonuclease HII, putative	0	EC:3.1.26.4, EC:3.4.21.0
E7KWF2	Ribonuclease L inhibitor, putative	1	EC:3.6.1.3
Q03625	sialidase, partial	2	EC:3.2.1.18
Q26853	surface glycoprotein	1	EC:3.2.1.18
Q2VYD0	surface glycoprotein Tc-85/16	1	EC:3.2.1.18
Q2VYC9	surface glycoprotein Tc-85/19	0	EC:3.2.1.18
Q9NG33	surface protease GP63, putative	0	EC:3.4.24.0
Q86DL8	surface protein-2	1	EC:3.2.1.18
Q8T2W4	Tcc1i14-2.1	4	EC:3.4.24.0
E7L3G9	Thimet oligopeptidase, putative	1	EC:3.4.24.0
E7KY86	trans-sialidase, putative	4	EC:3.2.1.18
E7KZ25	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
E7L092	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
E7L0A8	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
E7L0B8	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
E7L3F5	Trans-sialidase, putative	1	EC:3.2.1.18
E7L3S5	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
E7L3T3	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
E7L5S1	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
E7L6N9	Trans-sialidase, putative	1	EC:3.2.1.18
F1D695	trans-sialidase	0	EC:3.2.1.18
Q7YZX6	Unknown	3	EC:3.2.1.18
Q7YZX9	Unknown	0	EC:3.2.1.18

*a* número de domínios transmembranares preditos.

**Tabela 6.** Hidrolases identificadas exclusivamente na superfície de tripomastigotas.

ID (Uniprot)	Descrição	TM <sup>a</sup>	Enzyme Codes
A5JUX4	surface protein-2	1	EC:3.2.1.18
B3VSM7	trans-sialidase	1	EC:3.2.1.18
E7L8U7	ubiquitin hydrolase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	2	EC:3.1.2.15
E7L652	Trans-sialidase, putative	0	EC:3.2.1.18
A7BI39	glycoprotein 82 kDa	1	EC:3.2.1.18
Q26968	trans-sialidase	1	EC:3.2.1.18
G4WJZ8	vacuolar ATP synthase subunit B	0	EC:3.6.3.6
E7LAD4	ubiquitin hydrolase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	0	EC:3.1.2.15
E7KZH2	Phosphatase-like protein, putative	0	EC:3.1.3.0
O61109	cysteine peptidase, putative	1	EC:3.4.22.0

*a* número de domínios transmembranares preditos.

A respeito especificamente das peptidases presentes nos parasitos (tabela 7), ambas as formas possuem representantes com atividade treonina endopeptidásica (EC:3.4.25.0), aminopeptidásica (EC:3.4.11.0), metalopeptidásica (EC:3.4.24.0), ômega peptidásica (EC:3.4.19.0) e cisteíno-proteásica (EC:3.4.22.0), sendo esta a atividade do único representante exclusivamente presente em tripomastigotas, porém cuja atividade também é desempenhada por outras duas enzimas de amastigotas. Os amastigotas além dessas também possuem uma metalocarboxipeptidase (EC:3.4.17.0), que embora fosse detectada no controle, possui domínio transmembrana, ao passo que a serino-protease (EC:3.4.21.0) presente é a enzima POP Tc80, a qual não apresenta predição de ancora GPI ou domínio transmembrana e já foi sugerida como secretada por tripomastigotas e envolvida na invasão celular (Bastos, Grellier *et al.*, 2005). Em nossas condições experimentais, de fato ela estava presente no controle, ou seja, teria um nível basal de secreção. No entanto encontramos a POP Tc80 associada à superfície somente em amastigotas porque ela teria talvez uma outra função nesta forma ou porque a invasão pelos amastigotas extracelulares seria mais dependente da POP Tc80 que a invasão por tripomastigotas, porém sabe-se que ela é mais expressa em amastigotas que em tripomastigotas.

Os componentes da superfície celular dos parasitos identificados aqui também incluem potenciais elementos atuantes em vias metabólicas das células hospedeiras para evitar a degradação dos parasitos e/ou a exposição de antígenos para o sistema imune pela célula. Por exemplo existem enzimas Thimet oligopeptidase, putativas (TOP), conhecidas por atuarem na degradação de peptídeos liberados por proteassomas limitando, assim, a apresentação de antígenos do parasito por moléculas do MHC de classe I (York, Mo *et al.*, 2003) e também proteínas com atividade ubiquitina hidrolase ou deubiquitinases, que além do papel na regulação pós-traducional da expressão de proteínas, já foram descritas como inibidoras da produção de NF- $\kappa$ B em células infectadas por vírus (Zheng, Chen *et al.*, 2008) e em macrófagos (Zhou, Monack *et al.*, 2005). NF- $\kappa$ B tem frequentemente sido referido como um mediador central da resposta imune, uma vez que uma variedade de patógenos leva à sua ativação, que por sua vez controla a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, receptores imunes e moléculas de adesão da superfície celular (Li e Stark, 2002).

De fato, podemos observar maior diversidade de proteínas com atividade ubiquitina hidrolásica em tripomastigotas e em amastigotas, maior representatividade de Thimet oligopeptidases. É conhecida a interferência do *T. cruzi* na formação do imunoproteassoma



das células infectadas, de forma a evitar a exposição de antígenos do parasito para o sistema imune (Maçaneiro, 2008) e podemos, em parte, supor a atuação dessas moléculas de superfície nesse processo.

**Tabela 7.** Proteases classificadas com *EC* presentes no proteoma de superfície do parasito.

ID (Uniprot)	Forma de Vida	Descrição	TM <sup>b</sup>	Código de Enzima
Q6ZXC0	A*	Metalloprotease	1	EC:3.4.17.0
E7L126	T* and A*	proteasome beta 2 subunit, putative	1	EC:3.4.25.0
Q9NG33	A	surface protease GP63, putative	0	EC:3.4.24.0
E7LH12	A*	proteasome alpha 1 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0
E7KWH0	TA	Methionine aminopeptidase	0	EC:3.4.11.0
P92188	A*	Proteasome subunit alpha type-1	0	EC:3.4.25.0
E7L3G8	T* and A*	Thimet oligopeptidase, putative	1	EC:3.4.24.0
E7KYG3	T and A*	mitochondrial processing peptidase alpha subunit	0	EC:3.4.24.0
E7KWU5	A*	proteasome alpha 2 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0
E7KQY5	A*	Proteasome subunit alpha type	1	EC:3.4.25.0
E7KYQ4	A*	proteasome alpha 7 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0
E7L4J2	T and A	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C12, putative	0	EC:3.1.2.15; EC:3.4.19.0
P25779	A*	Cruzipain	0	EC:3.4.22.0
E7LLD9	T* and A	mitochondrial processing peptidase alpha subunit	0	EC:3.4.24.0
Q71MD6	A*	80 kDa prolyl oligopeptidase	0	EC:3.4.21.0;
E7L503	A*	Proteasome subunit alpha type	0	EC:3.4.25.0
B5U6U4	T and A	AAA ATPase-like protein G8	1	EC:3.4.24.0; EC:3.6.1.3
Q2VLK7	A	metacaspase 3	2	EC:3.4.22.0
E7L7V0	A	Peptidase, putative	2	EC:3.4.24.0
E7LD64	T* and A*	aminopeptidase, putative, metallo-peptidase, clan MA(E), family M1, putative	3	EC:3.4.11.0
E7KZZ7	T and A	O-sialoglycoprotein endopeptidase, putative	1	EC:3.4.24.0
E7KYK4	T* and A*	Aminopeptidase, putative	0	EC:3.4.11.0
E7L3G9	A*	Thimet oligopeptidase, putative	1	EC:3.4.24.0
E7KQV2	A*	proteasome alpha 5 subunit, putative	0	EC:3.4.25.0

E7L2H2	T and A	aminopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative	2	EC:3.4.11.0
E7LLV5	A*	proteasome beta-1 subunit, putative	1	EC:3.4.25.0
Q8T2W4	A	Tcc1i14-2.1	4	EC:3.4.24.0
E7LIQ6	A	aminopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan MG, Family M24, putative	0	EC:3.4.11.0
Q2VLK5	T* and A*	metacaspase 3	2	EC:3.4.22.0
O61109	T	cysteine peptidase, putative	1	EC:3.4.22.0

*a* presente na superfície de tripomastigotas (**T**), amastigotas (**A**) e/ou detectadas na amostra controle (\*).

*b* número de domínios transmembranares preditos.

#### 4.3.8 Conclusões gerais

A análise do proteoma da superfície celular das formas de vida dos parasitos presentes em mamíferos pelas técnicas de biotinição de proteínas expostas seguido por purificação por cromatografia de afinidade a estreptoavidina e de tripsinização da superfície de células intactas também ofereceram, assim com em epimastigotas, uma visão abrangente do subconjunto protéico de interesse. Pela análise em paralelo da amostra controle do experimento de tripsinização, podemos elencar os possíveis contaminantes, os quais podem também estar associados ou presentes na membrana e são em sua maioria proteínas secretadas/excretada.

Independente da localização subcelular das proteínas identificadas, embora a grande maioria seja comprovadamente membranar e/ou possui domínios transmembranares, nossas abordagens revelaram um extenso repertório de proteínas com potencial envolvimento na infecção de células hospedeiras, na de adesão, na modulação de resposta imune do hospedeiro mamífero, na virulência do parasito e em diversas vias metabólicas do hospedeiro e também proteínas capazes de regular e capacitar a diferenciação celular do próprio parasito.

Emergindo da comparação entre as proteínas presentes na superfície dos parasitos em suas diversas formas, podemos elencar novos potenciais alvos de drogas, especialmente com as classes de enzimas potencialmente estágio-específicas, assim como potenciais marcadores para diagnóstico.

Em suma, pelas abordagens simples aqui padronizadas e descritas, é possível visualizar de forma abrangente o extenso repertório protéico do parasito utilizado na

infecção, defesa contra o sistema imune e atuação no metabolismo do hospedeiro. O uso futuro das mesmas abordagens para parasitos tratados com drogas oferecerá mais respostas quanto à biologia do *T. cruzi*.

**5 Avaliação quantitativa da variação do  
proteoma e fosfoproteoma do *T. cruzi* durante  
a amastigogênese**

## 5.1 Desenho experimental

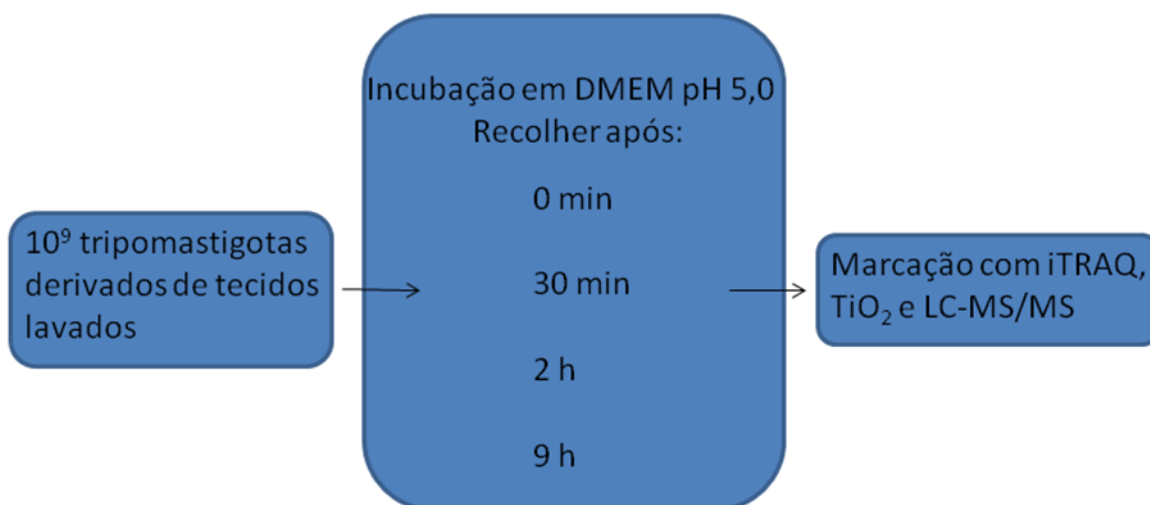
O desenho experimental para esse estudo foi proposto visando manter-se o mais simples e direto possível oferecendo simultaneamente o máximo de informações sobre esse processo de diferenciação.

Pelo uso da amastigogênese induzida *in vitro* pela incubação em meio DMEM pH 5,0 de tripomastigotas derivados de cultura, um modelo biológico bem estabelecido e validado do processo, ao invés de utilizar amastigotas intracelulares, foi possível obter amostras em fases intermediárias pontuais da diferenciação livres da eventual contaminação com componentes da célula hospedeira. Além disso, não se conhece uma metodologia capaz de gerar amostras de cultura *in vivo* de pontos intermediários definidos da amastigogênese, pois a infecção de células hospedeiras pelos tripomastigotas e a diferenciação intracelular deveria, para isso, ocorrer em fase.

Foi estipulado recolher amostras antes da indução (tripomastigotas); 30 min após o estímulo, onde esperamos observar as primeiras mudanças bioquímicas decorrentes do estímulo de diferenciação; 2 h após o estímulo, tempo mínimo no qual *in vivo* o parasito se encontra em pH ácido dentro do fagolisossomo; e 9 h após o estímulo (amastigotas axênicos). Após a incubação, os parasitos foram lavados e lisados em solução com agentes caotrópicos e coquetel completo de inibidores de proteases e fosfatases para garantir a integridade da estrutura primária das proteínas, das suas fosforilações, para inibir a atividade de qualquer enzima do parasito e para solubilizar o máximo de proteínas (sem adição de detergentes que poderiam comprometer a análise por MS) antes da remoção dos detritos celulares. O fluxograma encontra-se ilustrado pela figura 20.

Os extratos protéicos foram devidamente preparados para digestão, quantificados e marcados com o reagente iTRAQ<sup>TM</sup> e misturados em proporções iguais. Uma alíquota de 20 µg da mistura foi, então, fracionada em coluna HILIC, para identificação mais abrangente da amostra, e o restante seguiu para o enriquecimento de fosfopeptídeos por afinidade a TiO<sub>2</sub>. Cada fração (10 frações do HILIC e 1 fração de fosfopeptídeos) foi analisada duas vezes (duplicata técnica) por LC-MS/MS de alto rendimento para aumentar o número de identificações devido ao caráter estocástico da abordagem *shotgun*. Para garantir análise estatística de qualidade da quantificação, as amostras foram analisadas em triplicata biológica.

Somente identificações de alta confiabilidade e mínimo de 2 peptídeos por proteína foram aceitos para o proteoma total e também somente fosfopeptídeos com definição de alta confiabilidade do sítio de fosforilação.



