

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VIVIANE MONTEIRO GÓES

**Análise Genômica Funcional do *Trypanosoma cruzi*
submetido a diferentes tipos de estresse**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

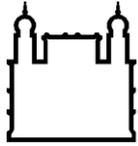
CURITIBA

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VIVIANE MONTEIRO GÓES

**Análise Genômica Funcional do *Trypanosoma cruzi*
submetido a diferentes tipos de estresse**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta tese intitulada

**Análise Genômica Funcional do *Trypanosoma cruzi*
submetido a diferentes tipos de estresse**

Defendida por
VIVIANE MONTEIRO GÓES

Sob orientação de
Marco Aurélio Krieger

Foi avaliada e aprovada pela banca examinadora composta por

Dr. Milton Ozório Moraes
Dr. Edson Rondinelli
Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz

Em Curitiba, na data de 17 de abril de 2008.

*Ao Eduardo, por todo amor e companheirismo,
Às minhas filhas Juliana e Giovana, pelo amor sem limites.*

Aos meus pais Luiz e Maria, pelo amor eterno e inigualável

Aos meus irmãos Lilian e Henrique, pelo carinho

A Gil e Namir, pelo apoio nesta fase final da tese

E a Deus, por tudo.

Que pena eu ainda não te conhecer.
Mas eu aguardo com grande ansiedade
Por este dia, pois sairemos pela vida,
Te ensinarei a vida,
Aprenderei a vida.
Vou te pegar, te carregar
E te ensinar um pouco de mim.
Gostaria de te dar um abraço
E nesse laço seremos uma só pessoa.
Serei paciente, consciente
Que mereças toda compreensão.
Entrarei em teu universo e como num verso
Iremos passear, cantar, sim, cantar
Uma linda melodia,
certo que nesse dia
Serei feliz.
Filho te amo!!!!

Roberto Rodrigues

AGRADECIMENTOS

Na realização deste trabalho, diversas pessoas e instituições deram sua contribuição e merecem nossos sinceros agradecimentos:

Ao **Dr. Marco Aurélio Krieger** que, além de meu orientador, ao longo destes muitos anos, tornou-se um amigo no qual o seu profissionalismo, competência, otimismo e perseverança são pontos fundamentais para que pudesse espelhar-me na figura de um cientista que merece todo meu respeito e admiração. Muito obrigada pela oportunidade de ter me ingressado na carreira científica, sempre compartilhando sua amizade, apoio e paciência que muito contribuiu para a formação de meu perfil científico. E sempre confiando e me dando a oportunidade de realizar este novo trabalho que estamos iniciando.

Ao **Dr. Samuel Goldenberg**, pela oportunidade de iniciar minha carreira científica, pelo exemplo de profissional experiente, competente e com um vasto conhecimento científico e sempre nos dando o privilégio de fazer ciência com muita qualidade técnica e intelectual neste país.

Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso e a Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos pelo exemplo de profissionais éticos e pelo convívio de muitos anos de laboratório.

À **Dr^a. Andréa Rodrigues Ávila** uma amiga de muitos anos que sempre esteve presente nos mais diversos momentos que passamos juntas. Sempre enfrentamos os desafios e responsabilidades por nossos trabalhos em conjunto, sempre esteve disposta a me ajudar nos momentos em que mais precisei. Principalmente, agora na correção desta tese. Te admiro pela força, garra e amor que tem pelo seu trabalho e pela ciência. Tenho a certeza que você terá uma carreira brilhante e de muito sucesso pela frente.

À **Dr^a. Vanessa Santos Sotomaior**, uma amiga leal e companheira que sempre esteve ao meu lado na elaboração deste projeto de doutorado e de tantos outros que colaboramos juntas. Exemplo de profissional ética, disciplinada e extremamente competente.

À Juliana Smidth uma amiga e sucessora nos trabalhos que se seguem em genômica dos diferentes tipos de estresse. Sempre esteve pronta a me ajudar nos experimentos que realizamos em São Paulo e tantos outros que fizemos juntas no IBMP.

Ao Dr. Bruno Dallagiovanna e Dr. Alejandro Correa grandes amigos, cada um deles sempre tiveram um conselho amigo, uma palavra de conforto nos momentos difíceis. Obrigada pelos momentos divertidos que passamos juntos no laboratório fazendo que nosso trabalho, apesar de cansativo, no final do dia valesse a pena.

Ao Dr. Christian Probst, que muito me ajudou na preparação de todas as análises de bioinformática deste trabalho.

À Celina Poersch, Andréa Dalabona e Daniela Pavoni, pela ajuda técnica e intelectual na metodologia de PCR em Tempo Real.

Aos amigos inseparáveis da sala do *Trypanosoma cruzi*: Andréa R. Ávila, Nilson Fidêncio, Alejandro Correa, Vanessa Sotomaior, Fabiola Holetz, pelos nossos longos e exaustivos procedimentos de extração de RNA.

À Edilaine Azevedo e ao Luiz Casarotto, pela ajuda e por sempre estarem dispostos a me ajudar com os processos burocráticos e as imagens ao longo deste trabalho.

A todos meus amigos que fazem parte do Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP.

Aos nossos colaboradores externos.

À Pós Graduação do Curso de Biologia Celular e Molecular.

Aos membros da banca examinadora.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	TRYPANOSOMA CRUZI	1
1.1.1	<i>O Parasita e a doença de Chagas</i>	1
1.1.2	<i>Ciclo de Vida do Trypanosoma cruzi</i>	5
1.1.3	<i>Metaciclogênese in vitro</i>	7
1.2	RESPOSTA AO ESTRESSE	12
1.3	EXPRESSÃO GÊNICA NOS TRIPANOSOMATÍDEOS.....	19
1.3.1	<i>O genoma do Trypanosoma cruzi</i>	19
1.3.2	<i>Biologia Molecular do Trypanosoma cruzi</i>	20
1.4	A GENÔMICA FUNCIONAL E TECNOLOGIA DE MICROARRANJOS	26
1.5	PROTEÔMICA E A ESPECTOMETRIA DE MASSA	30
1.5.1	<i>Aspectos Gerais</i>	30
1.5.2	<i>Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massa</i>	33
1.5.3	<i>Tipos de Estudos Proteômicos</i>	34
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES E MATERIAIS	39
3.2	SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA.....	40
3.3	CULTIVO DO TRYPANOSOMA CRUZI.....	44
3.3.1	<i>Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias)</i>	44
3.3.2	<i>Epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 dias)</i>	44
3.3.3	<i>Epimastigotas submetidos aos diferentes tipos de stress</i>	44
3.3.3.1	<i>Epimastigotas submetidos ao estresse nutricional:</i>	44
3.3.3.2	<i>Epimastigotas submetidos ao estresse de pH :</i>	45
3.3.3.3	<i>Epimastigotas submetidos ao estresse de temperatura:</i>	45
3.3.4	<i>Epimastigotas em diferenciação, aderidas ao substrato.</i>	45
3.3.5	<i>Tripomastigotas metacíclicos</i>	45
3.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	46
3.4.1	<i>Infecção in vitro</i>	46
3.4.2	<i>Infecção in vivo</i>	47
3.5	ISOLAMENTO DE mRNA POLISSOMAL DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	48
3.6	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS MRNAS POLISSOMAIS	50
3.7	TRATAMENTO COM DNASE.....	50
3.8	PURIFICAÇÃO DE RNA ATRAVÉS DE RNEASY (QIAGEN)	50

3.9	AMPLIFICAÇÃO DE RNA <i>IN VITRO</i>	50
3.10	CONFECÇÃO DO MICROARRANJO DE DNA	51
3.10.1	<i>O microarranjo de Trypanosoma cruzi</i>	51
3.10.2	<i>Anotação das sondas</i>	54
3.11	MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS DE cDNA COM FLUORÓFOROS.....	55
3.12	HIBRIDIZAÇÃO.....	55
3.13	DESENHO EXPERIMENTAL.....	56
3.14	LEITURA DOS SINAIS OBTIDOS	57
3.15	ANÁLISES E TRATAMENTO DOS SINAIS.....	58
3.15.1	<i>Análise da replicação interna</i>	59
3.16	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.....	60
3.17	CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DOS GENES A SEREM ANALISADAS.....	61
3.18	PCR EM TEMPO REAL.....	62
3.18.1	<i>Obtenção de DNA complementar a partir do mRNA Polissomal provenientes dos parasitas submetidos aos diferentes tipos de estresses</i>	63
3.18.2	<i>Amplificação dos genes selecionados</i>	63
3.19	ANÁLISE PROTEÔMICA.....	66
3.19.1	<i>Preparação de extrato total de proteínas</i>	66
3.19.2	<i>Digestão de proteínas por tripsina</i>	67
3.19.3	<i>Espectrometria de Massa em Tandem Associada à Cromatografia Líquida (LC-MS/MS)</i>	68
4	RESULTADOS	70
4.1	ANÁLISE DA TAXA DE METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i> APÓS SUBMISSÃO DO <i>T. CRUZI</i> A DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE	70
4.2	ANÁLISE DA INFECTIVIDADE ATRAVÉS DE ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	73
4.2.1	<i>Ensaio Biológico in vitro</i>	74
4.2.2	<i>Ensaio Biológico in vivo</i>	74
4.3	ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA POR MICROARRANJOS DE DNA.....	75
4.3.1	<i>Obtenção das amostras a serem hibridizadas no microarranjo</i>	75
4.3.2	<i>Hibridizações</i>	76
4.3.3	<i>Número de genes diferencialmente expressos</i>	79
4.3.4	<i>Seleção dos genes diferencialmente expressos</i>	80
4.3.5	<i>Identificação de genes significativamente diferentes entre os estresses</i>	82
4.4	ANÁLISE QUANTITATIVA POR PCR EM TEMPO REAL DOS GENES SELECIONADOS	89
4.5	ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA A DIFERENTES ESTRESSES	95
4.5.1	<i>Número de peptídeos e proteínas identificados após a análise de 2D Nano LC-MS/MS</i>	95

4.5.2	<i>Proteínas diferencialmente expressas entre os diferentes tipos de estresse</i>	
<i>analizados</i>	96	
4.5.3	<i>Comparações entre os dados de microarranjo e proteômica do T. cruzi</i>	115
5	DISCUSSÃO	118
6	CONCLUSÕES	146
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
8	ANEXOS	177

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA: albumina bovina sérica
cDNA: DNA complementar
CDS: sequência codificadora
cRNA: RNA complementar ao RNA original gerado a partir de transcrição *in vitro*
Cy-3: cianina 3
Cy5: cianina 5
dATP: desoxiadenosina trifosfato
dCTP: desoxicitidina trifosfato
DD: differential display
DEG: genes diferencialmente expressos
DEPC: dietil pirocarbonato
dGTP: desoxiguanosina trifosfato
Dm: *Didelphis marsupialis*
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucléico
DNase: desoxirribonuclease
dNTP: desoxirribonucleosídeo trifosfato
dsRNA: RNA dupla-fita
dTTP: desoxitimidina trifosfato
EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético
ESAG: expression site associated gene
EST: expressed sequence tag
FC: fold change
FCI: fenol/clorofórmio/álcool isoamílico
FDR: false discovery rate
g: aceleração da gravidade
gp: glicoproteína
gRNA: RNA guia
Hsp: heat shock protein
HTGS: high throughput genomic sequence

IBMP: Instituto de Biologia Molecular do Paraná
kb: 1000 nucleotídeos em RNA ou 1000 pares nucleotídeos em DNA
kDa: quilo Dalton
kDNA: DNA do cinetoplasto
LIT: liver infusion tryptose
MASP: mucin-associated surface protein
Mb: 1000 kb
Mer: monômero
MOPS: ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino)
mRNA: RNA mensageiro
Nt: nucleotídeos
OD: densidade ótica
PABP: *poli-A binding protein*; proteína ligante de cauda poli-A
PARP: procyclic acidic repetitive protein
pb: pares de bases
PBS: tampão fosfato
PCR: reação em cadeia pela polimerase
PEPCK: proteína fosfoenolpiruvato carboxicinase
PFAM: protein families
RDE: representation of differential expression
RNA: ácido ribonucléico
RNase: ribonuclease
SAM: significance analysis of microarrays
SDS: sódio dodecil sulfato
SSC: standard saline-citrate
TAU: triatomine artificial urine
TIFF: tag image file format
TIGR: The Institute of Genome Research
Tris: hidroximetil aminometano
TSK: Trypanosoma cruzi sequence consortium
UTR: *untranslated region*; região não traduzida
VSG: variable surface glycoprotein

RESUMO

A diferenciação dos epimastigotas (formas replicativas e não-infectivas) em tripomastigotas metacíclicos (formas não-replicativa e infectivas) é o processo denominado metaciclogênese. Um evento essencial para a metaciclogênese, que pode ser mimetizado *in vitro*, é o estresse nutricional que os parasitas enfrentam nas porções posteriores do tubo digestivo do inseto vetor. Importantes mudanças no programa de expressão gênica ocorrem durante o estresse e desempenham um papel fundamental nas mudanças morfológicas e fisiológicas observadas durante a metaciclogênese. No entanto, poucas informações estão disponíveis em relação à capacidade e diferentes condições de estresse em disparar a metaciclogênese e, também, sobre os genes envolvidos na regulação dessas respostas. Para tanto, foi realizada uma análise comparativa das diferentes condições estresse (aumento temperatura, diminuição do pH e o estresse nutricional), em experimentos de metaciclogênese *in vitro* a fim de avaliar a capacidade de diferenciação do parasita diante de tais condições. Foi observado que todos os parasitas submetidos às condições de estresses são capazes de se diferenciar, entretanto, os parasitas provenientes dos estresses de pH e temperatura sofrem um retardo no disparo da metaciclogênese, porém esta diferença é minimizada até o final do processo. Para comparar as propriedades biológicas dos tripomastigotas metacíclicos originados de cada condição de estresse, foram feitos ensaios de infecção em células *Vero* e camundongos *Swiss*. Foi possível constatar que todos os tripomastigotas foram capazes de infectar as células *Vero*, assim como, infectar os camundongos. Para investigar a expressão dos genes foi utilizada a tecnologia de microarranjos. Foi selecionado um conjunto de 32 genes especificamente expressos nos tipos de estresse estudados. Para os genes selecionados foram realizadas análises quantitativas pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) que validaram os dados de microarranjo tendo uma concordância de resultados de mais de 90%. Devido ao fato dos genes selecionados apresentarem, em geral, uma resposta similar nos estresses estudados, também foi realizado uma análise específica dos dados de microarranjo e foram selecionados genes significativamente

diferente entre os estresses. Concomitantemente, foram realizadas análises do proteoma utilizando LC-MS/MS, a fim de obter mais detalhes sobre a abundância relativa das proteínas de *T. cruzi* quando as distintas condições de estresse foram estabelecidas. Após a análise dos dados, 173 proteínas foram selecionadas como sendo provavelmente diferencialmente expressas nas condições de estresses analisada em relação às formas epimastigotas. Além disso, quando comparados os dados provenientes da proteômica com os dados de microarranjo foi observado um padrão mais complexo de expressão diferencial à nível de proteínas do que aquele observado no microarranjo. Com isso, podemos inferir que estes dados em conjunto indicam uma potencial importância da regulação pós-traducional no disparo da diferenciação celular das formas epimastigotas.

ABSTRACT

The differentiation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes (metacyclogenesis) involves the transformation of a replicative, non-infectious form of *T. cruzi* into a non-replicative, infectious stage. An essential event in metacyclogenesis that can be mimicked *in vitro*, is the nutritional stress faced by the parasites at the mid-gut of the insect host. Important changes in the gene expression program occur during this process and it is likely that they play an important role in the physiological and morphological changes observed during the metacyclogenesis. However, little information is available concerning the ability of different stress conditions in triggering metacyclogenesis and also, about the genes involved in the regulation of these responses. In this work, it was performed a comparative analysis of different stress conditions (temperature increase, pH decrease and nutritional stress) in triggering metacyclogenesis *in vitro*. It was observed that parasites subjected to the three stress conditions were able to differentiate. However, the parasites that underwent pH and temperature stresses showed a delay in the onset of metacyclogenesis, but this difference was minimized by the end of the process. To compare the biological properties of metacyclic trypomastigotes obtained from the three sources, infection assays were carried on with Vero cells and Swiss mice. All trypomastigotes were able to infect Vero cells, as well as infect mice. To investigate the gene expression profiles of the parasites under the stress conditions microarray technology has been used. A set of 32 genes was selected that are specifically expressed under stress conditions. The microarray data for the 32 genes selected were confirmed by quantitative real-time PCR (qPCR) showing a concordance of results of more than 90%. Due to the fact that the selected genes have in general showed a similar response in different stresses studied, a specific microarray analysis was performed to select genes that are expressed significantly different among the stresses. Concomitantly, shotgun proteome LC-MS/MS analysis have been carried out in order to gain further insight into the relative abundance of *T. cruzi* proteins when the different stress conditions were established. After data analysis, 173 proteins were selected as differentially expressed under the stress conditions when compared

to unstressed epimastigote form. Proteomic data have shown a more complex profile (of differential expression) than that observed from the microarray data. All these data together allowed us to infer the potential importance of post-translational regulation of gene expression in triggering epimastigote differentiation to the infective forms.

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRYPANOSOMA CRUZI

1.1.1 O Parasita e a doença de Chagas

O protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* está situado no reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastidae, sub-ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* (Levine et al., 1980). A ordem Kinetoplastidae apresenta uma especialização denominada cinetoplasto, DNA especializado (kDNA) em sua mitocôndria única (revisto por Maslow e Simpson, 1995).

O gênero *Trypanosoma* (Brenner, 1979) pode ser dividido em dois grupos: Stercoraria que inclui os tripanossomas que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor e cujas formas infectivas são liberadas através das fezes (por exemplo, *T. cruzi* e *T. lewisi*) e Salivaria que inclui tripanossomas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e cujas as formas infectivas são encontradas nas glândulas salivares, que podem ser inoculadas mecanicamente (por exemplo, *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli*).

Em 1.909, Carlos Chagas descreveu a infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). A doença de Chagas é uma doença grave que afeta milhões de pessoas na América Latina e contra a qual não existe vacina ou tratamento quimioterápico eficiente. A doença caracteriza-se por ser debilitante e incapacitante e é uma das principais causas de aposentadoria antecipada nas áreas de risco.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* em 18 países (México na América do Norte e todos os países da América Central e América do Sul). Estima-se que 100 milhões de indivíduos estejam sob risco de contaminação

nas regiões afetadas endemicamente pela doença. Existe ainda um risco de contaminação em regiões não endêmicas, isso devido à doação de sangue e transplante de órgãos em países que recebem imigrantes das zonas endêmicas, como por exemplo, os Estados Unidos e países da Europa.

Há 21.000 mortes anualmente em decorrência da doença e 2 a 3 milhões de pessoas possuem complicações crônicas. Sendo detectado cerca de 300.000 novos casos por ano. Estima-se que no Brasil haja 5 milhões de pessoas infectadas (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>).

O principal modo de transmissão do parasito ao homem ocorre por via vetorial, insetos hematófagos infectados da ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Durante o repasto sanguíneo de insetos infectados, os parasitos podem ser eliminados nas fezes e excretas e, desta forma, infectar o hospedeiro mamífero através de mucosas ou descontinuidades da pele. Outras vias de transmissão incluem a transfusão sanguínea, e com menor frequência, transmissão congênita, acidente de laboratório (Brener, 1979) e transplante de órgãos (Dias, 1979; Schmunis 2000). Recentemente, a transmissão por via oral vem sendo responsável por um número significativo, cerca de um caso novo a cada 24 horas, dos casos agudos da doença na Amazônia brasileira (Coura *et al.*, 2002). Alimentos contendo ou o inseto-vetor ou suas fezes seriam a fonte de infecção. Esporadicamente, há relatos de casos de contaminação oral, fora da região norte, como a recente infecção ocorrida em Santa Catarina através de caldo-de-cana.

A doença de Chagas é caracterizada por apresentar duas fases distintas, a aguda e a crônica. As características de cada fase, assim como a evolução para a cura ou óbito, dependem de diversos fatores ligados ao *T. cruzi* – como cepa, virulência e tamanho do inóculo –, ao homem – idade, sexo e provavelmente grupo étnico – e ao ambiente (revisto por Cançado, 2000).

