



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde

**Análise Proteômica de *Trypanosoma cruzi*:
construção de mapas bidimensionais em pH
alcalino**

Adriana Dias Magalhães

Orientador: Prof. Dr° Carlos André Ornelas Ricart

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Patologia Molecular da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília-DF

Março de 2006

AGRADECIMENTOS

É com muito carinho que escrevo esta sessão de agradecimentos, pois as pessoas que aqui menciono tornaram possível a realização deste trabalho, fizeram parte do meu dia a dia neste período e significaram muito para minha formação.

Ao Prof^o Carlos André Ornelas Ricart pelo conhecimento transmitido, paciência, compreensão e incentivo que permitiu a realização desse trabalho.

Ao amigo Jaime Paba que com paciência e sabedoria soube transmitir o conhecimento necessário para a realização dessa tese.

Aos professores Jaime M. Santana e Antônio Teixeira por fornecerem a infra-estrutura necessária para a manutenção das culturas celulares.

Aos professores Marcelo Valle de Sousa, Wagner Fontes, Mariana de Souza Castro, Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima, Pedro Portugal Zanotta por contribuírem na minha formação profissional e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LMPDC Glória Cadavid, David Neves, Ellen e Meire pela ajuda com a cultura de células.

Ao Antônio Rufino pela amizade e ao Nuno pelo apoio técnico durante a realização dessa tese.

Aos amigos e colegas do LBQP Adriano, Alexandre, Anna, Camila, Carol, Carlos Garcia, Carlos Morris, Fábio, Felipe Salomão, Flávia Fernanda, Flávia Melissa, Gabriela, Higor, Karina, Lanuse, Liudy, Liz, Oscar, Pedro Ivo, Pollyana, Rafael, Renan por tornarem o ambiente de trabalho agradável.

Ao Sébastien por ajudar na manutenção das culturas celulares e pelas discussões científicas.

Ao amigo Ricardo Bastos Cunha por ter me mostrado o quão bonito é ser pesquisador; pelos momentos de discussão científica, e por ter sido um amigo de todas as horas.

A Aline pelas discussões científicas, pelas tardes de Terapia intensiva, por estar ao meu lado em todas as horas, por ser uma pessoa forte e me ensinar a encarar a vida de outra maneira.

A Carlinha pelo companheirismo nas horas difíceis e fáceis também.

As amigas Mirta, Polyana e Thaís que são fundamentais na minha vida.

Ao meu irmão Márcio e as minhas irmãs Alaíde e Micheline por acreditarem em mim e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus cunhados Paulo Marcelo e Adriana por serem pra mim como irmãos.

Aos meus sobrinhos Matheus, Marcelinho, Maria Clara, Isadora, Antônio Augusto e Mariana por proporcionarem momentos de felicidade e descontração.

Ao amigo José Rubens por ser uma pessoa iluminada e por estar ao meu lado na busca do caminho espiritual.

Aos amigos dos Grupos Jerônimo Mendonça e Irmã Clara por mostrarem que através da caridade e auto-conhecimento é possível alcançar a paz e o equilíbrio.

Ao Mestre Cláudio Caparelli que com sua serenidade e força me guiava nos momentos difíceis.

Ao meu pai por acreditar em mim, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo seu amor à família que foi importante na construção de um verdadeiro lar do qual me orgulho muito em fazer parte.

Agradeço especialmente à minha mãe pelo amor, incentivo, amizade, dedicação, por sempre me mostrar a importância do estudo, por acreditar no meu potencial e por ser tudo em minha vida.

Agradeço também a OMS, FAPDF e ao CNPq pelo apoio financeiro e à Universidade de Brasília que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

"Se conservares o amor no coração, - obra divina do Universo, - nunca te perderás na sombra, porque terás convertido a própria alma em presença de luz."

Emmanuel

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença de Chagas	1
1.2. Diferenciação em <i>T. cruzi</i>	4
1.3. Expressão de proteínas em <i>T. cruzi</i>	5
1.4. Genômica e Transcriptômica	8
1.5. Proteômica	10
1.5.1. Eletroforese Bidimensional	11
1.5.2. Espectrometria de massa	12
1.6. Dificuldades e abordagens técnicas para o estudo de proteínas básicas	13
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
4. METODOLOGIA	19
4.1. Cultura e obtenção de parasitas	19
4.2. Eletroforese bidimensional de proteínas básicas	19
4.3. Digestão de <i>spots</i> protéicos	20
4.4. Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF	21
4.5. Gel “dois em um” (<i>Two-in-one gel</i>)	21
5. Resultados e Discussão	23
5.1. Padronização dos géis básicos	23
5.2. Identificação de proteínas	33
5.3. Mapas proteômicos de tripomastigotas e amastigotas	41
5.4. Gel “dois em um”(<i>Two-in-one gel</i>)	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46

7. PERSPECTIVAS	47
8. BIBLIOGRAFIA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiologia da doença de Chagas.	1
Figura 2. Três diferentes estágios de vida do <i>T. cruzi</i>	3
Figura 3. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	4
Figura 4. Esquema mostrando o mecanismo de <i>trans-splicing</i>	7
Figura 5. Esquema mostrando a reidratação do gel e a aplicação da amostra com o <i>cup loading</i>	16
Figura 6. Esquema mostrando uma fita de papel de filtro como ponte entre a extremidade da tira de IPG e do eletrodo.	16
Figura 7. Esquema ilustrando o esquema do gel “dois em um”.....	21
Figura 8. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> segundo o método 1.....	25
Figura 9. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> segundo o método 2.....	26
Figura 10. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> segundo o método 4.	28
Figura 11. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> segundo o método 5.....	29
Figura 12. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> segundo o método 6.....	31
Figura 13. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> segundo o método 7.....	32
Figura 14. Exemplo de uma busca de impressão digital do mapa peptídico usando o programa Mascot.....	36
Figura 15. Proteínas identificadas em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por <i>peptide mass fingerprinting</i>	37
Figura 16. Mecanismo de ação de uma PDI.	40
Figura 17. Mapas proteômicos de <i>T. cruzi</i> usando IPGs de faixa básica de pH (6-11).....	42

Figura 18. Eletroforese bidimensional da forma epimastigota comparando a parte ácida do gel usando a técnica do gel “dois em um”. 44

Figura 19. Eletroforese bidimensional da forma epimastigota comparando a parte básica do gel usando a técnica do gel “dois em um”. 45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Protocolos de padronização de géis bidimensionais básicos 22

Tabela 2. *Spots* de proteínas analisados por MALDI-TOF MS e identificados por busca em banco de dados não redundante NCBI..... 38

ABREVIATURAS

2DE	eletroforese bidimensional
ddp	diferença de potencial elétrico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
ICAT	<i>isotope coded affinity tagging</i>
IEF	focalização isoelétrica (<i>isoelectric focusing</i>)
IPG	gradiente imobilizado de pH (<i>Immobilized pH gradient</i>)
LC-MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LIT	<i>liver infusion tryptose</i>
MALDI-TOF MS	espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz (<i>Matrix assisted laser desorption ionization time of fly mass spectrometry</i>)
MASP	<i>mannose-binding lectin-associated serine proteases</i>
mRNA	RNA mensageiro
MTA	metiltioadenosina
MM	massa molecular
m/z	razão massa carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PDI	proteína dissulfito isomerase
PGK	fosfoglicerato quinase
pI	ponto isoelétrico
PMF	impressão digital do mapa peptídico (<i>Peptide mass fingerprinting</i>)
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonil (<i>Phenyl methyl sulphonyl fluoride</i>)
PMSR	peptídeo metionina sulfóxido redutase
RNA	ácido ribonucléico

rpm	rotações por minuto
SBF	soro fetal bovino
SDS	dodecil sulfato de sódio
SL	seqüência líder
TFA	ácido trifluoacético
TLCK	$N\alpha$ -p-tosil-L lisina cloro metil cetona (<i>$N\alpha$-p-tosyl-L-lisine chloro methyl ketone</i>)
TPCK	N-tosil-L-fenil alanina clorometil cetona (<i>N-tosyl-L-phenyl alanine chloromethyl ketone</i>)
Tris	tris-hidroximetilaminoetano
V	voltagem
Vh	volts-hora

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o parasita causador da doença de Chagas, a qual atinge 16-18 milhões de pessoas. Recentemente, o seqüenciamento do genoma do *T. cruzi* foi concluído, o que deu novo impulso aos projetos pós-genômicos visando a elucidação da expressão diferencial de proteínas ao longo do ciclo de vida do parasita. A proteômica é bastante apropriada para este fim, já que a regulação da expressão de proteínas em *T. cruzi* ocorre em nível pós-transcricional. Objetivando-se o estudo das proteínas básicas do proteoma de *T. cruzi*, condições para eletroforese bidimensional (2-DE) em pH alcalino das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas foram estabelecidas. Tornou-se necessário otimizar as condições experimentais para tais géis, já que nessa faixa de pH é normal o aparecimento de longas listras horizontais (*streaking*), baixa resolução de *spots* e baixa reprodutibilidade. O protocolo final, desenvolvido para formas epimastigotas, consistiu na adição de 10% de isopropanol ao tampão de reidratação do gel de gradiente imobilizado de pH, aplicação da amostra em uma fita de papel de filtro conectada ao ânodo, uso de fita embebida com solução de DTT junto ao catodo e focalização isoeletrica utilizando-se o equipamento Multiphor II (GE Healthcare). Um total de 10 *spots* do gel de epimastigotas foram identificados por impressão digital do mapa peptídico (*peptide mass fingerprint*). As proteínas identificadas foram: fosfoglicerato quinase, prostaglandina F2a sintase, peptídeo metionina sulfóxido redutase, metiltioadenosina fosforilase, proteína dissulfeto isomerase, AKB ligase e quatro proteínas hipotéticas (hipotéticas). As condições padronizadas para a 2-DE foram aplicadas na construção de mapas bidimensionais das formas tripomastigotas e amastigotas. Os mapas resultantes permitiram verificar diferenças de expressão entre os proteomas. Por último, foi testada a metodologia do gel “dois em um” para 2-DE em faixa ampla de pH, que mostrou resultados promissores para futuras análises da expressão comparativa de proteínas em *T.cruzi*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the parasite that causes Chagas disease, a chronic illness that affects 16-18 million people. Recently, the sequencing of *T. cruzi* genome was concluded. This accomplishment stimulated post-genomic projects aiming at elucidating the differential protein expression through the parasite life cycle. Proteomics is the most suitable methodology for this since *T. cruzi* protein expression regulation occurs at post-transcriptional level. In order to study the basic proteins from *T. cruzi* proteome, conditions for two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) of epimastigote, trypomastigote and amastigote life forms were developed. It was necessary to optimize the 2-DE experimental conditions since in the alkaline pH range the gels usually presents spot streaking, low resolution and poor reproducibility. The final protocol, developed for epimastigotas, consisted of the addition of 10% isopropanol to the IPG gel strip rehydration buffer, sample loading using the “paper bridge” method, use of paper strip embedded in DTT solution near the cathode and isoelectric focusing using the Multiphor II apparatus (GE Healthcare). A total of 10 spots from the epimastigote gel were identified by peptide mass fingerprinting. The identified proteins were phosphoglycerate kinase, prostaglandin F2a synthase, methionine peptide sulfoxide reductase, methylthioadenosin phosphorylase, protein disulfide isomerase, AKB ligase and four hypothetical proteins. The optimized 2-DE conditions were applied to the construction of trypomastigotes and amastigotas two dimensional maps. The resulting maps permitted the visualization of differences in protein expression among the proteomes. Finally, the “two-in-one” 2-DE methodology for wide range pHs was tested and gave promising results that may be used in future studies on *T. cruzi* comparative protein expression.

A doença de Chagas está associada a várias reações imunológicas e imunopatológicas. Durante a fase aguda e crônica da doença, vários fenômenos auto-ímunes são observados e podem resultar em uma ativação policlonal ou efeito supressivo que ocorre durante a infecção do parasita (Ouaisi *et al.*, 2001).

A doença humana apresenta duas fases sintomáticas (aguda e crônica) e uma fase assintomática (indeterminada). Na fase aguda os parasitos multiplicam-se no local da infecção, disseminam-se para os tecidos e começam a se localizar nos órgãos. Essa fase geralmente ocorre de 6-8 semanas após a infecção, tem como uma das características clínicas o sinal de Romana (edema bipalpebral unilateral) como porta de entrada do parasita, nessa fase aparecem também os sinais gerais de infecção. A fase aguda é responsável pela morte de aproximadamente 10% dos casos por insuficiência cardíaca decorrente de miocardite aguda ou meningoencefalite aguda. A fase crônica afeta órgãos internos principalmente o coração, o esôfago, o cólon e o sistema nervoso periférico. Dois mecanismos são propostos para a patogenicidade da fase crônica da doença: a inflamação crônica e auto-imunidade. As manifestações clínicas da fase crônica ocorrem anos após a infecção podendo ser fatal se não tiver tratamento, $\frac{1}{4}$ das pessoas desenvolvem sintomas cardíacos, pequena porcentagem desenvolve problemas no trato digestório e raramente há sintomatologia no sistema nervoso periférico. Na fase indeterminada ocorre o aumento da resposta imune e destruição da parasitemia. A fase indeterminada ocorre por vários anos ou décadas sendo que os sinais clínicos e sintomas desaparecem e as pessoas se tornam soropositivas (Souza, 2000).

O *T. cruzi* possui diferentes formas morfológicas e funcionais relacionadas com o hospedeiro vertebrado, tripomastigotas e amastigotas, e invertebrado, epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Os epimastigotas possui o cinetoplasto (DNA mitocondrial) posterior ao núcleo, os tripomastigotas possuem o cinetoplasto anterior ao núcleo e por último a forma amastigota adquire a forma esférica dentro da célula do hospedeiro vertebrado (Figura 2). O ciclo de vida do *T. cruzi* está mostrado na Figura 3. Os parasitas 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 parasita ocorre quando os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos no tubo digestivo do vetor. Os tripomastigotas metacíclicos são liberados através das fezes e urina do hospedeiro invertebrado atingindo o hospedeiro vertebrado por uma ferida na pele ou através da mucosa. Os parasitas invadem diferentes tipos de células no hospedeiro, rapidamente se diferenciam em amastigotas, sofrendo várias divisões no interior das células infectadas. Em seguida, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados para o sangue após o rompimento da membrana celular, iniciando o próximo ciclo de infecção de outras células ou ciclo biológico do parasita quando ingerido pelo inseto vetor (Garcia and De Azambuja, 2000).

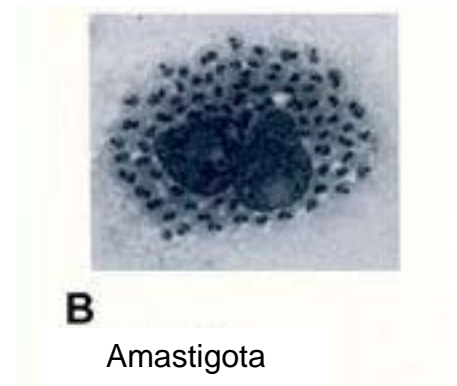
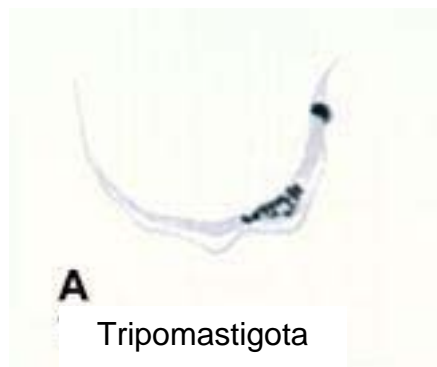


Figura 2. Três diferentes estágios de vida do *T. cruzi* (De Souza, 2002).