**Figura 20.** Fluxograma experimental para a análise proteômica da amastigogênese.

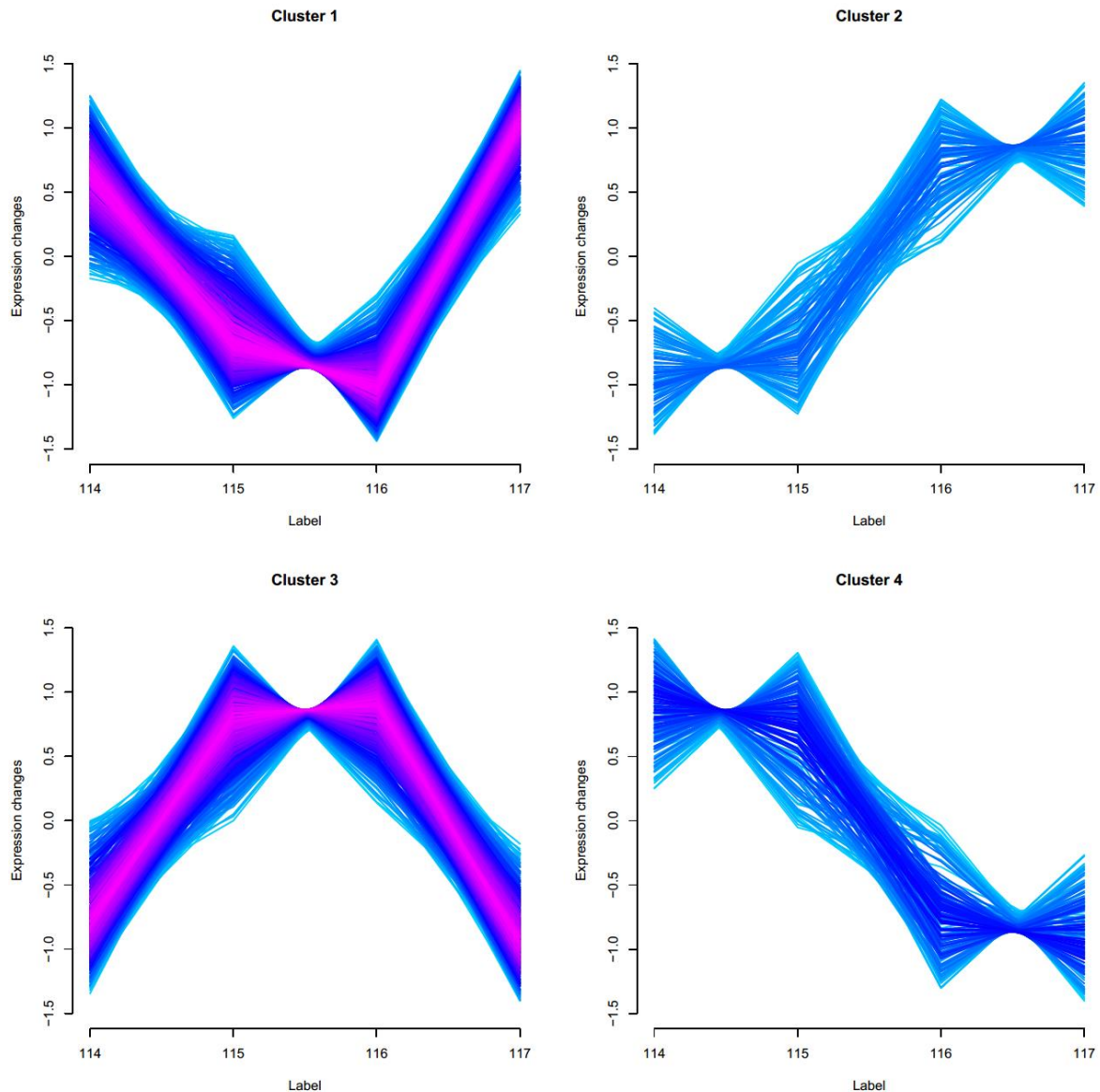
## 5.2 Resultados e discussão

### 5.4.1 Identificação de proteínas e fosfopeptídeos por LC-MS/MS e análise estatística dos níveis de expressão relativos

Neste trabalho pioneiro sobre as variações do proteoma e fosfoproteoma do *T. cruzi* durante a amastigogênese, cada amostra da diferenciação (marcada e misturada) foi separada em frações e analisadas em triplicata biológica com duas repetições de cada (duplicata técnica). As listas de identificações das respectivas duplicatas técnicas foram mescladas e os grupos de proteínas repetidos foram removidos. Da mesma forma, foram removidos os fosfopeptídeos cuja identificação do sítio fosforilado teve o valor de probabilidade *pRS* calculado menor que 75%, conforme sugerido pelo desenvolvedor do *software* (Beausoleil, Villen *et al.*, 2006). Então, as listas de identificações de alta confiabilidade dos peptídeos e fosfopeptídeos com suas respectivas intensidades dos íons *reporter* foram analisadas estatisticamente com o *software* R e os elementos com regulação estatisticamente válida foram identificados.

Das 1339 proteínas marcadas com iTRAQ e identificadas no proteoma total durante a amastigogênese, 560 apresentaram regulação da expressão protéica estatisticamente significativa. Dessas proteínas marcadas, 381 fosfopeptídeos puderam ser purificados (pertencentes a 225 proteínas) das quais 183 fosfopeptídeos (132 proteínas) são regulados.

Por dois testes estatísticos distintos (*minimal centroid distance* e *xie beni index*) os fosfopeptídeos e proteínas regulados (em relação a amostra de tripomastigotas) puderam ser agrupados em somente quatro *clusters* (dados não mostrados). Essa quantidade surpreendentemente pequena de *clusters* apresentou linhas de tendência de expressão das proteínas e fosfopeptídeos (fig 21) que se correlacionam com os eventos pelos quais o parasito passa nas células hospedeiras *in vivo*. Como a figura 21 demonstra, as maiores diferenças de expressão podem ser encontradas somente nos tempos intermediários do processo sem muitas diferenças entre os pontos extremos onde estão as formas completamente diferenciadas do parasito (clusters 1 e 3) e após 2 horas de incubação em pH ácido, corroborando o tempo de indução *in vivo* (clusters 2 e 4), uma vez que no hospedeiro as formas tripomastigotas permanecem em pH ácido no fagolisossomo por cerca de 2 horas. Dessa forma pode-se sugerir com segurança que os eventos de fosforilação e desfosforilação de proteínas e regulação da expressão relativa das proteínas identificados nesse trabalho fazem parte dos processos moleculares principais da diferenciação entre as formas do *T. cruzi* presentes no ser humano. A maioria das proteínas com expressão regulada grupam-se no cluster 3 e 1, com 219 e 183 membros, respectivamente, e o cluster 4 possui a menor quantidade de componentes.



**Figura 21.** Linhas de tendência da expressão de proteínas e fosfopeptídeos durante a amastigogênese nos tempos zero (114), 30 minutos (115), 2 horas (116) e 9 horas (117) de indução da diferenciação.

#### 5.4.2 *Variações quantitativas no proteoma total durante a amastigogênese*

Com uma observação geral dos termos *GO slim* de componente celular, foi possível observar que a grande maioria das proteínas reguladas de localização conhecida foram anotadas como membranares (fig. 22) e esse termo foi o mais freqüente em todos os clusters. De fato, quase 40% das proteínas reguladas (217 proteínas) tiveram ao menos 1 domínio transmembranar predito. Também se observou que proteínas super e sub-

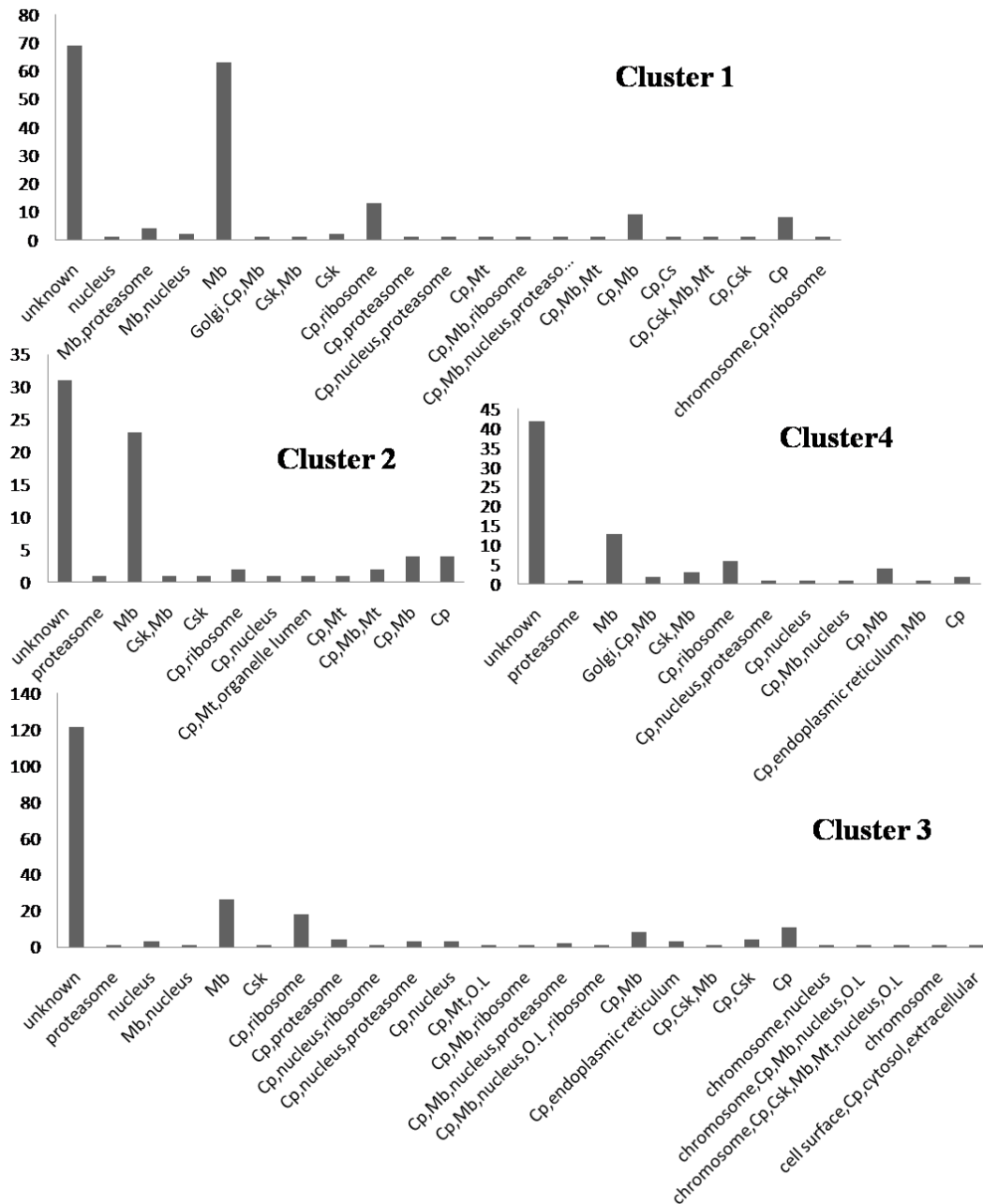


expressas nos tempos intermediários (*clusters* 1 e 3) abrangeram o maior número de compartimentos celulares.

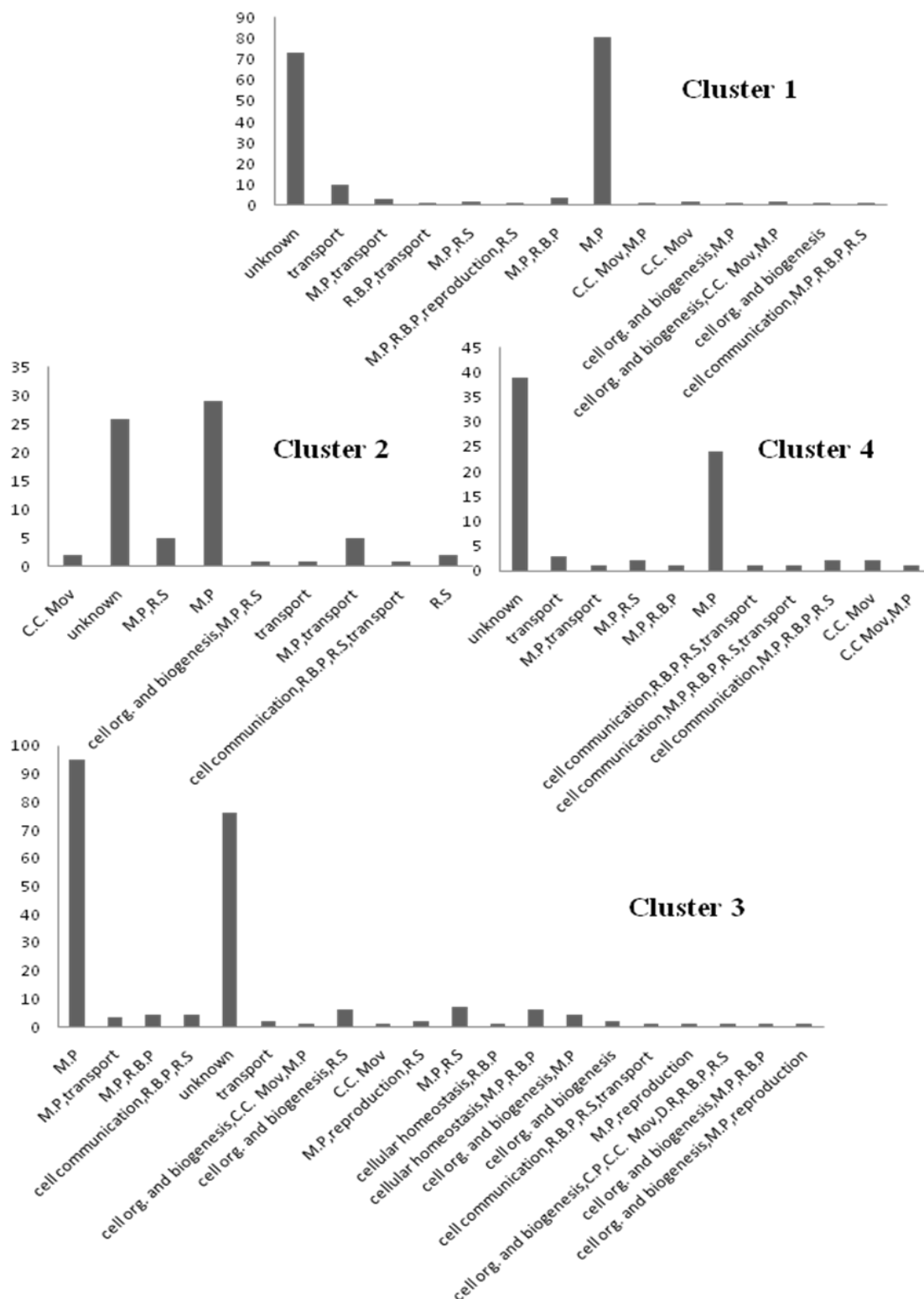
Proteínas envolvidas com processos metabólicos também foram os elementos mais freqüentemente observados em todos os clusters (fig 23) assim como proteínas com atividade catalítica (fig. 24), evidenciando a grande reestruturação metabólica e funcional sofrida pela célula ao longo de todo o processo de diferenciação e é, portanto, consequência da indução pela incubação em meio ácido.