A fase aguda é caracterizada pela elevada parasitemia, na qual podem ocorrer quadros aparentes (febre, edemas, etc) mais severos, principalmente

em crianças de baixa idade, ou um quadro inaparente assintomático, com febre passageira e sintomas inespecíficos. O tratamento consegue curar a doença de Chagas de 30 a 80 por cento dos casos agudos e congênitos relatados, sendo mais eficiente quanto mais precocemente for instalado. A duração da fase aguda varia geralmente de 4 a 12 semanas, ao fim das quais o quadro febril e a parasitemia tendem a desaparecer (revisto por Dias, 2000). Em paralelo, decrescem também os níveis de imunoglobulinas da classe IgM e sobem os níveis da classe IgG. Estes elementos praticamente definem a transição para a doença de Chagas crônica (tardia, de lenta evolução e com baixa parasitemia) (Dias et al., 1984; Dias et al., 1997; Storino et al., 1994; Amato et al., 1997).

A maioria dos casos agudos não-tratados evolui para a chamada forma crônica indeterminada que consiste na presença da infecção associada à ausência de sintomatologia e exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos normais. No plano temporal, o indivíduo com a forma crônica indeterminada pode simplesmente estar evoluindo silenciosa e lentamente, vindo a manifestar-se, mais tarde, uma forma clinicamente determinada (Dias et al., 2000).

Em certas circunstâncias, especialmente quando o quadro cardíaco é muito intenso na fase aguda, ocorre uma evolução direta desta fase para uma fase crônica determinada. Em tal evolução pode ocorrer a chamada forma subaguda que se caracteriza por uma gravíssima cardiopatia, sobrevivendo a morte na maioria dos pacientes (Dias et al., 2000).

Do ponto de vista epidemiológico, as formas crônicas determinadas são as que causam os maiores impactos médico-sociais da doença, particularmente a cardiopatia crônica, com a conseqüente perda de produtividade, absenteísmo, impedimento ao trabalho e comprometimento de órgãos vitais. Muitos casos de formas crônicas determinadas apresentam uma evolução benigna e muito lenta, compatível com muitos anos de vida. No entanto, um percentual não desprezível, principalmente nas cardiopatias chagásicas, acaba tendo uma evolução grave, com comprometimento cardíaco

sobrevindo a morte por insuficiência cardíaca, arritmias graves e, também, por tromboembolismos (Puigbó et al., 1993; Storino et al., 1994; Gontijo et al., 1994; Guimarães et al., 1997).

O controle da doença de Chagas acontece predominantemente por evitar a transmissão, sendo o combate aos insetos vetores e o desenvolvimento econômico e social das áreas endêmicas relevantes para diminuir ou eliminar o contato vetor com o homem. Intervenções diretas e indiretas sobre insetos vetores e seleção de doadores de sangue atuam como medidas preventivas da doença de Chagas (Dias, 1994; Goldenberg e Krieger, 1997).

A erradicação do *Trypanosoma cruzi* nos países endêmicos é praticamente inviável, visto a complexidade dos partícipes do ciclo silvestre da circulação do parasita. A eliminação dos insetos vetores nas áreas domiciliares através do uso de inseticidas de ação residual foi utilizada em diferentes países da América Latina com elevada taxa de sucesso e é uma das alternativas possíveis de efeito mais imediato, no entanto requer uma intensa campanha em toda a área endêmica. Todavia, a resolução a longo prazo requer a atuação contínua destes programas, restringindo a participação do inseto vetor ao ciclo silvestre, eliminando as probabilidade de contato do homem com o vetor. Isto implica em resolver fundamentalmente uma precária situação sócio-econômica que afeta grande parte da população dos países envolvidos.

Até o momento, não há vacina disponível para a doença de Chagas, sendo a quimioterapia o único meio de tratamento. Para a eliminação do parasita, as drogas benzonidazol e o nifurtimox são utilizados predominantemente na fase aguda (Rassi e Luquetti, 2003), contudo, a eficácia dependente da cepa e o alto grau de toxicidade são fatores limitantes para um tratamento adequado. Estas drogas causam várias reações colaterais indesejáveis que, por vezes, obrigam a interrupção do tratamento. Embora o mecanismo de ação destas substâncias no parassita não esteja esclarecido, acredita-se que a primeira aja inibindo a síntese de proteínas e de RNA,

enquanto a segunda atua na via de detoxificação de radicais livres. As probabilidades de cura diminuem à medida que a doença vai adquirindo a forma crônica (revisado por Cançado *et al.*, 2000).

1.1.2 Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve a passagem obrigatória em dois hospedeiros e durante o qual o parasita sofre alterações morfológicas, ultra-estruturais, funcionais e bioquímicas (Tyler e Engman, 2001).

O *T. cruzi* é um parasita heteroxênico cujo ciclo de vida é descrito como apresentando duas formas replicativas (epimastigota e amastigota) e uma forma não replicativa e infectante (tripomastigota). As formas epimastigotas replicam-se na luz do intestino médio do hospedeiro invertebrado, enquanto as formas amastigotas multiplicam-se dentro de células infectadas do hospedeiro vertebrado mamífero. As diferenciações celulares das formas epimastigotas e amastigotas originam as formas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas sanguíneas, respectivamente.

O hospedeiro invertebrado ingere sangue de animais infectados com as formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo. Ao chegar ao estômago do vetor, estas formas iniciam sua transformação para epimastigotas. No intestino, os epimastigotas se multiplicam e podem migrar e aderir às porções posteriores, cujo ambiente é pobre em nutrientes (Kollien e Schaub, 2000). Neste caso, o estresse nutricional que estas formas sofrem é um dos sinais que desencadeia o processo de diferenciação celular de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas que são liberados nas fezes e na urina do vetor. Esta diferenciação também depende da interação hidrofóbica entre o flagelo e a parede interna no aparelho digestivo do inseto (revisado por De Souza, 1984; Bonaldo *et al.*, 1988; Kollien e Schaub, 2000).

No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas alcançam a corrente sanguínea através da pele (pequenas descontinuidades) ou da mucosa do hospedeiro. Os tripomastigotas podem infectar uma variedade

de tipos celulares com algumas poucas exceções, como neutrófilos e basófilos. Logo após a penetração, forma-se o vacúolo parasitóforo, e inicia-se a transformação das formas tripomastigotas em amastigotas com posterior ruptura da membrana do vacúolo. Após sucessivas divisões no citoplasma da célula, as formas amastigotas transformam-se em formas tripomastigotas sanguíneas (Carvalho e De Souza, 1989; Andrews et al., 1990). Ocorre então a ruptura da célula com liberação dos parasitas que podem ou infectar outras células ou serem ingeridos pelo inseto vetor (Brenner, 1979; De Souza, 1984) (Figura 1.1).

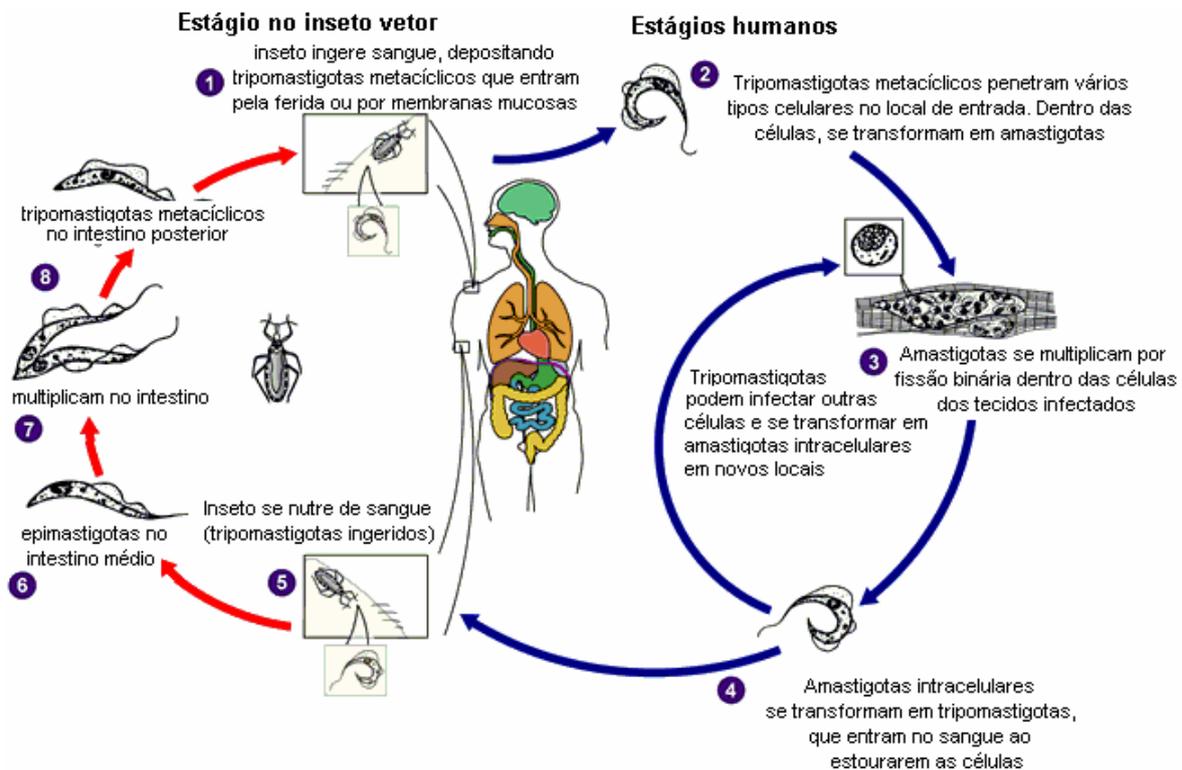


Figura 1.1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx).

1.1.3 Metaciclologênese *in vitro*

A metaciclologênese corresponde ao processo de diferenciação celular das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* e tem sido o modelo adotado em nosso laboratório para os estudos dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica do parasita (Ávila, et al., 2003).

Este processo que ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor pode ser mimetizado *in vitro* em condições quimicamente definidas (Contreras et al., 1985b; Bonaldo et al., 1988), permitindo isolar células em vários estágios de diferenciação do *T. cruzi*. *In vitro*, a transferência de epimastigotas de um meio nutricional rico para um meio sem qualquer fonte de carbono gera o estresse nutricional (Contreras et al., 1985b, Goldenberg et al., 1987, Bonaldo et al., 1988; Contreras et al., 1988). A metaciclologênese *in vitro* permite a obtenção de tripomastigotas metacíclicos com as mesmas propriedades biológicas descritas para o parasita que se diferencia no inseto vetor (Contreras et al., 1988).

Uma das alterações metabólicas do *T. cruzi*, quando submetido ao estresse nutricional, é a utilização de proteínas acumuladas no reservossomo, um endossomo peculiar de Kinetoplastida, como principal fonte de recursos para a sua atividade metabólica. A escassez de nutrientes está associada ao processo de acidificação do conteúdo do reservossomo e de ativação de suas enzimas. Nestas condições, o reservossomo passa para o estado de lisossomo. A degradação do estoque de proteínas leva ao desaparecimento desta organela com a liberação dos aminoácidos para o citoplasma, cujo consumo é favorecido em condições de estresse nutricional (Soares et al., 1989; Urbina, 1994; Soares, 1999).

Outra alteração metabólica observada durante a metaciclologênese é o acúmulo de lipídios e a alteração na composição da membrana citoplasmática de organelas. Os ácidos mirístico e linoléico sofrem acentuada redução, enquanto a concentração dos ácidos palmítico, esteárico e linolênico é

incrementada. *In vitro*, logo após serem submetidas ao estresse nutricional, as células em diferenciação são mais semelhantes às tripomastigotas do que às epimastigotas, considerando o seu conteúdo lipídico (Soares *et al.*, 1989; Esteves *et al.*, 1989).

A metaciclogênese *in vitro*, inicia-se após um estresse nutricional, que é efetuado pela transferência dos epimastigotas cultivados em meio LIT, rico em nutrientes, para o meio TAU (*triatomine artificial urine*), que mimetiza as condições iônicas encontradas na urina do inseto vetor. Após duas horas de incubação nesse meio, os parasitas são transferidos para o meio de diferenciação (TAU3AAG) que consiste do meio TAU suplementado com glicose e três aminoácidos (L-prolina, ácido L-glutâmico, ácido L-aspártico), onde permanecem por 96 horas. Nestas condições, cerca de 80% dos parasitas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (Contreras *et al.*, 1985; Bonaldo *et al.*, 1988). A obtenção de tripomastigotas metacíclicos está esquematizado na Figura 1.2.. Na Figura 1.3, está representada as porcentagens das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas nos diferentes períodos durante a metaciclogênese *in vitro*.

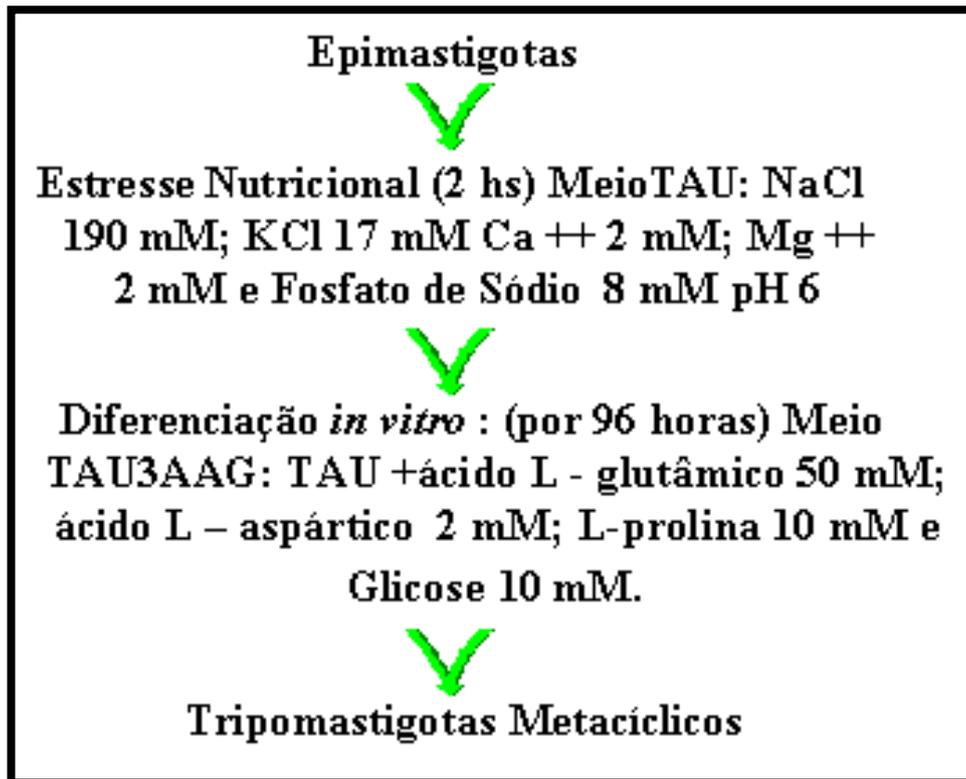


Figura 1.2. Representação esquemática do processo de metaciclogênese *in vitro*.

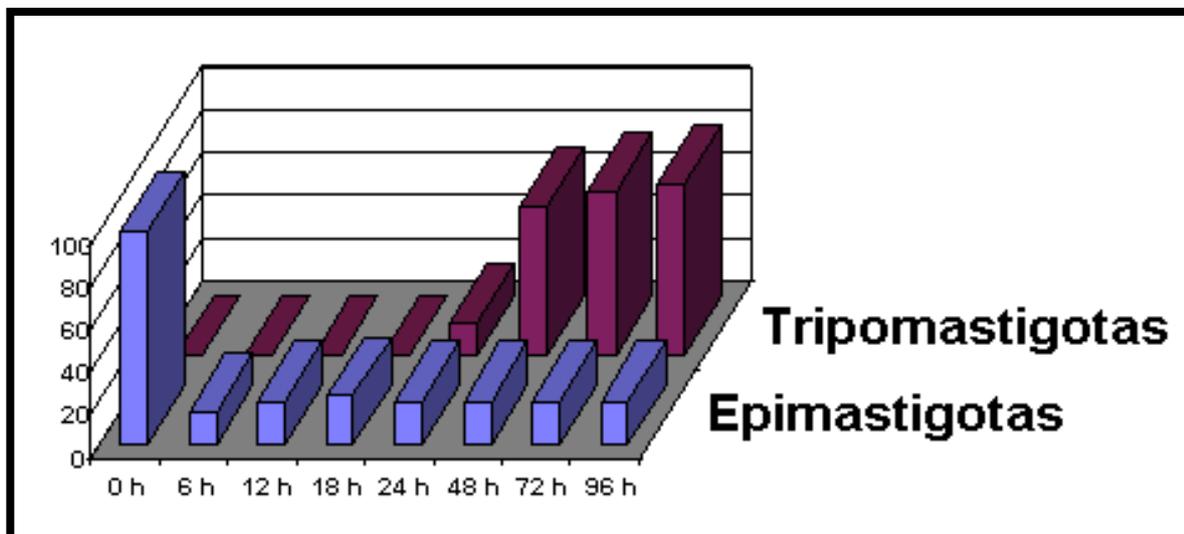


Figura 1.3. Porcentagem de formas epimastigotas e tripomastigotas presentes no sobrenadante de cultura em meio TAU3AAG, em diferentes tempos (Fonte: Bonaldo et al., 1988, modificado).

A transformação *in vitro* das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas requer a adesão dos primeiros a um substrato (Bonaldo et al., 1988), semelhante ao que foi descrito para o processo de metaciclogênese no interior do triatomíneo (Zeledon et al., 1984; Schaub, 1994). Embora necessária, a adesão não é suficiente para promover a metaciclogênese, há evidências de que os parasitas tenham sua expressão gênica reprogramada (Bonaldo et al., 1988; Kleffmann, Schmidt e Schaub, 1998). Os fenômenos de adesão e de diferenciação celular são interrompidos se, após um período de estresse nutricional, as condições de boa nutrição forem restauradas. Deste modo, é possível que o estresse nutricional esteja associado à expressão de proteínas de adesão (Figueiredo, et al., 2000).

No início da metaciclogênese, especialmente durante o estresse nutricional e o princípio do processo de adesão, deve ocorrer uma reprogramação da expressão gênica (Goldenberg et al., 1984) e foi possível observar que as alterações na expressão gênica precedem as alterações morfológicas ocorridas na metaciclogênese (Contreras, et al., 1985a). Do mesmo modo, alterações bioquímicas e na composição da superfície celular podem ser observadas logo após o estresse nutricional (Contreras et al., 1985b; Esteves et al., 1989; de Andrade et al., 1991). Vinte e quatro horas depois do início do processo de diferenciação, as formas epimastigotas em diferenciação apresentavam-se resistentes à lise pelo complemento, uma propriedade das formas tripomastigotas metacíclicas (Nogueira, Bianco e Cohn, 1975). Os níveis de transcrição são reduzidos durante a metaciclogênese (Goldenberg et al., 1985) e os produtos de genes de expressão transiente e regulação pós-transcricional podem ser observados (Ávila et al., 2001; Dallagiovanna et al., 2001). A caracterização e mapeamento dos genes expressos pelos parasitas (aderidos e não aderidos) podem prover dados fundamentais para a compreensão do processo de diferenciação celular. Como durante a metaciclogênese *in vitro* não ocorre replicação, é possível isolar diferentes populações do parasita, permitindo o estudo dos genes regulados durante este processo.

Várias moléculas são capazes de influenciar a metaciclologênese. A L-prolina que é utilizada como fonte energética pode estimular a metaciclologênese (Contreras *et al.*, 1985; Homsy, Granger e Krassner, 1989). Os inibidores da ADP-ribosil transferase, uma enzima tipicamente encontrada em células eucariotas em diferenciação, bloqueiam a metaciclologênese (González *et al.*, 1987). Do mesmo modo atuam os inibidores de metalo- e cisteína-proteínases (Bonaldo *et al.*, 1991; Cazzulo *et al.*, 1994). A presença e a concentração dos íons Ca^{2+} , K^+ , PO_4^- e HCO_3^- facilitam a metaciclologênese, enquanto o ânion Cl^- a impede (Krassner *et al.*, 1991).