Doença de Chagas: Ciclo de Vida do *Trypanossoma cruzi*

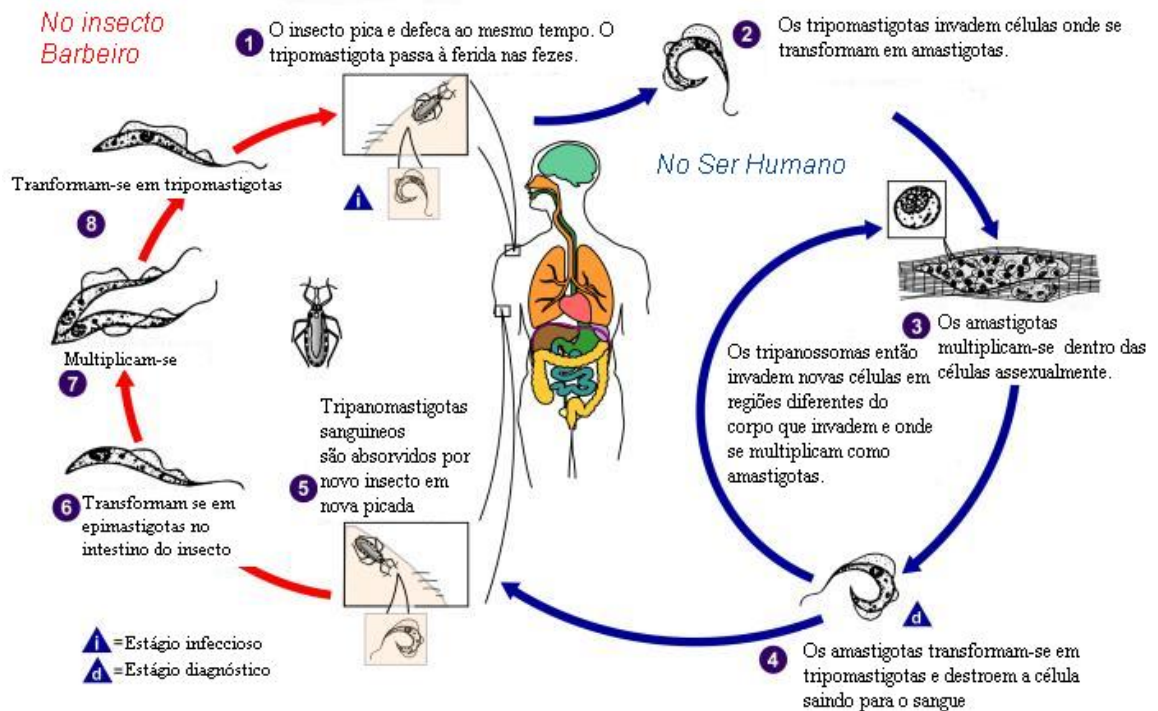


Figura 3. Ciclo de vida do *T. cruzi*.

(Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Doen%C3%A7a_de_Chagas)

A Doença de Chagas é inicialmente diagnosticada de acordo com o histórico do paciente e pelas manifestações clínicas da doença. O diagnóstico é confirmado pela detecção do parasita no sangue na fase aguda da doença e pela detecção de anticorpos na fase crônica da doença. Os tratamentos disponíveis para as infecções agudas são de alta toxicidade e de variável eficácia sendo que nas formas crônicas da doença poucas opções terapêuticas podem ser oferecidas aos pacientes.

1.2. Diferenciação em *T. cruzi*

A diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor provavelmente como uma resposta deste parasita às mudanças ambientais, tais como a redução de nutrientes disponíveis. Os mecanismos envolvidos no

disparo deste processo, que é orientado por notáveis mudanças na expressão gênica, permanecem desconhecidos. A metaciclologênese em *T. cruzi* pode ser mimetizada *in vitro*, em condições químicas definidas, permitindo a seleção de parasitas em vários estágios de diferenciação. 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 metaciclologênese resultam em importantes mudanças na expressão diferencial dos genes (Yamada-Ogatta *et al.*, 2004). Poucos genes estágio-específicos da metaciclologênese de *T. cruzi* são conhecidos e descritos e a maioria que é conhecida codifica antígenos de superfície (Ávila *et al.*, 2003). O estudo de genes estágio-específicos da metaciclologênese ajuda no entendimento da patologia da doença de Chagas e pode conduzir a uma compreensão melhor dos mecanismos que controlam sua expressão.

A primeira amastigogênese ocorre quando o tripomastigota metacíclico se transforma em amastigota dentro da célula do hospedeiro mamífero, e o segundo processo é observado quando tripomastigotas derivados de tecido se diferenciam em amastigotas (Contreras *et al.*, 2002). A maioria da informação a respeito do processo de amastigogênese vem do estudo da forma tripomastigota derivada de tecido, porém pouco é conhecido sobre o processo de desenvolvimento que direciona a forma metacíclica na forma amastigota. (Navarro *et al.*, 2003).

1.3. Expressão de proteínas em *T. cruzi*

O estudo de genes estágio-específico dos tripanossomatídeos fornece informações sobre as diferentes formas de vida e da interação do parasita com o hospedeiro. Além disso, esses estudos podem proporcionar importantes ferramentas para desvendar os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica. O *T. cruzi* regula a expressão de proteínas de maneira pós transcricional através de variações na estabilidade do mRNA ou da eficiência da tradução dos mRNAs (Clayton, 2002). A expressão de proteínas varia nos

diferentes estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*. Por exemplo, em epimastigotas são encontradas as proteínas gp 72 e cruzipaina (Harth *et al.*, 1992, Cazzulo and Frasch, 1992); em tripomastigotas metacíclicos a gp 82, gp 90 e gp 35/50 (Teixeira and Yoshida, 1986; Hart *et al.*, 1993; Ramirez *et al.*, 1993), em tripomastigotas são encontradas a trans-sialidase (Frevet *et al.*, 1992), gp 83 (Villalta *et al.*, 1992) e os antígenos Ssp 1, Ssp 2 e Ssp 3 (Andrews *et al.*, 1987). Em amastigotas encontram-se a amastina (Teixeira *et al.*, 1994), o epitopo Ssp 4 (Burleigh and Andrews, 1998), e a gp 83 ou ASP (“amastigote surface protein”) (Pan and McMahonPratt, 1989, Low and Tarleton, 1997).

O *Trypanosoma brucei* apresenta um mecanismo que burla o sistema imune do hospedeiro através de variações antigênicas. O parasita é coberto por uma única proteína que tem a função de ativar o sistema imune do hospedeiro, em seguida, por um processo de recombinação gênica, algumas células formam uma nova capa protéica que não é reconhecida pelo sistema imune, dessa forma o parasita pode atacar o hospedeiro sem ser reconhecido. Esse processo de mudar a cobertura pode ocorrer milhares de vezes, resultando em um ciclo crônico de infecção da doença. O *T. cruzi* não se submete a variações antigênicas como ocorre no *T. brucei*, porém expressa várias moléculas de superfície, dentre elas as mais importantes e mais estudadas foram as mucinas e a família das trans-sialidasas (Clayton, 2002).

Os tripanossomatídeos apresentam mecanismos genéticos peculiares, tais como, a organização dos genes de proteínas em unidades transcricionais policistrônicas, o processamento dos transcritos através de *trans-splicing* e da editoração do RNA. Os RNAs mensageiros dos tripanossomatídeos apresentam, na extremidade 5', uma seqüência extremamente conservada de 39 nucleotídeos denominada seqüência líder (SL) ou *mini-exon*. A SL é adicionada ao mRNA através de um mecanismo de *trans-splicing*. Trata-se de uma reação intermolecular da qual participam uma molécula doadora (RNA da seqüência líder) e um aceptor, que é o mRNA que está sendo sintetizado. A reação envolve a clivagem das duas espécies de RNAs e transferência da SL para o mRNA. A reação de *trans-splicing* é catalisada por um complexo multienzimático

constituído por enzimas específicas e ribonucleases. A SL é derivada de um RNA de 110 nucleotídeos codificado por genes localizados em um ou dois cromossomos, dependendo da cepa de *T. cruzi*. O RNA da SL é clivado e uma porção de 39 nucleotídeos resultante da clivagem é transferida para a região 5' do mRNA nascente. A região 5' do pré-mRNA é clivada em um sítio específico (consenso AG) e substituída pela SL. Como os RNAs mensageiro e da SL são codificados por genes situados em diferentes sítios do genoma, o processo foi denominado de *trans-splicing* (Figura 4) (Landfear, 2003, Silveira, 2000).

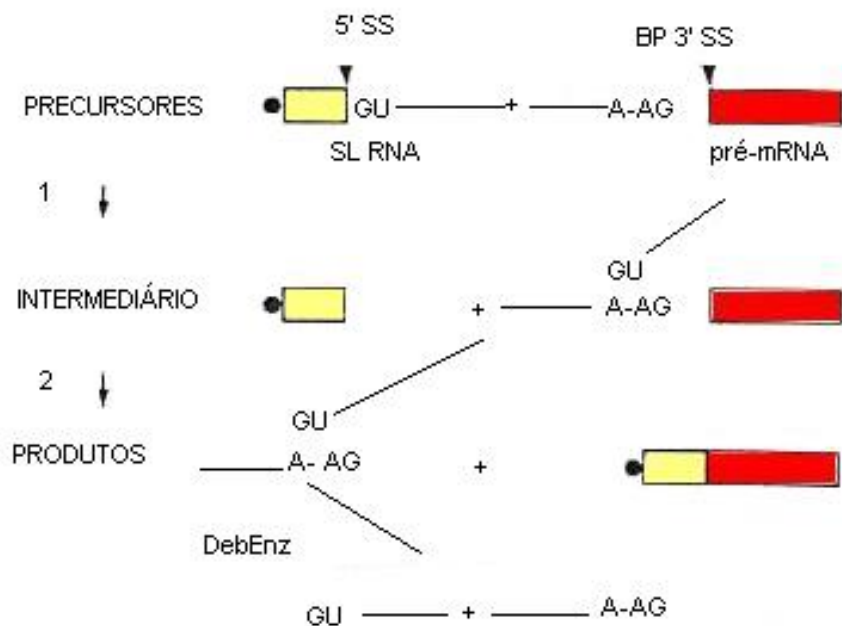


Figura 4. Esquema mostrando o mecanismo de *trans-splicing*. A caixa amarela representa a seqüência líder (SL) e a vermelha o mRNA. Nessa reação ocorre a transferência dos 39 nucleotídeos (SL) do SL RNA para o pré-mRNA. Parte da porção 5' do pré-mRNA é substituída pela SL (Modificado de Ullu *et al.*, 1996).

A ausência de seqüências promotoras consenso nos tripanossomatídeos sugere que o controle da expressão gênica nos tripanossomas ocorre principalmente a nível pós-transcricional e envolve o processamento e tradução dos transcritos. A SL está teoricamente presente em todos os mRNAs do tripanossoma. A função exata da SL ainda não é conhecida. No entanto, há

evidências de que a SL confere a estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação, e auxilia também na interação do mRNA com os ribossomos. Transcritos que não apresentam SL perdem a sua estabilidade e não são traduzidos. Tal como ocorre nos eucariontes superiores, os mRNAs dos tripanossomas apresentam na sua extremidade 3' uma cauda composta por cerca de 30 resíduos de adenina (cauda poli A). Porém, ao contrário dos eucariontes superiores, os mRNAs dos tripanossomatídeos não apresentam uma seqüência consenso para a adição de resíduos de adenina. Sabe-se que a adição de SL e da cauda poli A ocorre durante a transcrição do mRNA mas ainda existe uma certa controvérsia com relação à hierarquia desses eventos (Silveira, 2000).

1.4. Genômica e Transcriptômica

A análise genética de *T. cruzi* é uma tarefa laboriosa, pois não há condensação cromossômica durante a divisão celular. O *T. cruzi* apresenta um genoma diplóide, e se reproduz assexuadamente. A ausência de reprodução sexuada também dificulta a análise genética desses parasitas por meio de métodos convencionais. O emprego de técnicas modernas de transformação do parasita com diferentes construções genéticas tem produzido resultados promissores (Silveira, 2000).

O genoma nuclear de *T. cruzi* pode ser agrupado em três classes: a) seqüências que codificam proteínas, b) seqüências que codificam RNAs e c) seqüências repetitivas, as quais não são codificadoras (Silveira, 2000).

O seqüenciamento de genoma de parasitas vem progredindo. Alguns genomas apresentam dificuldades de serem seqüenciados, ou por serem grandes ou por terem várias seqüências de DNA repetidas tornando assim um obstáculo para seqüenciar de forma compreensiva com os recursos atuais. Sendo assim, *sequence tags* (EST), que são seqüências transcritas e expressas nas células, são utilizados.

O projeto genoma de *T. cruzi* começou oficialmente em 1994 em dois fóruns científicos independentes: CYTED – Programa Ibero-Americano para

Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia financiado pelo governo espanhol, e OMS-Organização Mundial de Saúde (Levine *et al.*, 1994, Zingales *et al.*, 1997). O objetivo do projeto genoma é a obtenção da seqüência completa de nucleotídeos do genoma nuclear. Os resultados finais do genoma de *T. cruzi* foram publicados no volume 309 da revista *Science* de 2005 (El-Sayed *et al.*, 2005).

O *T. cruzi* apresenta um genoma diplóide com cerca de 22.570 genes codificantes de proteínas. Mais de 50% do genoma do parasita consiste de seqüências repetidas, tais como, retrotransposons de genes da grande família das moléculas de superfícies, os quais incluem trans-sialidases, mucinas, gp 63s e as proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP). A recombinação homóloga tem sido bem documentada em tripanosomatídeos pelo fato de serem usadas em manipulações experimentais do genoma e é a chave do mecanismo de variação antigênica que *T. brucei* usa para a evasão imune. Várias classes de moléculas importantes da via de sinalização celular não se encontram em tripanosomatídeos, incluindo receptores transmembrânicos, proteína G heterotrimérica, a maior parte dos receptores catalíticos, domínios SH2 e SH3 e fatores que regulam a transcrição. Alguns receptores catalíticos foram encontrados e todos são adenilato ciclases (El-Sayed *et al.*, 2005).

A elucidação da seqüência completa do genoma de *T. cruzi* não é suficiente para definir os processos dinâmicos relacionados à expressão de proteínas. Assim, estudos pós-genômicos visando a elucidação da expressão diferencial de proteínas em diferentes condições, incluindo as metodologias proteômicas e as de *DNA microarray* tornaram-se uma conseqüência natural do seqüenciamento do genoma. Deve-se lembrar que a regulação gênica em *T. cruzi* não se dá em nível transcricional. Como já mencionado anteriormente, os genes de *T. cruzi* são transcritos constitutivamente na forma de mRNAs policistrônicos que são processados a mRNAs monocistrônicos através de um mecanismo de *trans-splicing*. A regulação da expressão ocorre, portanto, através do controle da estabilidade e/ou da tradução específica dos mRNAs (Vanham and Pays, 1995). Esse fato limita o uso de *DNA microarrays* e torna a

abordagem proteômica bastante atrativa para descrever as mudanças globais na expressão proteica global durante o ciclo de vida do *T. cruzi*.

1.5. Proteômica

O termo proteoma foi criado em 1995 e refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo, ou no caso de organismos multicelulares, como o complemento proteico expresso por um tecido ou células diferenciadas (Wilkins *et al*, 1996). Enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da sua vida, o proteoma é extremamente dinâmico e variável. A análise proteômica permite saber se e quando um produto genético está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução. A análise proteômica pode mostrar como esses processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica (Anderson *et al.*, 2000).

A proteômica possui a potencialidade de contribuir decisivamente para desvendar os complexos caminhos metabólicos nas diversas etapas celulares, gerando descobertas sem precedentes na biologia celular. A pesquisa proteômica já está tornando possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (Cash, 2002).

O estudo do proteoma também pode viabilizar a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos.

A análise proteômica dos estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* vem sendo desenvolvida há mais de 5 anos por pesquisadores da Universidade de Brasília. O grupo, coordenado pelo Prof. Drº Carlos André Ornelas Ricart, publicou dois dos primeiros artigos sobre proteômica de *T. cruzi*. O primeiro

deles relatou a construção de mapas proteômicos de três formas de vida do parasita: tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas em faixa de pH 4-7 (Paba *et al.*, 2004a) enquanto o segundo trabalho utilizando uma abordagem sem uso de eletroforese e sim reagentes de marcação isotópica (ICAT) mostrou a expressão diferencial de proteínas nas formas tripomastigotas e amastigotas (Paba *et al.*, 2004b).

Mais recentemente foi publicado, também no volume 309 da *Science* (Atwood III *et al.*, 2005), um artigo apresentando a análise proteômica de *T. cruzi* usando cromatografia multidimensional acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). A estratégia é extremamente poderosa e permitiu a identificação de um grande número de proteínas, porém não foi capaz de fornecer informações características dos polipeptídeos, tais como, ponto isoelétrico e massa molecular o que inviabiliza a determinação de isoformas protéicas assim como modificações pós-traducionais.

1.5.1. Eletroforese Bidimensional

Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas com base em duas das suas propriedades: numa primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e, numa segunda dimensão, em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com a sua massa molecular (MM) (O'Farrell, 1975). Em géis bidimensionais os polipeptídeos aparecem formando manchas (*spots*) após serem corados. Diferentes *spots* podem conter isoformas da mesma proteína com coordenadas específicas de pI e MM. Em 1988, Angelika Görg introduziu o uso de gradientes imobilizados de pH (IPG), nos quais tampões especiais são co-polimerizados com acrilamida e bisacrilamida, acarretando uma melhor reprodutibilidade dos perfis bidimensionais. 2D-PAGE é uma técnica que pode ser usada para a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos entre amostras. O aparecimento ou desaparecimento de *spots* podem fornecer informações acerca de proteínas estágio-específicas, enquanto a intensidade

dos *spots* fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídeos (Graves and Haystead, 2002).