Emergindo além da relativa uniformidade entre as classificações de função e processo biológico dos diferentes clusters, pudemos observar que proteínas relacionadas à homeostase celular encontram-se super-expressas nos tempos intermediários da diferenciação, como também o foram aquelas relacionadas à reprodução e de ligação a DNA. Portanto é possível concluir que a indução da amastigogênese por pH ácido de fato capacita o parasita para os eventos de replicação e que isso ocorre ainda antes da saída do fagolisossomo.

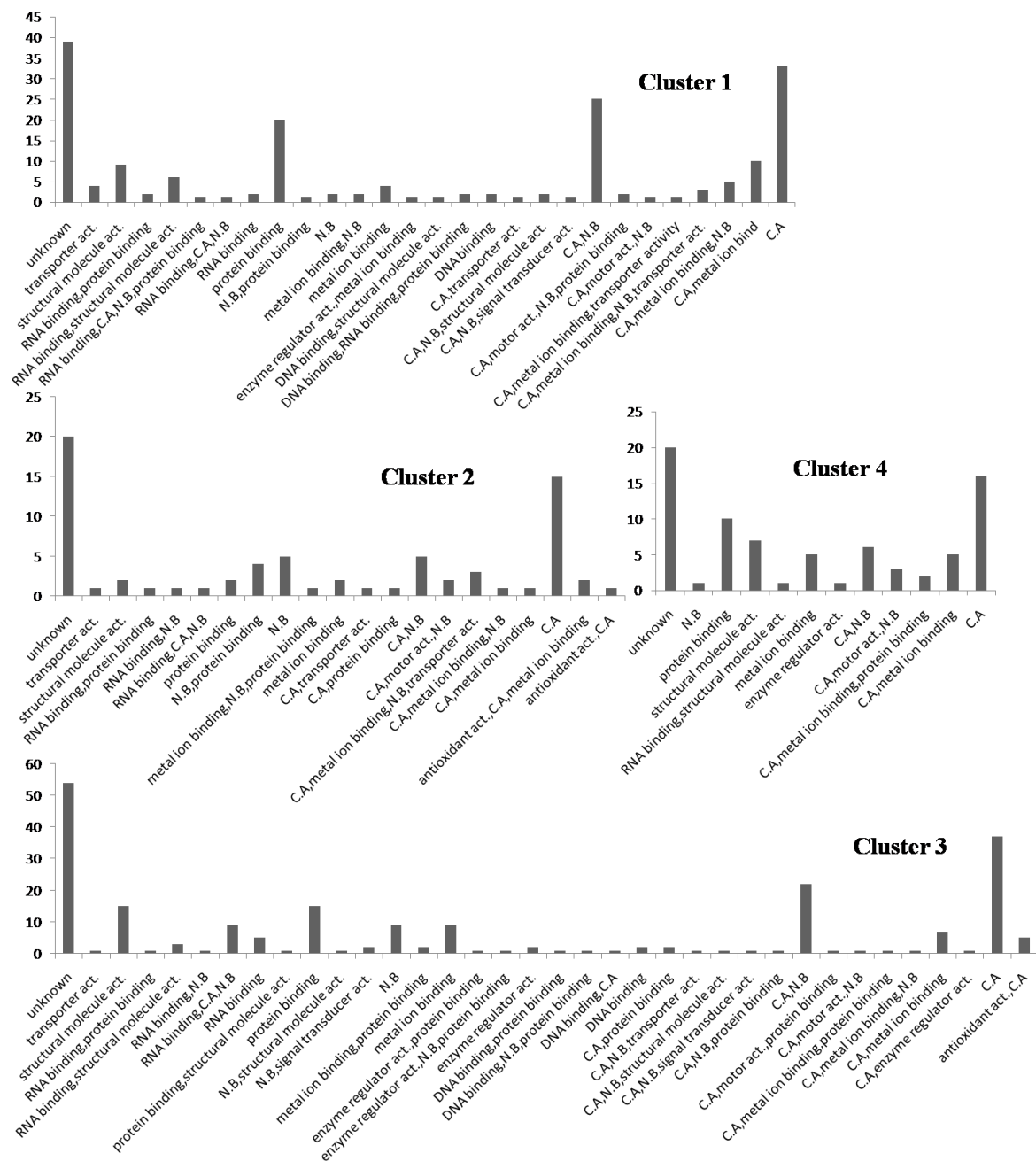
Da mesma forma que no capítulo anterior, devido ao significativo número de proteínas não anotadas e a grande quantidade de proteínas com atividade catalítica, foi empregado o *software* Blast2GO para obter-se um maior e mais abrangente detalhamento das amostras e a classificação das enzimas presentes.



**Figura 22.** Termos *GO slim* de componente celular das proteínas reguladas durante a amastigogênese. Eixo Y representa o número de grupos de proteínas. (Mb) *Membrane*, (Mt) *mitochondrion*, (Cp) *cytoplasm*, (Cs) *cytosol*, (Csk) *cytoskeleton* e (O.L) *organelle lumen*.



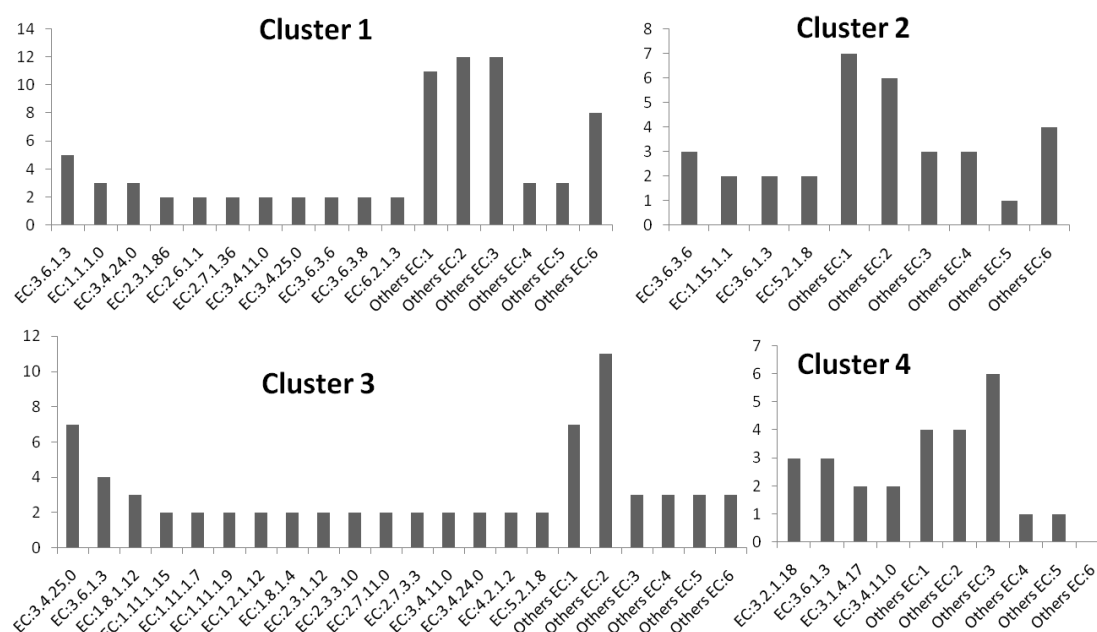
**Figura 23.** Termos *GO slim* de processo biológico das proteínas reguladas durante a amastigogênese. Eixo Y representa o número de grupos de proteínas. (M.P) *Metabolic process*, (C.C. Mov) *cellular component movement*, (R.S) *response to stimulus*, (C.P) *cell proliferation*, (D.R) *defense response* e (R.B.P) *regulation of biological process*.



**Figura 24.** Termos *GO slim* de função molecular das proteínas reguladas durante a amastigogênese. Eixo Y representa o número de grupos de proteínas. (C.A) *Catalytic activity* e (N.B) *nucleotide binding*.

### 5.4.3 Enzimas

Em todos os clusters de perfis de regulação de expressão, proteínas com atividade hidrolítica foram as mais representadas (fig. 25). Enzimas adenosino-trifosfatases (EC:3.6.1.3) possuem representantes em todos os perfis, sendo que cadeias pesadas de dineínas putativas apresentaram redução no nível de expressão durante a amastigogênese (clusters 1 e 4), assim como a subunidade ATPásica proteassomal regulatória 1, putativa (gi|407861152), porém as subunidades 2 e 3 dessas proteínas (gi|407849457 e gi|407844541) foram super-expressas nos tempos intermediários da diferenciação. Essas subunidades proteassomais foram anotadas como relacionadas à reprodução, assim como o foi a *Transitional endoplasmic reticulum ATPase* putativa (gi|322820539), uma proteínas membranas que também se encontra agrupada no cluster 3, necessária para a fragmentação das pilhas de Golgi durante a mitose e para a sua remontagem após a mitose, envolvida na formação do retículo endoplasmático de transição, na via de conjugação de ubiquitina e na resposta a dano no DNA (Ishigaki, Hishikawa *et al.*, 2004; Song, Sever *et al.*, 2005; Acs, Luijsterburg *et al.*, 2011; Meerang, Ritz *et al.*, 2011). Após 2 horas de indução, apenas duas ATPases que são relacionadas com a degradação de proteínas foram super-expressas, a chaperona ClpB (*caseinolytic peptidase B*) e a proteína ativadora de proteassoma PA28 putativa (gi|407848921) que em *T. brucei* foi proposto que cumprisse funções regulatórias no controle da degradação proteassomal de peptídeos gerados em uma ainda não identificada maquinaria de degradação de proteínas (Yao, Huang *et al.*, 1999).



**Figura 25.** Classes de atividade enzimática mais abundantes detectadas em cada cluster de proteínas reguladas durante a amastigogênese. Eixo Y representa o número de proteínas detectadas *in silico* com a determinada atividade.

Proteínas membranares com atividade ATPásica exportadoras de  $H^+$  (EC:3.6.3.6) foram agrupadas nos *clusters* 1 e 2, das quais aquelas sub-expressas nos tempos intermediários são as proteínas SERCA-type calcium-ATPase (gi|4165126) e Calcium-translocating P-type ATPase putativa (gi|322827561), que também são transportadoras do íon  $Ca^{2+}$  (EC:3.6.3.8) e as outras são enzimas próton-motoras. É um fato curioso encontrar transportadores de  $Ca^{2+}$  sub-expressos durante a amastigogênese, uma vez que a liberação das reservas desse íon e o conseqüente aumento na sua concentração citosólica são eventos-chave na diferenciação do parasito, porém uma possível explicação seja que a liberação por esses transportadores de membrana ocorra ainda antes de 30 min de indução e, a partir de então, essas proteínas sejam degradadas.

Enzimas Ser/Thr-cinases (EC:2.7.11.0) foram agrupadas no cluster 3. Tais cinases, *NIMA-related kinase* (gi|322819192) e *protein kinase A catalytic subunit isoform 1* (gi|407847507), são respectivamente conhecidas por regular processos cruciais como ciclo celular (O'regan, Blot *et al.*, 2007) e participar de vias de sinalização que regulam processos metabólicos e diferenciação. Já foi observado que subunidades regulatórias de PKA interagem com ATPases do tipo P e atuam também com outras proteínas de

membrana do parasito como membros da família TS (Bao, Weiss *et al.*, 2008; Bao, Weiss, Ma, Kahn *et al.*, 2010) e várias revisões já têm mencionado a atividade dessa proteína em tripanosomatídeos (Naula e Seebeck, 2000; Seebeck, Gong *et al.*, 2001; Huang, 2011). Outra Ser/Thr-cinase, a *mitogen-activated protein kinase*, putativa (gi|407831435), foi por sua vez sub-expressa nos tempos intermediários (*cluster* 1). Proteínas da família das MAPK são reguladores conhecidos de proliferação celular, expressão gênica, diferenciação, mitose, apoptose e outros (Pearson, Robinson *et al.*, 2001)

Enzimas 3',5'-nucleotídeo-cíclico fosfodiesterases (EC:3.1.4.17) foram encontradas somente no *cluster* 4, isto é, sub-expressas após 2 hora de indução. Trata-se de duas proteínas nucleotídeo cíclico fosfodiesterases transmembranares (gi|55741314 e gi|37543960), das quais uma já foi caracterizada (Diaz-Benjumea, Laxman *et al.*, 2006). Essas proteínas regulam os níveis de moléculas cAMP e cGMP, que consistem em segundos mensageiros intracelulares de vias de sinalização cuja importância na proliferação celular do *T. cruzi* já é conhecida (Santos e Oliveira, 1988; Huang, 2011). A diminuição da expressão dessas enzimas após o tempo de permanência no fagolisossomo reforça a hipótese de que os processos-chave de indução/regulação da amastigogênese se completam nesse período e a diferenciação após essas 2 horas já é irreversível com o período posterior até a diferenciação completa sendo necessário somente para o ajuste ultraestrutural. Além disso, cAMP fosfodiesterases já foram descritas em *T. cruzi* como implicadas na osmoregulação, associadas a flagelo e que os membros dessa classe de enzimas e outras envolvidas na via de sinalização do cAMP apresentam-se compartimentalizadas e, portanto, existem microambientes intracelulares com níveis distintos do segundo mensageiro (Kunz, Oberholzer *et al.*, 2005; Alonso, Schoijet *et al.*, 2006; 2007; Schoijet, Miranda *et al.*, 2011).

Também sub-expressas após 2 horas de indução encontraram-se as glicoproteínas de superfície 85 *kDa surface antigen* (gi|544414), *surface glycoprotein Tc-85/16* (gi|37778153) e *trans-sialidase* (gi|642913), todas com atividade exo- $\alpha$ -sialidásica (EC:3.2.1.18). Essas proteínas são bastante envolvidas no processo de invasão de células hospedeiras e também facilitam o processo de escape do vacúolo parasitóforo (Andrews, 1994), o que torna esperado a redução na abundância dessas proteínas após esse tempo, porém foi identificada outro membro dessa família de proteínas, a trans-sialidase putativa (gi|322826620), com o padrão oposto de regulação.

#### 5.4.4 *Cinases, fosfatases e proteínas relacionadas à transdução de sinais e regulação de processos metabólicos*

Dentre as proteínas de expressão regulada durante a diferenciação da forma tripomastigota do *T. cruzi*, 19 estão anotadas com funções biológicas relacionadas à transdução de sinais (tabela 8) enquanto outras 31 estão envolvidas com a regulação de processos biológicos (tabela 9).