As concentrações de polifosfatos inorgânicos de cadeia longa e curta, nos acidocalcissomos do *T. cruzi*, elevam-se durante a amastigogênese e a fase estacionária de crescimento das formas epimastigotas. Estas concentrações são reduzidas em condições de estresse hiposmótico e alcalino. A hidrólise destas cadeias está associada à liberação de Ca^{2+} pelos acidocalcissomos e a respostas rápidas do parasita a alterações ambientais. Portanto, os polifosfatos também devem estar envolvidos na regulação da metaciclologênese (Ruiz, *et al.*, 2001).

O AMPc é capaz de estimular a metaciclologênese (Gonzales-Perdomo, Romero e Goldenberg, 1988) e foi encontrado na urina do inseto vetor *Rhodnius prolixus* (Kollien e Schaub, 2000). As moléculas de AMPc, quando associadas a quinases, desempenham papel importante na fosforilação de inúmeras proteínas e polipeptídeos, o que resulta na alteração de suas atividades biológicas. As concentrações desta molécula podem mudar em função do ambiente, viabilizando uma rápida adaptação das células a novas condições ambientais (Schwartz, 2001). Foi descrito que estas moléculas podem induzir a transcrição do gene Tc26, durante a metaciclologênese. Não são encontrados transcritos deste gene nas formas epimastigotas, porém, eles estão presentes nas formas em diferenciação e tripomastigotas (Heath, *et al.*, 1990).

Tomlinson e colaboradores mostraram que em *T. cruzi* a diminuição do pH leva a diferenciação de tripomastigotas em amastigotas. Desta forma, o efeito de baixo pH fisiológico parece ser de grande relevância e a transformação ácido-induzida extracelularmente parece representar uma técnica experimental de grande valia para estudos de mecanismos moleculares envolvidos no processo de diferenciação (Tomlinson, et al., 1995). As condições de temperatura e de pH também parecem exercer influência na diferenciação de outros parasitas. Na diferenciação celular em *T. brucei* quando imposto o estresse de diminuição de temperatura associado ao citrato/cis-aconitato levam a um rápido aumento da taxa de diferenciação celular no parasita. Assim como, células que sofreram tratamento em baixo pH também são levadas à diferenciação celular neste organismo. (Rolin *et al.*, 1998; Nolan *et al.*, 2000). Do mesmo modo, em *Leishmania*, mudanças de temperatura e pH disparam a expressão diferencial de genes, bem como, a diferenciação celular neste parasita (Srinivas, et al., 1999). Enfim, distintas condições de estresse podem levar o aumento da taxa de diferenciação celular nos parasitas.

1.2 RESPOSTA AO ESTRESSE

A capacidade de responder rapidamente às variações de temperatura, nutrientes, bem como, outras alterações ambientais é importante para a atividade geral da célula e sua sobrevivência. A compreensão a respeito da resposta das células às alterações ambientais é um tópico de grande interesse porque pode oferecer pistas sobre os aparatos moleculares que permitem as células a se adaptarem a novos ambientes. Os mecanismos moleculares que estão envolvidos na regulação do remodelamento da expressão gênica em virtude da adaptação a novos ambientes são a chave para a elucidação de muitas respostas sobre o comportamento celular perante estímulos adversos. Índícios significativos dos mecanismos envolvidos na mudança de ambientes vieram de estudos dos genes que são expressos em resposta a estresses

celulares específicos (Causton, et al., 2001). Por exemplo, foi demonstrado que a indução de uma resposta clássica de choque térmico acarreta aumento de síntese e a abundância de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (HSPs) (Graefer, et al., 2002).

Dentre os organismos já estudados, eucariotos e procariotos, todos parecem responder de forma similar diante de condições de estresse térmico impostos. Ativando uma série de genes altamente conservados conhecidos como genes de choque térmico (Sanchez-Moreno, et al., 1997).

As HSPs além de terem sua expressão induzida na resposta ao estresse, também possuem diversos papéis essenciais nas células. Dentre eles podem ser citados: dobramento de proteínas, acoplamento, localização intracelular, secreção e degradação de outras proteínas. Apesar disso, nem todas as HSPs são estresse-induzíveis, mas aquelas que são, respondem também a uma variedade de estresse, tais como, temperaturas extremas, depleção de energia celular, concentrações extremas de íons, gases e várias substâncias tóxicas (Feder e Hofmann, et al., 1999).

Em *Escherichia coli*, há uma maquinaria essencial para sobrevivência diante de diferentes tipos de estresse. Para tanto a expressão de um grande número de genes encontra-se sob controle de σ^S , que é codificado pelo gene *rpoS*, enquanto que o gene *rpoH*, codifica o fator transcricional σ^{32} , que controla a expressão dos genes em resposta ao estresse térmico (HSP). Foi verificado que a cepa *rpoH* é extremamente sensível a uma súbita troca de temperatura. Quando se encontra em um crescimento exponencial aeróbico, enquanto que a cepa silvestre MC4100 e a cepa mutante *rpoS* apresentam resistência ao estresse térmico. Quando as células se encontram na fase estacionária as três cepas apresentam resistência à troca de temperatura (Delgado-Olivares, et al., 2006).

O papel das HSPs nas interações parasita-hospedeiro merecem atenção dos pesquisadores. Da perspectiva do vetor, as HSPs expressas pelo hospedeiro intermediário durante a invasão do parasita são potenciais

antígenos que provocam a resposta imune. As HSPs do parasita são potencialmente úteis como alvos de vacinas. Da perspectiva do parasita, a síntese de HSPs é um mecanismo de defesa celular que permite que o parasita viva em diferentes ambientes térmicos ao longo do ciclo de vida. Existem vários estudos demonstrando como ocorre a regulação da expressão de HSPs no parasita, bem como, a expressão diferencial destas proteínas ao longo do ciclo de vida e os tipos de HSPs que são induzidas quando há mudanças de temperatura. Por exemplo, em *T. brucei*, transcritos de mRNA de HSP 70 e HSP 83 aumentam sua expressão em 100 vezes quando passam do vetor para o hospedeiro mamífero. Em *Schistosoma mansoni*, existem HSPs que são expressas em estágios evolutivos diferentes do seu ciclo de vida. Parasitas que possuem insetos como vetores merecem muita atenção quanto à forma como a expressão das HSPs são reguladas, isto é o caso de parasitismo de nematóides, cestóides, *Plasmodium*, *Borrelia burgdorferi*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Theileria*. Alguns parasitas considerados de vida livre não necessitam de vetor. Desta forma, em alguns casos, a indução das HSPs acompanha a transição do ambiente sofrida pelo hospedeiro (Feder e Hofmann, 1999).

Os organismos que vivem em um ambiente aeróbico são obrigados a possuir estratégias celulares efetivas para a proteção de reativos de detoxificação de oxigênio gerados por estresse oxidativo. Além desses mecanismos, também foram necessários o desenvolvimento de diversas enzimas antioxidante e componentes, tais como, enzimas de reparo de DNA, sistema de desagrupamento, que remove proteínas danificadas, sistemas de regulação que controlam a transcrição, tradução e ativação. Apesar de muitas pesquisas a fim de investigar os mecanismos moleculares envolvidos com a resposta ao estresse, estes ainda permanecem obscuros devido a vias complexas de sinalização e o envolvimento de várias proteínas neste processo (Miura, 2004).

O envelhecimento celular pode acarretar uma maior influência do estresse oxidativo nos sistemas biológico. Richardson e Holbrook mostraram

que a indução do fator de choque térmico (HSF) e HSP, especialmente HSP70 diminuem com o envelhecimento. As HSPs desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa celular contra o calor, estresse oxidativo e outros tipos de estresse, desta forma, a diminuição deste sistema pode reduzir bruscamente a capacidade do organismo a responder a mudanças do ambiente (Richardson e Holbrook, 1996). Em contraste, análise de microarranjo de DNA mostrou evidências que a expressão basal das HSPs aumentam com o envelhecimento (Lee, et al., 1999; Lee, et al., 2000). Além disso, foi observado que o envelhecimento de cérebro de ratos (Uno, et al., 2000) ou fibroblastos humanos (Fonager, et al., 2002) também resulta em um aumento basal do nível expressão de HSP70. Esta elevação na expressão ocorre como uma resposta ao envelhecimento associado ao acúmulo de proteínas danificadas por oxidação. Elevação da expressão de HSPs associada ao envelhecimento também foi observada em *Drosophila* (Wheeler, et al., 1995).

Os tripanosomatídeos apresentam um processo único de metabolismo do tiol no qual o sistema glutationa/glutationa redutase é substituído por tripanotiona/tripanotiona redutase. A tripanotiona di-tiol é a molécula chave para síntese dos precursores de DNA, homeostase do ascorbato, desintoxicação de hidropoxidases e a exportação/sequestro de conjugados de tiol (Smimidt & Krauth-Siegel, 2002). O *T. cruzi* é exposto aos metabólitos tóxicos de oxigênio que são gerados pelo metabolismo de drogas e respostas imunes, além daqueles produzidos por processos endógenos. Entretanto, muitas lacunas ainda existem para que seja esclarecido o sistema de defesa oxidativo do parasita, incluindo o(s) mecanismo(s) de redução do peróxido. A redução de peróxidos no *T. cruzi* é catalisada por duas enzimas distintas que dependem de tripanotiona. Essas enzimas foram localizadas no citosol e em mitocôndrias, sendo membros da família de proteínas antioxidantes peroxiredoxinas e são caracterizadas pela presença de dois domínios conservados contendo redox cisteínas. O papel destas proteínas em proteger o *T. cruzi* do prejuízo mediado pelo peróxido foi demonstrado seguindo a super-expressão da atividade da enzima (Wilkinson et al., 2000). A triparedoxina peroxidase combinada com a tripanotiona redutase pode formar um composto

NADPH mediante um sistema de defesa contra hidroperóxidos em tripanosomatídeos (Steinert et al., 1999).

O metabolismo do hidroperóxido em *Crithidia fasciculata* foi caracterizado e envolve uma cascata de três oxidoredutases compreendendo tripanotiona redutase (TR), triparedoxina (TXN1) e triparedoxina peroxidase (TXNPx) (Rhee et al., 1999). Epimastigotas de *T. cruzi* exibem forte imunoreatividade com anticorpos contra TXN1 e TXNPx de *Crithidia fasciculata*. Foi mostrado que o metabolismo hidroperóxido tripanotiona dependente, previamente estabelecido para *C. fasciculata*, opera em *T. cruzi* (Guerrero et al., 2000).

Em *T. brucei*, é clara a importância do metabolismo mediado pela tripanotiona para resistência a H_2O_2 . A associação desta enzima à virulência e sobrevivência do parasita foi mostrado através do “knock-out” condicional de tripanotiona redutase (Krieger et al., 2000). A triparedoxina tem sido apresentada como sendo substrato do ribonucleotídeo redutase em *T. brucei*, sendo assim, essencial para a biossíntese do DNA no parasita (Lüdemann et al., 1998). Estudos mostraram que frações citoplasmáticas e mitocondriais de extratos do *T. cruzi* podem gerar níveis significativos de H_2O_2 (Boveris & Stoppani, 1977; Denicola-Seoane et al., 1992) e isto tem corroborado a necessidade de um sistema metabólico efetivo do peróxido, em ambos compartimentos.

A transição de parasitas dos insetos vetores para hospedeiros mamíferos está associada a uma exposição do mesmo, ao meio extra e intracelular do hospedeiro e a elevação da temperatura do ambiente. Essas alterações do ambiente podem ser vistas no parasita como estresse celular e que provoca um choque térmico clássico com um aumento da síntese e abundância de HSPs, mas para certos parasitas o estresse por temperatura também funciona como um sinal de diferenciação celular e de adaptação aos novos ambientes. Em *L. donovani*, a necessidade de diferenciação de promastigotas à amastigotas durante o ciclo de vida do parasita está

correlacionado com o aumento de temperatura ocorrido durante a transição do inseto para o mamífero. Experimentos *in vitro* onde há um aumento de temperatura de 25 a 37 °C, combinado com a acidificação do meio de cultura, constituem um estímulo suficiente para induzir a diferenciação de promastigotas à amastigotas em culturas axênicas (Graefe *et al.*, 2002).

A situação de *T. cruzi*, no entanto, é diferente. A diferenciação de epimastigotas à tripomastigotas metacíclicos ocorre no intestino do inseto vetor, antes da transição de hospedeiros e não está correlacionada com um aumento de temperatura. A diferenciação de tripomastigota para amastigotas também não coincide com um aumento de temperatura, uma vez que ambas as formas residem no hospedeiro mamífero. Além disso, alterações morfológicas não foram atribuídas a proteínas de choque térmico em formas de *T. cruzi* em cultura. Desta forma, o estudo da inibição de HSP90 em *T. cruzi* para monitorar os efeitos na síntese de HSP e os aspectos morfológicos e de crescimento do parasita mostrou a interrupção do processo de divisão das formas epimastigotas, mas não foi capaz de levar estas células à metaciclogênese (Graefe *et al.*, 2002).

Outro aspecto morfológico de resposta ao estresse é a autofagia que consiste em um mecanismo usado pelos eucariotos para degradar e reciclar proteínas e organelas e é essencial para a manutenção celular, homeostase e o desenvolvimento celular durante a diferenciação, além metamorfose e envelhecimento. Acredita-se que este mecanismo tenha surgido inicialmente como uma resposta a escassez de nutrientes e estresse em organismos unicelulares, tais como, levedura, em organismos multicelulares, a autofagia além disso, também foi associada à neurodegeneração, cardiomiopatias, infecção por patógeno, distúrbios musculares, câncer e morte celular (não por apoptose). Durante autofagia, porções de citoplasma são englobadas em vesículas de dupla membrana chamada autofagossomos que posteriormente fundem-se com lisossomas/vacúolos, permitindo assim degradação do material por englobamento por hidrolases lisossomais (Alvarez, *et al.* 2007).

Muito pouco se sabe sobre a autofagia em organismos unicelulares primitivos, tais como, parasitas protozoários. Sabe-se que este processo é essencial para manutenção e sobrevivência do parasita, está envolvido com a diferenciação de estágios evolutivos do *T. cruzi*. A via de autofagia pode representar um alvo para estratégias de novos quimioterápicos contra a doença de Chagas (Alvarez et al., 2007).

A base molecular da autofagia foi elucidada através de rastreamentos genéticos de *Saccharomyces cerevisiae*, onde 16 genes essenciais (ATG) foram identificados. Dentre esses genes, dois sistemas únicos ubiquitina-like desempenham um papel importante nos estágios iniciais de biogênese de autofagossomas. O primeiro deles é o sistema Atg12 e o segundo são proteínas ubiquitina-like (Alvarez et al., 2007).

Mecanismos de controle pós-transcricional desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica durante a resposta celular ao estresse. A resposta celular ao estresse e inibição do início da tradução leva ao acúmulo de mRNA no citoplasma em estruturas específicas. Por exemplo, em células mamíferas, mRNA não traduzidos concentram-se em grânulos de estresse que são agregados citoplasmáticos. Em leveduras, e em menor grau nas células dos mamíferos, o estresse induzido causa a inibição da síntese das proteínas e provoca acúmulo de mRNA reprimidos traducionalmente em P – *bodies*, que são foci citoplasmáticos que contém várias proteínas envolvidas na repressão da tradução e degradação de mRNA. Este mRNAs marcados estresse-dependente sugerem que a resposta celular ao estresse inclui a modulação de taxas de degradação de mRNA. Vários estudos sugerem que taxas de degradação mRNAs podem alterar a resposta a vários tipos de estresse (Hilgers, et al., 2006).

1.3 EXPRESSÃO GÊNICA NOS TRIPANOSOMATÍDEOS

1.3.1 O genoma do *Trypanosoma cruzi*

Os tripanosomatídeos, assim como outros eucariotos, possuem um genoma nuclear e um genoma mitocondrial sendo que este último representa cerca de 10 a 30 por cento do total de DNA celular (Borst et al., 1982). Cada célula contém uma única mitocôndria onde o seu DNA está organizado sob a forma de uma rede de mini e maxicírculos concatenados (revisto por Shapiro e Englund, 1995). Existem milhares de minicírculos e cerca de 50 maxicírculos (Savill e Higgs, 1999). As seqüências maduras de grande parte dos mRNAs mitocondriais codificados pelos maxicírculos são produzidas por um processo pós-transcricional denominado edição de RNA que consiste na inserção ou deleção de nucleotídeos (notadamente uridinas). Pequenos RNAs guias codificados pelos maxi e minicírculos, dirigem as mudanças feitas durante a editoração dos mRNAs mitocondriais (revisto por Moffett et al., 1997).

Em relação ao DNA nuclear, os cromossomos em tripanosomatídeos não são distinguidos, pois não sofrem condensação em nenhum estágio tanto de ciclo celular quanto do ciclo de vida. Entretanto, o nível de condensação da cromatina varia durante o desenvolvimento dos tripanossomas. Desta forma, o maior nível de condensação é observado nas formas sangüíneas, quando comparado com as formas procíclicas do *T. brucei*. Resultados semelhantes foram vistos nas formas tripomastigotas em relação às formas epimastigotas do *T. cruzi*, estes diferentes padrões podem ser associados a diferenças nas taxas de transcrição (Hecker et al., 1994; Elias et al., 2001). Essas variações podem ser atribuídas a diferentes padrões de histonas H1 presentes nestes parasitas (Aslund et al., 1994; revisto por Belli, 2000).

Através de técnicas de eletroforese de campo pulsado (Schwartz e Cantor, 1984; Carle et al., 1986) foi possível identificar bandas cromossômicas nestes parasitas. O genoma nuclear do *T. cruzi* consiste, em média, de 43 a 50

Mpb de DNA distribuídos entre 30 a 40 bandas cromossômicas que apresentam tamanhos de 0,45 a 4,0 Mpb (Johnston et al., 1999).

Em 2001, três instituições – The *Institute for Genomic Research (TIGR)*, *Seattle Biomedical Research Institute (SBRI)* e *Karolinska Institutet* – fizeram um consórcio (*TSK*) cujo objetivo foi o seqüenciamento do genoma de *T. cruzi*. A cepa eleita foi a CL Brener, por ser bem caracterizada experimentalmente (Zingales *et al.*, 1997) e os primeiros resultados foram liberados no final de 2004. Estima-se que o tamanho do genoma haplóide desta cepa é de aproximadamente 55 Mpb, bem maior do que o esperado (El-Sayed et al., 2005a).

Calcula-se que 50 % do genoma nuclear seja constituído por seqüências repetitivas. Neste conjunto, encontram-se alguns genes de proteínas – como os que codificam tubulina e grandes famílias de genes codificadores de glicoproteínas de superfície –, genes de RNAs – como rRNA e RNA da seqüência líder – e um número majoritário de seqüências repetitivas – mini- e microsatélites e elementos genéticos móveis. Retrotransposons ocupam aproximadamente 5 % do genoma (El-Sayed e al., 2005a). Estas seqüências repetitivas podem estar em tandem ou espalhadas em diferentes *locus* no genoma.

Aproximadamente 60 % do genoma contêm seqüências codificadoras. A estimativa do número de genes por genoma haplóide é de aproximadamente 12000. Em 60 Mbp, foram identificados cerca de 3600 pseudogenes. Dentre os genes codificadores de proteínas, 18% são constituídos de famílias de proteínas de superfície – superfamília das trans-sialidases, mucinas, gp63 e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs).

1.3.2 Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*

Os tripanosomatídeos apresentam transcrição policistrônica (Johnson et al., 1987; Kooter et al., 1987), mas mRNAs maduros monocistrônicos. Os transcritos policistrônicos, em muitos casos, apresentam várias repetições de

um mesmo gene em um arranjo em tandem (Swindle e Tait, 1996). Este tipo de arranjo foi descrito para genes que codificam proteínas de choque térmico (Dragon et al., 1987) da família das transialidase/neuroaminidase (Beard et al., 1988), cruzipaína (Campetella et al., 1992), tubulina (Maigon et al., 1988; Soares et al., 1989), enzima fosfoenol piruvato carboxi-quinase (Linss et al., 1993) da família dos transportadores de hexoses (Tetaud et al., 1994) e para as glicoproteínas tipo mucina (Di Noia et al., 1995; Di Noia et al., 2000).