Apesar de ser uma técnica poderosa a 2D-PAGE apresenta limitações, sendo que as principais estão relacionadas à pouca representação de proteínas de alta massa molecular, a baixa resolução de proteínas hidrofóbicas e a dificuldade de visualizar proteínas existentes em número reduzido de cópias por células (Gygi and Aebersold, 2000). Existe também dificuldade de se obter padrões eletroforéticos reprodutíveis para proteínas com ponto isoelétrico muito alcalino (Hoving *et al.*, 2000). O pré-fracionamento da amostra (Görg *et al.*, 2002, Locke *et al.*, 2002), a diminuição da concentração da malha dos IPGs (Brush *et al.*, 2003, Candiano *et al.*, 2002) assim como a diminuição do efeito eletroendosmótico em géis alcalinos (Hoving *et al.*, 2002) têm aliviado significativamente essas restrições.

1.5.2. Espectrometria de massa

A espectrometria de massas (MS) determina as massas moleculares de compostos químicos através da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa-carga (m/z). Um espectrômetro de massa é composto basicamente de duas partes: o sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporizá-las e carregá-las eletricamente, e o analisador de massa propriamente dito, que separa os íons resultantes de acordo com a massa (Siuzdak, 1996).

Atualmente existem duas técnicas de ionização: a desorção a *laser* auxiliada por matriz (MALDI), onde a amostra é irradiada com um feixe de laser que causa a ionização e a desorção da molécula, e a eletropulverização, na qual a amostra em uma solução acidificada é pulverizada na forma de gotículas altamente carregadas na presença de um campo elétrico forte. Uma corrente de gás é aplicada às gotículas que, com a evaporação do solvente, decrescem de volume ocasionando a repulsão mútua entre as cargas e a liberação dos íons na direção do analisador de massa.

Dois tipos de analisadores de massa acompanham esses sistemas de ionização: o de tempo de voo (*time of-flight*- TOF) que é usualmente associado à ionização tipo MALDI, mas pode também ser utilizado com eletropulverização e o quadrupolo, que é geralmente usado com eletropulverização, mas pode estar associado também a desorção a *laser* (Cunha, 2003).

As proteínas podem ser identificadas por impressão digital do mapa peptídico (PMF) que consiste na digestão das proteínas de interesse com tripsina ou outro agente proteolítico e posterior determinação das massas moleculares dos peptídeos resultantes por espectrometria de massa, normalmente do tipo MALDI-TOF. Os valores de massas moleculares obtidos são usados em buscas computacionais em que são comparados com resultados de digestão *in silico* das proteínas existentes em bancos de dados utilizando *softwares* específicos. Na ionização por desorção a *laser* auxiliada por matriz (MALDI), a amostra é solubilizada em uma matriz. A identificação é realizada combinando as massas observadas dos peptídeos com as massas resultantes da digestão teórica (Siuzdak, 1996).

1.6. Dificuldades e abordagens técnicas para o estudo de proteínas básicas

A otimização de condições para a construção de géis bidimensionais em regiões de pH alcalino constitui um grande desafio técnico (Bae *et al.*, 2003, Olsson *et al.*, 2002). Em tais faixas de pH é notável o aparecimento de longas listras horizontais (*streaking*), baixa resolução de *spots* e baixa reprodutibilidade. Os problemas de *streaking* são conseqüências do desaparecimento do agente redutor (normalmente o DTT) da parte básica do gel de gradiente imobilizado de pH (IPG *strip*) usado na etapa de focalização isoelétrica. Esse desaparecimento acarreta oxidação dos grupos tióis das proteínas resultando em pontes dissulfeto intra e intercadeias. Outros efeitos deletéricos na resolução e reprodutibilidade incluem transporte ativo de água na direção do ânodo (eletroendoosmose reversa) causada pelas fortes cargas positivas dos tampões básicos de acrilamida e a hidrólise da acrilamida em ácido acrílico em pHs alcalinos (Hoving *et al.*, 2002).

Reidratação do gel na solução da amostra, reidratação em tampão 2D seguido de aplicação da amostra com auxílio de um recipiente especial-*cup loading*, e a aplicação da amostra em uma fita de papel de filtro são maneiras de aplicar a amostra no IPG *strip*.

Na reidratação do gel o *strip* fica submerso na solução de reidratação contendo a proteína a ser estudada (Figura 5). Devido ao tamanho dos poros do *strip*, moléculas pequenas, tais como água, uréia e detergente, entram no gel mais rápido do que as proteínas. Por essa razão é preciso no mínimo doze horas para que as proteínas entrem completamente no gel. As vantagens mais importantes desse método são: diminuição de erros por manipulação, pois a aplicação da amostra e a IEF são combinadas em apenas uma etapa; não ocorre precipitação no ponto de aplicação da amostra devido as proteínas serem distribuídas uniformemente sobre o gradiente; durante a reidratação do gel pode-se aplicar uma voltagem para melhorar a entrada de proteínas de alta massa molecular. A técnica de reidratação do gel apresenta algumas desvantagens, dentre elas: em gradientes básicos a reidratação leva à perda de proteínas, pois algumas proteínas não têm afinidade por ambiente básico; aumento da atividade de proteases quando a reidratação é feita em temperatura ambiente; durante o processo de reidratação a concentração da proteína fora do *strip* aumenta o que pode levar à formação de agregados de proteínas; proteínas com baixa solubilidade tendem a precipitar formando um borrão no gel (Westermeier and Naven, 2002).

Um outro método utilizado é a reidratação em tampão 2D seguido de aplicação da amostra com auxílio de um recipiente especial - *cup loading* (Figura 5). Nessa técnica o *strip* é pré-hidratado apenas com a solução de reidratação. A amostra é aplicada em um pequeno recipiente para amostra que pode ser colocado na parte básica ou ácida do gel e as proteínas são transportadas para dentro do *strip* eletroforéticamente. O tempo mínimo para a reidratação do *strip* por esse método é de 6 horas. As vantagens mais comuns descritas nesse método são: o melhoramento da focalização isoelétrica em faixa estreita de pH, em pH muito ácidos e em gradientes básicos; a amostra é transportada

imediatamente no gel diminuindo a possibilidade de interações entre as proteínas; redução do efeito das proteases; e as proteínas podem ser carregadas em ambas as extremidades do *strip*. Esse método apresenta algumas desvantagens que devem ser levadas em consideração, como por exemplo: proteínas com ponto isoelétrico perto do ponto da aplicação apresentam a solubilidade e mobilidade baixa, devido a isso tendem a precipitar na superfície e a construir um rastro vertical na segunda dimensão do gel; o volume da amostra a ser aplicada é limitado (Westermeier and Naven, 2002).

A amostra também pode ser aplicada em uma fita de papel de filtro e esta fita é colocada como ponte entre a extremidade da tira de IPG e do eletrodo (Figura 6) (Sabounchi-Schütt *et al.*, 2000). Esse método apresenta os mesmos princípios do *cup loading* com a diferença que o volume da amostra a ser aplicado é muito maior. Uma vantagem desse método é que apenas as proteínas de interesse entram no *strip* e resultando numa melhor focalização das proteínas.

Hoving e colaboradores (2002) observaram uma melhora em géis alcalinos e em géis de faixa estreita de pH ao modificar o tampão 2D original. Essas modificações consistiram em adicionar glicerol e isopropanol ao tampão 2D e ao aumentar a quantidade de agente redutor no meio de focalização. Uma boa focalização resulta em uma melhor análise diferencial do proteoma usando a 2-D PAGE, pois define e aumenta o número dos *spots*.

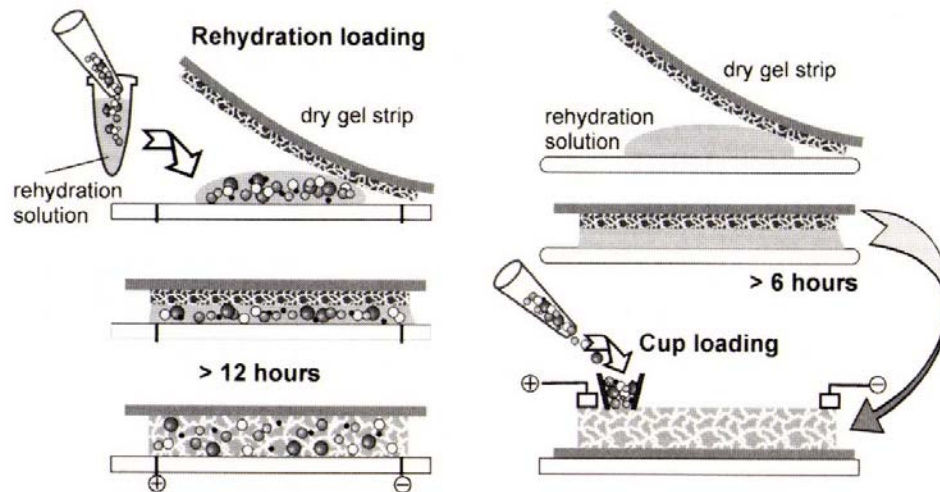


Figura 5. Esquema mostrando a reidratação do gel e a aplicação da amostra com o *cup loading* (Westermeier and Naven, 2002).

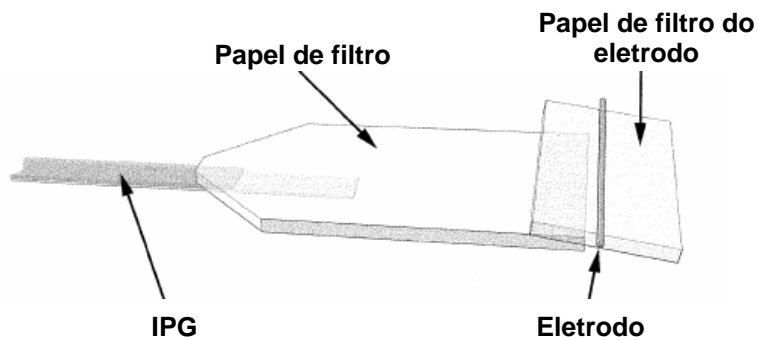


Figura 6. Esquema mostrando uma fita de papel de filtro como ponte entre a extremidade da tira de IPG e do eletrodo. A amostra é aplicada na fita de papel de filtro (Sabounchi-Schütt *et al.* 2000).

2. JUSTIFICATIVA

O *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida complexo, caracterizado por mudanças morfológicas e metabólicas sensíveis a estímulos originados no ambiente em que o parasita se encontra. Isto o faz um modelo interessante para o estudo do controle da diferenciação celular em eucariotos. Além disso, apesar da Doença de Chagas ter sido descrita há 90 anos, ela ainda continua a ser um desafio em termos de saúde pública na América Latina, muito embora os programas de controle da transmissão tenham reduzido consideravelmente o risco de infecção (www.who.int/tdr/). Atualmente, os tratamentos disponíveis para as infecções agudas é de alta toxicidade e de variável eficácia sendo que nas formas crônicas da doença poucas opções terapêuticas podem ser oferecidas aos pacientes. O estudo do proteoma do *Trypanosoma cruzi*, permite a criação de mapas ou perfis da expressão proteica das diferentes formas do parasita os quais estarão disponíveis para consulta por outros investigadores. Espera-se que as informações fornecidas pelos mapas proteômicos possam contribuir para o conhecimento da biologia do parasita, incluindo os mecanismos de controle do seu ciclo celular, a caracterização de proteínas responsáveis pela sua virulência, assim como da descoberta de possíveis alvos de terapia que ofereçam à população infectada novas alternativas de tratamento.

3. OBJETIVOS

- ✓ Padronização dos géis bidimensionais para proteínas de *T. cruzi* em faixa de pH alcalino.
- ✓ Construção de mapas bidimensionais alcalinos para as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*
- ✓ Identificação inicial de *spots* protéicos dos géis bidimensionais.
- ✓ Disponibilização dos resultados em uma página na internet.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultura e obtenção de parasitas

As formas epimastigotas foram obtidas por cultura em meio LIT (*liver infusion tryptose*) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SBF), incubados a 25°C com agitação constante. As formas tripomastigotas foram coletadas a partir de cultura celular em fibroblastos (Andrews and Colli, 1982), mantidos em meio DEM suplementado com SBF 5 %, 100 µg/µL de gentamicina, 100 µg/µL de penicilina, a 37 °C em atmosfera contendo 5 % CO₂ e propagados a cada dez dias após digestão com tripsina 0,1 %. Amastigotas axênicos foram obtidos a partir de tripomastigotas incubados em meio DEM pH 5.0, durante 12h a 37 °C, 5 % CO₂ (Tomlinson *et al.*, 1995). A contagem dos parasitas foi realizada usando diluições crescentes em câmara de Neubauer.

4.2. Eletroforese bidimensional de proteínas básicas

Os parasitas foram lavados três vezes por centrifugação a 3.000 rpm com solução salina 0,85 %. Foi adicionado um volume 10 vezes menor de SDS 0,2 % aos *pellets* que foram fervidos por 5 minutos e, em seguida, resfriados por 1 minuto e solubilizados durante 30 minutos em tampão 2D (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 1 %, Triton X-100 2 %, Pharmalyte 6-11 0,5 %) contendo inibidores de proteases (EDTA 5 mM, PMSF 100 µM, TLCK 100 µM, TPCK 100 µM, pepstatina A 1 µM, leupeptina 100 µM) centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos para eliminar restos celulares e estocados a -80 °C até o uso.

Com o objetivo de se obter melhores resultados para os géis básicos oriundos da isoeletrofocalização (IEF), vários testes foram realizados. Esses testes estão resumidos na Tabela 1. Quando necessário para reduzir o volume, precipitações das amostras foram feitas por adição de acetona gelada ao extrato protéico dos parasitas (três vezes o volume da amostra) durante 2 h, centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 min e solubilizadas no tampão 2D (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 1 %, Triton X-100 2 %, isopropanol 10 %, Pharmalyte 6-

11 0,5 %) antes da reidratação. Todos os experimentos foram realizados utilizando géis de 18 cm com gradiente 6-11. Após a focalização os géis foram submetidos à redução/alquilação por incubação consecutiva em 3 mL de DTT 125 mM e acrilamida 125mM em tampão equilíbrio (Tris-HCL 50 mM pH 6,8, uréia 6 M, glicerol 30 % v/v, SDS 1 %) durante 20 minutos. A separação na segunda dimensão foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE). Para visualização das proteínas presentes nos géis, estes foram corados com nitrato de prata segundo o protocolo de Blum *et al* (1987).

4.3. Digestão de spots protéicos

Os *spots* retirados do gel da forma epimastigota foram descorados por incubação numa solução de ferrocianeto de potássio 15 mM, tiosulfato de sódio 50 mM por 15 minutos (Gharahdadhi *et al.*, 1999). Em seguida, o *spot* foi lavado com três ciclos de água, bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos e acetonitrila 100 % por 10 minutos . Na última lavagem com acetonitrila os *spots* foram macerados com pistilo e secos em Speed Vac. Os géis secos foram reidratados por adição de uma solução de 5-10 µL de uma solução bicarbonato de amônio 100 mM, cloreto de cálcio 5 mM contendo tripsina suína modificada (Promega) 12,5 ng/µL e incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 10 µL do mesmo tampão de digestão sem enzima e incubou-se a 37 °C *overnight*. Os digestos resultantes foram extraídos com duas lavagens com 40 µL de água:acetinitrila: ácido trifluoroacético (66:33:0.1 v/v/v) em sonicador durante 10 minutos. Após secagem em *Speed Vac*, cada digesto foi solubilizado em 10 µL de TFA 0.1 %. Logo em seguida, os digestos foram desalinizados em microcolunas de fase reversa *Zip Tip* (Millipore, Billerica, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a desalinização, os peptídeos foram eluidos da microcoluna diretamente na solução de matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em 50 % acetonitrila, 0.1 % TFA) e aplicado diretamente na placa de aço do espectrômetro de massa.

4.4. Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF

Para a obtenção de mapas peptídicos de cada amostra, análises foram realizadas em um espectrômetro tipo MALDI-TOF modelo Reflex IV (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Os espectros foram obtidos em modo positivo, refletor e extração retardada. Cada espectro foi calibrado internamente com picos de queratina e editados manualmente selecionando apenas os picos monocarregados, a edição foi realizada usando os programas Xmass e Biotools. As buscas foram realizadas através do programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information, NCBI. Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50-100 ppm ou 0,1 Da, restrição de massa molecular de acordo à observada na separação eletroforética, organismos eucariotos, máximo de um sítio tríptico de corte não clivado, propionamidação como modificação constante de cisteínas e oxidação de metionina como modificação variável.

4.5. Gel “dois em um” (*Two-in-one gel*)

Para se obter o gel “dois em um” foram aplicadas às proteínas correspondentes a 10^8 células da forma epimastigota em cada um dos dois *strips* de pH 3-10 usados no experimento. Após a IEF cada *strip* foi cortado ao meio e colocado na segunda dimensão de acordo com o esquema mostrado na Figura 7.