Foram identificadas super-expressas nos tempos intermediários da amastigogênese proteínas monoméricas ligantes de GTP como as *ADP-ribosylation factors 1 e 3* (gi|70867395 e gi|70883358) e *ADP-ribosylation factors-like* (gi|322823357) putativas, que regulam a formação de vesículas, o tráfego intracelular dessas, remodelamento de actina e ativação da fosfolipase D (Boman e Kahn, 1995; Moss e Vaughan, 1995; Park, Kim *et al.*, 2000; Pasqualato, Renault *et al.*, 2002; Nie, Hirsch *et al.*, 2003; Kawasaki, Nakayama *et al.*, 2005) e proteínas rab 11 (gi|407853753 e gi|407835694), que também desempenham papel na regulação do tráfego intracelular de vesículas, em especial na reciclagem de endossomos (Stenmark e Olkkonen, 2001; Grosshans, Ortiz *et al.*, 2006), ao passo que a rab 7 putativa (gi|407847514) comumente associada a endossomos tardios (Soldati, Rancano *et al.*, 1995) foi super-expressa somente após 2 horas de indução e uma proteína hipotética (gi|407850451) descrita pelo *software* como *ras-related protein rab-2a*, cuja localização foi relatada no retículo endoplasmático e Golgi (Short, Preisinger *et al.*, 2001; Rual, Venkatesan *et al.*, 2005), foi sub-expressa após 2 horas. Essa categoria de proteínas parece ser importante para a amastigogênese, corroborando com o fato que ela é conhecida por controlar uma vasta gama de processos biológicos que incluem sinalização do receptor, vias de transdução de sinal intracelular e síntese protéica

Outra proteína regulatória identificada super-expressa nos tempos intermediários foi a proteína 14-3-3 (gi|407859812), que tem a habilidade de ligar-se a uma plêiade de proteínas de sinalização funcionalmente diversas, incluindo cinases, fosfatases e receptores de membrana atuando, assim, em uma ampla faixa de processos regulatórios vitais, tais como transdução de sinal mitogênico, apoptose e controle do ciclo celular (Fu, Subramanian *et al.*, 2000). Em *T. brucei*, essas proteínas desempenham um papel central na motilidade, citocinese e ciclo celular (Inoue, Nakamura *et al.*, 2005), mas essa família de proteínas ainda não foi estudada em *T. cruzi*.



**Tabela 8. Proteínas de expressão regulada durante a amastigogênese relacionadas à transdução de sinais.**

ID (NCBI)	cluster	Descrição (Uniprot)	Descrição (Blast2GO)	TM <sup>a</sup>
gi 407843924	1	serine/threonine protein phosphatase 2A regulatory subunit, putative	serine threonine protein phosphatase 2a regulatory subunit	1
gi 322818689	1	Putative uncharacterized protein	ADP-ribosylation factor gtpase activating	1
gi 407835032	1	protein kinase, putative,mitogen-activated protein kinase, putative	mitogen-activated protein kinase	1
gi 407847529	2	poly(A)-binding protein, putative, polyadenylate-binding protein, putative	Poly(A)-binding protein	0
gi 407847514	2	rab7 GTP binding protein, putative	rab7 GTP binding protein	1
gi 322823357	3	ADP-ribosylation factor-like protein, putative	ADP-ribosylation factor-like protein	0
gi 407853753	3	small GTP-binding protein Rab11, putative,Rab11 GTPase, putative	small GTP-binding protein	0
gi 407859812	3	14-3-3 protein, putative	14-3-3 protein	0
gi 70883358	3	ADP-ribosylation factor 3, putative	ADP ribosylation factor 3	0
gi 407835694	3	small GTP-binding protein Rab11, putative,Rab11 GTPase, putative	small GTP--binding protein rab1	0
gi 322826564	3	Thimet oligopeptidase, putative	thimet oligopeptidase	1
gi 322822336	3	Putative uncharacterized protein	faz1_tryb2 ame: full=flagellar attachment zone protein 1	0
gi 70867395	3	ADP-ribosylation factor 1, putative	ADP-ribosylation factor	0
gi 322820941	3	Putative uncharacterized protein	GTP-ase activating protein	1
gi 407850451	4	hypothetical protein TCSYLVIO_004099	ras-related protein rab-2a	1
gi 407846684	4	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	GTP-binding nuclear protein	0
gi 55741314	4	cyclic nucleotide phosphodiesterase	cAMP specific	5
gi 37543960	4	cyclic nucleotide phosphodiesterase	cAMP specific	6
gi 70887024	-	60S ribosomal protein L23, putative	60s ribosomal protein 123	0

<sup>a</sup> número de domínios transmembranares preditos.

**Tabela 9.** Proteínas de expressão regulada durante a amastigogênese relacionadas à regulação de processos biológicos.

ID (NCBI)	cluster	Descrição (Uniprot)	Descrição (Blast2GO)	TM <sup>a</sup>
gi 322816735	1	Mitochondrial RNA-binding protein 2, putative	mitochondrial rna binding protein 2	0
gi 407850988	1	hypothetical protein TCSYLVIO_003802	suppressive immunomodulating	2
gi 322818689	1	Putative uncharacterized protein	ADP-ribosylation factor gtpase activating	1
gi 407835032	1	protein kinase, putative,mitogen-activated protein kinase, putative	mitogen-activated protein kinase	1
gi 407861152	1	proteasome regulatory ATPase subunit 1, putative	proteasome regulatory ATPase subunit 1	0
gi 322820826	1	Isoleucine--tRNA ligase	isoleucyl-trna synthetase	5
gi 322819420	1	Mitochondrial RNA binding protein 1, putative	mitochondrial rna binding protein 1	0
gi 407847514	2	rab7 GTP binding protein, putative	rab7 GTP binding protein	1
gi 28195111	3	protein kinase A regulatory subunit	protein kinase a regulatory subunit	0
gi 322823357	3	ADP-ribosylation factor-like protein, putative	ADP-ribosylation factor-like protein	0
gi 407853753	3	small GTP-binding protein Rab11, putative,Rab11 GTPase, putative	small GTP-binding protein	0
gi 124109207	3	thiol transferase Tc52	thiol transferase tc52	1
gi 322815184	3	Mitochondrial RNA binding protein, putative	rna binding protein rbp16	0
gi 407849690	3	protein disulfide isomerase, putative	protein disulfide isomerase	0
gi 19171158	3	Tryparedoxin	Tryparedoxin	0
gi 70883358	3	ADP-ribosylation factor 3, putative	ADP ribosylation factor 3	0
gi 407848174	3	dihydrolipoyl dehydrogenase, putative	dihydrolipoamide dehydrogenase	1
gi 407835694	3	small GTP-binding protein Rab11, putative,Rab11 GTPase, putative	small GTP-binding protein rab1	0
gi 6166121	3	Dihydrolipoyl dehydrogenase	dihydrolipoamide dehydrogenase	1
gi 34922663	3	Kinetoplastid membrane protein 11	kinetoplastid membrane protein-11	0
gi 70867395	3	ADP-ribosylation factor 1, putative	ADP-ribosylation factor	0

gi 322820941	3	Putative uncharacterized protein	GTPase activating protein	1
gi 322818216	3	Putative uncharacterized protein	activator of 90 kda heat shock protein atpase-like protein 1	0
gi 70886939	3	eukaryotic initiation factor 5a, putative	eukaryotic initiation factor 5a	1
gi 407853650	3	protein disulfide isomerase, putative	protein disulfide	0
gi 136620	3	Trypanothione reductase	trypanothione reductase	2
gi 407850451	4	hypothetical protein TCSYLVIO_004099	ras-related protein rab-2a	1
gi 407846684	4	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	GTP-binding nuclear protein	0
gi 9967363	4	proteasome regulatory non-ATPase subunit 1-1	proteasome regulatory non-atpase subunit	5
gi 55741314	4	cyclic nucleotide phosphodiesterase	cAMP specific	5
gi 37543960	4	cyclic nucleotide phosphodiesterase	cAMP specific	6

a número de domínios transmembranares preditos.

A via de sinalização intracelular por cAMP está dentre as principais vias de coordenação de processos no *T. cruzi* (Flawia, Tellez-Inon *et al.*, 1997; Huang, 2011), portanto não foi surpresa encontrar cinases MAPK (*cluster 1*) e PKA (*cluster 3*) com expressão regulada durante a amastigogênese, mas o fato dessas proteínas apresentarem padrões opostos de expressão é uma informação relevante e inédita. Também com regulação distinta, foram observadas duas cAMP fosfodiesterases membranares, porém nenhuma enzima adenilato ciclase foi identificada dentre as proteínas reguladas.

A enzima PKA é também um conhecido mediador de transdução de sinais. Essa família de Ser/Thr-cinases dependentes de cAMP consistem de holoenzimas com duas subunidades regulatórias e duas catalíticas que, com o aumento da concentração de cAMP (em decorrência da ativação de adenilato ciclasas e/ou pela inibição de fosfodiesterases), as subunidades catalíticas são separadas das regulatórias e podem agir em diferentes substratos.

Já está bem estabelecido que a metaciclologênese de *T. cruzi* é mediada pela sinalização por cAMP (Flawia, Tellez-Inon *et al.*, 1997) e que PKAs possuem papel fundamental na maioria das células eucarióticas. O primeiro relato da presença de atividade de PKA em *T. cruzi* foi feito por Ulloa e colaboradores em 1988 (Ulloa, Mesri *et al.*, 1988) e a subunidade catalítica foi purificada por Ochatt e colaboradores em 1993

(Ochatt, Ulloa *et al.*, 1993) e Huang em 2002 (Huang, Werner *et al.*, 2002). Ambas as subunidades catalíticas e regulatórias da TcPKA localizam-se na região flagelar e na membrana plasmática de tripomastigotas (Huang, Weiss *et al.*, 2006; Bao, Weiss, Ma, Kahn *et al.*, 2010) e a relatada interação com ATPases do tipo-P parece sugerir um papel dessas ATPases no ancoramento das TcPKAs à membrana plasmática do parasito (Bao, Weiss *et al.*, 2009).

Bao e colaboradores publicaram os resultados de um *screening* em busca de proteínas que interagissem com a TcPKA (Bao, Weiss *et al.*, 2008). Esse estudo usando um sistema de duplo-híbrido elencou 38 candidatos, dos quais 18 eram proteínas hipotéticas e 8 eram presumivelmente importantes na regulação do crescimento, adaptação e diferenciação do parasito, dentre os quais estão a MAPK e a fosfodiesterase cAMP-específica, reforçando a importância da sinalização cAMP-PKA nesse organismo e a provável inter-relação entre essas vias.

MAPK são mediadores bem conhecidos de transdução de sinais em eucariotos superiores e são ativados por uma ampla gama de estímulos por diversos modos, incluindo receptores tirosina cinase, receptores acoplados a proteína G e PKC. Em *T. brucei*, a deleção do homólogo de MAPK, a TbMAPK5, resultou na diminuição da parasitemia e diferenciação prematura (Domenicali Pfister, Burkard *et al.*, 2006), a deleção da TbMAPK2 afetou a diferenciação (Muller, Domenicali-Pfister *et al.*, 2002) e foi relatado que a TbMAPK4 conferiu resistência a estresse por temperatura (Guttinger, Schwab *et al.*, 2007). Recentemente, a TcMAPK2, uma cinase de *T. cruzi* homóloga à ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*), foi caracterizada e apresentou alta homologia com a ERK2 de eucariotos inferiores, mas com diferenças significativas com a de mamíferos (Bao, Weiss, Ma, Lisanti *et al.*, 2010). Em tripomastigotas, essas cinases foram localizadas principalmente ao longo do flagelo, ao passo que em amastigotas intracelulares, elas concentraram-se na membrana plasmática. A forma fosforilada (ativa) da TcMAPK2 foi relatada maior em tripomastigotas que em amastigotas e também foi relatada a interação com enzimas PKA e cAMP-fosfodiesterases do parasito, indicando inter-relações entre essas vias de sinalização e sugerindo que a TcMAPK desempenha um papel importante na resposta a estresse do parasito e possivelmente na regulação de sua proliferação e diferenciação.

As proteínas fosfatases catalisam a desfosforilação de substratos de cinases, incluindo as PKA e MAPK, e o uso de inibidores de fosfatases demonstraram a relevância

da atividade dessas enzimas na amastigogênese de *T. cruzi* (Grellier, Blum *et al.*, 1999) e o bloqueio da diferenciação de tripomastigotas incubados em pH 5,0, mesmo com concentrações extremamente baixas do inibidor ácido ocadáico, caracterizaram o papel crítico da proteína fosfatase 2A na diferenciação (Gonzalez, Cornejo *et al.*, 2003). Não detectamos regulação no nível de expressão da subunidade catalítica da proteína fosfatase 2A, porém sua subunidade regulatória putativa (gi|407843924) foi subexpressa nos tempos intermediários da diferenciação, como o foi também uma fosfatase-like (gi|32282890) e uma proteína fosfatase 2C putativa (gi|407852188). Por outro lado, outra proteína fosfatase 2C putativa (gi|407850919) e uma proteína fosfatase putativa (gi|322815489) tiveram o perfil oposto de expressão.

Comparado com outros genomas eucarióticos, o *T. cruzi* possui uma baixa proporção de Tyr-fosfatases e uma expansão de Ser/Thr-fosfatases e fosfatases atípicas, das quais aquelas de especificidade dupla são maioria, compreendendo mais de um terço do total dessas enzimas (Brenchley, Tariq *et al.*, 2007). Também é digno de menção o fato de que ainda não foi descrita nenhuma Tyr-cinase em *T. cruzi* (Marchini, De Godoy *et al.*, 2011).