Também foram descritos nos tripanosomatídeos, transcritos policistrônicos contendo informações de genes não relacionados funcionalmente, como por exemplo, os transcritos dos genes presentes no *locus* das glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) (Johnson et al., 1987; Kooter et al., 1987; Pays et al., 1989). Neste caso, pelo menos 11 genes diferentes (ESAGs – *Expression Site Associated Genes*) estão associados ao sítio de expressão das VSGs, cujos transcritos apresentam importantes diferenças tanto nos níveis dentro da célula com na taxa de tradução. Outros relatos descrevem também sítios de expressão onde diferenças nos níveis de mRNAs são observadas para os genes pertencentes à mesma unidade transcricional (Gibson et al., 1988; Revelard et al., 1993). A transcrição de forma policistrônica diminui o papel potencial de promotores na modulação da expressão gênica, favorecendo a relevância dos mecanismos de controle pós-transcricional.

Na maioria das células eucarióticas, a região estrutural dos genes que codificam polipeptídeos é formada por uma série de exons (seqüências codificantes) e introns (seqüências não codificantes). A transcrição é iniciada através de vários fatores transcricionais que se ligam ao sítio de iniciação da transcrição, mobilizando e ativando a RNA polimerase II que estende a transcrição até um sítio terminador. Um resíduo de metil guanosina trifosfato (Gppp) é adicionado na extremidade 5' do transcrito primário (*Cap*), enquanto que, por um processo denominado poliadenilação, a cauda poli-A é inserida na porção 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA. Através do processo de *cis-splicing*

ocorre a remoção das seqüências de introns e a união das seqüências de exons adjacentes (Lodish et al., 2000).

Embora exista evidência de que apenas um gene seja processado pelo *cis-splicing* em tripanosomatídeos, um outro processo denominado *trans-splicing* foi descrito e mostrou-se essencial na maturação dos mRNAs. Estudos feitos pioneiramente com os genes das VSG mostram que uma seqüência comum é adicionada à extremidade 5' dos transcritos (Sutton e Boothroyd, 1986). A adição desta seqüência nucleotídica comum, denominada mini-exon (ME) ou *spliced leader* (SL), mostrou-se depois comum a todos os mRNAs de tripanosomatídeos (Walder et al., 1986), sendo efetuada através da reação de *trans-splicing* (Agabian, 1990). Esta reação acrescenta à extremidade 5' dos precursores dos mRNAs dos tripanosomatídeos 39 nucleotídeos, cuja seqüência é espécie-específica (Luo et al., 1999). Esta seqüência é proveniente de um precursor, SL-RNA, de cerca de 135 a 141 nucleotídeos para *T. brucei*, (Sutton e Boothroyd, 1986) e 110 nucleotídeos para *T. cruzi* (Zwierzynski e Buck, 1991). A maquinaria envolvida no *trans-splicing* é muito semelhante àquela presente no *cis-splicing* de outros eucariotos (Agabian, 1990; Vanhamme e Pays, 1995). O mini-exon ou *spliced-leader* fornece a todos os mRNAs a estrutura do tipo *cap* (análogo cíclico de guanosina tri-fosfatada) presente na extremidade 5' dos mRNAs eucarióticos (Luo et al., 1999). O processamento dos RNAs precursores, através da adição da cauda poliadenilada na região 3' e da seqüência do mini exon na região 5', permite que genes transcritos de forma conjunta resultem em mRNAs maduros independentes e possam sofrer diferentes níveis de regulação. A localização dos sítios de adição da cauda poli A e do sítio de adição do mini-exon seria determinada por regiões ricas em polipirimidinas (Lebowitz et al., 1993). Estas regiões, quando deletadas, alteram a posição da adição de ambas as extremidades. (Berberof et al., 1995; Lebowitz et al., 1993; Hug et al., 1993; Matthews et al., 1994; Vassella et al., 1994). Como este procedimento é efetuado de forma bi-direcional, os modelos mais aceitos sugerem que enquanto o mini-exon é adicionado à extremidade de um transcrito, a cauda

poli A é inserida no transcrito adjacente dentro da mesma unidade transcricional (Lebowitz et al., 1993).

Apenas alguns promotores de genes que codificam para proteínas foram funcionalmente identificados em tripanosomatídeos. Os primeiros promotores caracterizados foram os promotores relacionados à transcrição das glicoproteínas majoritárias de superfície do *T. brucei*: prociclina e VSG (Pays et al., 1990; Rudenko et al., 1990; Zomerdiijk et al., 1990). Estes promotores apresentam peculiaridades em relação aos promotores de genes transcritos por RNA polimerase II de eucariotos, pois a RNA polimerase associada aos mesmos não é inibida por α -amanitina (Clayton et al., 1990; Kooter e Borst, 1984; Rudenko et al., 1989; Zomerdiijk et al., 1990). Estes promotores guardam similaridades com promotores dos genes codificadores para os RNAs ribossomais (Sherman et al., 1991; Brown et al., 1992; Janz e Clayton, 1994). Os três tipos clássicos de RNA polimerase, em relação à sensibilidade a α -amanitina, já foram identificados em tripanosomatídeos (Cornelissen et al., 1989; Cornelissen et al., 1990;) e a maior subunidade de cada enzima já foi clonada e caracterizada (Evers et al., 1989; Jess et al., 1989; Grondal et al., 1989). A RNA polimerase II das espécies de tripanosomatídeos mostraram peculiaridades em relação a um possível domínio regulador (heptapeptídeos C-terminais) (Evers et al., 1989). Também foi evidenciada a capacidade da RNA polimerase I em transcrever mRNAs (Rudenko et al., 1991; Zomerdiijk et al., 1991). Existe certa controvérsia em relação ao tipo de RNA polimerase envolvida na transcrição dos genes de VSG e prociclina. Alguns grupos aceitam que estes genes são transcritos por uma RNA polimerase I, enquanto outros sugerem a presença de uma RNA polimerase II distinta associada à expressão dos mesmos (revisto em Vanhamme e Pays, 1995). Enquanto estes antígenos majoritários são expressos de forma estágio-específica, os promotores são ativos tanto nas formas procíclicas quanto nas formas sanguíneas do *T. brucei* (Pays et al., 1990), indicando que mecanismos de regulação devem ser atuantes. No caso da VSG, por exemplo, apenas um dos sítios de expressão é ativo nas formas sanguíneas, sendo que as transcrições das outras cópias espalhadas pelo genoma são abortadas após seu início

(Vanhamme et al., 1995; Vanhamme e Pays, 1995). Neste caso, evidenciou-se a primeira regulação transcricional estágio-específica na expressão de genes tripanosomatídeos.

Embora não tenham sido caracterizados outros promotores para genes que codificam para proteínas em tripanosomatídeos, experimentos mostram que muitas seqüências intergênicas de diferentes grupos de genes (*clusters*) podem induzir a expressão de genes repórteres nestes parasitas. Por exemplo, seqüências intergênicas do *cluster* da tubulina (Curotto-de-Lafaille e Wirth, 1992), ou da proteína de choque térmico HSP 83 (Aly et al., 1993) em *Leishmania*, ou da amastina em *T. cruzi* (Texeira et al., 1995), foram capazes de estimular a transcrição de genes repórteres. É interessante notar que em *T. cruzi*, níveis de indução significativamente superiores são obtidos quando se utilizam vetores de expressão transiente contendo a seqüência do promotor ribossomal (Lu e Buck, 1991; Tyler Cross et al., 1995). Assim, a RNA polimerase I parece ser capaz de transcrever mRNAs em tripanosomatídeos (Rudenko et al., 1991; Zomerdiijk et al., 1991) ou, alternativamente, a RNA polimerase II pode iniciar a transcrição a partir de promotores para a RNA polimerase I.

Apesar de existirem indícios de modulação da expressão gênica durante a transcrição em tripanosomatídeos (Pays et al., 1990; Rudenko et al., 1990; Zomerdiijk et al., 1990; Urmenyi et al., 1992; Graham e Barry, 1995; Lee, 1996), muitos dos dados obtidos até o momento apontam para um papel mais relevante da modulação dos eventos pós-transcricionais.

Dados bem consistentes sobre elementos envolvidos com os mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos são provenientes de estudos relacionados com a estabilidade de certos mRNAs. A diferença na estabilidade do RNA, de acordo com a forma evolutiva do parasita, pode estar em parte associada à presença de seqüências reguladoras nas regiões não traduzidas. Experimentos de transfecção, com a utilização de genes repórteres, confirmam a hipótese do papel destas regiões através da

diferença de estabilidade observada nos transcritos do gene repórter nos diferentes estágios evolutivos do parasita. Foram descritos elementos presentes nas regiões 3' UTR que aumentam a estabilidade dos mRNAs em determinadas fases do ciclo de vida, enquanto diminuem a estabilidade dos mesmos transcritos em outras formas do parasita. Por exemplo, a região 3' UTR do gene da prociclina aumenta a estabilidade deste transcrito nas formas procíclicas do *T. brucei* (Hehl et al., 1994) e mapeamento fino desta região (297 bases) evidenciou a presença de um elemento regulador positivo e pelo menos um elemento regulador negativo (Furger et al., 1997). Em relação à VSG, também foi caracterizado um elemento localizado na região 3' não traduzida, que confere maior estabilidade ao gene repórter nas formas sanguíneas do que nas formas procíclicas do *T. brucei* (Berberof et al., 1995).

Regiões 3' UTR de outros genes mostraram-se importantes no controle da expressão gênica em tripanosomatídeos. Por exemplo, regiões UTR presentes no mRNA de amastina, de cruzipaina (Teixeira et al., 1995; Tomás e Kelly, 1996; Coughlin et al., 2000), gp 72, gp 85, HSP 60 e da gliceraldeído 1-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (Nozaki e Cross, 1995). Estes resultados comprovam o envolvimento das regiões 3' UTRs no controle pós-transcricional destes genes em tripanosomatídeos.

Embora a maior parte destes relatos localizem este tipo de elemento na região 3' UTR, também foi descrita a presença de elementos reguladores na região 5' UTR. No caso da expressão da enzima DNA topoisomerase de *Crithidia fasciculata*, foi demonstrado o envolvimento de duas regiões regulatórias de aproximadamente oito nucleotídeos localizadas na porção 5' UTR de seu mRNA. A deleção destas regiões resulta na expressão constitutiva desta enzima durante o ciclo de vida de *C. fasciculata* (Pasion et al., 1996).

Em resumo, os mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos parecem ser distintos dos mecanismos comumente encontrados em eucariotos superiores sendo que a maior parte dos eventos de regulação da expressão gênica parece ser pós-transcricional.

Evidências sobre um possível controle traducional também foram observados em tripanosomatídeos. Os níveis de transcritos de uma serina-treonina quinase, denominada NRK, eram constitutivamente similares em todo o ciclo celular do *T. brucei*, no entanto, altos níveis desta proteína eram encontrados nas formas sangüíneas do parasita (Gale Jr et al., 1994). O mesmo foi observado em algumas proteínas expressas por *T. cruzi*, tais como, a cruzipaina (Tomás e Kelly, 1996), topoisomerase II (Fragoso et al., 1998) e KMP 11, uma proteína de 11 kDa associada ao citoesqueleto do parasita (Thomas et al., 2000). Apesar de níveis similares de mRNA estarem presentes em todas as formas evolutivas do parasita, os níveis de proteínas eram maiores nas formas epimastigotas em relação às outras formas.

Alguns relatos na literatura sugerem que a regulação da expressão de alguns genes em *T. cruzi* pode ocorrer durante a mobilização deste mRNAs para o polissoma. Este tipo de regulação foi evidenciado para os genes que codificam tubulina, metacicloquina, cblp1 e TcImp4 (Carvalho et al., 1990; Ávila et al., 2001; Dallagiovanna et al. 2001; Fragoso et al., 2003).

A maioria dos estudos sobre a regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos envolve genes que são abundantemente expressos em um determinado estágio do desenvolvimento, tais como genes que codificam VSG, M-VSG, prociclina, amastina, neuroaminidases e gp72 (Texeira et al., 1995; Vanhame e Pays, 1995; Pays e Nolan, 1998; Graham et al. 1998; Abuin et al., 1999). Nesses casos, apesar de existir algum tipo de regulação durante a tradução, outros mecanismos parecem ser predominantes na regulação da expressão desses genes notadamente em eventos associados à degradação seletiva de algumas espécies de mRNAs.

1.4 A GENÔMICA FUNCIONAL E TECNOLOGIA DE MICROARRANJOS

Atualmente há disponível um grande número de seqüências de tripanosomatídeos, fruto inicialmente de esforços isolados na caracterização de genes e mais recentemente de consórcios para análise em larga escala,

com a utilização de metodologias de *high throughput*. A partir destes dados, várias metodologias podem ser utilizadas para o melhor entendimento da biologia destes organismos. Uma destas metodologias é o microarranjo de ácidos nucleicos, descrita inicialmente em 1995 por Peter Brown e colaboradores (Schena *et al.*, 1995) e, desde então, ela vem sendo utilizada intensamente nas mais diversas áreas, como câncer e estudo do ciclo celular de leveduras.

Uma das mais importantes aplicações de arranjos é a monitoração da expressão gênica. A coleção de genes que é expressa ou transcrita do DNA genômico, algumas vezes referida como transcritoma, é sem dúvida uma das maiores determinantes do fenótipo e função celular. A transcrição do DNA genômico para produzir mRNA é o primeiro passo para síntese protéica, e diferenças na expressão do gene são responsáveis por diferenças fenotípicas e morfológicas (Cho *et al.*, 1998).

Os microarranjos são produzidos a partir da aplicação de moléculas de DNA, denominadas sondas (oligonucleotídeos, cDNAs, produtos de PCR, entre outros, normalmente representando genes) em uma matriz. A impressão é coordenada por um robô que carimba uma alíquota de cada produto gênico em um certo número de matrizes em uma operação em série (Duggan *et al.*, 1999). Atualmente, os microarranjos são geralmente feitos em lâminas para microscopia que apresentam baixa fluorescência intrínseca. Elas são revestidas com poli-lisina, amino silanos ou reativos de amino silanos, o que facilita a adesão do DNA ao vidro. Na maioria dos casos, o DNA é fixado à matriz por irradiação ultra violeta (Cheung *et al.*, 1999). Os alvos do microarranjo são normalmente representações de moléculas de cDNA (Duggan *et al.*, 1999) marcadas com os fluoróforos, Cy-3, Cy-5, pois, apresentam relativa eficiência de incorporação por meio de uma reação de transcriptase reversa, boa fotossensibilidade e, quando excitados, emitem espectros não sobrepostos (espectro verde e vermelho respectivamente).

Um dos aspectos mais interessantes da análise de expressão gênica em larga escala através de hibridação de microarranjos é a possibilidade de desenvolvimento de agrupamentos com expressão coordenada. Existem algumas metodologias para a confecção destes agrupamentos, as quais baseiam-se em algoritmos matemáticos muito semelhantes àqueles utilizados para a construção de filogenias através da comparação de seqüências de DNA de diferentes organismos.

Os microarranjos começaram a ser utilizados para estudos em tripanossomatídeos em 2002. Diehl *et al.* compararam mRNA total de *T. brucei* de duas formas distintas, a procíclica e a sangüínea, usando um microarranjo de aproximadamente 20000 produtos de PCR referentes a clones de uma biblioteca de fragmentos genômicos. Apenas 2% das sondas se mostraram diferencialmente expressas e a maioria delas correspondia a genes como VSG, ESAGs, PARP e HSP83.

Saxena *et al.* (2003) utilizaram microarranjos de aproximadamente 9200 seqüências para avaliar a diferenciação das formas procíclicas para metacíclicas de *Leishmania major*. O material utilizado foi o mRNA total celular e menos que 2% dos genes se mostraram com a expressão alterada no processo de diferenciação.

Minning *et al.* (2003) realizaram o primeiro trabalho utilizando microarranjos para a análise de *T. cruzi*. O arranjo consistia em 4400 fragmentos genômicos. O processo estudado foi a diferenciação *in vitro* da forma tripomastigota para a amastigota. Menos que 1,5% das sondas mostraram-se diferencialmente expressas.

Posteriormente, três trabalhos utilizando *Leishmania* como modelo foram publicados. Guimond *et al.* (2003) utilizaram um microarranjo direcionado para genes envolvidos com resistência a drogas, contendo apenas 44 genes. Akopyants *et al.* (2004) utilizaram um microarranjo de aproximadamente 22000 sondas (metade de genes conhecidos, metade de clones genômicos) e avaliaram as diferenças no mRNA total entre as formas do ciclo de vida.

Apenas 3,2% das sondas mostraram expressão diferencial. Almeida *et al.* (2004) utilizaram um microarranjo de aproximadamente 1800 sondas originárias de uma biblioteca de cDNA de *L. major* comparando as formas procíclicas, metacíclicas e amastigotas a fim de selecionar genes diferencialmente expressos nos estágios em questão.

Baptista *et al.* (2004) utilizaram microarranjos de 730 sondas para comparar duas cepas distintas de *T. cruzi*: CL Brener e Silvio, através da hibridização de DNA e de RNA. Um total de 68 e 84 sondas mostrou-se diferente nas comparações envolvendo DNA e RNA, respectivamente.

Brems *et al.* (2005), utilizaram uma versão ampliada do microarranjo de Diehl *et al.* (2002) para comparar diferenças tanto no mRNA total quanto no RNA associado a polissomos em duas cepas de *T. brucei*. Em quaisquer das frações de RNA encontrou-se diferença na expressão de aproximadamente 2% dos genes.

Leifso *et al.* (2007) utilizaram microarranjos de oligonucleotídeos representando 8160 genes a fim de analisar o perfil de expressão de mRNA das formas promastigotas e amastigotas de *L. major*. Foi observado que mais de 94% dos genes eram expressos em ambas as formas. Estes resultados sugerem que o genoma deste parasita é constitutivamente expresso e que a *Leishmania* adapta-se a seus hospedeiros utilizando genes adequados para os diferentes ambientes a qual é exposto.

Saxena *et al.* (2007) utilizam microarranjos de DNA para investigar o provável papel dos RNAs na diferenciação de promastigotas em amastigotas de *L. donovani*. Resultados deste estudo indicam que há mudanças específicas na expressão gênica durante a diferenciação do parasita. Alguns genes têm sua expressão alterada no início da diferenciação celular, outros somente no final. Ainda foi possível notar que um número substancial de genes tem sua expressão transitória, super ou sub-regulados, durante a diferenciação; e mudanças permanentes na expressão gênica são observadas durante esta fase.

A avaliação do transcriptoma durante a metaciclogênese em *Trypanosoma cruzi* através do uso de microarranjos de DNA permite a identificação de genes cujos níveis de mRNA mudam durante o processo. Esses genes podem estar envolvidos diretamente na determinação do processo biológico. Além da identificação de genes candidatos a estarem atuando, direta ou indiretamente, no processo de metaciclogênese, a utilização de microarranjos de DNA permite avaliar o processo de forma menos qualitativa, a qual seria representada pela identificação e descrição dos genes diferencialmente expressos. Essa avaliação mais quantitativa do processo pode ser feita de diferentes formas, desde a contagem de genes diferencialmente expressos em cada etapa do processo, a contagem após sua separação de acordo com a fração de mRNA celular, até a utilização de técnicas que avaliam os dados em dimensionalidades maiores, como o cálculo de distâncias inter-gênicas baseadas nos valores de expressão diferencial e posterior agrupamento das amostras através das distâncias calculadas.

No presente estudo, diferentes abordagens quantitativas e qualitativas foram utilizadas para a obtenção de sumarizações dos dados. É muito importante salientar que, em um estudo genômico-funcional por microarranjos, a quantidade de dados obtida é muito grande e o número de técnicas analíticas passíveis de serem utilizadas é ainda maior. Essa amplitude de análises possíveis se torna ainda maior quando se utiliza uma abordagem de série de tempo, como a que é implementada de forma discreta no presente estudo, e se tenta avaliar a expressão diferencial por meio de duas representações distintas e parcialmente interpoladas do transcriptoma celular, como é a utilização do mRNA polissomal da célula.

1.5 PROTEÔMICA E A ESPECTOMETRIA DE MASSA

1.5.1 Aspectos Gerais

O termo “proteoma” foi proposto em 1993 por Mark Wilkins e Keith Williams para referir-se à identificação sistemática do complemento protéico

total do genoma (Blackstock e Weir, 1999; Lopez, 1999), ou seja, se refere ao conjunto de proteínas que são expressas pelo genoma de um organismo ou tipo celular (Haynes e Yates, 2000). Entretanto, este termo pode também ser usado em um sentido menos universal, para referir-se ao conjunto de proteínas que está sendo expresso num dado momento da vida da célula (Abbot, 1999).