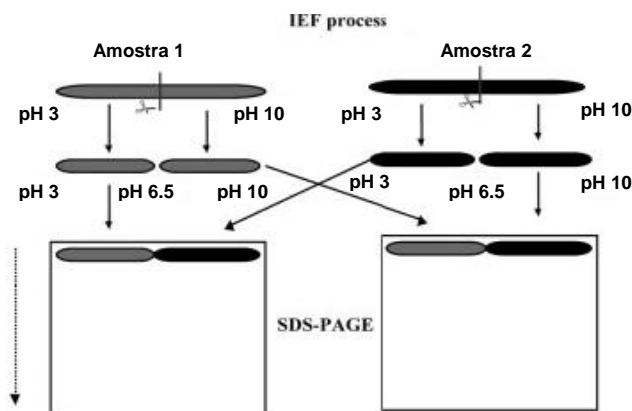


Figura 7. Esquema ilustrando o esquema do gel “dois em um”. (modificado de Wang *et al.*,2003)

Tabela 1. Protocolos de padronização de géis bidimensionais básicos

Método	Precipitação com acetona	Equipamento	Parâmetros	DTT no cátodo	Método de aplicação
1	sim	IPG phor	500 V 1000 V 1000-8000 V	1:00 h 1:00 h 4:00 h	não Reidratação do gel
2	sim	Multiphor II	500 V 500-3500 V 3500 V	0:01 h 1:30 h 6:00 h	não Reidratação do gel
3	sim	Multiphor II	500 V 500-3500 V 3500 V	0:01 h 1:30 h 30:00 h	não Reidratação do gel
4	sim	Multiphor II	300 V 300 V 300-1400 V 1400 V 1400-3500 V 3500 V	0:01 h 3:00 h 6:00 h 10:00 h 3:00 h 2:00 h	sim <i>Cup loading</i>
5	sim	Multiphor II	300 V 300 V 300-1400 V 1400 V 1400-3500 V 3500 V	0:01 h 3:00 h 6:00 h 10:00 h 3:00 h 2:00 h	sim <i>Cup loading (De Streak)</i>
6	não	Multiphor II	150 V 300 V 600 V 3500 V	1:00 h 2:00 h 1:00 h 8:00 h	sim Papel de filtro no ânodo
7	não	Multiphor II	150 V 300 V 600 V 3500 V	1:00 h 2:00 h 1:00 h 10:00 h	sim Papel de filtro no ânodo

5. Resultados e Discussão

5.1. Padronização dos géis básicos

As tentativas de construção de géis 2D para proteínas básicas de *T. cruzi* utilizando métodos padronizados para faixas amplas de pH não mostraram resultados satisfatórios (dados não mostrados). Tornou-se então necessário investir na otimização das condições para tais géis. Variações técnicas dos protocolos (Tabela 1) foram desenvolvidas e testadas. Das três formas de vida do parasita estudadas nesse trabalho, foi escolhida a forma epimastigota para a padronização, sendo que em cada gel foram utilizadas as proteínas correspondentes a 10^8 células.

Dentre os parâmetros variados estavam o tipo de aparelho utilizado para a focalização isoelétrica (Multiphor II or IPGPhor- GE Healthcare), o método de aplicação de amostras (reidratação do gel na solução da amostra ou reidratação em tampão 2D seguido de aplicação da amostra com auxílio de um recipiente especial-*cup loading*), a aplicação de uma fita de papel de filtro embebida em solução de DTT perto do cátodo com a intenção de diminuir a depleção do agente redutor, precipitação da amostra e redissolução em tampão 2D contendo isopropanol antes da focalização isoelétrica (IEF) e variação dos parâmetros de voltagem ao longo da IEF.

O Método 1 refere-se ao protocolo padrão do fabricante para a focalização de géis básicos utilizando o aparelho IPGPhor. Apesar do perfil bidimensional apresentar alguns *spots* bem resolvidos na faixa de massa molecular (MM) entre 14.4 - 20 kDa, pode-se perceber a existência de *streaking* horizontal e ausência de *spots* definidos acima de 43 kDa (Figura 8).

O IPGPhor (GE Healthcare) é atualmente o aparelho de focalização isoelétrica mais moderno existente no nosso laboratório, porém o mesmo não permite que sejam feitas certas modificações apropriadas para focalizações na região básica, tais como aplicação de amostra por *cup loading* nem uso de fitas embebidas em DTT. Sendo assim, foi testado o Método 2 usando o aparelho

Multiphor II (GE Healthcare) aplicando a amostra por reidratação do gel e utilizando o protocolo padrão sugerido pelo fabricante. O perfil bidimensional usando o Método 2 foi inferior ao do método anterior (Figura 9) com *streakings* pronunciados em todas as faixas de massa molecular, o que nos levou a propor novas modificações metodológicas.

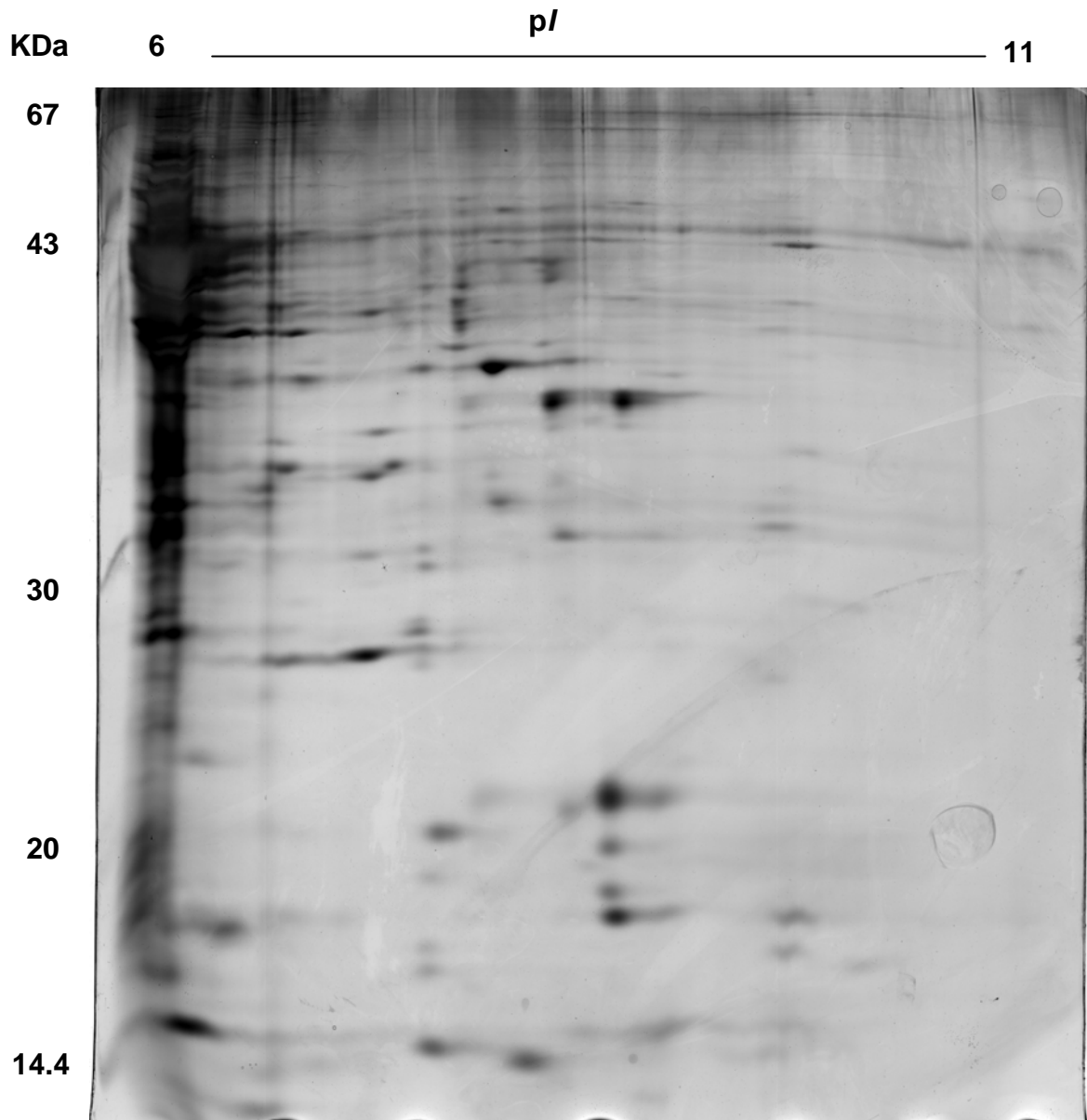


Figura 8. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de *T. cruzi* (extrato protéico correspondente a 10^8 células) segundo o método 1. A amostra foi precipitada com acetona gelada, aplicada no *strip* por reidratação do gel e focalizada usando o equipamento IPGphor. O gel foi corado com nitrato de prata.

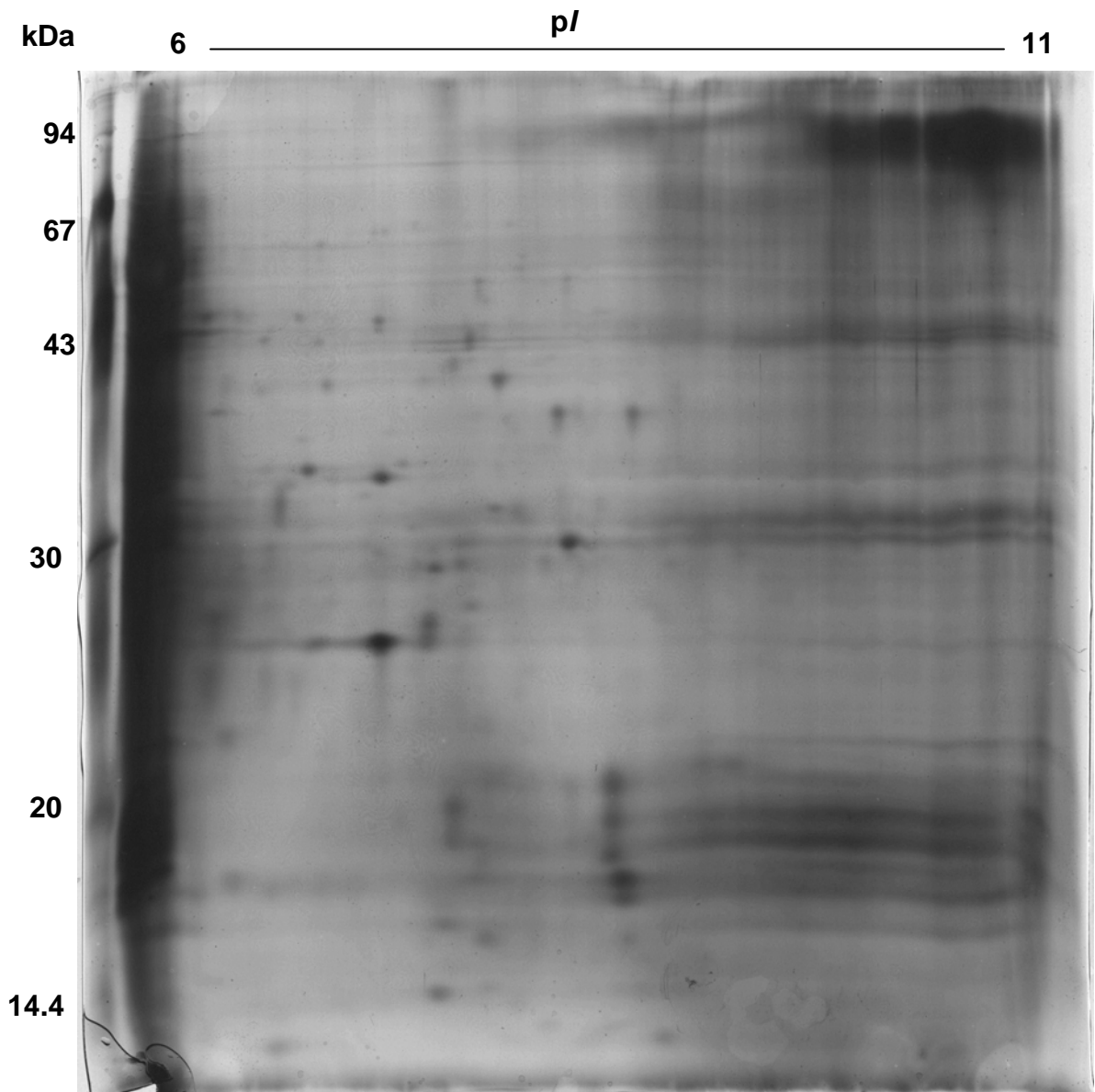


Figura 9. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de *T. cruzi* (extrato protéico correspondente a 10^8 células) segundo o método 2. A amostra foi precipitada com acetona gelada, aplicada no *strip* por reidratação do gel e focalizada usando o equipamento Multiphor II. O gel foi corado com nitrato de prata.

No Método 3 foi alterada a quantidade total de volts-hora (Vh), aumentando de 6 para 30 h o tempo da etapa 3 a 3500 V. Nesse método o perfil bidimensional ficou ainda pior em termos de resolução (dados não mostrados) devido, provavelmente, a excesso de focalização (*overfocusing*).

O Método 4 introduz a aplicação da amostra por *cup loading* próximo ao ânodo durante a IEF e utiliza condições de tempo e voltagem de corrida apropriadas para tal de acordo com instruções do fabricante. Segundo Görg e colaboradores (2000) a aplicação da amostra com o *cup loading* melhora significativamente a focalização das proteínas básicas. Ainda não há uma explicação de como o *cup loading* melhora a definição dessas proteínas. Especula-se que somente as proteínas dentro da escala de pI estudadas entram realmente no gel, eliminando assim os contaminantes, tais como, ácidos nucléicos, moléculas grandes e proteínas que não são de interesse. Esses contaminantes podem contribuir para a formação de listras horizontais nos géis bidimensionais, prejudicando também a definição dos *spots* (Garfin and Heerdt, 2000). A Figura 10 mostra um perfil com maior resolução de *spots* do que os anteriores, indicando que o *cup loading* é vantajoso em relação à reidratação do gel de IPG na solução de amostra.

Com o intuito de melhorar ainda mais a resolução dos géis foi introduzido no Método 5 um produto comercial (*DeStreak* – GE Healthcare) que foi desenvolvido para melhorar perfis de géis básicos. Esse produto consiste de solução de hidroxietil dissulfeto que evitaria formação de pontes dissulfeto nas proteínas da amostra. Surpreendentemente o perfil bidimensional foi muito pobre, apresentando *spots* apenas nos extremos de pH (Figura 11).

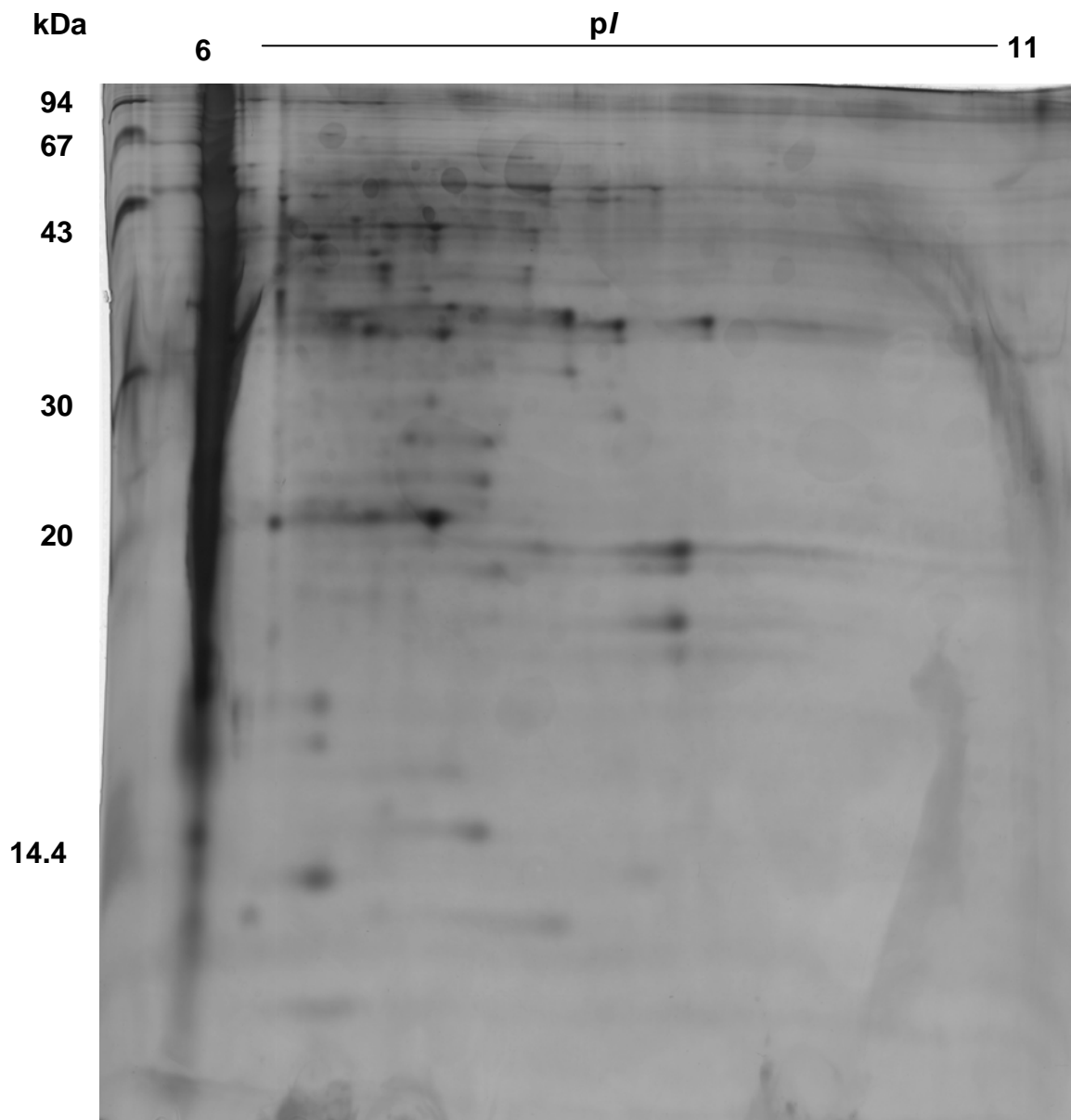


Figura 10. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de *T. cruzi* (extrato protéico correspondente a 10^8 células) segundo o método 4. A amostra foi precipitada com acetona gelada, aplicada no *strip* por *cup loading*, focalizada usando o equipamento Multiphor II com uma fita de DTT no catôdo. O gel foi corado com nitrato de prata.