Na tabela 10 estão compiladas todas as proteínas de expressão regulada com o termo *kinase* ou *phosphatase* presentes em uma das descrições ou na anotação do GO. Em geral, as cinases presentes estão envolvidas no metabolismo de carboidratos, exceto as já discutidas proteínas de transdução de sinais e as adenilato cinases, que fazem parte de um sistema de monitoramento do estado de energia celular (Dzeja e Terzic, 2009)

**Tabela 10.** Cinases e fosfatases de expressão regulada durante a amastigogênese.

ID (NCBI)	cluster	Descrição (Uniprot)	Descrição (Blast2GO)	TM <sup>a</sup>
gi 407849962	1	6-phospho-1-fructokinase, putative	ATP-dependent phosphofructokinase	0
gi 322827691	1	Putative uncharacterized protein	aminoglycoside phosphotransferase	1
gi 348658714	1	mevalonate kinase	mevalonate partial	0
gi 407835032	1	protein kinase, putative, mitogen-activated protein kinase, putative	mitogen-activated protein kinase	1
gi 322818669	1	Putative uncharacterized protein	hypothetical protein	1
gi 407853645	1	hypothetical protein TCSYLVIO_002347	adenylate kinase	2
gi 407852451	1	mevalonate kinase, putative	mevalonate kinase	2
gi 407831435	1	mitogen-activated protein kinase, putative	mitogen-activated protein	1

gi 407843751	1	adenosine kinase, putative	Ribokinase	2
gi 407843924	1	serine/threonine protein phosphatase 2A regulatory subunit, putative	serine threonine protein phosphatase 2a regulatory subunit	1
gi 322828909	1	Phosphatase-like protein, putative	phosphatase-like protein	0
gi 407852188	1	phosphatase 2C, putative	phosphatase 2c	0
gi 28195111	3	protein kinase A regulatory subunit	protein kinase a regulatory subunit	0
gi 322819192	3	NIMA-related kinase, putative	folate biopterin transporter	1
gi 74893984	3	Arginine kinase	arginine kinase	0
gi 407844351	3	arginine kinase, putative	arginine kinase	0
gi 322815950	3	Phosphoglycerate kinase	phosphoglycerate kinase	1
gi 322820941	3	Putative uncharacterized protein	gtpase activating protein	1
gi 407837695	3	adenylate kinase, putative	adenylate kinase	1
gi 407847507	3	protein kinase A catalytic subunit isoform 1, putative	protein kinase a catalytic subunit isoform 1	1
gi 407850919	3	protein phosphatase 2C, putative	protein phosphatase 2c-like protein	0
gi 322815489	3	Protein phosphatase, putative	protein phosphatase	0
gi 407843470	4	hypothetical protein TCSYLVIO_007583	adenylate kinase 7	0
gi 407847367	4	galactokinase-like protein, putative	Galactokinase	2
gi 407853703	4	protein kinase C substrate protein, heavy chain, putative	protein kinase c substrate heavy	0
gi 70885555	-	S-phase kinase-associated protein, putative	s-phase kinase-associated	1

a número de domínios transmembranares preditos.

#### 5.4.5 O fosfoproteoma da amastigogênese

A análise dos níveis de abundância (referida aqui como expressão) dos fosfopeptídeos marcados com iTRAQ e enriquecidos com TiO<sub>2</sub> revelou que ao contrário das proteínas totais, onde a maioria encontrava-se super ou subexpressas nos tempos intermediários da diferenciação (*clusters* 1 e 3), a maior parte dos fosfopeptídeos apresentaram variação significativa no nível de expressão após 2 horas de incubação em DMEM pH 5,0 (*clusters* 2 e 4) o que nos indica que a ação de cinases e fosfatases induzidas direta ou indiretamente pelo meio ácido, e responsáveis pela diferenciação, aconteça ainda dentro do fagolisossomo, porém não imediatamente. Ao todo 69 e 61 fosfopeptídeos (49 e 41 fosfoproteínas) foram agrupadas respectivamente nos *clusters* 2 e

4. O *cluster* 1 concentrou 30 fosfopeptídeos (27 fosfoproteínas) enquanto que o *cluster* 3, 23 fosfopeptídeos (15 fosfoproteínas).

A observação das identificações dos sítios de fosforilação de fosfopeptídeos com expressão regulada mostrou que 165 fosfopeptídeos apresentaram apenas um resíduo fosforilado, enquanto que foram encontrados 18 peptídeos multifosforilados. Puderam ser identificados com segurança 119 pS, 21 pT e 1 pY em fosfopeptídeos regulados presentes em 157, 27 e 1 proteínas, respectivamente.

Ao todo, 46 fosfoproteínas reguladas foram anotadas pelo *ProteinCenter* como membranares e/ou com pelo menos 1 domínio transmembranar e puderam ser encontradas proteínas com até 9 domínios transmembranares preditos, por exemplo, na cadeia pesada da dineína putativa (gi|407853700). Também significativo foi a proporção de proteínas hipotéticas, desconhecidas ou não caracterizadas, as quais totalizaram 77 fosfoproteínas com expressão regulada.

Como já mencionado, proteínas cinases regulam diversos processos celulares e estão envolvidas em quase todas as vias metabólicas celulares conhecidas, em especial nas vias de transdução de sinais, portanto a atividades dessas proteínas devem ser finamente reguladas. Existem várias revisões a respeito de mecanismos de regulação das proteínas cinases (Johnson, Noble *et al.*, 1996; Hubbard, 1999; 2002), como, por exemplo, fosforilação de resíduos do *loop* de ativação ou de sítios em domínios C- ou N-terminais das cinases. Ressaltamos também que a fosforilação de resíduos pode ter um papel ativador ou inibitório, dependendo do tipo de resíduo e da proteína.

A análise dos fosfopeptídeos durante a amastigogênese revelou que 10 proteínas cinases e 1 proteína fosfatase possuíam variação significativa na fosforilação de ao menos um peptídeo durante o processo de diferenciação e várias dessas proteínas estão potencialmente associadas a membranas devido a domínios transmembranares (tabela 11).

As subunidades catalíticas de PKA e PKA-like putativa apresentaram regulação na fosforilação de resíduos de Ser e Thr agrupados nos *clusters* 2 e 4, enquanto que suas subunidades regulatórias agruparam-se nos *clusters* 1 e 4. Uma MAPK putativa também apresentou um fosfopeptídeo agrupado no *cluster* 4. Também subregulada após duas horas de indução foi a única fosfo-Tyr detectada com variação durante a diferenciação. Esse resíduo pertence a glicogênio sintetase cinase 3 $\alpha$  putativa (gi|407846847). Tal cinase já foi identificada atuando em mais de 40 proteínas diferentes e em uma variedade de vias, influenciando estrutura celular, crescimento, motilidade e apoptose (Jope e Johnson, 2004).

Embora Tyr-cinases de *T. cruzi* ainda sejam desconhecidas, já foram relatadas fosforilações de resíduos de Tyr em proteínas de *T. cruzi* e *T. brucei* (Parsons, Valentine *et al.*, 1991; Nett, Davidson *et al.*, 2009; Marchini, De Godoy *et al.*, 2011)

Uma única proteína fosfatase apresentou regulação de fosfopeptídeos. Trata-se de uma Ser/Thr-fosfatase putativa (gi|322828093) com um único resíduo de fosfo-Ser detectado e agrupado no *cluster 2*

**Tabela 11.** Cinases e fosfatase com fosfopeptídeos de expressão regulada durante a amastigogênese.

ID (NCBI)	cluster	Fosfopeptídeos	Descrição (Uniprot)	TM <sup>b</sup>
gi 70885555	1	PEEFDpSQEVDFTK	S-phase kinase-associated protein, putative	1
gi 407855987	1	NTIALWEAQApSEGADEERGF GEGPVWVVK	regulatory subunit of protein kinase A-like protein, putative	0
gi 322828093	2	NYMNPpSPTQPPVDAAR, GVAEPDpTPR	Serine/threonine-protein phosphatase	1
gi 407862997	2	pSLAGSIDYQAPEVLK	protein kinase, putative	1
gi 10119900	2	GGMpTSHAAVVAR, SGAAApSMPGMMDTVNLG MNK	pyruvate phosphate dikinase 2	0
gi 322818077	2	YFDRYPEpSPRHPLPPLTAK, pTFTLCGTPEYLAPEVIQSR	Protein kinase A catalytic subunit, putative	1
gi 407832869	3	AVATPPHpSQQQQQLTAEAIG EATDGR	serine/threonine protein kinase, putative	1
gi 407832551	4	DAASpSDAGDDVTPAK	regulatory subunit of protein kinase A-like protein, putative	0
gi 407846847	4	KLSPSEPNVApYICSR	glycogen synthase kinase-3 alpha, putative	2
gi 407847507	4	pTFTLCGTPEYLAPEVIQSK	protein kinase A catalytic subunit isoform 1, putative	1
gi 407831435	4	AATAALApSAENVLGADHML R	mitogen-activated protein kinase, putative	1

<sup>a</sup> número de domínios transmembranares preditos.



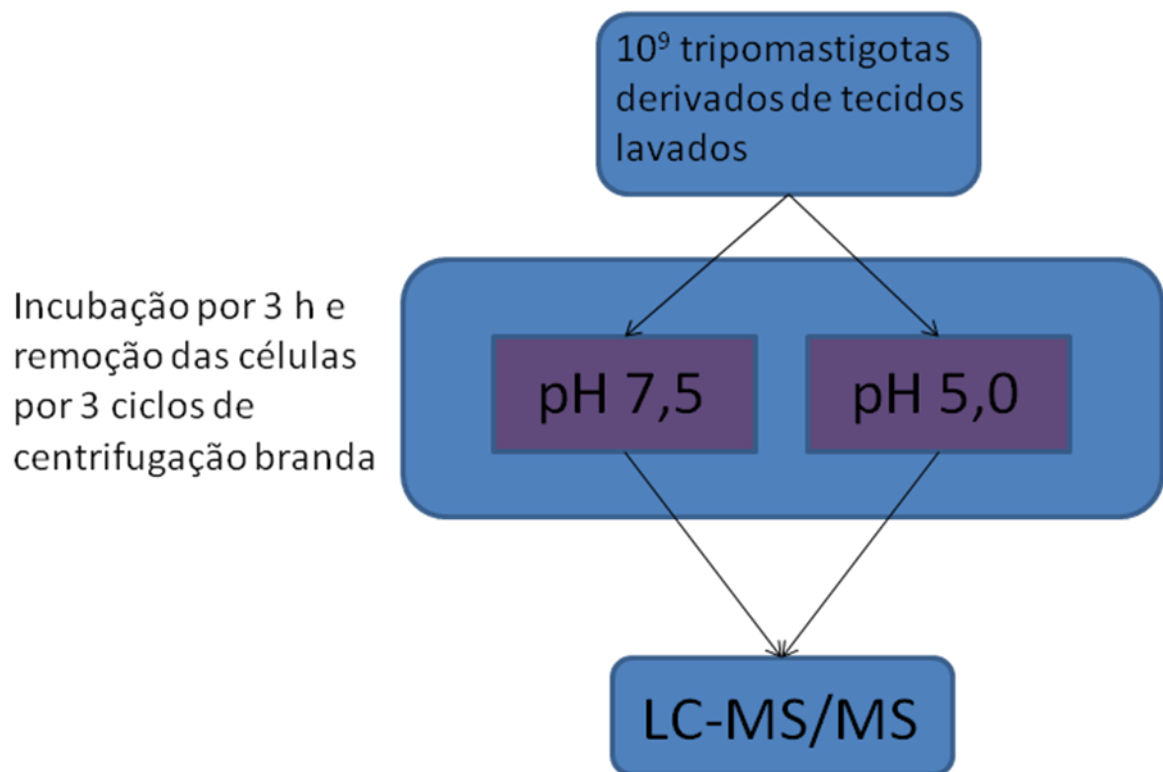
#### 5.4.6 Conclusões

A análise quantitativa do proteoma e do fosfoproteoma do *T. cruzi* durante a amastigogênese revelou que as variações na abundância relativa de proteínas e fosfopeptídeos durante esse processo de diferenciação seguem apenas quatro linhas de tendência (super e subexpressas somente nos tempos intermediários ou somente após 2 horas), sendo que a maior parte das proteínas apresentou variação de expressão nos tempos intermediários, enquanto que as abundâncias nas fosforilações modificaram-se preferencialmente após 2 horas. A maior parte das proteínas com variação de expressão foi anotada como membranares, com atividade catalítica e como envolvidas em processos metabólicos. Também foram observados indícios que, como na metaciclologênese, existe o envolvimento das proteínas PKA e MAPK.

**6 Comparação qualitativa do secretoma de tripomastigotas incubados em pH fisiológico e do secretoma no início da amastigogênese**

## 6.1 Desenho experimental

Visando uma análise comparativa qualitativa simples dos secretomas de tripomastigotas em pH fisiológico e de tripomastigotas em processo de diferenciação, esses subproteomas foram recolhidos com cuidados análogos àqueles tomados nos experimentos de tripsinização da superfície celular (ver Capítulo 2), o qual é bastante semelhante os protocolos de produção de TESA. Resumidamente, foram recolhidos tripomastigotas lavados, derivados de cultura de células HeLa, e incubados por 3 h em meio DMEM pH 5,0 e em DMEM pH 7,5 nas mesmas condições padronizadas para o experimento de tripsinização de células intactas. Após a incubação as células foram removidas de forma a evitar ao máximo a eventual lise mecânica e o sobrenadante, com as proteínas excretadas, devidamente tratado para identificação das mesmas por LC-MS/MS em idênticas condições de forma a ser possível comparar qualitativamente os secretomas (fig. 26).



**Figura 26.** Fluxograma experimental da análise dos exoproteomas de tripomastigotas incubados em pH

## 6.2 Resultados e discussão

### 6.3.1 Identificação e comparação dos exoproteomas

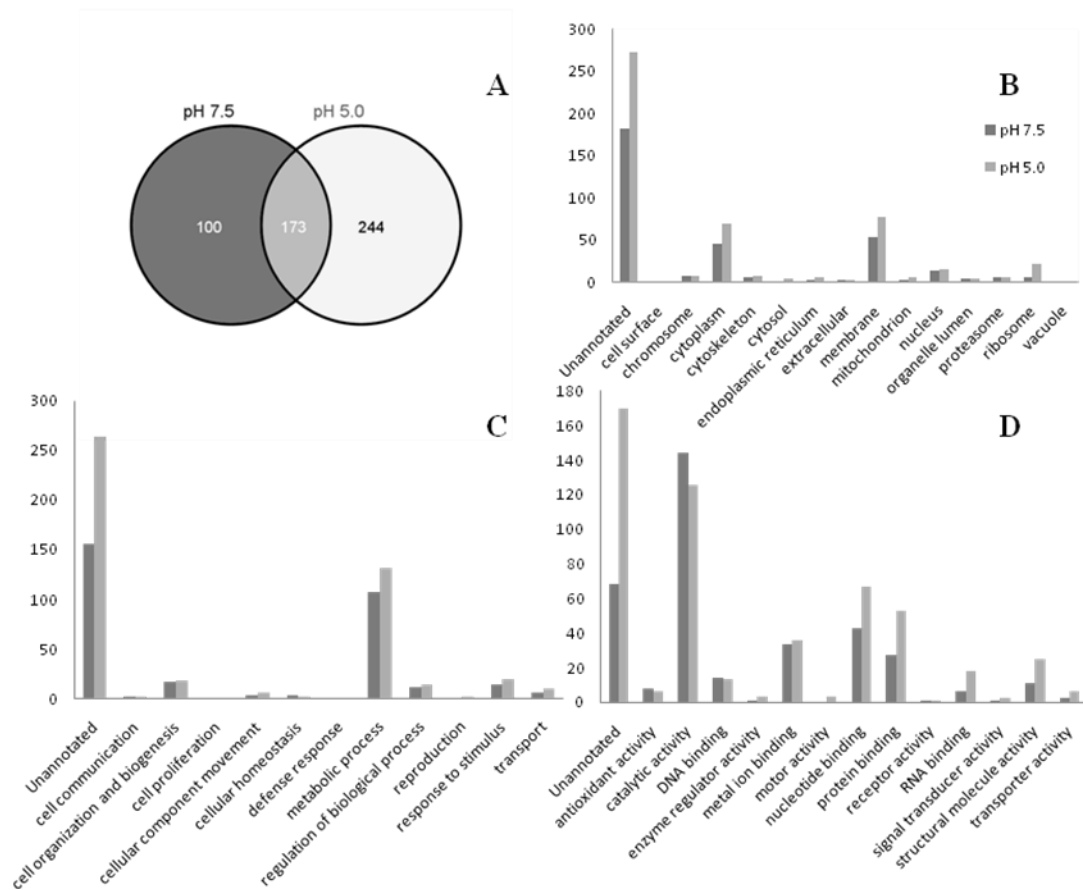
Nesse estudo comparativo preliminar dos exoproteomas cada amostra foi analisada em uma única corrida de gradiente longo de eluição de LC. Embora não fosse esperada a identificação completa das proteínas nem a comparação quantitativa entre as amostras, as identificações obtidas expuseram quais conjuntos de proteínas se apresentaram mais abundantes em cada uma das condições.