As proteínas são muito ricas em informação biológica. Suas atividades específicas, tipos de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para a descrição de sistemas biológicos (Aebersold, 2003).

O seqüenciamento do genoma tem sido prioridade da pesquisa em Biologia Molecular nos últimos anos. Atualmente, já são conhecidos que 23 genomas de eucariotos estão completos, 195 em fases finais de conclusão e 221 projetos estão em desenvolvimento. A quantidade de informação disponível em banco de dados é praticamente duplicada a cada 12 meses (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome/org.html). Entretanto, essa imensa quantidade de informação, por si só, revela muito pouco a respeito de como as proteínas operam nos organismos (Wilkins e Hochstrasser, 1996).

Contrariamente ao genoma, que funciona como repositório estático da informação genética e cujo conteúdo não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico.

Um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas, dependendo de variáveis como estágio do ciclo de crescimento, disponibilidade de nutrientes, temperatura, resposta ao estresse, condições patológicas e diferenças entre estirpes (Cahill et al., 2001).

Após a seqüência completa do genoma de um organismo ter sido determinada, quadros de leitura aberta ou ORFs (*Open Reading Frames*), nas seqüências de nucleotídeos podem ser preditas, identificando todas as prováveis proteínas codificadas. A confiabilidade das ORFs preditas é baixa para genes pequenos ou genes com pouca ou nenhuma homologia com outros

genes conhecidos. Entre estas ORF's, muitas codificam para proteínas ditas hipotéticas, cuja comprovação da existência está baseada unicamente em análises computacionais das seqüências genômicas e suas funções são desconhecidas (Cash 2002). Aproximadamente 30% das ORF's de organismos já seqüenciados codificam para proteínas hipotéticas, cuja comprovação de existência requer seu aparecimento físico. A confirmação de um produto gênico através da análise proteômica é um passo importante complementar à anotação do genoma (Pandey e Mann, 2000). Em um estudo proteômico realizado por Cash e colaboradores (1998) com *Hemophilus influenzae* foram observadas, entre as proteínas mais abundantes, os produtos de 19 ORFs hipotéticas demonstrando, portanto, a importância desta análise para o conhecimento detalhado do genoma e a funcionalidade dos genes anotados.

As proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, metilação, acetilação e clivagem proteolítica, entre outras. Por este motivo, a estrutura final e função das diversas proteínas não podem ser definidas com base apenas nas seqüências nucleotídicas dos genes que as codificam (Cahil et al. 2001). Em análise com gel bidimensional, observou-se que em bactérias, um único gene pode codificar para uma ou mais proteínas resultado de modificações pós-traducionais e pós-transcricionais (Wilkins et al., 1996). Até mesmo para organismos pouco complexos, como o *Mycoplasma genitalium*, existem 24% mais proteínas do que genes (Abbot, 1999).

O grande número de informações obtidas pelo seqüenciamento do genoma sugere possíveis modos de expressão do genoma, mas não provê dados sobre eventuais modificações pós-traducionais, assim como, do controle da atividade em resposta a condições particulares. Este problema pode ser minimizado através do estudo da expressão gênica através dos níveis protéicos (Dunn, 1998). Análise do mRNA fornece informações a respeito da função gênica, porém este é um modo indireto, tendo em vista que os mRNA são os intermediários na expressão da informação genética (entre DNA e proteína) e não as entidades funcionais em si. Além disso, diversos estudos

demonstraram que há baixa correlação entre a abundância de mRNA na célula e proteínas (Oliver, 2000).

A Proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (Blackstock e Weir, 1999). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas proteínas na célula (Cash, 1998). Portanto, o passo do genoma para o proteoma é um passo do nível da informação genética para a função celular. As concentrações de proteínas que são alteradas em determinadas condições fisiológicas mostram quais funções sofrem modificações (Jungblut, 2001).

1.5.2 Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massa

A possibilidade de identificar rapidamente um grande número de proteínas através de espectrometria de massa (MS) foi um enorme avanço na área da proteômica. Em 2002, John B. Feen e Koichi Tanaka receberam o prêmio Nobel em química pelo aprimoramento das técnicas de ionização brandas utilizadas em ionização por eletronspray (ESI) e ionização por remoção a laser assistida por matriz (MALDI), respectivamente. Estas técnicas são consideradas brandas pela sua capacidade de gerar íons a partir de macromoléculas não voláteis, sem ou com muito pouca fragmentação da molécula analisada.

A tripsina, normalmente utilizada para a digestão das proteínas, faz clivagem específica C-terminal adjacente a resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos cujas massas são determinadas por espectrometria de massa (Shevchenko et al., 1996; Cagney et al., 2003) e que podem ser considerados como impressão digital daquela molécula (Quadroni e James, 2001).

A espectrometria de massa determina a massa molecular através da relação carga/massa (m/z) de íons gerados a partir da molécula analisada. Atualmente, MALDI e ESI são as tecnologias utilizadas para ionização das proteínas e sua subsequente identificação (KÖPKE, 2003). O equipamento MALDI, acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo (TOF – *Time of flight*), é normalmente utilizado para a realização da impressão digital de peptídeos (PMF – *Peptides Mass Fingerprint*) de proteínas e outras moléculas (Aebersold e Goodlet, 2001).

A identificação de uma proteína através dos valores das massas moleculares de seus peptídeos é realizada por comparação *in silico* através de pesquisa em banco de dados disponíveis como o *Mascot*, *Sequest*, *ProFound*, *Ms-Fit*, dentre outros.

O programa *Sequest* faz uso de um algoritmo computacional que compara as massas determinadas para peptídeos proteolíticos com as massas calculadas para todas as clivagens enzimaticamente possíveis dos produtos de cada ORF predita pela seqüência genômica de organismos presentes em base de dados. A proteína é identificada baseando-se na avaliação dessa comparação. As diversas bases de dados utilizadas são o *Genbank*, o *SwissProt Database*, o *Protein Database* e o *EMBL*.

A identificação é fortemente influenciada pela quantidade de proteína na amostra, grau de modificação pós-traducional, qualidade das buscas automáticas e presença da proteína nos bancos de dados. O conhecimento do genoma de um organismo é de grande importância para permitir a identificação exata das proteínas pelo padrão de peptídeos.

1.5.3 Tipos de Estudos Proteômicos

Existem diversos tipos de estudos proteômicos. A abordagem proteômica clássica é o estudo da expressão global de proteínas (*Expression Proteomics*), que envolve a criação de mapas quantitativos das proteínas expressas a partir de extratos de células ou tecidos. Os perfis protéicos dos

proteomas expressos sob diferentes condições fisiológicas são comparados. Informações deste tipo de estudo podem permitir a identificação de proteínas de transdução de sinal ou identificar proteínas específicas de estados patológicos e estados fisiológicos diversos (Graves e Haystead, 2002). Normalmente, a separação das proteínas é feita por eletroforese bidimensional e a identificação através de espectrometria de massa (Jocelyn e Ilag, 2002). Em abordagens denominadas como *Shotgun Proteomics*, uma mistura de proteínas é digerida com uma protease específica; os peptídeos resultantes são separados por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e analisados por espectrometria de massa (LC-MS/MS) (Schwartz et al., 2002; Hancock et al., 2002).

A disponibilidade de seqüências genômicas tem permitido um estudo mais detalhado do proteoma de diversos organismos utilizando técnicas como microarranjos de proteínas, bloqueio sistemático de genes e eletroforese bidimensional. Utilizando os dados do genoma é possível realizar análises proteômicas *in silico* (Matte et al., 2003). Programas como o *Proteogest* são capazes de realizar a digestão trípica de um proteoma e analisar os peptídeos resultantes. Desta maneira, são geradas estatísticas descritivas para o proteoma intacto ou proteoliticamente digerido (Cagney et al., 2003). O conhecimento de tais dados pode auxiliar no planejamento de proteomas experimentais.

Uma série de trabalhos envolvendo abordagens proteômicas de parasitas já foram publicados. Com o decorrer dos anos, técnicas cada vez mais avançadas para identificação de proteínas foram sendo utilizadas e possibilitaram um maior conhecimento das proteínas que constitui os organismos em questão.

Em 2002, o grupo de Babara Papadopoulou, demonstrou a comparação dos padrões de expressão de proteínas entre formas promastigotas (formas extracelulares) e amastigotas (formas intracelulares) de *Leishmania infantum* utilizando a técnica de eletroforese em gel bidimensional (2-DE) em conjunto

com a identificação por LC-MS/MS. Neste caso, foram resolvidas em gel bidimensional cerca de 2000 proteínas, o que equivale a cerca de 25% de proteínas preditas do parasita. Destas, 62 foram identificadas como sendo diferencialmente expressas, possibilitando identificar proteínas candidatas ao desenvolvimento de vacinas e novas drogas.

Bente et al., 2003, também observaram mudanças no padrão de expressão de proteínas quando comparadas formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, utilizando a técnica de 2-DE e a identificação de proteínas por MALDI-TOF. Neste trabalho também foram identificadas proteínas estágio-específicas, assim como, proteínas que tinha um caráter aumentado ou diminuído quando realizado a diferenciação *in vitro* induzida pelo calor. A diferença principal deste trabalho, em relação ao artigo acima citado, foi a separação das proteínas de acordo com grupos funcionais.

Paba et al., 2004a, realizaram experimentos utilizando as metodologias de 2-DE em *T. cruzi*. Análises de géis bidimensionais associadas à identificação de proteínas por MALDI-TOF das formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas revelaram poucas diferenças na expressão de proteínas quando comparadas as três formas evolutivas. Paba et al., 2004b, estudaram a amastigogênese *in vitro* do *T. cruzi* usando a tecnologia de ICAT, na qual, 41 proteínas foram identificadas e classificadas em três grupos funcionais.

Parodi et al., 2004, padronizaram e geram um protocolo reprodutível de análise por gel 2-DE para realização de mapas de proteínas das formas epimastigotas do *T. cruzi*. E mais recentemente, este mesmo grupo em colaboração com o IBMP, analisou o processo de metaciclogênese *in vitro* do *T. cruzi* por gel 2-DE acoplado à metodologia de MALDI-TOF. Foram gerados mapas 2D de diversos pontos do processo de metaciclogênese visando a análise dos diferentes perfis de expressão de proteínas entre os pontos. Assim foi possível, por exemplo, identificar proteínas únicas da forma tripomasntigotas metacíclicas (Parodi et al., 2007).

Atwood, et al. (2005) realizaram a análise do proteoma de quatro fases evolutivas do *T. cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, amastigotas e tripomastigotas) através da metodologia de LC-MS/MS. Um total de 2784 proteínas foram identificadas e destas, cerca de 1000 são provenientes de genes anotados com hipotéticos. Foi observado que durante a diferenciação celular do parasita uma série de mudanças moleculares, bioquímicas e celulares foram notadas.

Como podemos observar, há uma série de técnicas de proteômica empregadas a fim de identificar proteínas nas diferentes formas evolutivas dos parasitas. Sendo assim, as ferramentas proteômicas podem levar, por exemplo, à descoberta de alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas e vacinas.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi comparar os efeitos no *T. cruzi*, após a imposição de diferentes tipos de estresse, seja através da análise da taxa de diferenciação celular e da infectividade, assim como, dos perfis de expressão gênica do *T. cruzi* submetidos a diferentes tipos de estresse utilizando técnicas de microarranjos de DNA e espectrometria de massa. Tendo também como objetivos específicos os seguintes tópicos:

Quantificar a taxa de metaciclogênese *in vitro* após a imposição dos distintos tipos de estresse (estresse nutricional, estresse de pH e estresse de temperatura) através da contagem diferencial de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas em diferentes períodos de tempo.

Analisar a capacidade infectiva dos tripomastigotas metacíclicos provenientes dos diferentes tipos de estresse após ensaios *in vitro* (infecção de células Vero) e *in vivo* (inoculação em camundongos e triatomíneos).

Analisar o perfil de genes expressos pelo parasita quando submetidos diferentes condições de estresse através de microarranjos de DNA.

Selecionar genes diferencialmente expressos nos tipos de estresse propostos.

Analisar o perfil de proteínas identificadas após a imposição dos diferentes estresses por espectrometria de massa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES E MATERIAIS

Ambion: MessageAmp™ II aRNA Kit.

Amicon: Microcon 30.

Amersham-Pharmacia Biotech: dCTP-Cy3; dCTP-Cy5; dNTPs;

RNAse H; Taq DNA polimerase.

BioRad: Agarose; azul de bromofenol; xilenocianol.

Corning: Lâminas para microarranjo CMT GAPS.

Cult-lab: Soro fetal bovino.

Difco: Extrato de levedura; infuso de fígado; triptose, Aminoácidos.

Invitrogen: Kit “BioPrime DNA Labeling System”; λ DNA/HindIII; DTT;

EDTA; fenol; RNA ladder; hexâmeros aleatórios; sacarose; Superscript™

II; trisma base; RNase OUT™.

Merck: Acetato de sódio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico;

álcool isoamílico; citrato de sódio; cloreto de cálcio; cloreto de lítio;

cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; clorofórmio;

etanol absoluto; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de

sódio; glicose; hidróxido de sódio; maltose; SDS; sulfato de amônia;

sulfato de magnésio.

Microbiológica: Hemina.

Promega: DNase RQ1 (livre de atividade tipo RNase);

RNasin®; ImProm-IITM Reverse Transcriptase.

Qiagen: QIAquick 96 PCR purification kit; RNeasy®, RNase-free DNase Set.

Sigma: β-mercaptoetanol; ácido L-aspártico; ácido L-glutâmico;

ampicilina; brometo de etídeo; BSA; cicloheximida; DEAE-celulose;

DEPC; DMSO; DNA de esperma de salmão; ficoll; formaldeído;

formamida; heparina; hepes; L-prolina; NP-40; polivinilpirrolidona; RNA sample buffer.

TPP: garrafas para cultivo de células.

USB: Isotiocianato de guanidina; MOPS; sacarose; uréia, soro fetal bovino, L-glutamina, penicilina, estreptomicina, CO₂.

3.2 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Clorofórmio/Álcool isoamílico: 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico.

Colchão de sacarose: sacarose 2 M, em tampão de lise celular hipotônico.

Fenol saturado: fenol saturado com solução de trisma base 100 mM, até atingir pH 7,5.

FCI – Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico: 25 partes de fenol

saturado, 24 partes de clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico, pH 7,5.

H₂O: A água utilizada em todos os procedimentos foi proveniente do sistema de filtragem milli-Q (Millipore). A água utilizada para procedimentos com RNA foi tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

Meio LIT (Liver Infusion Tryptose): extrato de levedura 15 g/l; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; glicose 2,2 g/l; hemina 0,02 g/l; infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaCl 4,4 g/l; soro fetal bovino 10 % (v/v) e triptose 5 g/l. pH 7,2 ajustado com HCl.

Meio TAU (Triatomine Artificial Urine): CaCl₂ 2 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; NaCl 190 mM; tampão fosfato pH 6,0 8 mM.

Meio TAU3AAG: TAU suplementado com: ácido L-aspártico 2 mM, ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM e glicose 10 mM.

Solução de Denhardt (50 X): albumina bovina sérica (BSA) fração V 1% (p/v); ficoll 400 1 % (p/v) e polivinilpirrolidona 1 % (p/v).

Solução para desnaturação: NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M.

Solução para hibridização dos microarranjos: SSC 6 X; Denhardt's 5X; DNA de esperma de salmão tipo III fragmentado e desnaturado 0,25 mg/ml; SDS 0,5 % (p/v) e formamida 50 % (v/v).

Solução para lavagem do microarranjo de menor estringência: SDS 0,01 % (p/v) e SSC 0,5 X.

Solução para lavagem do microarranjo de maior estringência: SSC 0,06 X.

Solução para neutralização: NaCl 1,5 M; tris-HCl pH 8,0 0,5 M.

Solução para ressuspensão de polissomos: EDTA 10 mM; NaCl 100 mM; SDS 0,5 % (p/v) e tris-HCl pH 7,5 10 mM.

SSC (standard saline-citrate) (20 X): citrato de sódio pH 7,0 0,3 M e NaCl 3 M.

Tampão de lise celular hipotônico: β -mercaptoetanol 5 mM; cicloheximida 10 μ g/ml; heparina 20 U/ml; MgCl₂ 5 mM; NaCl 10 mM e Tris-HCl pH 7,6 10 mM.

Tampão GET: EDTA pH 8,0 10 mM; glicose 0,1 % (p/v); Tris-HCl pH 7,6 2,5 mM.

Tampão MOPS: acetato de sódio 5 mM pH 7,0; EDTA pH 8,0 2 mM; MOPS 20 mM.

Tampão NKM: cicloheximida 10 μ g/ml; heparina 20 U/ml; hepes pH 7,4 10 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1,5 mM e NaCl 140 mM.

Tampão para aplicação de amostras de DNA em gel (10 X): azul de bromofenol 0,25 % (p/v); ficoll 400 25 % (p/v) e xilenocianol 0,25 % (p/v), em tampão TBE 1 X.

Tampão para aplicação de amostras de RNA em gel: corante – MOPS 1 X, glicerol 25 % (v/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v) – 15% (v/v); formaldeído 6 % (v/v); formamida 80 % (p/v) e tampão MOPS 1 X.

Tampão PBS (10 X): KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄.7H₂O 4,3 mM e NaCl 137 mM.

Tampão RT: KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM e Tris-HCl pH 8,3 250 mM.

Tampão SM: MgSO₄.7H₂O 8 mM; NaCl 100 mM; tris-HCl pH 7,5 50 mM

Tampão TBE (10 X): ácido bórico 55 g/l; EDTA 8,3 g/l e trisma base 108 g/L.

Tampão TE: EDTA 1 mM e tris-HCl pH 7,6 10 mM.

Tampão PSG: NaCl 150 mM; Tampão salina fosfato pH 8,0; Glicose 10%.

Tampão de Solubilização de proteômica: Urea 7M, thiourea 2M, DTT 1%, Triton X – 100 2% e Protease inhibitor cocktail (GE Healthcare).

Tampão de lise protéica: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0.25 M de sacarose, 0.2% Triton X-100 e o mix de inibidor de protease (GE) nas concentrações indicadas pelo fabricante.

Solução de bloqueio: 5% de leite desnatado em PBS/Tween 0,1%.

Tampão de amostra para proteínas: 40 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 2,5% β-mercaptoetanol, 6% glicerol e 0,005% azul de bromofenol.

Tampão de fosfatase alcalina: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.

Tampão de Transferência: 25 mM de tris base, 192 mM glicina e 20% metanol.

Ponceau S: 0,5% de Ponceau S e 1% de ácido acético.

3.3 CULTIVO DO TRYPANOSOMA CRUZI

Para a realização deste trabalho foram utilizadas células do clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi* (Goldenberg et al., 1984; Contreras et al., 1988), em diferentes fases do processo de metaciclogênese *in vitro* (Contreras et al., 1985).

3.3.1 Epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias)

Culturas axênicas de *T. cruzi* em meio LIT foram mantidas a 28 °C e, a cada três dias, foram repicadas mediante inóculos iniciais de 1×10^6 células/ml mantidas nestas condições até a realização dos experimentos. As formas epimastigotas foram obtidas no terceiro dia de cultivo, na fase logarítmica de crescimento, quando a densidade celular era de ~ 2 a 3×10^7 células/ml. Tais condições foram estabelecidas segundo a curva de crescimento do parasita em meio LIT a 28 °C (Camargo, 1964).

3.3.2 Epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 dias)

Culturas axênicas de *T. cruzi* em meio LIT foram mantidas a 28 °C. Neste caso, as formas epimastigotas foram obtidas no quinto dia de cultivo, em final de fase logarítmica de crescimento, quando a densidade celular era de ~ 5 a 6×10^7 células/ml. Tais condições foram estabelecidas segundo a curva de crescimento do parasita em meio LIT a 28 °C (Camargo, 1964).

3.3.3 Epimastigotas submetidos aos diferentes tipos de estresse

3.3.3.1 Epimastigotas submetidos ao estresse nutricional:

As formas epimastigotas a serem submetidas a estresse nutricional foram obtidas por centrifugação – 8.000 x g, 5 minutos, 10 °C – de culturas em final da fase logarítmica de crescimento. As condições de estresse foram

proporcionadas pela manutenção destas células por 2 horas, em meio TAU, na concentração de 5×10^8 células/ml, a 28 °C (Contreras, et al., 1985).