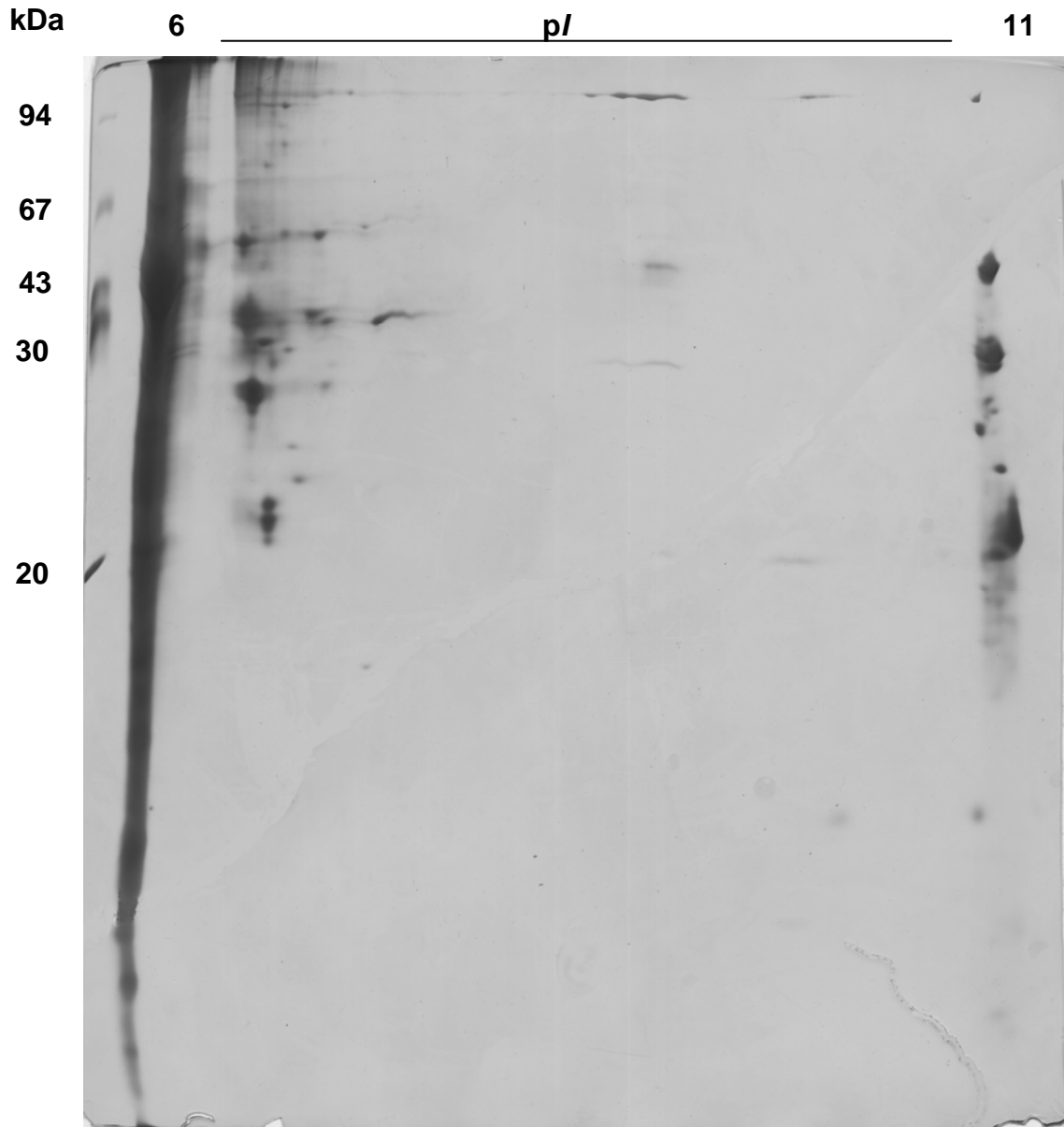


Figura 11. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de *T. cruzi* (extrato protéico correspondente a 10^8 células) segundo o método 5. A amostra foi precipitada com acetona gelada, aplicada no *strip* por *cup loading* substituindo o tampão 2D por *DeStreak*, focalizada usando o equipamento Multiphor II com uma fita de DTT no catôdo. O gel foi corado com nitrato de prata.

Nos métodos anteriores as amostras contendo o lisado de *T. cruzi* eram precipitadas e ressuspensas em tampão bidimensional com o intuito de reduzir o volume a ser aplicado pelo aumento da concentração de proteínas na solução. A fim de testar se a precipitação das proteínas estaria atrapalhando os géis bidimensionais foi decidido testar um método de aplicação onde a amostra era aplicada em pedaço de papel de filtro posicionado entre o *strip* e o anôdo (*paper bridge loading*). Tal método permite aplicação de até 450 µl de amostra, o que tornaria desnecessária a precipitação prévia da amostra. O gel resultante mostrou uma resolução de *spots* muito boa (Figura 12).

Finalmente, no Método 7 utilizou os mesmos parâmetros do método anterior, apenas aumentando de 8 para 10 h o tempo de focalização na etapa 4 com uma ddp de 3500 V. O perfil bidimensional ficou ainda melhor e o Método 7 foi considerado adequado e otimizado para as etapas posteriores do trabalho (Figura 13).

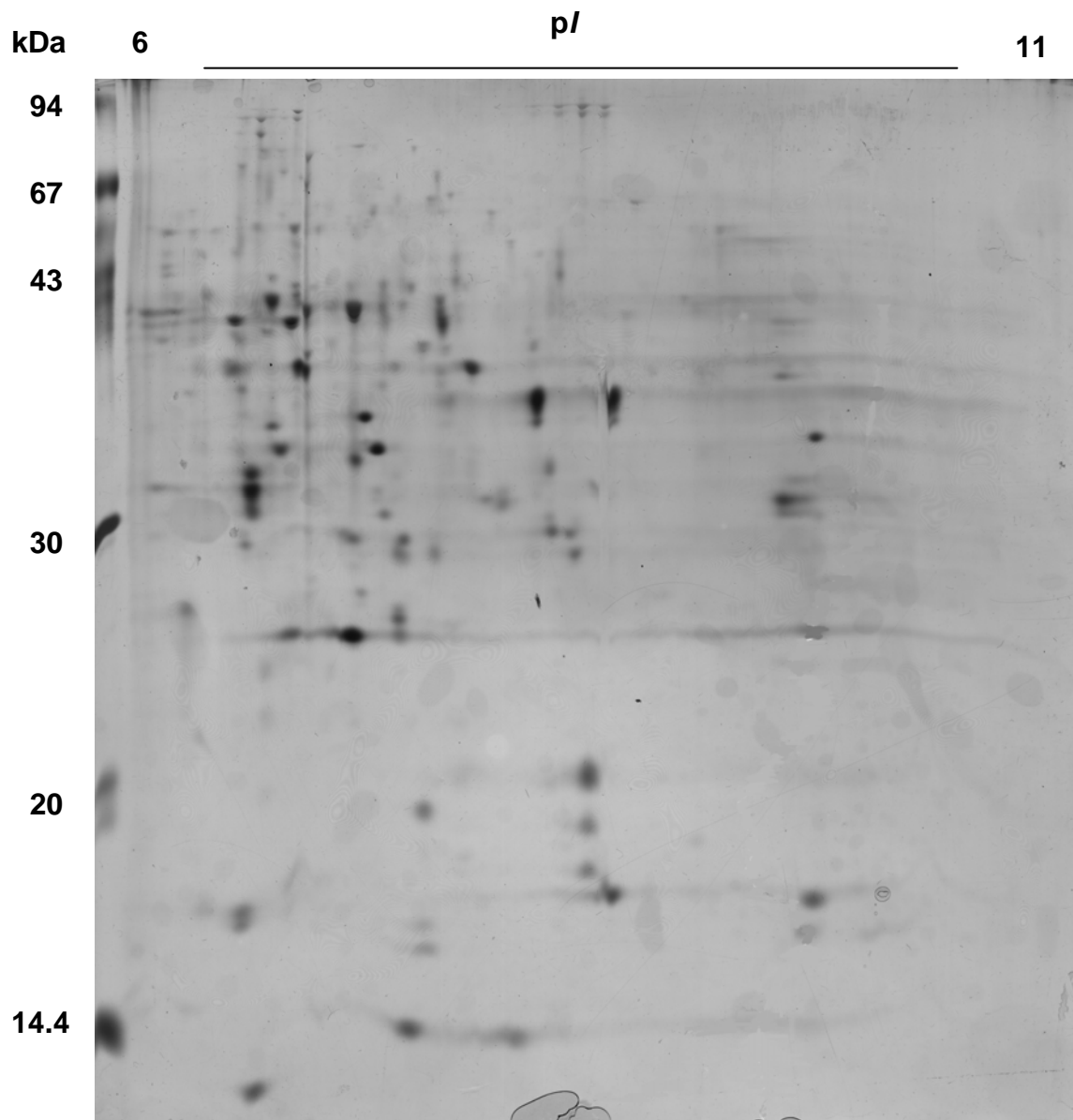


Figura 12. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de *T. cruzi* (extrato protéico correspondente a 10^8 células) segundo o método 6. A amostra foi aplicada no *strip* com uma fita de papel de filtro no anôdo, focalizada usando o equipamento Multiphor II com uma fita de DTT no cátodo. O gel foi corado com nitrato de prata

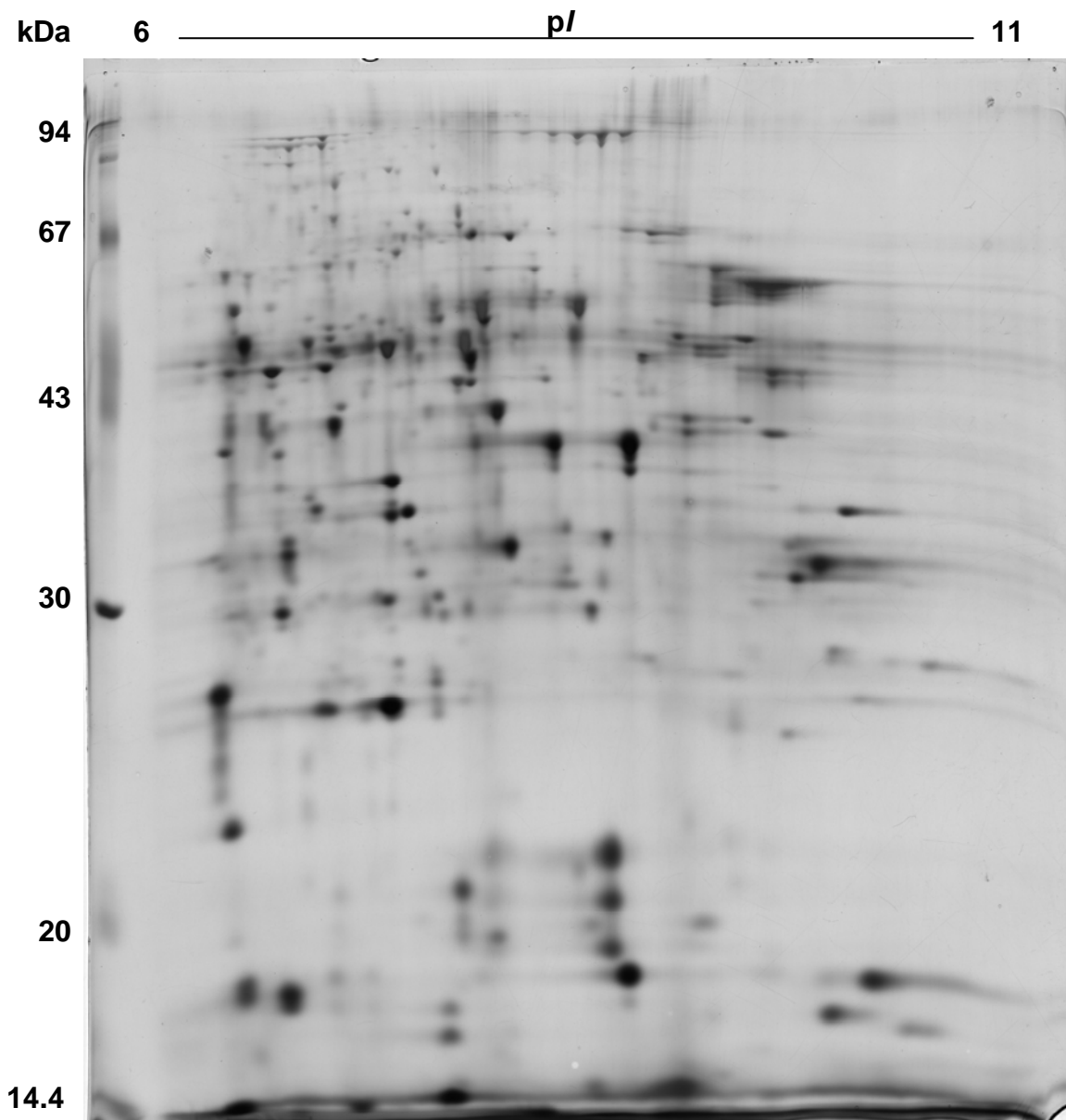
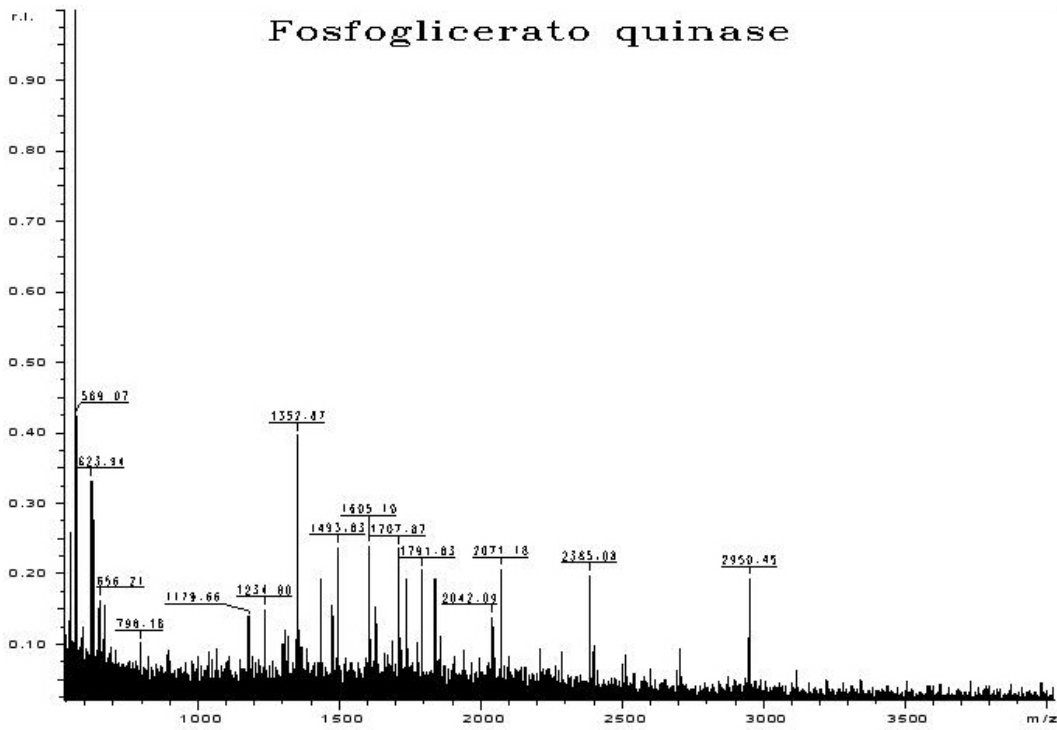


Figura 13. Perfil bidimensional do proteoma de formas epimastigotas de *T. cruzi* (extrato protéico correspondente a 10^8 células) segundo o método 7. A amostra foi aplicada no *strip* com uma fita de papel de filtro no ânodo, focalizada usando o equipamento Multiphor II com uma fita de DTT no cátodo. O gel foi corado com nitrato de prata

5.2. Identificação de proteínas

Quarenta e sete *spots* do mapa bidimensional de epimastigotas foram submetidos à digestão trípica e espectrometria de massa tipo MALDI-TOF (Figura 15). Um exemplo de uma busca de impressão digital do mapa peptídico (PMF) usando o programa Mascot pode ser observado na Figura 14. Dez proteínas foram identificadas sendo sete delas diferentes (Tabela 2). Pela análise da Tab. 2 pode-se observar diferenças significativas entre os valores de *p/s* e massas moleculares teóricos dos observados experimentalmente. Esse fato pode ser explicado devido ao fato de as proteínas poderem sofrer modificações pós-traducionais, tais como, fosforilação, metilação, acetilação e clivagem proteolítica.