Para um maior número de proteínas identificadas, o secretoma em pH fisiológico foi analisado em duplicata e em pH ácido, em triplicata técnica e renderam respectivamente um total de 273 e 417 grupos de proteínas identificados.

Verificou-se que o parasito apresentou mudanças drásticas no seu secretoma tanto na quantidade quanto no tipo de proteínas expressas após pouco mais de 3 horas de indução da diferenciação por incubação em meio ácido quando comparado com o exoproteoma de 3 horas de incubação em DMEM, pH 7,5 (fig 27) e que somente o processo biológico de patogênese foi sub representado no início da diferenciação (tabela 12).

Também foi notável a grande quantidade de proteínas membranares em ambas as amostras, sendo que 73 proteínas secretadas/excretadas por tripomastigotas em pH neutro e 89 secretadas/excretadas em pH ácido, apresentavam de 1 a 6 domínios transmembranares preditos.

Bayer-Santos e colaboradores (Bayer-Santos, Aguilar-Bonavides *et al.*, 2012) já relataram em seu estudo sobre o secretoma de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos que estas formas liberam uma grande quantidade de microvesículas e exossomos. Os resultados parecem mostrar que o mesmo ocorre com tripomastigotas derivados de tecidos, mas a diminuição na proporção de proteínas membranares no início da amastigogênese leva a crer que o estímulo para a diferenciação desencadeia outras formas de secreção além da vesicular e é provável que as vesículas encontradas nessa amostra sejam liberadas ainda no início da incubação, antes que o estímulo pelo pH ácido efetue completamente as mudanças nos processos celulares.



**Figura 27.** Comparação entre os exoproteomas de tripomastigotas incubados em pH 5,0 w em pH 7,5. Diagrama de Venn das identificações em cada condição de incubação (A) e termos GO slim (software ProteinCenter) de componente celular (B), processo biológico (C) e função molecular (D) das proteínas identificadas. Eixo Y representa o número de grupos de proteínas.

**Tabela 12.** Termos GO sub representados na amostra incubada em pH 5,0 comparado com a incubada em pH 7,5

	Descrição	Count <sup>a</sup>	Ref. Count <sup>b</sup>	Raw p-value <sup>c</sup>	FDR p-value <sup>d</sup>
<b>Funções moleculares</b>	catalytic activity	126	144	7.26E-07	4.19E-04
	hydrolase activity	74	91	1.25E-04	3.62E-02
	alpha-sialidase activity	41	58	4.57E-04	4.39E-02
	exo-alpha-sialidase activity	41	58	4.57E-04	4.39E-02
	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	41	58	4.57E-04	4.39E-02
<b>Processos Biológicos</b>	Pathogenesis	42	59	4.48E-04	4.39E-02

*a* número de vezes que esta característica ocorre no conjunto de dados de análise.

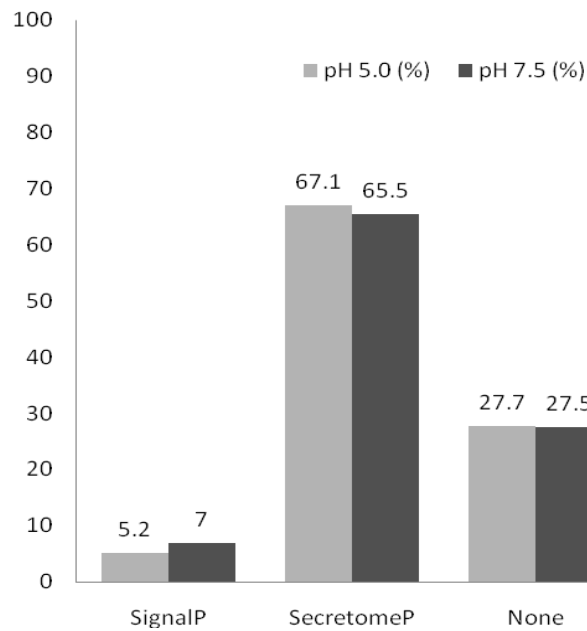
*b* número de vezes que esta característica ocorre no conjunto de dados de referência.

*c* o valor-p não tratado indicando a significância desta diferença na ocorrência dessas características entre os conjuntos de dados.

*d* a versão corrigida por FDR do valor-p não tratado.

Algoritmos de predição de secreção por via clássica (SignalP) e não clássica (SecretomeP) demonstraram que pouco mais de 72% das proteínas identificadas em cada condição foram de fato preditas como secretadas, embora a maioria por vias não clássicas (fig. 28). Somente 5.2 % e 7% de todas as identificações nas amostras de parasitos em pH ácido e neutro, respectivamente, possuíam o peptídeo-sinal predito, demonstrando que apenas uma pequena porção das proteínas seguia a via clássica de secreção através do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, o que está de acordo com outros organismos da ordem kinetoplastidae (Cuervo, De Jesus *et al.*, 2009; Grebaut, Chuchana *et al.*, 2009; Geiger, Hirtz *et al.*, 2010).

Novamente devido ao significativo número de proteínas não anotadas e a grande quantidade de proteínas com atividade catalítica, foi empregado o *software* Blast2GO para obtermos um maior e mais abrangente detalhamento de nossas amostras e a classificação das enzimas presentes, as quais serão tratadas em assuntos específicos nos tópicos seguintes

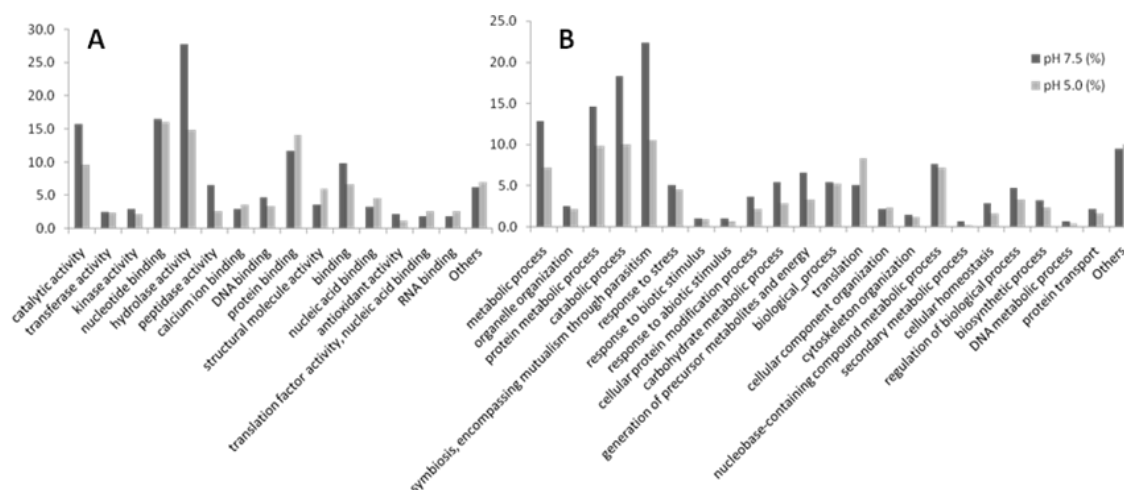


**Figura 28.** Abundância relativa das proteínas identificadas nos secretomas de tripomastigotas incubados em pH 5.0 e em pH 7.5 e preditas como secretadas por via clássica (algoritmo SignalP) e não clássica (algoritmo SecretomeP).

### ***6.3.2 O estímulo de diferenciação causa grandes mudanças no repertório funcional do exoproteoma de tripomastigotas***

Dentre as 364 proteínas anotadas pelo *software* Blast2GO, aquelas de função hidrolásica e atividade catalítica grandemente representadas no exoproteoma de tripomastigotas em pH 7.5 perderam significativamente representação no repertório de proteínas secretadas/excretadas após o estímulo de diferenciação (fig 29A). Efetivamente o estímulo alterou a dominância de proteínas hidrolíticas (peptidases, kinases, transferases, hidrolases e atividade catalítica) por proteínas de ligação (a cálcio, DNA, RNA e a outras proteínas) e proteínas de atividade molecular estrutural.

A quase totalidade das proteínas de atividade molecular estrutural exclusivamente encontradas no secretoma em pH 5.0 são proteínas ribossomais, exceto uma KAP (*kinetoplast-associated protein*) e uma proteína putativa não caracterizada, descrita pelo *software* como VAP (*vesicle-associated membrane protein-associated protein a isoform 2*), as quais foram preditas para secreção por via não-clássica e não possuem domínio transmembranar.



**Figura 29.** Comparação entre os exoproteomas de tripomastigotas incubados em pH 5,0 e em pH 7,5. Termos GO slim (software Blast2GO) de função molecular (A) e processo biológico (B) das proteínas identificadas. Eixo Y representa a porcentagem em relação ao total de proteínas identificadas em cada condição.

Proteínas KAP desempenham um papel de neutralização de cargas e condensação de DNA em *T. cruzi* e sua dinâmica no cinetoplasto em várias formas do parasito tem sido bastante estudada (Gonzalez, Rosales *et al.*, 1990; Zavala-Castro, Acosta-Viana *et al.*, 2000; Cavalcanti, Shimada *et al.*, 2009; De Souza, Rampazzo Rde *et al.*, 2010), porém não há descrição de uma função desempenhada por ela quando secretada.

Proteínas VAP são proteínas integrais de membrana do retículo endoplasmático altamente conservadas e implicadas em diversas funções moleculares (Lev, Ben Halevy *et al.*, 2008), o que parece divergir da característica físico-química de nossa proteína. Porém, analisando-se os domínios protéicos detectados, encontramos o domínio PapD-like (IPR008962) e MSP (IPR000535). Proteínas VAP (VAPB/ALS8 humana, VAP33 de *Drosophila* e VPR-1 de *C. elegans*) são proteínas homólogas com um domínio MSP (*major sperm domain*) N-terminal e um domínio transmembranar. O domínio MSP é assim nomeado devido à similaridade com a proteína MSP de *C. elegans*, um hormônio que se liga ao receptor Eph e induz a maturação do oócito. Também já foi relatado que domínios MSP de proteínas VAP são clivadas e secretadas como ligantes de receptores Eph (Tsuda, Han *et al.*, 2008), que corresponde à maior subfamília de receptores tirosina cinase, e estão implicados na regulação de diversos processos como formação de fronteiras teciduais



(Rohani, Canty *et al.*, 2011), migração celular e segmentação (Davy e Soriano, 2005), em sua maioria no desenvolvimento embrionário. A superfamília PapD-like de chaperonas periplasmáticas dirigem a montagem de mais de 30 organelas de superfície adesivas de superfície que mediam a ligação de diferentes bactérias patogênicas a tecidos de hospedeiros (Barnhart, Pinkner *et al.*, 2000).

O incremento de proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  se reflete do papel regulatório desse íon durante e após a invasão, um evento que conhecidamente desencadeia a liberação dos reservatórios intracelulares de cálcio em ambas as células.

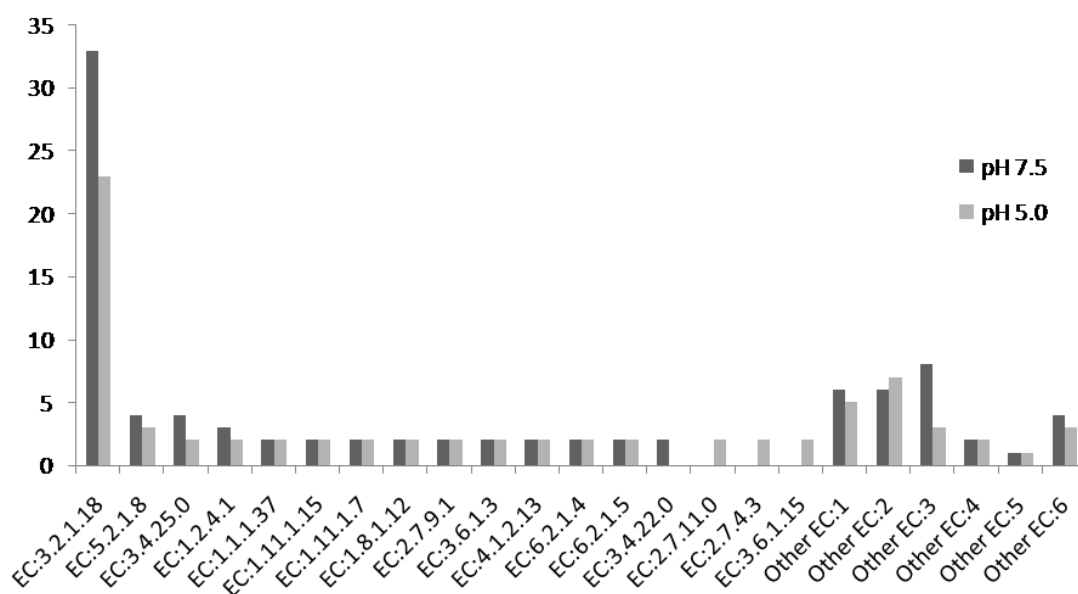
O estímulo de diferenciação dos parasitos também diminuiu sobremaneira a quantidade e proporção de proteínas secretadas relacionadas ao metabolismo de diversos compostos, à geração de metabólitos secundários e energia e a simbiose e parasitismo (fig. 29B). O incremento mais significativo em quantidade, na amostra incubada em pH ácido, ocorreu nas proteínas categorizadas nos processos biológicos de tradução, processo metabólico de compostos contendo nucleotídeos, organização de componente celular e de resposta a estresse.