3.3.3.2 Epimastigotas submetidos ao estresse de pH :

Para o estresse de pH (Causton, et al., 2001, modificado para *T. cruzi*) foi adicionado uma solução de HCl (11,7M) em cultura de epimastigotas no final de fase logarítmica de crescimento, para acidificar o meio (pH 5,0). E a cultura foi incubada a 28 °C por um período de 2 horas.

3.3.3.3 Epimastigotas submetidos ao estresse de temperatura:

As formas epimastigotas, foram mantidas em cultura axênica em meio LIT e incubadas a 28 °C por 5 dias. Após este período de tempo, as células foram submetidas a uma temperatura de 37°C por um período de 2 horas.

3.3.4 Epimastigotas em diferenciação, aderidas ao substrato.

Após o estresse nutricional, as células são cultivadas até 24 horas, em meio TAU3AAG, na concentração de 5×10^8 células/mL, a 28 °C. Durante este período, os parasitas aderem-se às paredes das garrafas de cultivo. Para obtenção das células aderidas, o sobrenadante da cultura foi desprezado e as formas epimastigotas foram liberadas por forte agitação das garrafas de cultura, contendo 10 mL de tampão NKM, após (Bonaldo *et al.*, 1.988). Foram coletadas amostras em 3, 12 e 24 horas de cultivo.

3.3.5 Tripomastigotas metacíclicos

Para testar a viabilidade dos parasitas submetidos a diferentes tipos de estresse no que diz respeito a capacidade de diferenciação em formas infectantes foram feitos ensaios de metaciclogênese *in vitro* como descrito por Bonaldo et al., 1988. Exceto algumas modificações mencionadas abaixo.

Após o estabelecimento dos estresses de acordo com os itens descritos anteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio TAU3AAG na concentração de 5×10^6 células/ml, a 28 °C. Durante este período, os parasitas aderiram-se às paredes das garrafas de cultivo e diferenciaram-se nas formas tripomastigotas metacíclicas, soltando-se do substrato (descrito em Bonaldo et al., 1988).

Nestas condições e sem agitação, as formas epimastigotas aderiram ao substrato e diferenciaram-se nas formas tripomastigotas metacíclicas que apareceram livres no sobrenadante da cultura. Ao final das 96 horas, é possível observar que 80 a 90 % das células neste sobrenadante são tripomastigotas metacíclicas (Bonaldo et al., 1988).

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

A capacidade de infecção dos tripomastigotas metacíclicos provenientes dos diferentes tipos de estresse foi avaliada *in vitro* através do uso de culturas de células *Vero* (ATCC-CCL81), *in vivo* usando camundongos *Swiss* e vetores triatomíneos (*Rhodnius prolixus*). Estes experimentos foram realizados no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.4.1 Infecção *in vitro*

As células *Vero* (ATCC-CCL81) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 5ml de meio DMEM pH 7,4 suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SBF), 2mM de L-glutamina, acrescido de 100 µg/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina, mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e repicadas semanalmente.

Para os ensaios de infecção *in vitro*, as monocamadas foram lavadas com PBS e tratadas com tripsina 0,25% + EDTA 0,1% por 5 minutos a 37°C, transferidas imediatamente para tubos plásticos estéreis de 15ml contendo meio DMEM + 5% de SBF e centrifugadas a 250 x g / 5 minutos a temperatura

ambiente. O sobrenadante foi descartado, as células suspensas em meio DMEM, o número de células determinado em câmara de *Neubauer* e a concentração ajustada para 4×10^4 células/ml. A viabilidade celular foi avaliada pela adição do corante azul de tripan 0,02%. Quinhentos microlitros da suspensão celular foram semeados sobre lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro em placas de 24 orifícios e as placas mantidas a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, as monocamadas foram infectadas com os tripomastigotas metacíclicos (5 parasitas/célula) obtidos *in vitro* como descrito no item 3.3.5 e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 4 horas de infecção, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS pH 7,4 para remoção dos parasitos não aderidos e novamente incubadas em DMEM + 5% SBF sob as condições acima mencionadas. Após 72 horas de infecção, oito lamínulas de cada variável de tripomastigotas metacíclicos foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo *Giemsa*. A porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares por célula foram determinadas pela análise aleatória de 200 células por lamínula (X 1000) como descrito por Toma et al., 2000. A capacidade de completar o ciclo de vida intracelular foi avaliada pela manutenção das células infectadas por um período de 5 dias. A liberação dos tripomastigotas no sobrenadante da cultura foi avaliada duas vezes ao dia em microscópio invertido (X 400). A análise dos resultados foi feita pelo cálculo de variância (ANOVA) e valores de $p < 0,05$ ou menores foram considerados como indicativos de significância.

3.4.2 Infecção *in vivo*

Cada camundongo de um grupo de 5 a 6 fêmeas adultas albinas Swiss foi inoculado intraperitonealmente com 10^4 tripomastigotas obtidos a partir da metaciclogênese *in vitro* sob diferentes condições de estresses citada no item 3.3.5. Os animais foram mantidos em infectório sob condições controladas. Durante um período de cinco semanas pós-inoculação, a mortalidade e a parasitemia foram avaliadas a cada dois dias através de exame a fresco (Brenner, 1962). Na sexta semana após a inoculação, os animais foram

anestesiados com éter e 0,5 ml de sangue obtido pelo plexo retrorbital, em condições assépticas, foi utilizado para realização de hemocultura em meio LIT e sorologia. As hemoculturas foram mantidas a 28°C e examinadas semanalmente até o 45º dia. O soro dos animais foi coletado para a realização da pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* através do método de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* como antígeno.

Para o xenodiagnóstico, os camundongos foram imobilizados em telas e individualmente expostos a grupos de dez ninfas de 3º estágio de *Rhodnius prolixus* mantidas em jejum. Após 30 minutos, os insetos completamente ingurgitados foram separados e mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade. No trigésimo dia após a alimentação, os triatomíneos foram dissecados e o trato digestivo examinado em microscópio (x 400).

3.5 ISOLAMENTO DE mRNA POLISSOMAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Células das formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias), epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 dias), epimastigotas submetidos ao estresse nutricional, de pH e de temperatura foram utilizados para extração de mRNA polissomal como descrito abaixo. Tendo sido realizado três réplicas biológicas distintas para cada extração de mRNA em questão, exceto para EPI 3 dias o qual foi efetuado apenas uma réplica.

A extração de mRNA polissomal foi realizada conforme descrito por Goldenberg et al., 1985, com modificações.

Inicialmente, 5×10^9 células foram mantidas no meio de cultivo e acrescido de cicloheximida (na proporção de 10 mg/ 5×10^9 células) durante 15 minutos, a temperatura ambiente. A seguir, foram recuperadas por centrifugação – 8000 x g, 5 minutos, 10 °C – e lavadas duas vezes em tampão NKM acrescido de cicloheximida (10 µg/ml). A lise dos parasitas foi realizada com 5×10^9 células em 15,5 ml de tampão de lise celular hipotônico, acrescido

de cicloheximida 10 $\mu\text{g/ml}$, heparina 20 U/ml, β -mercaptoetanol 5 mM e deixados nesta solução por 5 minutos em gelo. Decorrido este tempo foi acrescentado 1 % (v/v) de Nonidet P-40 e vortexado de 30 segundos à 1 minuto e observado periodicamente ao microscópio. Quando a lise foi observada adicionou-se uma solução de sacarose 2M, acrescida de cicloheximida 10 $\mu\text{g/ml}$, heparina 20 U/ml e β -mercaptoetanol 5 mM em um volume apropriado para que a concentração final ficasse 0,25M.

Foram sedimentados os núcleos através da centrifugação a 9000 x g, 10 minutos, a 4 °C e as mitocôndrias através da centrifugação a 9000 x g, 30 minutos, a 4 °C. A fração polissomal foi obtida após ultra-centrifugação do sobrenadante pós-mitocondrial, sobre um colchão de sacarose 2M (acrescido de cicloheximida 10 $\mu\text{g/ml}$, heparina 20 U/ml e β -mercaptoetanol 5mM), a 365.000 x g por 2 horas a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet, contendo as moléculas de RNA associadas à polissomos, foi congelado a -70 °C.

Após o descongelamento e homogeneização em 5 ml de solução de ressuspensão de polissomos, o mRNA foi extraído pelo método de fenol a quente (Scherrer, 1969). Para tanto, fenol saturado previamente aquecido a 65 °C foi adicionado (v/v) e esta mistura foi vigorosamente agitada e mantida 65 °C, por 3 minutos, com agitação intermitente. A seguir, esta mistura foi centrifugada por 5 minutos, a 2000 rpm, à temperatura ambiente e recolhida, então, a fase aquosa (superior). A extração foi repetida com FCI, à temperatura ambiente, e a fase aquosa foi precipitada em acetato de sódio 3 M (1/10 v) e isopropanol (v/v). Nestas condições, o RNA foi mantido a -20 °C até o momento de uso. O mRNA foi recuperado através de centrifugação a 16000 x g e o sedimento foi lavado três vezes com etanol 70 %. O mRNA foi ressuspensão em água ultra pura, fez-se tratamento com DNase e purificação com RNeasy. A quantidade e qualidade do mRNA foram estimadas.

3.6 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE E QUALIDADE DOS mRNAS POLISSOMAIS

A quantidade de mRNA foi determinada através da medição da absorbância a 260 nm, considerando que o valor da absorbância igual a 1 equivale a 40 µg/ml de RNA. A qualidade dos RNAs foi determinada fazendo-se a razão entre a absorbância a 260 e a 280 nm.

3.7 TRATAMENTO COM DNASE

100 µg de cada amostra de mRNA foram mantidos a 37 °C, por 30 minutos, com 10U de DNase RQ1, em BSA 100 µg/ml, DTT 0,05 %, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM, RNasin® 1 U/µl e Tris-HCl pH 8,0 50 mM. A seguir, a amostra foi aquecida a 70 °C, por 10 minutos. O produto desta digestão foi purificado conforme o item 3.8.

3.8 PURIFICAÇÃO DE RNA ATRAVÉS DE RNEASY (QIAGEN)

Amostras de mRNA tratadas com DNase foram purificadas conforme o protocolo “RNA cleanup” do kit, seguindo-se as especificações do fabricante.

3.9 AMPLIFICAÇÃO DE RNA *IN VITRO*

A amplificação do mRNA foi realizada utilizando-se o kit MessageAmp™ II aRNA (Ambion). Brevemente, a 1ª fita de cDNA foi gerada em uma reação com oligodT-promotorT7, *first strand buffer*, inibidor de RNase, dNTPs e transcriptase reversa, conforme volumes definidos pelo fabricante, por 2 horas a 42 °C. A segunda fita do cDNA foi sintetizada em uma reação com *second strand buffer*, dNTPs, DNA polimerase e RNase H, conforme volumes definidos pelo fabricante, por 2 horas a 16 °C. O cDNA foi purificado em colunas de afinidade do próprio kit e a transcrição do RNA ocorreu adicionando-se dNTPs 10mM, *T7 reaction buffer* e *T7 enzyme mix*, por 14 horas a 37 °C. Após esta incubação, o DNA foi degradado pelo tratamento com

DNase I. O RNA foi purificado em colunas de afinidade do próprio kit. A quantidade e pureza do RNA foram determinadas conforme item 3.6.

3.10 CONFECÇÃO DO MICROARRANJO DE DNA

3.10.1 O microarranjo de *Trypanosoma cruzi*

Nosso grupo trabalha com microarranjos desde 2000. Com o passar do tempo uma série de etapas foram aprimoradas e sendo realizadas com maior autonomia no IBMP. E desde 2003, possuímos a capacidade plena do processo de produção. Todo o processo de manufatura, marcação de ácidos nucléicos, produção dos dados, bem como, análise de bioinformática do microarranjo é realizada no IBMP.

O microarranjo de *Trypanosoma cruzi* utilizado neste trabalho foi a versão 5.0. As sondas, num total de 10.046 *spots*, compostas a partir de bibliotecas de EST de *Trypanosoma cruzi*, seqüências de EST presentes no Genbank e genes identificados no genoma seqüenciado de *T. cruzi* estão dispostas em uma única unidade, contendo 48 setores de 16 colunas e 16 linhas, num total de 12.288 posições disponíveis, sendo que as posições restantes (n=2242) estão ocupadas por solução de espotagem (DMSO 50%) ou vazias. Os 10.046 *spots* podem ser divididos em:

- 3.552 sondas individuais, amplificadas por PCR a partir de DNA genômico de *T. cruzi* e cujo os oligos são oriundos da segunda versão do microarranjo e foram desenhados a partir dos dados de EST de *T. cruzi* disponíveis no Genbank no ano de 2000.

- 2.354 sondas individuais, amplificadas por PCR de insertos clonados em vetor Topo T-A (Invitrogen), referentes à biblioteca de EST de epimastigotas, epimastigotas em estresse nutricional, epimastigotas aderidos em 24 horas de diferenciação e tripomastigotas metacíclicos, produzida no IBMP (Picchi, et al., *em preparação*), adições referentes às terceira e quarta versões do microarranjo.

– 3.203 sondas individuais, amplificadas por PCR a partir de DNA genômico de *T. cruzi*, incluídas na quinta versão do microarranjo, cujos oligos foram desenhados diretamente a partir das informações do genoma seqüenciado (El-Sayed, et al., 2005), constituindo-se nos genes não identificados pelas bibliotecas de ESTs.

–144 sondas referentes a 12 genes selecionados como controles de hibridação, por apresentarem uma intensidade de sinal muito forte nos primeiros experimentos feitos. Os genes participantes deste conjunto serão citados posteriormente.

– 134 sondas referentes a genes selecionados, incluídos por serem de interesse às linhas de pesquisa de outros grupos do IBMP ou colaboradores.

– 4 sondas referentes ao genoma do endossimbionte de *Crithidia deanei*, utilizados como controles negativos de DNA.

– 10 produtos da amplificação do gene Q do bacteriófago λ Q, usado como controle negativo.

Devido à complexidade e redundância da montagem atual do genoma de *T. cruzi*, é possível fazer somente uma estimativa dos genes distintos que são reconhecidos por essas sondas. Nossas estimativas atuais demonstram que um número mínimo de 4000 e um máximo de 5000 genes estão sendo avaliados pela versão atual do microarranjo de *T. cruzi*.

Para amplificar as sondas cujas seqüências foram selecionadas em bancos de dados, 3650 pares de oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados, com o auxílio do software *PrimerSelect* (Lasergene - DNASTAR), tendo como características uma temperatura para hibridização de aproximadamente 55 °C, tamanho entre 18 e 22 nt e ausência de estruturas secundárias, assim como, híbridos entre o par de iniciadores nas condições previstas para a reação de PCR. Com estes oligonucleotídeos, o tamanho das sondas geradas por PCR foi de 150 a 600 nt.

A partir disso, as sondas foram amplificadas utilizando DNA genômico de *T. cruzi* como molde e seguindo um protocolo pré-estabelecido por nosso grupo (Probst, tese de doutorado). Estes produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1 %. Nos casos onde a quantidade de produto de PCR era muito pequena ou havia a presença de ampliações inespecíficas, diferentes condições de PCR foram utilizadas para otimizar a amplificação destas sondas.

As 2354 sondas da biblioteca de EST das fases de diferenciação do parasita clonadas em vetor Topo T-A foram amplificadas utilizando-se os iniciadores: 5' tcgagcggccgcccgggcaggt 3' e 5' agcgtggtcgcgccgaggt 3'. Já as 134 sondas selecionadas por serem de interesse a outros projetos foram amplificadas segundo seus ensaios de origem.

Os controles internos utilizados na confecção do microarranjo de *T. cruzi* foram amplificados conforme os ensaios de origem com é o caso dos genes que codificam tubulina, proteína ligante de cauda poli-A (PABP) e fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK). E as outras sondas tais como – CTG_1028, CTG_1121, CTG_1183, CTG_1344, CTG_1547, CTG_1872, CTG_1974, CTG_3707, CTG_3789 –, foram amplificadas segundo o protocolo utilizado para amplificação das sondas.

Como controles externos, foram utilizadas sondas complementares a uma seqüência do gene Q do bacteriófago λ , em diferentes concentrações. Estas sondas foram obtidas com a amplificação do gene Q do bacteriófago λ clonado em pQE-30, utilizando-se com iniciadores específicos para o gene.

Os produtos de PCR de todas as sondas foram purificados pelo sistema QIAquick 96 PCR purification kit, segundo as recomendações do fabricante, secos e diluídos em DMSO 50 %.

As sondas purificadas foram carimbadas nas lâminas de vidro cobertas com amino-silano (CMT GAPS - Corning), pelo robô Genetix MiniQArray. A fixação das amostras à superfície foi realizada expondo as lâminas a 120 J/cm² de luz ultravioleta.

3.10.2 Anotação das sondas

A etapa de anotação das sondas representa uma etapa crucial na transformação dos resultados da hibridação em conhecimento biológico válido. No caso do *T. cruzi*, o estado atual do genoma representa uma dificuldade na correta identificação da complementariedade entre a sonda e o gene similar, pois este último pode não representar corretamente a entidade original. Além disso, a informação da seqüência da sonda, por ser oriunda de biblioteca de ESTs, é também uma representação incompleta e ruidosa da seqüência original. Estes dois aspectos, em conjunto, tornam a identificação da correspondência sonda-gene complementar uma tarefa não trivial em *T. cruzi*.

No intuito de otimizar esse processo, foi desenvolvido no IBMP um software para a visualização das relações entre as sondas e genes, permitindo o acesso fácil a diversas informações, como a complexidade da construção da sonda, seu padrão de amplificação, sua correspondência com os genes de *T. cruzi* e a complexidade dos genes similares, o que possibilita a identificação de hibridação cruzada ou problemas na montagem ou identificação dos genes pelo consórcio responsável pelo projeto genoma de *T. cruzi*. Este software, denominado CruziGeneDB, também permite a navegação por outros dados relativos aos genes de *T. cruzi*, constituindo-se em uma ferramenta de gerenciamento e visualização de dados que está sendo essencial ao projeto de genômica funcional de *Trypanosoma cruzi*.

A anotação funcional das sondas do microarranjo de *T. cruzi* foram associadas aos genes similares mais prováveis através dos resultados de uma comparação por BLASTn (Altschul et al., 1990) usando-se como banco de dados as regiões codificantes de proteína identificadas e anotadas pelo consórcio de seqüenciamento do genoma de *T. cruzi*, conjuntamente com uma curagem manual auxiliada pelo CruziGeneDB.

3.11 MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CDNA COM FLUORÓFOROS

As amostras de cRNA foram convertidas em cDNA e a marcação ocorreu durante a síntese da 2ª fita. Duas µg de cada amostra de cRNA foram retro-transcritas utilizando-se 2000 pmol de hexâmeros aleatórios (Invitrogen), 25 ηmol de cada dNTP, 2 µl de transcriptase reversa (ImProm-ITM Reverse Transcriptase/Promega) nas condições tampões recomendadas para a enzima, 60U de RNase OUT™ (Invitrogen), em um volume final de 30 µl, a 42 °C, durante 2 horas. O RNA foi degradado após a adição de 15 µl de NaOH 0,1 N e incubação a 70 °C, por 10 minutos. O pH da solução foi neutralizado com a adição de 15 µl de HCl 0,1 N e as amostras foram concentradas e purificadas após a adição de 400 µl de H₂O e centrifugação em colunas microcon 30 (Amicon) a 12000 x g. A segunda-fita foi sintetizada em 50 µl a 37 °C por 2 horas, utilizando-se 20 µl de *Random Primers Solution* e 40U da enzima Klenow (ambos os reagentes do kit BioPrime DNA Labeling System) e 6 nmol de dATPs, dGTPs e dTTPs e 3 ηmol de dCTPs e 2 ηmol de dCTP-Cy-3 ou dCTP-Cy-5. Após quatro lavagens em colunas microcon 30, com 400 µl de H₂O cada, as amostras foram concentradas para 20 µl, misturadas com 100 µl de solução de hibridização, desnaturadas e colocadas sobre a lâmina já acopladas na estação de hibridização.