Entre as proteínas identificadas temos quatro proteínas hipotéticas, proteínas que participam de vias metabólicas (fosfoglicerato quinase, prostaglandina F2a sintase, peptídeo metionina sulfóxido redutase e metiltioadenosina fosforilase), uma proteína que é responsável pela formação e rearranjo das pontes dissulfeto (proteína dissulfeto isomerase) e por último uma proteína que participa da via bioquímica responsável em converter treonina em glicina (AKB ligase). Esse mapa proteômico já está disponibilizado na página <http://www.lbqp.unb.br/tcruzi>.

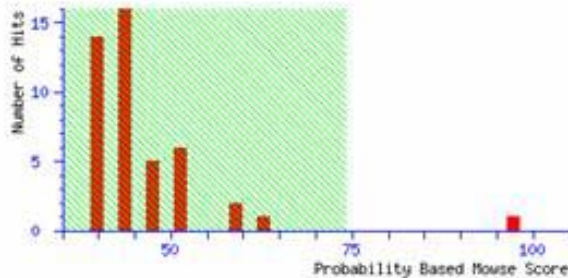


MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : jaime
 Email : bucaros@unb.br
 Search title :
 Database : NCBI nr 20050907 (2817606 sequences; 967108758 residues)
 Taxonomy : Eukaryota (eucaryotes) (1318398 sequences)
 Timestamp : 15 Sep 2005 at 14:18:14 GMT
 Top Score : 97 for [gi|70872287](#), phosphoglycerate kinase, putative [*Trypanosoma cruzi*]

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 74 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As: [Help](#)
 Significance threshold $p <$ Max. number of hits

- [gi|70872287](#) Mass: 44867 Score: **97** Expect: 0.00025 Queries matched: 10
 phosphoglycerate kinase, putative [*Trypanosoma cruzi*]
[gi|70881162](#) Mass: 44956 Score: 72 Expect: 0.083 Queries matched: 8
 phosphoglycerate kinase, putative [*Trypanosoma cruzi*]

Protein View

Match to: gi|70872287 Score: 97 Expect: 0.00025
phosphoglycerate kinase, putative [Trypanosoma cruzi]

Nominal mass (M_r): 44867; Calculated pI value: 6.19
NCBI BLAST search of [gi|70872287](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Trypanosoma cruzi](#)
Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|71411859](#) from [Trypanosoma cruzi](#)

Fixed modifications: Propionamide (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR
Number of mass values searched: 30
Number of mass values matched: 10
Sequence Coverage: 39%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MALKEKKGID QVDVKGKRVL IRVDFNVPVK DGKITNDYRI RSALPTIKKV
51 LESGGSCVLM SHLGRPKGVT MAAAAACGDD SVPGYEAGAT LKPVAERLGE
101 LLNVPVVFAP DCLKAASTVE KLSPGGVVLL ENVRFYVEEG SKKEEERDAM
151 ARVLASYGDV YISDAFGTAH RESATMTGIP KVLGHGAAGY LMEKEISYFA
201 KVLGSPARPL VAIVGGAKVS DKIQLLDNML QRIDHLIIGG AMAYTFLKAQ
251 GHKIGSSMCE EDKLDLARSL LKKAEDRKVT VLLPVDHVCH TEFKAVEAPL
301 VTEGVDIPDG YMALDIGPRT IEKYVEVVAK CKSAIWNGPM GVFEMAPYSK
351 GTFFAIAKVMG DSTQNHGLMS IIGGDSASA AELSGEAPRM SHVSTGGGAS
401 LELLEGKTLP GVAVLDDKE
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
50 - 65	1715.96	1714.95	1714.85	0.10	0	K.VLES GGSCVLM SHLGR.P
50 - 67	1941.12	1940.11	1940.00	0.12	1	K.VLES GGSCVLM SHLGRPK.G
68 - 97	2949.44	2948.44	2948.40	0.04	1	K.GVT MAAAAACGDD SVP GYEAGAT LKPVAER.L
122 - 134	1352.87	1351.87	1351.78	0.08	0	K.LSP GGV LVLENR.F
153 - 171	2042.09	2041.08	2040.99	0.09	0	R.VL ASYGDV YISDA FGTAH R.E
182 - 194	1345.82	1344.81	1344.69	0.12	0	K.VL GHGAAGY LMEK.E
202 - 218	1605.10	1604.10	1603.98	0.12	1	K.VL GSPARPL VAIVG GAK V
219 - 232	1673.01	1672.00	1671.90	0.10	1	K.VS DKIQ LLDNMLQR.I
254 - 268	1737.93	1736.93	1736.81	0.12	1	K.IG SSMCE EDKLD LAR S
333 - 357	2705.16	2704.16	2704.30	-0.15	1	K.SAI WNGPM GVFEM APYSK GTF FAIAK V 2 Oxidation (M)

No match to: 1179.66, 1234.80, 1300.56, 1307.78, 1320.70, 1434.84,
1475.86, 1490.06, 1493.83, 1629.88, 1657.98, 1707.87, 1773.96, 1790.79,
1839.04, 1857.00, 2070.20, 2384.13, 2399.09, 2510.21

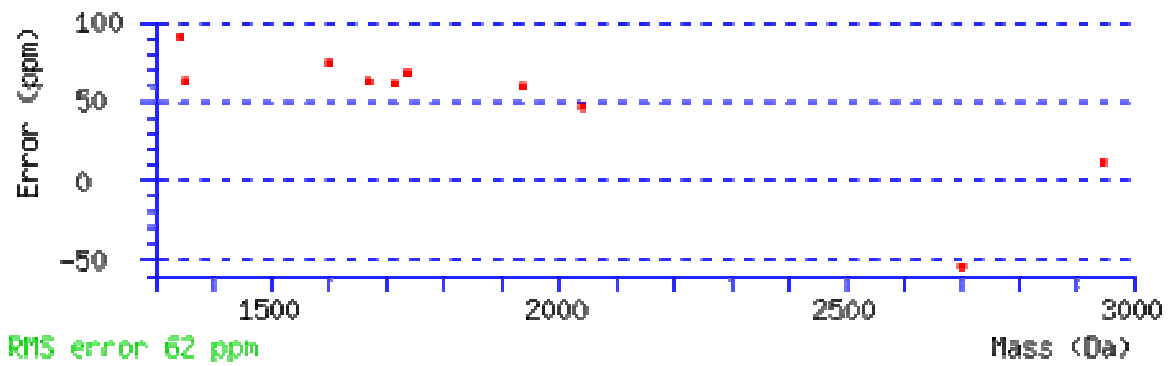


Figura 14. Exemplo de uma busca de impressão digital do mapa peptídico usando o programa Mascot. A partir de um espectro de massa (figura acima) a busca resulta numa lista de proteínas candidatas contendo variadas informações incluindo um valor numérico que determina se a identificação é confiável ou não (*Mowse score*). Em seguida temos os peptídeos que parearam com a proteína do banco de dados (vermelho), a porcentagem de cobertura e sua localização dentro da sequência da mesma.

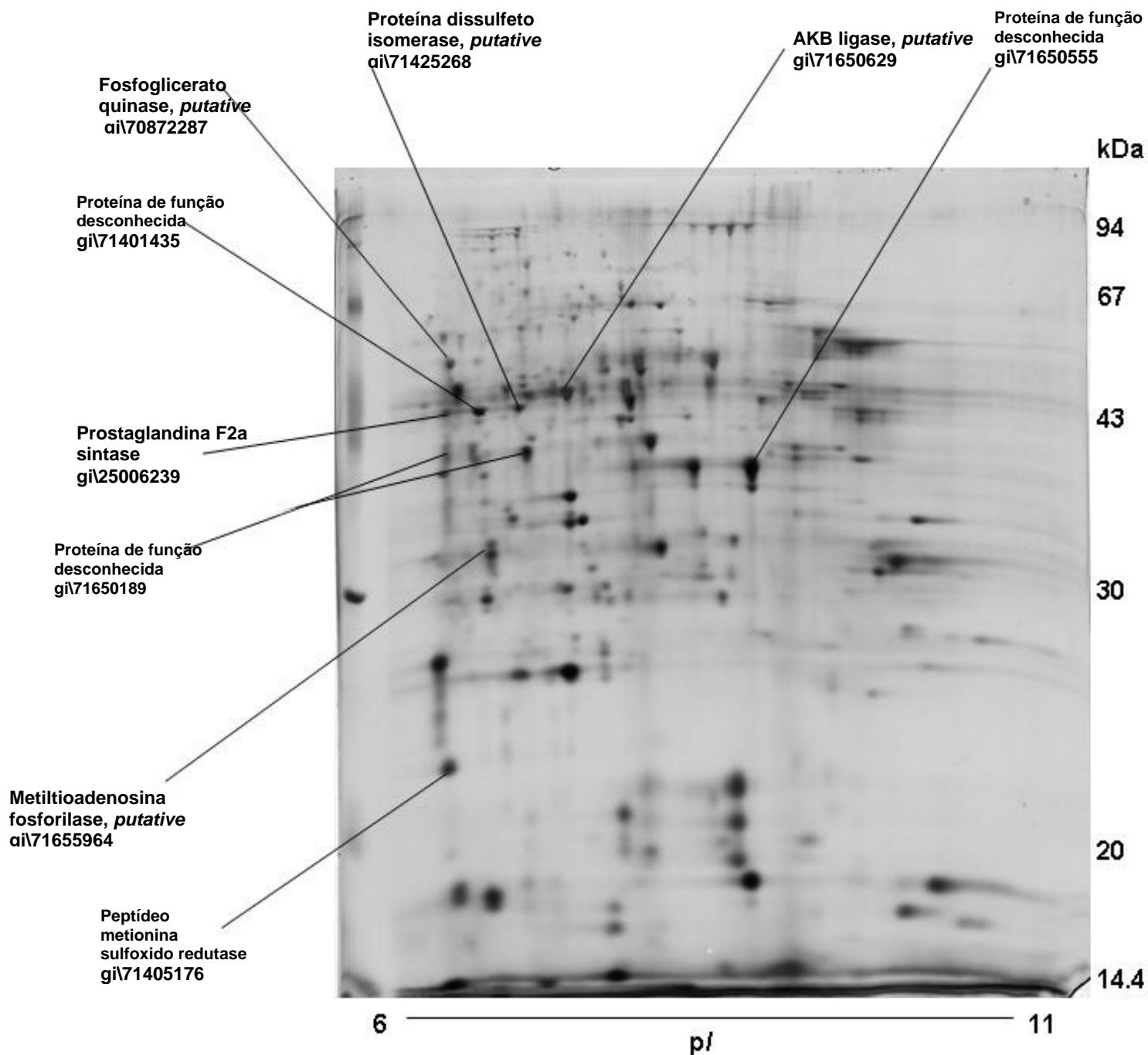


Figura 15. Proteínas identificadas em epimastigotas de *T. cruzi* por impressão digital do mapa peptídico.

Tabela 2. Spots de proteínas (obtidos da Figura 15) analisados por MALDI-TOF MS e identificados por busca em banco de dados não redundante NCBI.

Proteína	No de Acesso (NCBI)	MM experimental	MM teórica	pI experimental	pI teórico	Sequence coverage (%)	MASCOT score	Categoria funcional
Fosfoglicerato quinase, <i>putative</i>	gi\70872287	57.800	44.867	6.50	6.19	39	97	Metabolismo
Proteína de função desconhecida	gi\71401435	52.251	68.088	6.65	6.49	12	83	—
Prostaglandina F2a sintase	gi\25006239	51.376	42.235	6.40	5.83	29	107	Metabolismo
Proteína de função desconhecida	gi\71650189	46.428	44.512	6.50	8.48	18	77	—
Proteína de função desconhecida	gi\71650189	46.428	44.512	7.00	8.48	21	80	—
Proteína dissulfeto isomerase, <i>putative</i>	gi\71425268	52.251	42.060	7.00	6.69	23	79	Formação e rearranjo das pontes dissulfeto
AKB ligase, <i>putative</i> (2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligase)	gi\71650629	54.965	44.071	7.25	6.72	21	75	Via bioquímica que converte a L-treonina em glicina
Peptídeo metionina sulfoxido redutase	gi\71405176	22.850	22.220	6.40	6.12	27	75	Metabolismo
Proteína de função desconhecida	gi\71650555	44.887	19.444	8.55	8.05	33	80	—
Metiltioadenosina fosforilase, <i>putative</i>	gi\71655964	37.280	33.600	6.75	6.34	18	74	Metabolismo

As seqüências obtidas das proteínas hipotéticas (gi\71401435, gi\71650189 e gi\71650555) encontradas nas identificações por MALDI-TOF foram analisadas confrontando-as com banco de dados. As buscas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foram feitas pelo site NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) contra bancos de dados não redundantes.

As proteínas hipotéticas devem ser cuidadosamente estudadas porque são proteínas que não tem similaridade significativa com proteínas conhecidas de outros organismos. Esse fato sugere que essas proteínas possuem função particular e são específicas da espécie. Além disso, algumas dessas proteínas

hipotéticas têm domínios conservados que pode ser útil ao tentar descobrir sua função.

Por exemplo, na proteína gi71401435 foi encontrado o domínio Uridina 5' trifosfato 14 (Utp 14). Esse domínio faz parte de um grande complexo ribonucleoprotéico que contém o snRNA U3. A depleção das proteínas de Utp impede a produção do rRNA 18S, indicando que são parte do pré-rRNA ativo que processa o complexo (Lodish *et al.*, 2000).

As proteínas gi71650189 e gi71650555 não contêm domínio conservado já descrito. Após a análise *in silico* das três proteínas hipotéticas identificadas, conclui-se que as únicas proteínas ortólogas encontradas nos bancos de dados são da família tripanosomatidae.

A fosfoglicerato quinase (PGK) é uma enzima que participa da via glicolítica e que é responsável pela conversão de 1,3-bifosfoglicerato em 3-fosfoglicerato. Essa proteína ainda não foi estudada em *T. cruzi*, mas sabe-se que essa enzima glicolítica é armazenada em organelas parecidas com peroxissomos denominada glicossomas (Concepcio'n, 2001). A glicólise em tripanossomatídeos é compartimentalizada. Estudos citoquímicos mostraram que o glicossoma apresentava uma grande quantidade de proteínas básicas, o que foi explicado posteriormente com a observação de que as enzimas da via glicolítica localizadas na organela apresentam um ponto isoelétrico alcalino, diferindo-as daquelas encontradas na matriz citoplasmática de células eucarióticas (Souza, 2000).

A prostaglandina F2a sintase apresenta atividade oxidoreductase e participa do transporte de elétrons. Kubata e colaboradores (2002) mostraram que lisado da forma epimastigota de *T. cruzi* sintetiza prostaglandinas a partir do ácido aracdônico. O ácido aracdônico é um ácido graxo poli-insaturado que é integrado no fosfolipídio das membranas plasmáticas sendo responsável por sua fluidez. Prostaglandina é um mediador do tipo eicosanóide, hormônio local que atua sobre receptores de membrana. A redução na produção de prostaglandina pode levar a um aumento na resposta imune pelo hospedeiro vertebrado durante a infecção aguda (Dost, 2004).

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) catalisa a quebra e o rearranjo das pontes dissulfeto (Figura 16). Essa proteína até o momento não foi estudada em *T. cruzi*, sabe-se que essa proteína está localizada no retículo endoplasmático, o qual apresentam propriedades oxidantes que são necessárias para a formação de pontes dissulfeto (Moutiez, 1997). Para proteínas que contém vários resíduos de cisteína, as PDI apresentam um papel importante, pois promovem uma rápida mudança entre os pares dissulfeto, permitindo que a proteína alcance o seu padrão de pontes dissulfeto compatível com o seu modelo tridimensional (Cooper, 2000).