A partir desses dados, acreditamos que o parasito ainda dentro do fagolisossomo, antes da diferenciação completa para a forma amastigota, já se capacita a interferir no metabolismo da célula hospedeira em todos os níveis, desde o genômico até o protéico e ultraestrutural.

### 6.3.3 *Enzimas*

O conjunto de proteínas com atividade catalítica, detectadas em ambas as amostras pelo *software*, foi amplamente dominado pela classe das exo- $\alpha$ -sialidasas (EC:3.2.1.18), cuja a totalidade é composta por proteínas TS e algumas glicoproteínas. Todas as proteínas com essa atividade são preditas como secretadas por vias não-clássicas, exceto duas TS que apresentaram peptídeo-sinal, uma exclusivamente detectada na amostra de pH 7.5 (gi|322827645) e outra exclusivamente em pH 5.0 (gi| 322829142). Embora a quantidade de proteínas TS detectadas após o estímulo de diferenciação axênica tenha diminuído significativamente, nessa situação elas ainda são bastante abundantes e um provável papel desempenhado por elas para o escape do parasito de dentro do fagolisossomo como facilitadoras da ação de proteínas formadoras de poros (Tc-Tox) já foi anteriormente descrito (Andrews, 1994).

Além das sialidasas, treonina endopeptidases (EC:3.4.25.0), peptidilprolil isomerases (EC:5.2.1.8), piruvato desidrogenases transferidoras de grupo acetil (EC:1.2.4.1) e cisteína proteases (EC:3.4.22.0) passaram a ter menos representantes após o estímulo de diferenciação (fig. 30). Exclusivamente nesta amostra de incubação em pH ácido, observou-se representantes das classes de atividade proteína-Ser/Thr cinase (EC:2.7.11.0), adenilato cinase (EC:2.7.4.3) e nucleosídeo-trifosfatase (EC:3.6.1.15), o que demonstra a interferência do parasito em vias de sinalização responsáveis por proliferação, diferenciação, apoptose e homeostase energética das células hospedeiras.



**Figura 30.** Comparação entre as classes de atividade enzimática mais abundantes detectadas no exoproteoma de tripomastigotas incubados em pH 7.5 e pH 5.0.

### 6.3.2 Conclusões

A obtenção das amostras nas condições descritas levou à identificação de proteínas das quais quase 3/4 são preditas como secretadas. Assim como em outros organismos da mesma ordem, a maioria foi predita como secretada por vias não-clássicas. Grande quantidade de proteínas membranares e/ou com domínios transmembranares preditos foram identificadas em ambas as condições, indicando uma intensa liberação de exossomos e microvesículas por tripomastigotas, porém a redução na proporção dessas proteínas na

amostra da incubação em pH ácido sugere que o parasito passe a secretar/excretar proteínas por outras formas.

As mudanças drásticas observadas no conjunto de proteínas secretadas em pH indutor da amastigogênese, comparado com aquelas em pH fisiológico, sugerem que o meio ácido causa a capacitação do parasito para influenciar, ainda antes do tempo em que o *T. cruzi* escapa do fagolisossomo, a fisiologia e metabolismo das células hospedeiras em todos os níveis, desde o genômico pela ação de proteínas de interação com DNA até o protéico e ultraestrutural com a interferência de vias de sinalização intracelular e proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  potencialmente atuantes em processos-chave.

# **7 Referências Bibliográficas**

ACS, K. et al. The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. **Nat Struct Mol Biol**, v. 18, n. 12, p. 1345-50, Dec 2011.

ALONSO, G. D. et al. TcPDE4, a novel membrane-associated cAMP-specific phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 145, n. 1, p. 40-9, Jan 2006. ISSN 0166

\_\_\_\_\_. TcrPDEA1, a cAMP-specific phosphodiesterase with atypical pharmacological properties from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 152, n. 1, p. 72-9, Mar 2007.

ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 18, p. 140-141, 1976.

ANDRADE, S. G. **Biodemas, zimodemas e esquisodemas: sua relação com a patologia da doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 71-80, 1999.

ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 2, p. 471-5, Feb 1994.

ANDREWS, N. W.; COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J. Protozool.**, v. 29, n. 2, p. 264-9, May 1982.

ANTELMANN, H. et al. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. **Genome Res**, v. 11, n. 9, p. 1484-502, Sep 2001.

ARAGAO, M. B. [Domiciliation of Triatominae or pre-adaptation to anthropophily and ornithophily?]. **Rev Saude Publica**, v. 17, n. 1, p. 51-5, Feb 1983.

ARSLAN, M. A.; KUTUK, O.; BASAGA, H. Protein kinases as drug targets in cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 6, n. 7, p. 623-34, Nov 2006.

ATWOOD, J. A., 3RD et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-6, Jul 15 2005.

ATYAME NTEN, C. M. et al. Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 212817, 2010.

AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 2034-9, Feb 17 2004.

AVILAN, L. et al. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. **Enzyme Res**, v. 2011, p. 932549, 2011.

- AYUB, M. J. et al. Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 382, n. 1, p. 30-4, Apr 24 2009.
- BAIDA, R. C. et al. Molecular characterization of serine-, alanine-, and proline-rich proteins of *Trypanosoma cruzi* and their possible role in host cell infection. **Infect Immun**, v. 74, n. 3, p. 1537-46, Mar 2006.
- BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 4, p. 1017-31, Oct 2007.
- BAO, Y. et al. Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 76, n. 10, p. 4757-63, Oct 2008.
- BAO, Y. et al. Protein kinase A regulatory subunit interacts with P-Type ATPases in *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 80, n. 6, p. 941-3, Jun 2009.
- BAO, Y. et al. Protein kinase A catalytic subunit interacts and phosphorylates members of trans-sialidase super-family in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, v. 12, n. 10, p. 716-26, Sep 2010.
- BAO, Y. et al. Molecular cloning and characterization of mitogen-activated protein kinase 2 in *Trypanosoma cruzi*. **Cell Cycle**, v. 9, n. 14, p. 2888-96, Jul 15 2010.
- BARNHART, M. M. et al. PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 14, p. 7709-14, Jul 5 2000.
- BARRETTO, M. P. [Reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the Americas]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 16, n. 4, p. 527-52, Oct-Dec 1964.
- BASTOS, I. M. et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **Biochem J**, v. 388, n. Pt 1, p. 29-38, May 15 2005
- BAYER-SANTOS, E. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **J Proteome Res**, Dec 8 2012.
- BAYONA, J. C. et al. SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 12, p. M110 007369, Dec 2011.
- BEAUSOLEIL, S. A. et al. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 10, p. 1285-92, Oct 2006.
- BERGERON, M. et al. Abnormal IFN-gamma-dependent immunoproteasome modulation by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. **Parasite Immunol**, v. 30, n. 5, p. 280-92, May 2008.

- BERRIZBEITIA, M. et al. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 2, p. 291-6, Feb 2006.
- BERTELLO, L. E.; ANDREWS, N. W.; DE LEDERKREMER, R. M. Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 79, n. 2, p. 143-51, Aug 1996.
- BHOWMICK, I. P. et al. Plasmodium falciparum enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. **Malar J**, v. 8, p. 179, 2009.
- BOMAN, A. L.; KAHN, R. A. Arf proteins: the membrane traffic police? **Trends Biochem Sci**, v. 20, n. 4, p. 147-50, Apr 1995.
- BRACK, C. [Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector rhodnius prolixus]. **Acta Trop**, v. 25, n. 4, p. 289-356, 1968.
- BREITLING, R. et al. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. **FEBS Lett**, v. 573, n. 1-3, p. 83-92, Aug 27 2004.
- BRENCHLEY, R. et al. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. **BMC Genomics**, v. 8, p. 434, 2007.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Microbiol**, v. 1, n. 4, p. 461-5, Aug 1998.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 3, p. 229-36, Mar 2006.
- CAVALCANTI, D. P. et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 120, 2009.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-6, Sep 15 2005.
- CONTRERAS, V. T. et al. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1213-20, Dec 2002.
- CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, v. 16, n. 3, p. 315-27, Sep 1985.
- CORDERO, E. M. et al. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. **J Proteome Res**, v. 8, n. 7, p. 3642-52, Jul 2009.

COURA, J. R. [Epidemiologic determinants of Chagas' disease in Brazil: the infection, the disease and its morbidity/mortality]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83 Suppl 1, p. 392-402, Nov 1988.

\_\_\_\_\_. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 113-22, Oct 30 2007.

COURA, J. R. Doença de Chagas. In: COURA, J. (Ed.). **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p.p. 12-18.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009.

CUERVO, P. et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **J Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79-92, Nov 2 2009.

DAVY, A.; SORIANO, P. Ephrin signaling in vivo: look both ways. **Dev Dyn**, v. 232, n. 1, p. 1-10, Jan 2005. ISSN

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

DE LOURDES HIGUCHI, M. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 263-7, 1999.

DE PABLOS, L. M. et al. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 79, n. 10, p. 3993-4001, Oct 2011.

DE SOUZA, F. S. et al. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 172, n. 2, p. 90-8, Aug 2010.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010.

DEANE, L. M. Animal Reservoirs of *Trypanosoma Cruzi* in Brazil. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 16, p. 27-48, Jan-Mar 1964.

DI NOIA, J. M. et al. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 271, n. 50, p. 32078-83, Dec 13 1996.

DIAZ-BENJUMEA, R. et al. Characterization of a novel cAMP-binding, cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase (TcrPDEB1) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v. 399, n. 2, p. 305-14, Oct 15 2006.



DIRCEU ESDRAS TEIXEIRA, P. H. C., MARLENE BENCHIMOL E WANDERLEY DE SOUZA. **Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011. 50p.

DOERIG, C. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1697, n. 1-2, p. 155-68, Mar 11 2004.

DOMENICALI PFISTER, D. et al. A Mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 7, p. 1126-35, Jul 2006.

DZEJA, P.; TERZIC, A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: Metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 4, p. 1729-72, Apr 2009.

EDMAN, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. **Arch Biochem**, v. 22, n. 3, p. 475, Jul 1949

ELIAS, J. E.; GYGI, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. **Nat Methods**, v. 4, n. 3, p. 207-14, Mar 2007.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular cycle. **J Protozool**, v. 32, n. 1, p. 80-3, Feb 1985.

FARIA, L. O.; LIMA, B. D.; DE SA, C. M. *Trypanosoma cruzi*: effect of the infection on the 20S proteasome in non-immune cells. **Exp Parasitol**, v. 120, n. 3, p. 261-8, Nov 2008.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, Oct 6 1989.

FERELLA, M. et al. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles. **Proteomics**, v. 8, n. 13, p. 2735-49, Jul 2008.

FERELLA, M. et al. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles. **Proteomics**, v. 8, n. 13, p. 2735-49, Jul 2008.

FERREIRA, D. et al. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5522-8, Oct 2006.

FLAWIA, M. M.; TELLEZ-INON, M. T.; TORRES, H. N. Signal transduction mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**, v. 13, n. 1, p. 30-3, Jan 1997.

FORATTINI, O. P. [Biogeography, origin and distribution of Triatominae domicile dispersal in Brazil]. **Rev Saude Publica**, v. 14, n. 3, p. 265-99, Sep 1980.

FORCE, T. et al. Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1196-205, Mar 16 2004.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 40, p. 617-47, 2000.

FURUYA, T. et al. A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 9, p. 6428-38, Mar 3 2000.

FUTSCHIK, M. E.; CARLISLE, B. Noise-robust soft clustering of gene expression time-course data. **J Bioinform Comput Biol**, v. 3, n. 4, p. 965-88, Aug 2005.

GEIGER, A. et al. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 20

\_\_\_\_\_. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. **BMC Microbiol**, v. 10, p. 20, 2010.

GONCALVES, M. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp Parasitol**, v. 72, n. 1, p. 43-53, Jan 1991.

GONZALEZ, A. et al. Cloning and characterization of a gene coding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 40, n. 2, p. 233-43, May 1990.

GONZALEZ, J. et al. A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v. 374, n. Pt 3, p. 647-56, Sep 15 2003.

GRAVES, J. D.; KREBS, E. G. Protein phosphorylation and signal transduction. **Pharmacol Ther**, v. 82, n. 2-3, p. 111-21, May-Jun 1999.

GREBAUT, P. et al. Identification of total and differentially expressed excreted-secreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 10, p. 1137-50, Aug 2009.

GREENBAUM, D. et al. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. **Genome Res**, v. 11, n. 9, p. 1463-8, Sep 2001.

GRELLIER, P. et al. Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 98, n. 2, p. 239-52, Jan 25 1999.

GRELLIER, P. et al. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47078-86, Dec 14 2001.

GROSSHANS, B. L.; ORTIZ, D.; NOVICK, P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 32, p. 11821-7, Aug 8 2006.

GUTTINGER, A. et al. A mitogen-activated protein kinase of *Trypanosoma brucei* confers resistance to temperature stress. **Mol Biochem Parasitol**, v. 153, n. 2, p. 203-6, Jun 2007.

HERNANDEZ-OSORIO, L. A. et al. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 283842, 2010.

HOARE, C. A. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. **Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh**, 1972.

HUANG, H. Signal transduction in *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol**, v. 75, p. 325-44, 2011.

HUANG, H. et al. Molecular cloning and characterization of the protein kinase A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 149, n. 2, p. 242-5, Oct 2006.

HUANG, H. et al. Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 9, p. 1107-15, Aug 2002.

HUBBARD, M. J.; COHEN, P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. **Trends Biochem Sci**, v. 18, n. 5, p. 172-7, May 1993.

HUBBARD, S. R. Src autoinhibition: let us count the ways. **Nat Struct Biol**, v. 6, n. 8, p. 711-4, Aug 1999.

\_\_\_\_\_. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. **Curr Opin Struct Biol**, v. 12, n. 6, p. 735-41, Dec 2002.

HURMALAINEN, V. et al. Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 4, p. 1112-22, Apr 2007.

INOUE, M. et al. The 14-3-3 proteins of *Trypanosoma brucei* function in motility, cytokinesis, and cell cycle. **J Biol Chem**, v. 280, n. 14, p. 14085-96, Apr 8 2005.

ISHIGAKI, S. et al. Physical and functional interaction between Dorfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. **J Biol Chem**, v. 279, n. 49, p. 51376-85, Dec 3 2004

J. BORGES-PEREIRA, I. P., J. R. COURA Observações sobre as dejeções e o número de *T. cruzi* eliminados por diferentes espécies de triatomíneos durante a alimentação. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. (Suppl. I): 7, 1988.

J.C.P. DIAS, J. R. C. Epidemiologia. In: JCP DIAS, J. C. (Ed.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p.p. 33-66.

JENSEN, O. N. Interpreting the protein language using proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 6, p. 391-403, Jun 2006.

JENSEN, S. S.; LARSEN, M. R. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 21, n. 22, p. 3635-45, 2007.

JIMENEZ, V. et al. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **J Cell Biochem**, v. 105, n. 3, p. 688-98, Oct 15 2008.