3.12 HIBRIDIZAÇÃO

As lâminas de microarranjo foram acopladas à estação de hibridização (GeneTAC HybStation - PerkinElmer), na qual todo o processo de hibridização e de lavagens pós-hibridização são automáticos. As hibridizações ocorreram durante 16 horas a 42 °C. As lavagens pós-hibridização foram realizadas com a solução de lavagem de menor estringência, seguida pela lavagem com a solução de maior estringência, duas vezes por 5 minutos à temperatura ambiente com cada solução. Após as lavagens as lâminas foram secas através de centrifugação.

3.13 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram realizados três experimentos de estresses em dias distintos, denominados Exp Str 02, Exp Str 26 e Exp Str 28. Em cada experimento foram obtidas amostras de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 DIAS), epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 DIAS), epimastigotas submetidos ao estresse nutricional (TAU), epimastigotas submetidos ao estresse de pH (pH) e epimastigotas submetidos ao estresse de temperatura (TEMP), das quais foram extraídos mRNA polissomais. Já no caso dos epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias) foi realizado apenas um experimento onde também foi extraído mRNA polissomal. Todos os pontos de cada experimento de estresse são oriundos do mesmo conjunto inicial de epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento, para que as diferenças biológicas inerentes a cada réplica biológica de experimento sugerido pudessem ser equalizadas internamente. A amostra de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias) foi obtida separadamente das amostras biológicas descritas acima, constituindo-se em uma réplica biológica, a qual foi comparada apenas com os epimastigotas obtidos em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 DIAS).

As hibridizações foram realizadas em um arranjo como o mostrado no esquema representado pela Figura 3.1. Este arranjo foi repetido 3 vezes usando as frações de mRNA polissomal obtidas no item 3.9, utilizando de cada vez, um conjunto de amostras biológicas distinto, exceto a única amostra de EPI 3 dias que foi hibridizada com cada uma das três réplicas biológicas já mencionadas. Desta forma, foi realizado um total de 36 hibridizações. Cada experimento de estresse foi hibridizado com microarranjos oriundos do mesmo lote de fabricação.

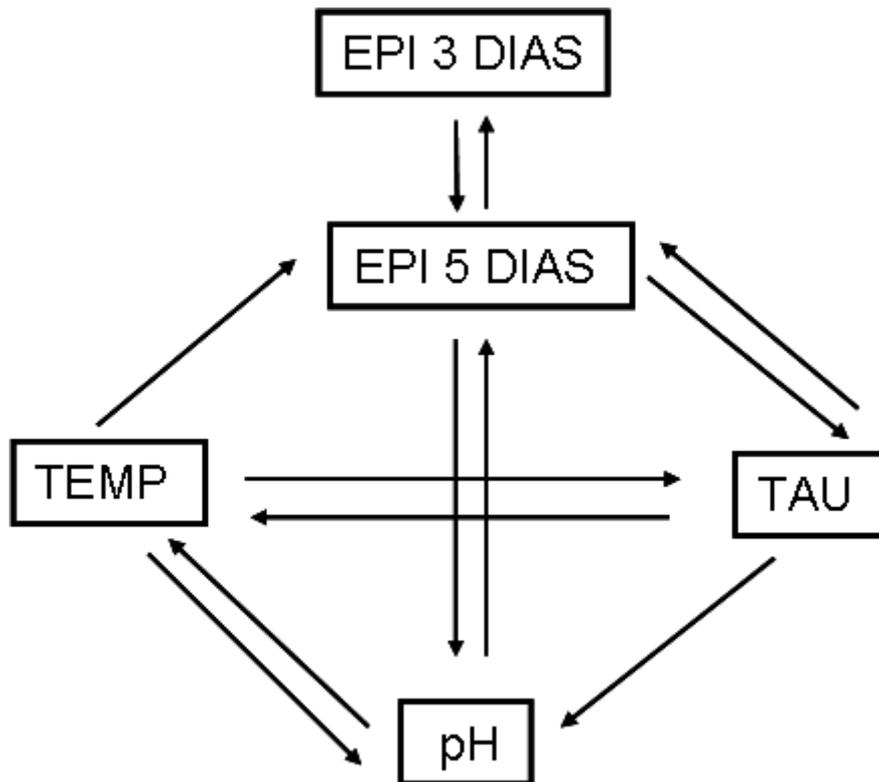


Figura 3.1. Desenho experimental das hibridizações. Cada seta representa uma hibridização. A cauda da seta indica as amostras marcadas com Cy3. A cabeça da seta indica as amostras marcadas com Cy5. Este esquema foi utilizado para cada um dos conjuntos.

3.14 LEITURA DOS SINAIS OBTIDOS

As lâminas são secas por centrifugação e submetidas à detecção de fluorescência pelo sistema Affymetrix 428 Array Scanner. Os sinais são obtidos pela medida da intensidade de fluorescência gerada em cada um dos *spots* e captada nos canais verdes – excitação do fluoróforo Cy-3 em 532 nm – e nos canais vermelhos – excitação do fluoróforo Cy-5 em 635 nm – do *scanner* óptico. A partir destes sinais são criadas imagens de 16-bits em formato TIFF (*tag image file format*). Cada uma destas imagens representa a leitura dos sinais obtidos em um dos comprimentos de onda utilizados.

3.15 ANÁLISES E TRATAMENTO DOS SINAIS

As imagens criadas pela leitura dos sinais obtidos são analisadas pelo *software Spot* (Beare e Buckley, 2004). Inicialmente, este programa estabelece coordenadas para cada um dos *spots*, no processo de gradeamento, de forma semi-automática. Deste modo, são delimitadas as áreas a serem analisadas.

A área, o perímetro e a característica circular do *spot* também são avaliados pelo *software Spot*, assim como a heterogeneidade dos *pixels* e do *background*. Esses parâmetros podem ser utilizados posteriormente como estimativas de qualidade do *spot*.

Entre as várias alternativas disponíveis, a normalização global não-linear dos dados foi escolhida para este trabalho. A normalização visa tornar os dados de intensidade dos microarranjos mais próximos aos níveis de mRNA presentes nas amostras originais, pela redução do erro associado à variação sistemática presente nas diferentes etapas que constituem um experimento de hibridização. Este tipo de normalização possui duas premissas:

As concentrações relativas das moléculas de RNA mensageiro nas amostras estudadas apresentam-se, em sua maioria, iguais. Caso haja expressão diferencial em um grau elevado, essa deve ser relativamente simétrica, isto é, a somatória das diferenças das sondas com expressão diferencial aumentada menos a somatória das diferenças das sondas com expressão diferencial diminuída deve ser próxima à zero. Apesar desta premissa não ser verdadeira para todos os casos, ela representa a priori a situação mais verossímil, sendo uma solução conservadora, pois maximiza a semelhança entre as duas amostras. Além disso, caso se deseje avaliar as diferenças entre as amostras de forma estritamente relativa, tal pressuposição é perfeitamente adequada.

As fontes de heterogeneidade entre os dois canais, que são normalmente as variáveis normalizadas, não são homogêneas, ou seja, apresentam diferentes intensidades de acordo com uma segunda variável, como o pino utilizado, a intensidade média do *spot* ou a região do microarranjo no qual a sonda foi

depositada. Portanto, cada *spot* deve ser normalizado por um valor que seja referente ao grupo no qual ele está presente, de acordo com os critérios supracitados.

Nessa premissa, apenas uma pequena fração das sondas que constituem o microarranjo são esperadas como tendo valores diferentes de intensidade entre os dois canais. As outras sondas, que não deveriam apresentar expressão diferencial, representariam uma excelente estimativa dos valores distintos de incorporação dos fluoróforos utilizados e essa diferença de incorporação seria ajustada pelo processo de normalização.

Os softwares R (*R Development Core Team*), Bioconductor (Dudoit et al., 2003) e LIMMA (Smyth, 2004) foram utilizados para a extração dos valores de *background* dos *spots*, transformação logarítmica na base 2 e normalização global não-linear, pelo método de *loess*. Esse método é empregado para normalizar os dois canais de cada microarranjo, e esse procedimento é repetido para todos os microarranjos do experimento.

Após a normalização intra-microarranjo, é feita a normalização inter-microarranjos, a qual serve para ajustar possíveis diferenças na intensidade média de cada lâmina. Para essa normalização, foi utilizado o método de normalização por *quartiles* (Bolstad et al., 2003), implementado no *software* LIMMA, o qual consiste em equalizar as curvas de distribuição de intensidade das sondas de todos os microarranjos de um experimento. O processo de normalização foi feito utilizando-se todas as amostras em conjunto.

3.15.1 Análise da replicação interna

Como descrito anteriormente, o microarranjo de *T. cruzi* contém três réplicas de suas sondas, em cada lâmina. A correlação entre os valores de intensidade dos *spots* em triplicata, para cada um dos dois canais, é muito alta. Isto se deve a variáveis compartilhadas, tais como, quantidades semelhantes de sonda depositada, utilização do mesmo pino, mesmas concentrações e seqüência das amostras de cDNA, reações similares de marcação das sondas,

condições iguais de hibridização e leituras assemelhadas dos sinais. Porém, alguns artefatos referentes à lâmina, como manchas e pontos brilhantes, podem interferir na medida do sinal. No entanto, como dificilmente esses artefatos irão interferir nas triplicatas do mesmo *spot*, pois estão dispostas em regiões distintas e distantes, é possível usar a informação primária, a mediana da intensidade dos *pixels* do microarranjo, para eliminar os *spots* considerados fora do padrão.

Para investigar estas fontes de heterogeneidade, os valores dos três *spots* repetidos na mesma lâmina são analisados a partir do cálculo do coeficiente de variação das três medidas de expressão relativa.

3.16 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Os genes diferencialmente expressos (DEG) apresentam concentrações distintas de seus produtos de transcrição. O reconhecimento inequívoco destes genes, em experimentos de hibridação, depende de repetidas observações de cada condição biológica a ser avaliada. Tais repetições permitem investigar a variabilidade associada a estas condições e inerente aos procedimentos experimentais.

Na ausência destas repetições, é possível arbitrar um valor limite a partir do qual concentrações de RNA mensageiro são consideradas representativas de genes diferencialmente expressos. Esta metodologia é denominada *fold change cut-off*. São comumente utilizados como valores limites aqueles que refletem expressões duplicadas ou, ainda, triplicadas em uma condição em relação à outra.

Porém, quando observações repetidas estão disponíveis, a expressão diferencial pode ser reconhecida de maneira mais acurada pelo emprego de recursos estatísticos clássicos – por exemplo, o *Teste T de Student* – ou deles derivados – por exemplo, o teste *Significance Analysis of Microarrays* ou SAM, que se constitui em uma versão modificada do *Teste T* (Tusher *et al.*, 2001)

O teste SAM constitui-se em adequações às particularidades do estudo de genômica funcional e se baseia em três pontos principais: (i) a inclusão de um parâmetro acessório que torna o teste mais conservador; (ii) a correção para múltiplos testes e (iii) o cálculo da probabilidade a partir dos próprios dados, através de permutação, ao invés da utilização de uma distribuição clássica, como a de *Student*. Este método apresenta diferentes formas de calcular a sua estatística, de acordo com o desenho experimental apropriado ao estudo.

Além de calcular uma estatística de expressão diferencial, o teste SAM também providencia uma medida de probabilidade de expressão gênica diferencial que corrige para o fenômeno de múltiplos testes, através do controle do FDR (*false discovery rate*) (Benjamini e Hochberg, 1995). O FDR pode ser descrito como a proporção esperada de falsos positivos dentre os genes denominados diferencialmente expressos.

3.17 CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DOS GENES A SEREM ANALISADAS

Para verificar a abrangência de análise dos dados obtidos através da técnica de hibridização em microarranjos de DNA das amostras submetidas aos diferentes tipos de estresses foram adotados seis critérios de análise. Estes critérios consistiam na comparação entre as amostras de epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 dias) com os distintos tipos de estresses (pH, temperatura e nutricional). Os parâmetros adotados corresponderam a valores de *fold change* que variaram de 2,0 a 1,5 e FDR 5% entre as três réplicas biológicas utilizadas na análise (Exp Str 02, Exp Str 26 e Exp Str 28). Os critérios foram classificados da seguinte forma:

Critério A – maior ou igual a duas vezes aumentado ou diminuído nas três réplicas biológicas.

Critério B – maior ou igual a duas vezes aumentados ou diminuídos em duas réplicas biológicas e exclusão da terceira réplica.

Critério C – maior ou igual a 1,75 vezes aumentado ou diminuído nas três réplicas biológicas.

Critério D – maior ou igual a duas vezes aumentado ou diminuído em uma réplica biológica; maior ou igual a 1,75 vezes aumentado ou diminuído na segunda réplica e maior ou igual a 1,5 vezes aumentado ou diminuído na terceira réplica biológica.

Critério E1 – maior ou igual a 1,5 vezes aumentado ou diminuído nas três réplicas biológicas.

Critério E2 – maior ou igual a duas vezes aumentado ou diminuído em uma réplica biológica e maior ou igual a 1,5 vezes aumentado ou diminuído em duas réplicas biológicas.

Critério E3 – maior ou igual a 1,75 vezes aumentado ou diminuído em uma réplica biológica e maior ou igual a 1,5 vezes aumentado ou diminuído em duas réplicas biológicas.

Após a análise dos dados, decidiu-se selecionar, para caracterização das seqüências nucleotídicas de seus respectivos genes as seqüências que apresentaram expressão aumentada ou diminuída de pelo menos 1,75 vezes nos três experimentos realizados (Critério C).

3.18 PCR EM TEMPO REAL

A fim de confirmar os perfis de expressão dos genes selecionados pelos ensaios de microarranjo de DNA foi realizada a técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR).

Os experimentos foram realizados com as mesmas amostras de mRNA obtidas nas três réplicas biológicas (Exp Str 02, Exp Str 26 e Exp Str 28) provenientes dos EPI 5 DIAS, bem como, dos ensaios realizados com os diferentes tipos de estresses, estresse TAU, estresse de pH e estresse de TEMP.

3.18.1 Obtenção de DNA complementar a partir do mRNA Polissomal provenientes dos parasitas submetidos aos diferentes tipos de estresses

Inicialmente, foram obtidos DNAs complementares (cDNA) a partir dos RNAs associados aos polissomas dos parasitas submetidos aos diferentes tipos de estresses e epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento das três réplicas biológicas realizadas. O protocolo utilizado, foi baseado no manual técnico da Promega (ImProm-II™ Reverse Transcription System), assim como, os reagentes utilizados para essa reação. O RNA do parasita foi empregado como molde para a síntese de cDNA via transcriptase reversa. Aproximadamente 2 µg de RNA foram incubados com oligo dT, por 10 min a 70 °C para desnaturação de ambos e imediatamente transferidos para o gelo. À mistura foi adicionada uma solução de dNTPs (0,5 mM/µL) MgCl₂ (120 µM), RNaseOUT (2 unidades) (Invitrogen), Transcriptase reversa ImProm-II (Promega) e respectivo tampão. A reação ocorreu por 2 h a 42 °C. As amostras de cDNA foram purificadas por Microcon YM-30 (Millipore), conforme descrição do fabricante, e armazenadas a -20 °C.

3.18.2 Amplificação dos genes selecionados

A fim de se obter ampliações com alta eficiência a partir da técnica de PCR em tempo real, desenhamos os oligonucleotídeos de modo a possuir T_m de aproximadamente 60 °C, que o tamanho médio esperado do amplificado fosse em torno de 150 pb, e que o oligonucleotídeo fosse complementar preferencialmente a região 3' do gene. Como normalizadores foram utilizados os genes H2B, o gene para proteína ribossomal L9 e a proteína hipotética de *T. cruzi* 6733 (1047053506733.130). Os oligonucleotídeos utilizados estão representados na Tabela 3.1.

Nome	Iniciador F	Iniciador R
TcQPCR_02C05	5' TCCCACAGATATCAGCGTAAAAAG 3'	5' CCAAGCACAGGGGCAAGTAA 3'
TcQPCR_02C06	5' CCTCTCCCTTGGTGGTCAGC 3'	5' GCATTTTCAGGCGTCTTTGTG 3'
TcQPCR_02C07	5' AATGGACGCAACAACAGTGACAG 3'	5' TTGGGAAGTAGCGGGAAGAAAGT 3'
TcQPCR_02C08	5' TTTTCGGCGGCAACGGACAAGT 3'	5' GCGGCGGCTGCTGGTATTC 3'
TcQPCR_02C09	5' TCGGCCCCGGTGTAAATGATGA 3'	5' TCCGCACAACACCGCTGACTTC 3'
TcQPCR_02C10	5' ACATTGCCCCACAGTACCAGACCAC 3'	5' AAATCCGAGCCAACACCACAGAAAA 3'
TcQPCR_02C11	5' TGCCAAGCTCCGGAACCTCACATT 3'	5' CAAGCCAAGAAACGCCAAAAACAAC 3'
TcQPCR_02C12	5' GAGTTACGCCGACCCATCACG 3'	5' GTAATCACGCGCAATTCCTCAAC 3'
TcQPCR_02D01	5' TGGATCGCTGCCGGTTTAGAGGA 3'	5' GGAGCCGTAGCCAACCATCACCAT 3'
TcQPCR_02D02	5' GGCATTGAAACCCTGGGAAACGAC 3'	5' GCAACCAACGCCCCCAGAGAATAA 3'
TcQPCR_02D03	5' GATCCGCGGTGCATGTTGTTTC 3'	5' ACGGTGTCGGGTTG 3'
TcQPCR_02D04	5' CGGCGTCGCAGGCAAGTTATGA 3'	5' ATCCGATCCAGTGCCGTTGTGAGT 3'
TcQPCR_02D05	5' AAATGGCTCAAACAGGATGGGACTCT 3'	5' CCTCACTTCGGCTACTACACAATGGT 3'
TcQPCR_02D06	5' CGTGGCGGGATGTCAGGTG 3'	5' GGGGCCGTGGAGCGTCTT 3'
TcQPCR_02D07	5' TCAGGCGAAGGAGTGGGGACAG 3'	5' GCCTCGGCATTCTTCAGCAGTG 3'
TcQPCR_02D08	5' TGGTCATGTCTAACGTCGTAAGGTG 3'	5' CTAAGCATGGCAGCGGAAAGTC 3'
TcQPCR_02D09	5' TCGCGGATGGTGAGGAGGTT 3'	5' TCATTACGCAGAGCCATCATTTCAT 3'
TcQPCR_02D10	5' GGACCACCTGCGCATCATCTCG 3'	5' AGGAAGCCAAGGCGGTTCGTCAC 3'
TcQPCR_02D11	5' AAGACCGCCGAGGCAAAACAGC 3'	5' GCGGCGTGAACCTCGTCCAACCT 3'
TcQPCR_02D12	5' ACGGAGGTCACAATCACGGCAGTA 3'	5' TCCCCACACGAACACCATCAGA 3'
TcQPCR_02E01	5' ACGCCTGCAGCCGAGTTGGT 3'	5' CTGCGCAGTGACGGTTGGAGTT 3'
TcQPCR_02E02	5' AATTGCGCGACAGGACCCACAC 3'	5' TGACGCCACGGAAGATGAGGAACT 3'
TcQPCR_02E03	5' TCCGAAAATGCACGAAAAGAA 3'	5' ATCCATCAACAGAAATCACGACAC 3'
TcQPCR_02E04	5' ACGCTCCACGGCCCCCTACA 3'	5' CGCCAACAACAGCTCCCAAAGTC 3'
TcQPCR_02E05	5' GGTCTGCGGCTGCTGTCAA 3'	5' GCCCTGGGTGCTCGGAATCA 3'
TcQPCR_02E06	5' CTGGCGACGCGGACGATACG 3'	5' ACACGGCCGACGGAACAACCTCTG 3'
TcQPCR_02E07	5' GACCTCCCAGATCCCGCCACAG 3'	5' CGGGTCCGCCTCAAGCATTTTC 3'
TcQPCR_02E08	5' CGCCTATGAATGAAGTGCCTCCTGTT 3'	5' TTCGTGCACCCCGTATAGATTTCTC 3'
TcQPCR_02E09	5' AGCTCTGCGGCGACCTCTTCC 3'	5' GCACGGCACGCTTGTCCATCTT 3'
TcQPCR_02E10a	5' TGCTTGC GGCGACGACAGT 3'	5' CCGGCGCAAACACCACAGGA 3'
L9	5' CCTCACTGCCGTTTCGTTGGTTTG 3'	5' ATGCGAGAGTGCCGTTGTGATGGT 3'
H2B	5' CGGTGGTGCGCGTCAACAAGAAGC 3'	5' CCAGGTCCGCCGCGCAGCACGAG 3'
6733	5' ACATGGATGCGGGTGAAGGTA 3'	5' TGCCGCCAATAAGGTAAAATC 3'

Tabela 3.1. Sequências nucleotídicas dos iniciadores *Foward (F)* e *Reverse (R)* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

O princípio da técnica de PCR em tempo real baseia-se na detecção de fluorescência emitida à medida que o DNA é gerado e de acordo com a concentração do fluoróforo entre as cadeias de DNA geradas. Foi utilizado o corante *SybrGreen I (Applied Biosystems)* para comparação das diferentes amostras de RNA. *SybrGreen* é um fluoróforo inespecífico capaz de detectar qualquer molecular de DNA dupla fita gerada.