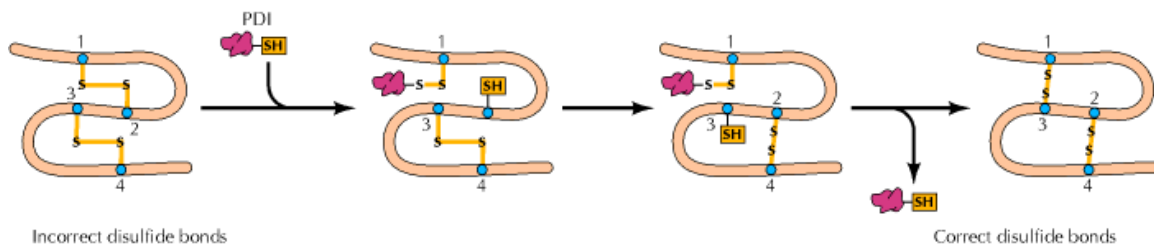


Figura 16. Mecanismo de ação de uma PDI. Nesse esquema a enzima catalisa a conversão de duas pontes dissulfeto incorretas (1-2 e 3-4) na forma correta (1-3 e 2-4) (Cooper, 2000).

Um spot correspondendo à AKB ligase (*2-amino-3-cetobutyrate coenzyme A ligase*) foi identificado. Esta proteína é uma enzima dependente de piridoxal fosfato (uma coenzima envolvida nas reações de ativação de aminoácidos), e tem a função de catalisar a segunda etapa da reação da via metabólica que converte a L- treonina em glicina (Lodish *et al.*, 2000). A função da AKB ligase não foi ainda estudada em *T. cruzi*. Essa enzima já foi estudada em humanos e também é conhecida por glicina C-acetiltransferase ou aminoacetona sintase.

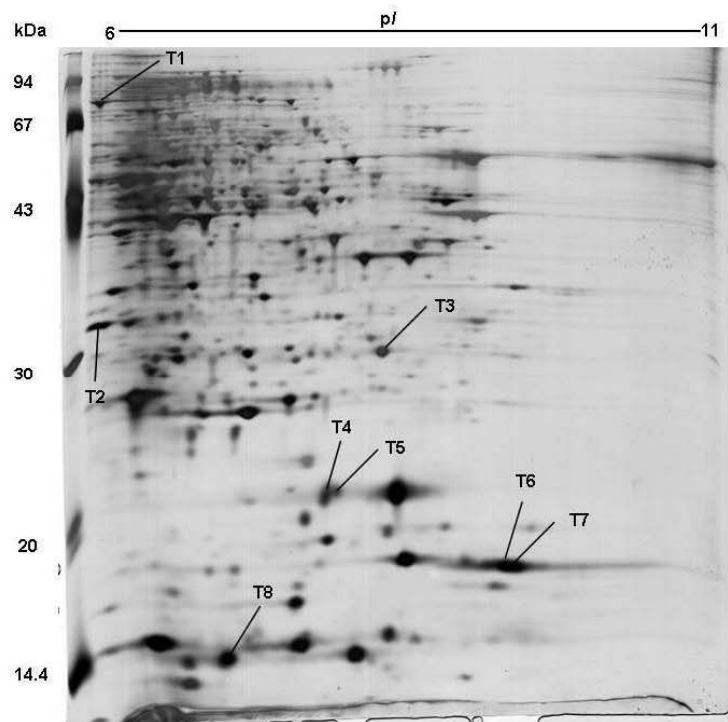
O peptídeo metionina sulfóxido redutase (PMSR) ainda não foi estudado em *T. cruzi*, no entanto apresenta funções conhecidas em *T. brucei* e em *Leishmania major*. Várias reações biológicas produzem grande quantidade de agentes oxidantes como subproduto do metabolismo aeróbico. Embora alguns desses compostos, particularmente o óxido nítrico, apresentem um papel importante nos processos bioquímicos regulatórios, o acúmulo desses oxidantes causam sérios danos nas células (Vaughan *et al.*, 2002). Nas proteínas um dos aminoácidos mais facilmente oxidado é a metionina, a qual é convertida em

sulfóxido de metionina. A PMSR apresenta um papel importante na célula, pois a protege de danos oxidativos. Essa enzima catalisa a redução do sulfóxido de metionina (Met-O) em metionina (Weissbach *et al.*, 2002).

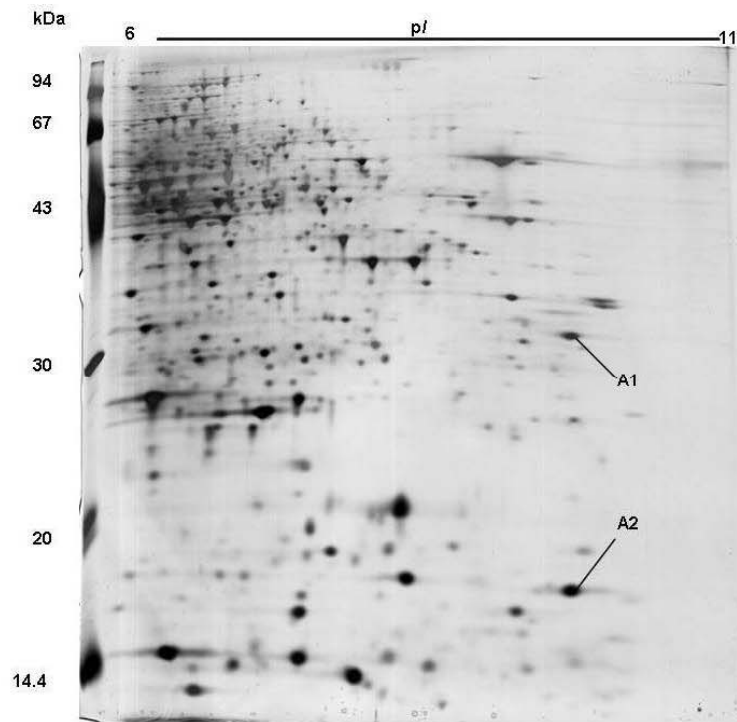
A metiladenosina fosforilase (MTA fosforilase) ainda não tem sua função descrita em *T. cruzi*, porém sabe-se que em *T. brucei* essa proteína é encontrada nos processos metabólicos. MTA fosforilase apresenta duas funções fundamentais nesses parasitas, uma por participarem da via de salvação das purinas, e a outra, por ser a melhor maneira de regenerar metionina nesses organismos que apresentam proteína e lipídeos altamente metilados (Bacch *et al.*, 1999).

5.3. Mapas proteômicos de tripomastigotas e amastigotas

Mapas proteômicos das formas tripomastigotas e amastigotas são mostrados na Figura 17. Ainda não foram feitas análises computacionais dos géis, mas por inspeção visual têm-se possíveis proteínas diferencialmente expressas. Esses *spots* posteriormente serão submetidos à digestão trípica e identificados por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF.



Tripomastigota



Amastigota

Figura 17. Mapas proteômicos de *T. cruzi* usando IPGs de faixa básica de pH (6-11). 10^8 células foram solubilizadas e separadas por 2DE de acordo com o método 7 (ver Tabela 1). Os géis foram corados com nitrato de prata. As setas T1 a T8 mostram proteínas diferencialmente expressas em tripomastigotas. As setas A1 e A2 mostram as proteínas diferencialmente expressas em amastigotas.

5.4. Gel “dois em um”(Two-in-one gel)

A eletroforese bidimensional (2-DE) ainda é a metodologia mais utilizada para separação de proteínas na pesquisa proteômica. A 2-DE é particularmente útil quando existe interesse na expressão comparativa de proteínas entre dois ou mais proteomas. Após a 2-DE e posterior detecção das proteínas um grande número de *spots* deve ser comparado de modo a verificarem-se as diferenças na intensidade dos mesmos. Apesar de hoje em dia a comparação entre perfis bidimensionais ser realizada com o auxílio de *softwares* especiais, esta etapa normalmente exige bastante trabalho e tempo, principalmente quando o número total de *spots* é muito alto. De um modo geral, a comparação entre perfis bidimensionais depende da padronização das várias etapas da 2-DE desde a preparação de amostra até a coloração. No método desenvolvido por Wang *et al.* (2003) as amostras a serem comparadas são primeiramente submetidas a uma IEF e os géis de IPG são posteriormente cortados em duas partes. Subseqüentemente, as metades de gel contendo a mesma faixa de pH são aplicadas lado a lado na etapa de SDS-PAGE (segunda dimensão). Assim, as duas metades de gel de IPG a serem comparadas são submetidas a mesmas condições SDS-PAGE e coloração o que facilita sobremaneira a posterior análise da expressão diferencial das proteínas. Além disso, o método não adiciona custos ao processo de 2-DE, pelo contrário, economiza amostra e reagentes, já que evita a necessidade de múltiplas repetições das análises.

As Figura 18 e Figura 19 mostram os resultados obtidos com formas epimastigotas de *T. cruzi* em faixa ampla de pH (3-10). Como pode ser visto, foi confirmada a eficiência da metodologia, já que as amostras iguais mostraram perfis bidimensionais idênticos. Ainda não foram feitas análises computacionais dos géis, mas pode-se antever que estas serão facilitadas pelas vantagens fornecidas pelo método.

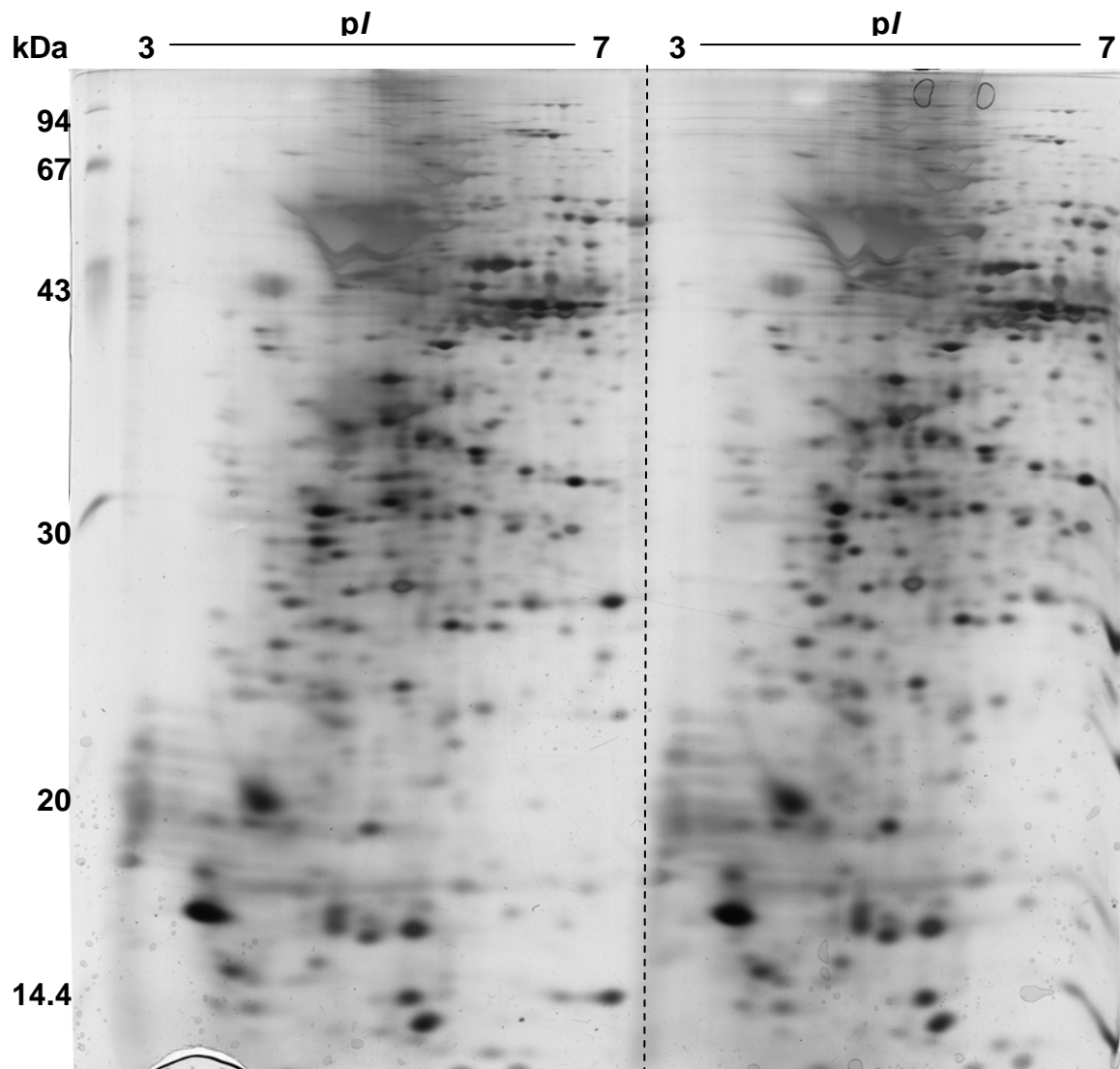


Figura 18. Eletroforese bidimensional da forma epimastigota (proteínas extraídas de 10^8 células) comparando a parte ácida do gel usando a técnica do gel “dois em um”. A amostra foi aplicada por reidratação do gel.

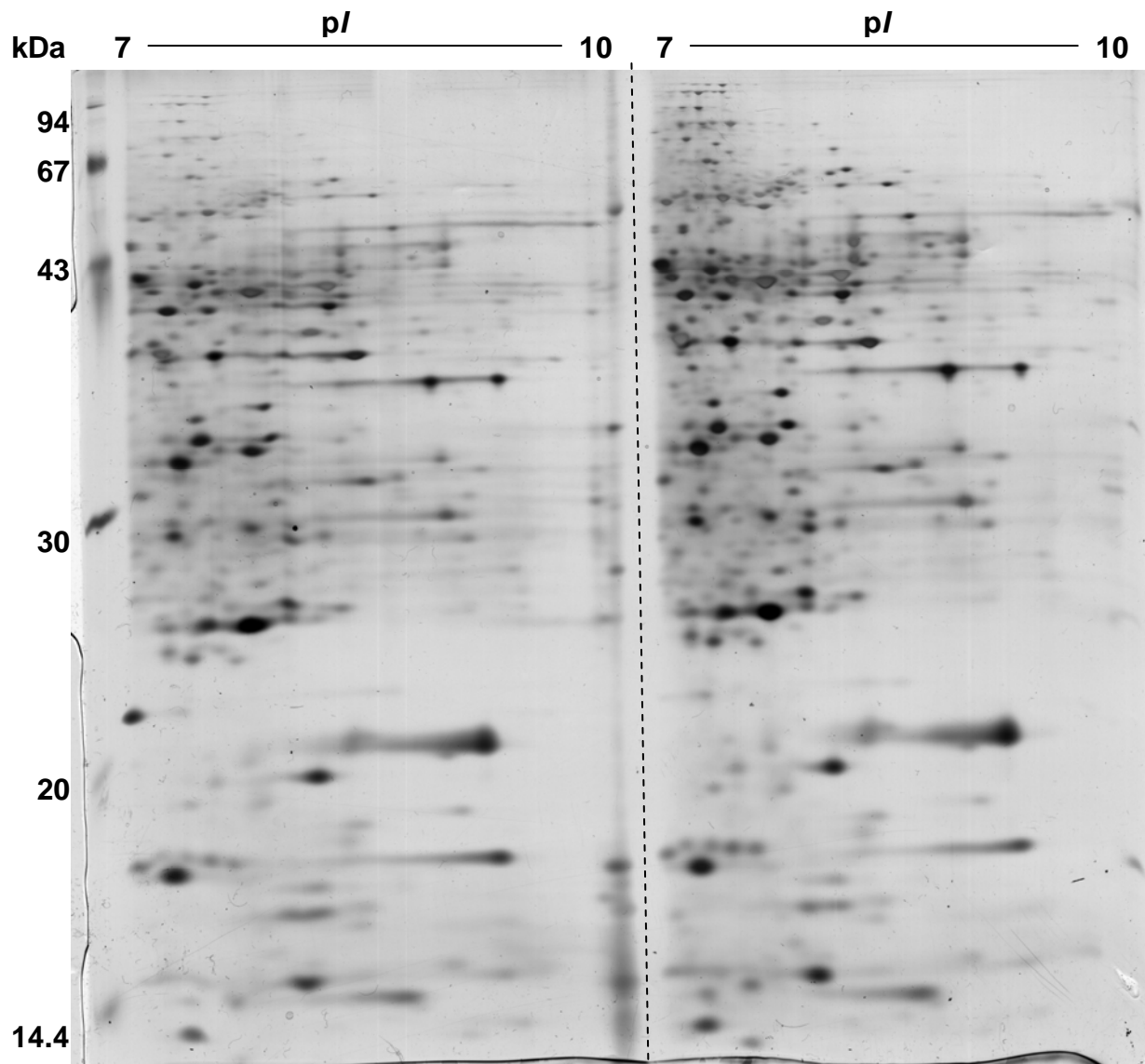


Figura 19. Eletroforese bidimensional da forma epimastigota (proteínas extraídas de 10^8 células) comparando a parte básica do gel usando a técnica do gel “dois em um”. A amostra foi aplicada por reidratação do gel.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho objetivou contribuir para a iniciativa da construção de mapas proteômicos comparativos das formas de vida do *Trypanosoma cruzi*, ocupando-se primariamente da construção de mapas bidimensionais na faixa alcalina de pH. Como esperado a padronização dos géis básicos exigiu o uso de diferentes variações protocolos até serem alcançados resultados satisfatórios. As condições de 2-DE otimizadas para as formas epimastigotas mostraram-se apropriadas para os géis de tripomastigotas e amastigotas. A comparação entre os perfis bidimensionais por inspeção visual indica a existência de possíveis proteínas diferencialmente expressas nas três formas do parasita. A metodologia do gel “dois em um” mostrou-se promissora para análises proteômicas comparativas e deve ser aplicada em futuros experimentos. O uso de impressão digital do mapa peptídico como método de identificação dos *spots* apresentou um razoável grau de sucesso devido à disponibilidade dos dados provenientes do seqüenciamento do genoma do *T. cruzi*. Algumas proteínas hipotéticas e putativas tiveram sua existência corroborada neste trabalho. Uma proporção maior de *spots* será identificada quando forem obtidas seqüências de aminoácidos por meio de espectrometria de massa (MS/MS). Por fim, espera-se que os mapas proteômicos advindos deste e de outros projetos de proteômica de *T. cruzi* (por exemplo, análise de subproteomas e fosfoproteomas) tornem-se importantes ferramentas para futuros projetos sobre a doença de Chagas, relacionados à resistência a drogas, virulência e sinalização celular, entre outros.