JOHNSON, L. N.; NOBLE, M. E.; OWEN, D. J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. **Cell**, v. 85, n. 2, p. 149-58, Apr 19 1996.

JONES, M. N.; HOLT, R. G. Cloning and characterization of an alpha-enolase of the oral pathogen *Streptococcus mutans* that binds human plasminogen. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 364, n. 4, p. 924-9, Dec 28 2007.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 2, p. 95-102, Feb 2004.

JPC DIAS, V. M. Doença de Chagas. In: DIAS, J. (Ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p.p. 557-593.

KANBARA, H., UEMURA, H., NAKAZAWA, S. & NUSSENZWEIG, V. Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 39, p. 226-228, 1990.

KAWASAKI, M.; NAKAYAMA, K.; WAKATSUKI, S. Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. **Curr Opin Struct Biol**, v. 15, n. 6, p. 681-9, Dec 2005.

KOZIOL, J. A. Comments on the rank product method for analyzing replicated experiments. **FEBS Lett**, v. 584, n. 5, p. 941-4, Mar 5 2010.

KUNZ, S.; OBERHOLZER, M.; SEEBECK, T. A FYVE-containing unusual cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. **FEBS J**, v. 272, n. 24, p. 6412-22, Dec 2005.

KURODA, I. et al. Phosphopeptide-selective column-switching RP-HPLC with a titania precolumn. **Anal Sci**, v. 20, n. 9, p. 1313-9, Sep 2004.

LARSEN, M. R. et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 7, p. 873-86, Jul 2005.

LEV, S. et al. The VAP protein family: from cellular functions to motor neuron disease. **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 6, p. 282-90, Jun 2008.

LI, X.; STARK, G. R. NFkappaB-dependent signaling pathways. **Exp Hematol**, v. 30, n. 4, p. 285-96, Apr 2002.

LIU, F. et al. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 1236-51, Jun 2009.

LOPEZ-CESPEDES, A. et al. Seroprevalence of Antibodies Against the Excreted Antigen Superoxide Dismutase by *Trypanosoma Cruzi* in Dogs From the Yucatan Peninsula (Mexico). **Zoonoses Public Health**, Jul 10 2012.

MAÇANEIRO, L. D. O. F. **Expressão de imunoproteassoma em células infectadas com *Trypanosoma cruzi***. 2008. 93 (doutorado). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today**, v. 14, n. 3, p. 119-24, Mar 1998.

MAGALHÃES, A. et al. *Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. **Proteome Sci**, v. 6, p. 24, 2008.

MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. **Anal Chem**, v. 72, n. 6, p. 1156-62, Mar 15 2000.

MAKAROV, A. et al. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. **Anal Chem**, v. 78, n. 7, p. 2113-20, Apr 1 2006.

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

MATEO, H. et al. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 271-6, May 2008.

MATSUMOTO, T. K. et al. *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 42, n. 3, p. 187-92, Mar 2002.

MCNULTY, D. E.; ANNAN, R. S. Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. **Mol Cell Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 971-80, May 2008.

MEERANG, M. et al. The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 11, p. 1376-82, Nov 2011.

MOORE, R. E.; YOUNG, M. K.; LEE, T. D. Qscore: an algorithm for evaluating SEQUEST database search results. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 13, n. 4, p. 378-86, Apr 2002.

MOSS, J.; VAUGHAN, M. Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 21, p. 12327-30, May 26 1995.

MOTTA, F. N. et al. The Trypanosoma cruzi virulence factor oligopeptidase B (OPBTc) assembles into an active and stable dimer. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30431, 2012.

MULLER, I. B. et al. Stage-specific requirement of a mitogen-activated protein kinase by Trypanosoma brucei. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 11, p. 3787-99, Nov 2002.

NAKAYASU, E. S. et al. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi at the epimastigote stage. **Proteomics**, v. 9, n. 13, p. 3489-506, Jul 2009.

NAKAYASU, E. S. et al. Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in Trypanosoma cruzi. **J Proteome Res**, v. 11, n. 1, p. 237-46, Jan 1 2012.

NAKAYASU, E. S. et al. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of Trypanosoma cruzi. **Mol Syst Biol**, v. 5, p. 261, 2009.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. **Biochim Biophys Acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 151-9, Dec 30 2005.

NAULA, C.; SEEBECK, T. Cyclic AMP signaling in trypanosomatids. **Parasitol Today**, v. 16, n. 1, p. 35-8, Jan 2000.

NETT, I. R. et al. Identification and specific localization of tyrosine-phosphorylated proteins in Trypanosoma brucei. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 4, p. 617-26, Apr 2009

NEVES, D. **Metiltioadenosina fosforilase de Trypanosoma cruzi, um alvo potencial para quimioterapia da doença de Chagas, apresenta ampla especificidade a substratos e elevada estabilidade estrutural.** 2006. PhD Thesis University of Brasília

NIE, Z.; HIRSCH, D. S.; RANDAZZO, P. A. Arf and its many interactors. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 4, p. 396-404, Aug 2003

NOZAKI, T. et al. Cloning and characterization of a gene encoding phosphatidyl inositol-specific phospholipase C from Trypanosoma cruzi. **Mol Biochem Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 283-95, Aug 20 1999

O'REGAN, L.; BLOT, J.; FRY, A. M. Mitotic regulation by NIMA-related kinases. **Cell Div**, v. 2, p. 25, 2007.

OCHATT, C. M. et al. Characterization of the catalytic subunit of Trypanosoma cruzi cyclic AMP-dependent protein kinase. **Mol Biochem Parasitol**, v. 57, n. 1, p. 73-81, Jan 1993.

OLSEN, J. V. et al. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 2010-21, Dec 2005.

OLSEN, J. V. et al. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. **Nat Methods**, v. 4, n. 9, p. 709-12, Sep 2007.

- OLVER, C.; VIDAL, M. Proteomic analysis of secreted exosomes. **Subcell Biochem**, v. 43, p. 99-131, 2007.
- ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 5, p. 252-62, Oct 2005.
- OSUNA, A. et al. Trypanosoma cruzi: calcium ion movement during internalization in host HeLa cells. **Int J Parasitol**, v. 20, n. 5, p. 673-6, Aug 1990.
- OSUNA, A. et al. Inhibition of lysosomal fusion by Trypanosoma cruzi in peritoneal macrophages. **Int J Parasitol**, v. 16, n. 6, p. 629-32, Dec 1986.
- PABA, J. et al. Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. **J Proteome Res**, v. 3, n. 3, p. 517-24, 2004 May-Jun 2004.
- PABA, J. et al. Proteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi. **Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 1052-9, Apr 2004.
- PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V. A. alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. **J Biol Chem**, v. 273, n. 23, p. 14503-15, Jun 5 1998.
- PARK, J. B. et al. Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by alpha-actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. **J Biol Chem**, v. 275, n. 28, p. 21295-301, Jul 14 2000.
- PARODI-TALICE, A. et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing Trypanosoma cruzi metacyclogenesis. **J Mass Spectrom**, v. 42, n. 11, p. 1422-32, Nov 2007.
- PARSONS, M. et al. Distinct patterns of tyrosine phosphorylation during the life cycle of Trypanosoma brucei. **Mol Biochem Parasitol**, v. 45, n. 2, p. 241-8, Apr 1991.
- PARSONS, M. et al. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi. **BMC Genomics**, v. 6, p. 127, 2005.
- PASQUALATO, S.; RENAULT, L.; CHERFILS, J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. **EMBO Rep**, v. 3, n. 11, p. 1035-41, Nov 2002.
- PEARSON, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev**, v. 22, n. 2, p. 153-83, Apr 2001.
- PEREZ-MORALES, D. et al. Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi epimastigotes subjected to heat shock. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 902803, 2012.
- PIACENZA, L. et al. Trypanosoma cruzi Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. **Antioxid Redox Signal**, May 21 2012.

PINKSE, M. W. et al. Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. **Anal Chem**, v. 76, n. 14, p. 3935-43, Jul 15 2004.

PODWOJSKI, K. et al. Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics. **Expert Rev Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 249-61, Apr 2010.

POLLEVICK, G. D. et al. Trypanosoma cruzi surface mucins with exposed variant epitopes. **J Biol Chem**, v. 275, n. 36, p. 27671-80, Sep 8 2000.

QIU, H.; WANG, Y. Quantitative analysis of surface plasma membrane proteins of primary and metastatic melanoma cells. **J Proteome Res**, v. 7, n. 5, p. 1904-15, May 2008.

RAMAJO-HERNANDEZ, A. et al. Schistosoma bovis: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. **Exp Parasitol**, v. 115, n. 1, p. 83-91, Jan 2007.

REISINGER, F.; MARTENS, L. Database on Demand - an online tool for the custom generation of FASTA-formatted sequence databases. **Proteomics**, v. 9, n. 18, p. 4421-4, Sep 2009.

RINGQVIST, E. et al. Release of metabolic enzymes by Giardia in response to interaction with intestinal epithelial cells. **Mol Biochem Parasitol**, v. 159, n. 2, p. 85-91, Jun 2008.

RODRIGUEZ, A. et al. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **J Cell Biol**, v. 134, n. 2, p. 349-62, Jul 1996.

ROHANI, N. et al. EphrinB/EphB signaling controls embryonic germ layer separation by contact-induced cell detachment. **PLoS Biol**, v. 9, n. 3, p. e1000597, Mar 2011.

ROSS, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Mol Cell Proteomics**, v. 3, n. 12, p. 1154-69, Dec 2004.

RUAL, J. F. et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. **Nature**, v. 437, n. 7062, p. 1173-8, Oct 20 2005.

SALTO, M. L. et al. Formation and remodeling of inositolphosphoceramide during differentiation of Trypanosoma cruzi from trypomastigote to amastigote. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 756-68, Aug 2003

SANT'ANNA, C. et al. Subcellular proteomics of Trypanosoma cruzi reservosomes. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1782-94, Apr 2009.

SANTANA, J. M. et al. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochem J**, v. 325 ( Pt 1), p. 129-37, Jul 1 1997.



SANTOS, D. O.; OLIVEIRA, M. M. Effect of cAMP on macromolecule synthesis in the pathogenic protozoa *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 3, p. 287-92, Jul-Sep 1988.

SCHOIJET, A. C. et al. Defining the role of a FYVE domain in the localization and activity of a cAMP phosphodiesterase implicated in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 1, p. 50-62, Jan 2011.

SCHWAMMLE, V.; JENSEN, O. N. A simple and fast method to determine the parameters for fuzzy c-means cluster analysis. **Bioinformatics**, v. 26, n. 22, p. 2841-8, Nov 15 2010.

SEEBECK, T. et al. cAMP signalling in *Trypanosoma brucei*. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 5-6, p. 491-8, May 1 2001

SHORT, B. et al. A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. **J Cell Biol**, v. 155, n. 6, p. 877-83, Dec 10 2001.

SILVERMAN, J. M. et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biol**, v. 9, n. 2, p. R35, 2008.

SILVERMAN, J. M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 6, p. 842-52, Mar 15 2010.

SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. In: (Ed.). **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**. New York: Springer, 2005. cap. 397-420,

SOBLIK, H. et al. Life cycle stage-resolved proteomic analysis of the excretome/secretome from *Strongyloides ratti*--identification of stage-specific proteases. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 12, p. M111 010157, Dec 2011.

SOLDATI, T. et al. Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 43, p. 25541-8, Oct 27 1995.

SONG, B. L.; SEVER, N.; DEBOSE-BOYD, R. A. Gp78, a membrane-anchored ubiquitin ligase, associates with Insig-1 and couples sterol-regulated ubiquitination to degradation of HMG CoA reductase. **Mol Cell**, v. 19, n. 6, p. 829-40, Sep 16 2005.

STENMARK, H.; OLKKONEN, V. M. The Rab GTPase family. **Genome Biol**, v. 2, n. 5, p. REVIEWS3007, 2001.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1988.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients. **J Exp Med**, v. 179, n. 3, p. 1017-22, Mar 1 1994.

TARLETON, R. L. et al. The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. **PLoS Med**, v. 4, n. 12, p. e332, Dec 2007.

TAVERNER, T. et al. DanteR: an extensible R-based tool for quantitative analysis of -omics data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 18, p. 2404-6, Sep 15 2012.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, Aug 2006.

TEIXEIRA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. **Am J Pathol**, v. 80, n. 1, p. 163-80, Jul 1975.

THINGHOLM, T. E. et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. **Nat Protoc**, v. 1, n. 4, p. 1929-35, 2006.

THINGHOLM, T. E.; LARSEN, M. R. The use of titanium dioxide micro-columns to selectively isolate phosphopeptides from proteolytic digests. **Methods Mol Biol**, v. 527, p. 57-66, xi, 2009.

TJALSMA, H. et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, n. 3, p. 515-47, Sep 2000.

TOMLINSON, S. et al. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, v. 110 ( Pt 5), p. 547-54, Jun 1995.

TROCOLI TORRECILHAS, A. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes Infect**, v. 11, n. 1, p. 29-39, Jan 2009.

TSUDA, H. et al. The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 963-77, Jun 13 2008.

ULLOA, R. M. et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J**, v. 255, n. 1, p. 319-26, Oct 1 1988.

ULRICH, P. N. et al. Identification of contractile vacuole proteins in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18013, 2011.

URBINA, J.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 495-501, Nov 2003.

VANEGAS, G. et al. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. **Parasitol Res**, v. 101, n. 6, p. 1511-6, Nov 2007.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol Rev**, v. 59, n. 2, p. 223-40, Jun 1995.

VILLALTA, F. et al. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS Lett**, v. 505, n. 3, p. 383-8, Sep 21 2001.

WHITE, F. M. The potential cost of high-throughput proteomics. **Sci Signal**, v. 4, n. 160, p. pe8, 2011.

WHO. **Chagas disease: control and elimination**. Executive Board. 2008

WIGODZINSKY, A. L. A. P. **Revision of the triatomine (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease**. New York: Bulletin of the American Museum of Natural History, 1979. 520 pp

WU, C. C.; MACCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Curr Opin Mol Ther**, v. 4, n. 3, p. 242-50, Jun 2002.

YAO, Y. et al. Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 33921-30, Nov 26 1999.

YORK, I. A. et al. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. **Immunity**, v. 18, n. 3, p. 429-40, Mar 2003.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcell Biochem**, v. 47, p. 82-91, 2008.

YOSHIDA, N. et al. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 57, n. 6, p. 1663-7, Jun 1989.

ZAVALA-CASTRO, J. E. et al. Stage specific kinetoplast DNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**, v. 76, n. 2, p. 139-46, Sep 18 2000.

ZHENG, D. et al. PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production. **Cell Res**, v. 18, n. 11, p. 1105-13, Nov 2008.

ZHOU, H. et al. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF-kappa B activation. **J Exp Med**, v. 202, n. 10, p. 1327-32, Nov 21 2005.