7. PERSPECTIVAS

Finalização do processo de construção de mapas proteômicos das três formas de vida do parasita na faixa básica de pH.

Construção de mapas bidimensionais do subproteoma do *T. cruzi*.

Análise do fosfoproteoma de *T. cruzi* nos três estágios e durante o processo de amastigogênese.

A análise dos mapas proteômicos poderá permitir-nos correlacionar os níveis de expressão protéica com as características biológicas de cada estágio de vida do parasito, tais como quiescência celular, infectividade, capacidade de replicação e vias metabólicas ativas.

Os mapas proteômicos, uma vez disponíveis para a comunidade científica através de publicações e da homepage do projeto tornar-se-á uma importante ferramenta para futuros projetos sobre a doença de Chagas, relacionados à resistência a drogas, virulência e sinalização celular, entre outros.

8. BIBLIOGRAFIA

Anderson, N. L.; Matheson, A. D. and Steiner, S. (2000). *Proteomics: applications in basic and applied biology*, in **Current Opinion in Biotechnology**. **11** (4), p. 408.

Andrews, N. W. and Colli, W. (1982). *Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells*. **J. Protozool.** **29**, 264-269.

Andrews, N. W., Hong, K. S., Robbins, E. S. and Nussenzweig, V. (1987). *Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.** **64**, 474-484.

Atwood III, J. A.; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Opperdoes, F. R.; Orlando, R. and Tarleton, R. L. (2005). *The Trypanosoma cruzi proteome*. **Science** **309**, 473-475.

Ávila, A. R.; Dallagiovanna, B.; Yamada-Ogatta, S. F.; Monteiro-Goés, V.; Fragoso, S. P.; Krieger, M. A. and Goldenberg, S. (2003). *Stage-Specific gene expression during Trypanosoma cruzi metacyclogenesis*. **Genet. Mol. Res.** **2** (1), 159-168.

Bacchi, C. J., Goldberg, B., Rattendi, D., Gorrell, T. E., Spiess, A. J. and Sufrin, J. R. (1999). *Metabolic Effects of a Methylthioadenosine Phosphorylase Substrate Analog on African Trypanosomes*. **Biochemical Pharmacology** **57**, 89-96.

Bae, S; Harris, A. G.; Hains, P. G.; Chen, H.; Garfin, D. E.; Hazell, S. L.; Paik, Y.; Walsh, B. J. and Cordwell, S. J. (2003). *Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects*. **Proteomics** **3**, 569-579.

Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987). *Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. **Electrophoresis.** **8**, 93-99.

Bruschi, M.; Musante, L.; Candiano, G.; Ghiggeri, G. M., Herbert, B.; Antonucci, F. and Righetti, P. G. (2003). *Soft immobilized pH gradient gels in proteome analysis: a follow-up*. **Proteomics** **3** (6), 821-825.

Burleigh, B. A. and Andrews, N. W. (1995). *The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells*. **Annu. Rev. Microbiol.** **49**, 175-200.

Candiano, G.; Musante, L.; Bruschi, M., Ghiggeri, G. M.; Herbert, B.; Antonucci, F. and Righetti, P. G. (2002). *Two-dimensional maps in soft immobilized pH gradient gels: a new approach to the proteome of Third Millennium*. **Electrophoresis** **23** (2), 292-297.

Cash, P. (2002). *Proteomics: the protein revolution*. **Biologist**. **2**, 49.

Cazzulo, J. J. and Frasch, A. C. (1992). *SAPA/ trans-sialidase and cruzipain: two antigens from Trypanosoma cruzi contain immunodominant but enzymatically inactive domains*. **FASEB. J.** **6**(14), 3259-3264.

Clayton, C. E. (2002). *Life without transcriptional control? From fly to man and back again*. **EMBO J.** **21**, 1881 - 1888.

Concepción, J., L., Adjé, C. A., Quiñones, W., Chevalier, N., Dubourdiou, M. and Michels, P. A. M. (2001). *The expresión and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in Trypanosoma cruzi*. **Molecular & biochemical Parasitology**. **1180**, 111-121.

Contreras, V. T.; Navarro, M. C.; Lima, A. R., Arteaga, R., Duran, F.; Askue, J. and Franco, Y. (2002). *Production of Amastigotes from Metacyclic Trypomastigotes of Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **98**(1), 83-91.

Cooper, G. M. (2000). *The flow of genetic information (capítulo 2)*. In: **The Cell – A molecular approach**. 2nd ed. Sunderland (MA)

Cunha, R. B. (2003) *Caracterização e sequenciamento de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa*. **Tese de Doutorado**, orientador Dr. Marcelo Valle de Souza, Universidade de Brasília, Brasília-DF.

De Souza, W. (2002). *From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality*. **Kinetoplas. Bio. Dis.** **1**, 1-21.

Dost, C. K., Saraiva, J., Monesi, N., Zentgraf, U., Engels, W. and Albuquerque, S. (2004). *Six Trypanosoma cruzi strains characterized by specific gene expression patterns*. **Parasitol Res.** **94**, 134-140.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou LH, Huang YT, Kindlund E, Ktingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarteton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD and Andersson B. (2005). *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. **Science** **309**, 409-415

Frevert, U., Schenkman, S. and Nussenzweig, V. (1992). *Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** **60** (6), 2349-2360.

Garcia, E. S. and De Azambuja, P. (2000). *Fisiologia de triatomíneos: Desenvolvimento, reprodução e interação com o Trypanosoma cruzi*. In: **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas** (2a. Edição). Brener Z, Andrade Z. A and Barral-Neto M (orgs.). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan Editora, p. 41-46.

Garfin D and Heerdt L (2000). **2-D Electrophoresis for Proteomics: A Methods and Product Manual**, Bio-Rad bulletin 2651

Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R. Meagher, D. A., Imal, b. S. and Mische, S. M. (1999). *Proteome Analysis To Assess Physiological Changes In Escherichia coli Grown Under Glucose Limited Fed-Batch Conditions*. **Electrophoresis** **20**, 601-605.

Görg, A., Postel, W.; Günther, S. (1988). *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. **Electrophoresis** **9**, 531-546.

Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R. and Weiss, W. (2000). *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. **Electrophoresis** **21**, 1037-1053.

Görg, A.; Boguth, G.; Kopf, A.; Reil, G.; Parlar, H. and Weiss, W. (2002). *Sample pre-fractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels*. **Proteomics** **2** (12), 1652-1657.

Graves, P. and Haystead, R. T. A. J. (2002). *Molecular Biologist's Guide to Proteomics*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **1**, 39-66.

Gygi, S. P. and Aebersold, R. (2000). *Mass spectrometry and proteomics*. **Current Opinion in Chemical Biology** 4, 489-494.

Hart, G., Haidaris, C. G. and So, M. (1992). *Purification and characterization of stage-specific glycoproteins from Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 60 (6), 2349-2360.

Harth, G., Mills, A. A.; Souto-Padron, T. and de Souza, W. (1992). *Trypanosoma cruzi glycoprotein 72: immunological analysis and cellular localization*. **Mol. Cell. Biochem.** 109(1), 25-36.

Hoving, S.; Voshol, H. and Van Oostrum, J. (2000) *Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels*. **Electrophoresis** 21 (13), 2617-2621.

Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D., Roberts, R. C. and Van Oostrum, J. (2002). *Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients*. **Proteomics** 2 (2), 127-134.

Kubata, B. K.; Kabututu, Z.; Nozaki, T.; Munday, C. J.; Fukuzumi, S.; Ohkubo, K.; Lazarus, M.; Maruyama, T.; Martin, S. K.; Duszenko, M. and Urade, Y.(2002). *A Key Role for Old Yellow Enzyme in the Metabolism of Drugs by Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** 196 (9), 1241–1251

Landfear, S. M. (2003). *Trypanosomatid transcription factors: Waiting for Godot*. **PNAS.** 100, 7-9.

Levine, M. J.; Ferrari, I.; Vazquez, M.; Franco da Silveira, J.; Cano, M. I.; Degrave, W.; Requena, J. M.; Alonso, C.; Zingales, B.; Gonzalez, A.; Hernandez, R.; Ramirez, J. L.; Aldao, R. R.; Saumier, A., Billaut A.; LePaslier, D. and Conhen, D. (1994). *Toward the physical map of Trypanosoma cruzi nuclear genome*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 89 (1), 17-18.

Locke, V. L.; Gibson, T. S.; Thomas, T. M.; Corthals, G. L. and Rylatt, D. B. (2002). *Gradiflow as a prefractionation tool for two-dimensional electroforesis*. **Proteomics** 2 (9), 1254-1560.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. and Darnell, J. (2000) *Protein Structure and Funcion*. **Molecular Cell Biology**. 4th ed New York: W. H. Freeman & Co

Low, H. P. and Tarleton, R. L. (1997). *Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the Trypanosoma cruzi sialidase superfamily*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 88 (1-2), 137-149.

Moutiez, M., Quéméneur, E., Sergheraert, C., Lucas, V., Tartar, A. and Davioud-Charvet, E. (1997). *Glutathione-dependent activitoes of Trypanosoma cruzi p52 makes it a new member of thiol: disulphide oxidoreductase family*. **Biochem. J.** **322**, 43-48.

Navarro, M. C., De Lima, A. R., Askue, J. and Contreras, V. T. (2003). *Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **98**(1), 83-91.

O'Farrell, P. H. (1975). *High resolution two-dimensional electrophoresis of protein*. **J. Biol. Chem.** **250**, 4007-4021.

Olsson, I., Larsson, K., Palmgren, R. and Bjellvist, B. (2002). *Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension*. **Proteomics** **2** (11), 1630-1632.

Ouaisi, A., Da Silva, A. C., Guevara, A. G., Borges, M. and Guilvard, E. (2001). *Trypanosoma cruzi-induced host immune system dysfunction: a rationale for parasite immunosuppressive factor(s) encoding gene targeting*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.****1**, 11-17.

Paba, J. ; Ricart, C. A. O. ; Fontes, W. ; Santana, J. ; Teixeira, A. R. L. ; Marchese, J. ; Williamson, B. ; Hunt, T. ; Karger, B. and Sousa, M. V. (2004). *Proteomic analysis of trypomastigote and amastigote forms of Trypanosoma cruzi using isotope-coded affinity tagging*. **Journal of Proteome Research.** **3**, 517-524

Paba, J. ; Santana, J. ; Teixeira, A. R. L. ; Fontes, W. ; Sousa, M. V. and Ricart, C. A. O. (2004). *Proteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi*. **Proteomics** **4**, 1052-1059.

Pan, A. A. and McMahon-Pratt, D. (1989). *Amastigote and epimastigote stage-specific components of Trypanosoma cruzi characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein*. **J. Immunol.** **143** (3), 1001-1008.

Ramirez, M. I., Ruiz, R. de C., Araya, J.E., da Silveira, J. F. and Yoshida, N. (1993). *Involvement of the stage-specific 82 kilodalton adhesion molecule of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes in host cell invasion*. **Infect. Immun.** **61** (9), 3636-3641.

Sabounchi-Schütt, F. Äström, J., Olsson, I., Eklund, A., Grunewald, J. and Bjellqvist, B. (2000). *An Immobiline DryStrip application method enablinh high-capacity two-dimensional gel electrophoresis*. **Electrophoresis** **21**, 3649-3656.

Silveira, J. F. (2000). *Biologia Molecular do Trypanosoma cruzi*. In: **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas** (2a. Edição). Brener Z, Andrade ZA & Barral Neto M (orgs.). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan Editora, 128-147.

Siuzdak, G. (1996). *Mass Analyzers and ion detectors (capítulo 2)*. **Mass spectrometry for biotechnology**. Academic press em San Diego-Califórnia.

Sousa, W. (2000). *O parasito e sua interação com os hospedeiros*. In: **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas** (2a. Edição). Brener Z, Andrade ZA & Barral Neto M (orgs.). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan Editora, p.88-123.

Teixeira, M. M. and Yoshida, N. (1986). *Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi identified by monoclonal antibodies*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **18**(3), 271-282.

Teixeira, S. M. R., Russell, D. G., Kirchhoff, L. V. and Donelson, J. E. (1994). *A differentially expressed gene family encoding "amastin", a surface protein of Trypanosoma cruzi amastigotes*. **J. Biol. Chem.** **269** (32), 20509-20516.

Tomlinson, S.; Vandekerckhove, F.; Frevert, U.; Nussenzweig, V. (1995). *The induction of Trypanosoma cruzi trypomastigote to amastigote by low pH*. **Parasitology** **110**, 547-554.

Ullu, E.; tschudi, C.; gunzi, A. (1996). *Trans-splicing in trypanosomatid protozoa*. In: Smith, D. F.; Parsons, M. (eds). **Molecular Biology of Parasitic Protozoa**. IRL Press Oxford, pp 115-129.

Vanhame, L. and Paus, E. (1995). *Control of gene expression in trypanosome*. **Microbiology Rev.** **59**, 223-240.

Vaughan, M., D., Sampson, P. B. and Honek, J. F. (2002). *Methionine In and Out of Proteins: Targets for Drug Design*. **Current Medicinal Chemistry** **9**, 385-409.

Villalta, F., Lima, M. F., Ruiz-Ruano, A. and Zhou, L. (1992). *Attachment of Trypanosoma cruzi to host cells: a monoclonal antibody recognized a trypomastigote stage-specific epitope on the gp 83 required for parasite attachment*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **182** (1), 6-13.

Wang, Y.; Cheung, P.; Wong, M. and Chun-Lap Lo, S. (2003). *"Two-in-one" gel for spot matching after two-dimensional electrophoresis*. **Proteomics** **3**, 580-583.

Weissbach, H.; Etienne, F.; Hoshi, T.; Heinemann, S. H.; Lowther, W. T.; Matthews, B.; St John, G.; Nathan, C. and Brot, N. (2002). *Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function*. **Arch Biochem Biophys.** **15** (397), 172-178.

Westermeier, R, and Naven, T. (2002) *Expression proteomics (capítulo 2)*. **Proteomics in Practice-** A Laboratory Manual of Proteome Analysis. Amershan Biosciences Europe GmbH, Germany.

WHO- World Health Organization (2002). *Control of Chagas Disease*, **Technical Report Series 905**, 82-83.

WHO- World Health Organization Statistical Information System Website-
<http://www.who.ch> (Acesso em Dezembro/2005)

Wilkins' M. R.; Pasquali' C.; Appel' R. D.; Ou, K.; Golaz' O.; Sanchez, J.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Hughes, G.; Humphery-Smith, I.; Williams, K. L.; and Hochstrasser, D. F (1996). *From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional gel electrophoresis and amino-acid analysis*. **Biotechnology** **14**, 61-65.

Yamada-Ogatta, S., F., Motta, C., Tomac, H. K., Monteiro-Goes, V., Ávila, A. R., Muniz, B. D., Nakamura, C., Fragoso S. P., Goldenberg, S., Krieger, M. A. (2004). *Trypanosoma cruzi: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes*. **Acta Tropica** **90**, 171-179.

Zingales, B.; Rondinelli, E.; Degrave, W.; Franco da Silveira, J.; Levin, M.; LePaslier, D.; Modabber, F.; Dobrokhotov, B.; Swindle J.; Kelly, J. M.; Aslund, L.; Hoheisel, J. D.; Ruis, A. M.; Cazzulo, J. J.; Pettersson, U.; Frasch, A. C. C. (1997). *The Trypanosoma cruzi genome initiative*. **Parasitology Today.** **13**, 16-22.