O método de quantificação utilizado foi o de curva padrão, através dos valores de *Ct (threshold cycle)*. A curva padrão consistiu em 4 pontos, diluindo-se o cDNA entre um ponto e outro. As concentrações foram de 10 ng a 16 pg.

Para curva padrão foram utilizadas amostras de cDNA provenientes do RNA polissomal de EPI 5 DIAS. Para cada gene analisado (incluindo os normalizadores), foram feitas curvas padrões para análise. Todas as reações foram feitas em triplicata.

As reações foram realizadas no ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System (Applied Biosystems)*. As reações com volume final de 20 µl, utilizando 10 ng de cDNA para cada reação, água livre de RNases, 200 mM de cada iniciador e a concentração recomendada de *SYBR Green Master Mix*. O ciclo de PCR foi: 2 min a 50 °C, 10 min à 95 °C, seguido por 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos, T_m do iniciador em °C por 30 segundos (ver Tabela 3.2) e 70 °C por 60 segundos. Curvas de dissociação também foram analisadas para detectar a especificidade da reação. Esse protocolo foi aplicado tanto para os genes a ser investigados, quanto para os genes normalizadores.

A eficiência das reações de PCR foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Eficiência da PCR} = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$$

Nome	Tm do iniciador
TcQPCR_02C05	55 °C
TcQPCR_02C06	55 °C
TcQPCR_02C07	60 °C
TcQPCR_02C08	60 °C
TcQPCR_02C09	60 °C
TcQPCR_02C10	55 °C
TcQPCR_02C11	60 °C
TcQPCR_02C12	60 °C
TcQPCR_02D01	62 °C
TcQPCR_02D02	60 °C
TcQPCR_02D03	62 °C
TcQPCR_02D04	60 °C
TcQPCR_02D05	55 °C
TcQPCR_02D06	55 °C
TcQPCR_02D07	
TcQPCR_02D08	60 °C
TcQPCR_02D09	65 °C
TcQPCR_02D10	60 °C
TcQPCR_02D11	60 °C
TcQPCR_02D12	55 °C
TcQPCR_02E01	65 °C
TcQPCR_02E02	60 °C
TcQPCR_02E03	55 °C
TcQPCR_02E04	65 °C
TcQPCR_02E05	60 °C
TcQPCR_02E06	60 °C
TcQPCR_02E07	60 °C
TcQPCR_02E08	60 °C
TcQPCR_02E09	60 °C
TcQPCR_02E10a	55 °C
L9	70 °C
H2B	60 °C
6733	55 °C

Tabela 3.2. Temperatura de anelamento (Tm) dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.

3.19 ANÁLISE PROTEÔMICA

3.19.1 Preparação de extrato total de proteínas

As proteínas totais foram extraídas das formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 dias), epimastigotas submetidos ao estresse nutricional, de pH e de temperatura de células de *T. cruzi* submetidas

as diferentes condições de estresses (pH, temperatura e nutricional) foram utilizados para extração de proteínas totais das células como mencionado a seguir. Para os experimentos que se seguem foram realizadas três réplicas biológicas distintas. Vale salientar que as amostras utilizadas para este experimento são provenientes das culturas utilizadas nos ensaios de microarranjos de DNA descritas acima (item 3.12).

5×10^8 células foram centrifugadas a $8000 \times g$ por 5 minutos a 10°C e lavadas três vezes em PBS seguidos pelos mesmos passos de centrifugação. A extração das proteínas foi realizada utilizando um protocolo padrão para *T. cruzi* (Paba et al., 2004). Neste protocolo, as células são suspensas em $50 \mu\text{L}$ de 0,2% de SDS e fervidas por 5 minutos e colocadas imediatamente no gelo por 1 minuto. Para a solubilização das proteínas foi adicionado $350 \mu\text{L}$ de tampão de solubilização e o material foi homogenizado e colocado por 30 minutos em um agitador orbital para uma maior eficiência de solubilização das proteínas. Decorrido este tempo, a amostra foi centrifugada à 14000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante transferido para outro tubo e armazenado à -80°C até o momento do uso.

3.19.2 Digestão de proteínas por tripsina

Previamente à digestão foi realizada uma purificação utilizando o kit 2D Clean-up (GE Healthcare) com cerca de $75 \mu\text{g}$ de proteínas totais, desta forma, as proteínas foram mantidas em uma condição precipitada.

A fim de deixar as proteínas em um estado reduzido, o *pellet* obtido na etapa anterior, foi suspenso em $25 \mu\text{L}$ de uma solução de uréia (8M Urea/100mM ABC/5mM Dithiothreitol (DTT) , para alcançar uma concentração de $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A amostra foi incubada por duas horas a uma temperatura de 24°C .

Após a redução, foi necessário alquilar as proteínas com iodoacetamida (IAA) prevenindo renaturações das mesmas. Para que isso ocorresse foi necessário a adição de 15 mM de IAA, em solução contendo bicarbonato de

amônia (200 mM IAA/100 mM ABC). A reação ocorreu durante o período de 45 minutos em uma temperatura de 24 °C em um ambiente protegido de luz. Ao fim da reação de alquilação foi necessário adicionar a mesma quantidade de DTT (200 mM DTT/100 mM ABC) para consumir toda a IAA adicionada previamente.

Uma vez as proteínas reduzidas e alquiladas foram realizadas diluições das amostras para se obter a uréia em uma concentração de 1 M. Para tanto, a amostra foi diluída com 50 mM ABC e 2 mM CaCl₂ antes de ser adicionado tripsina em uma proporção de 1:30 (tripsina : extrato protéico) A digestão ocorreu através da incubação a 37 °C, sob leve agitação, durante 18 horas. A inativação da digestão aconteceu com a adição de ácido trifluoroacético até que o pH da solução alcançasse 5,0.

3.19.3 Espectrometria de Massa em *Tanden* Associada à Cromatografia Líquida (LC-MS/MS)

Os peptídeos obtidos foram desalinizados em colunas C8 (Michrom BioResources) e submetidos a análise por 2D Nano LC-MS/MS (Michrom BioResources Paradigm MS4 Multi-Dimensional Separations Module, a Michrom NanoTrap Platform and an LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer). A espectrometria de massa (MS) foi operada na modalidade dado-dependente e os quatro íons mais abundantes em cada espectro de MS foi selecionado e fragmentado para produzir um *Tanden* de espectro de massa.

As proteínas foram identificadas pela comparação dos espectros gerados a partir dos peptídeos após a fragmentação na câmara de colisão, com a previsão teórica dos espectros presentes no banco de dados (BD) de proteínas preditas para o *T. cruzi* baseado na cepa de referência do genoma de CL Brener (El-Sayed *et al.*, 2005) utilizando o algoritmo *Sequest* (MacCoss, *et al.*, 2002; Gatlin, *et al.*, 2000). Para se estimar a taxa de falso positivo gerada pela comparação com BD de *T. cruzi* foi realizada uma nova busca utilizando o BD em questão, porém, invertendo a ordem dos aminoácidos das proteínas

antes de gerar os espectros teóricos (Banco de dados reverso). As combinações de peptídeos e proteínas foram ordenadas baseando-se na probabilidade gerada pelo algoritmo *Sequest* e ajustado para uma taxa de falso positivo menor que 0,1%. Somente peptídeos identificados que possuísem uma digestão trípica completa, com índice de *cross-correlation scores* (Xcorr) maior que 1,9, 2,3 e 3,75 para íons com uma, duas ou três cargas sequencialmente foram usados para identificação de peptídeos. Em adição a esta análise, o índice *delta correlation scores* (ΔCn) deveriam ser maiores que 0,1 e para aumentar a estringência somente foram selecionadas as proteínas que possuísem probabilidade menor que 0,005 ($\leq 5 \cdot 10^{-3}$).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA TAXA DE METACICLOGÊNESE *IN VITRO* APÓS SUBMISSÃO DO *T. CRUZI* A DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE

A fim de verificar a capacidade de diferenciação do *Trypanosoma cruzi* após submissão a distintos tipos de estresse (estresse de pH, estresse de temperatura e estresse nutricional), foram realizados três experimentos independentes de diferenciação celular do parasita em meio quimicamente definido (TAU3AAG). Os epimastigotas foram cultivados em meio LIT até atingirem final de fase logarítmica de crescimento, ou seja, quinto dia de cultivo a 28 °C. Os diferentes tipos de estresse foram estabelecidos conforme descritos em Materiais e Métodos (itens 3.3.3.1, 3.3.3.2 e 3.3.3.3) e as células foram inoculadas no meio de diferenciação celular (TAU3AAG) conforme descrito por Contreras et al., 1985. Como não existe divisão celular neste processo, a taxa de metaciclogênese foi calculada através de contagem de parasitas no sobrenadante de cultura, diferenciando-se entre as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. As contagens foram feitas a cada 24 horas durante 4 dias. Os dados indicaram que a taxa de metaciclogênese, ou seja, a capacidade de diferenciação celular não foi afetada pelos tipos de estresse utilizados neste trabalho. No entanto, os resultados mostraram que nas primeiras 48 horas há uma diferença na porcentagem de tripomastigotas metacíclicos presentes no sobrenadante da cultura após o estresse de pH (Gráfico 4.2) e de temperatura (Gráfico 4.3), quando comparados ao estresse nutricional (Gráfico 4.1). Isto indica que o parasita ao ser submetido aos estresses de pH e temperatura sofre um retardo no disparo da metaciclogênese, visto que a taxa de 70% de metacíclico observada nas primeiras 24 horas do estresse nutricional só é alcançada após 72 horas, no caso destes tipos de estresse.

Com o decorrer do tempo de permanência do parasita no meio TAU3AAG as diferenças no número de tripomastigotas metacíclicos tornaram-

se reduzidas até que nos tempos finais (96 horas) de metaciclogênese *in vitro*, independente do tipo de estresse imposto, estas diferenças não foram significativas. Os gráficos com a representação dos valores das contagens das células podem ser visualizados abaixo.

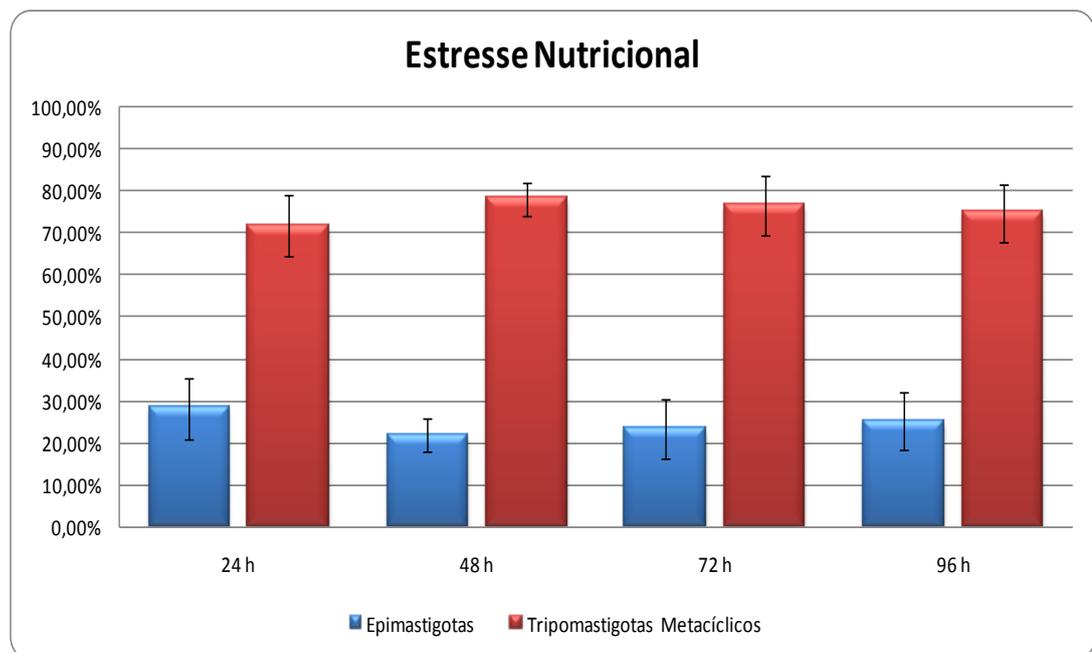


Gráfico 4.1. Porcentagem de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas presentes no sobrenadante de cultura em meio de diferenciação celular (TAU3AAG) após a submissão ao estresse nutricional, em diferentes períodos de tempo.

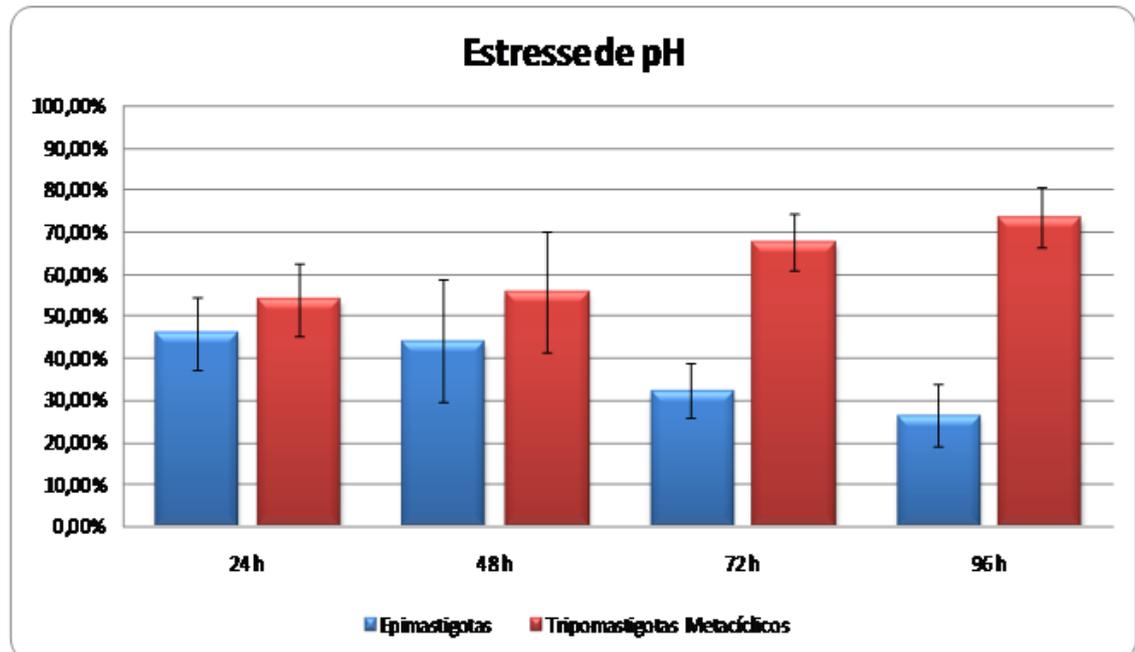


Gráfico 4.2. Porcentagem de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos presentes no sobrenadante de cultura em meio de diferenciação celular (TAU3AAG) após a submissão ao estresse de pH, em diferentes períodos de tempo.

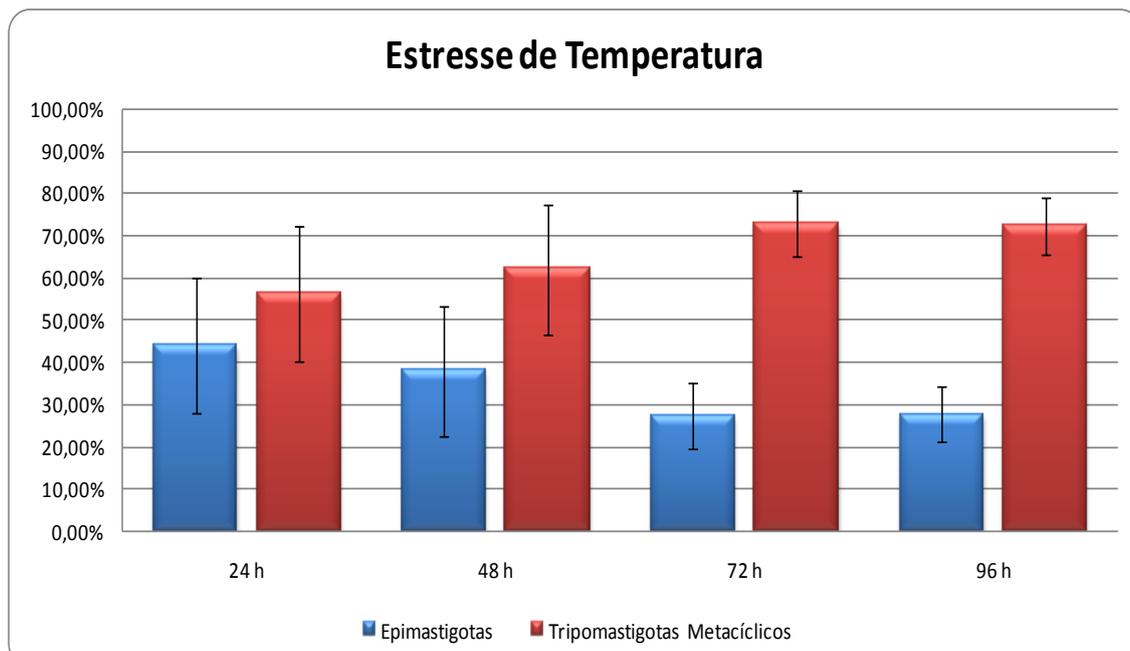


Gráfico 4.3. Porcentagem de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas presentes no sobrenadante de cultura em meio de diferenciação celular (TAU3AAG) após a submissão ao estresse de temperatura, em diferentes períodos de tempo.

4.2 ANÁLISE DA INFECTIVIDADE ATRAVÉS DE ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Como a submissão do parasita a diferentes tipos de estresse não afetou a sua capacidade de metaciclogênese, a questão foi verificar se a capacidade de infecção também não foi afetada. Para tanto, foram realizados ensaios de infecção em culturas de células Vero (*in vitro*) e camundongos (*in vivo*) utilizando os tripomastigotas metacíclicos purificados do sobrenadante de TAU3AAG após a indução dos diferentes tipos de estresse estabelecidos.

4.2.1 Ensaio Biológicos *in vitro*

Os tripomastigotas metacíclicos obtidos sob diferentes condições de estresse não apresentaram diferenças na capacidade de infecção e de multiplicação intracelular ($p > 0,10$ – Tabela 4.1). As taxas de infecção após 72 horas de interação variaram de 4,0 a 6,13% com um número médio de 12 a 17 amastigotas por célula (Tabela 4.1). Além disso, a liberação dos parasitas no sobrenadante das monocamadas celulares, observada após 96 a 120 horas de infecção, reforça que os tripomastigotas mantiveram sua capacidade de infecção, multiplicação e diferenciação intracelular.

Tipo de estresse	% de células infectadas*	Nº de amastigotas por célula*
Temperatura	6,13 ± 2,07% (4,0 a 10,5%)	12,79 ± 2,46 (9,7 a 16,6)
pH	4,0 ± 1,56% (2,0 a 6,5%)	12,56 ± 4,05 (8,0 a 18,0)
TAU	4,79 ± 1,08% (4,0 a 7,0%)	17,2 ± 5,09 (13,3 a 27,2)

Tabela 4.1. Taxa de infecção de células Vero após 72 horas de incubação com tripomastigotas metacíclicos de Trypanosoma cruzi clone Dm28c obtidos sob diferentes condições de estresse. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 8 lamínulas por experimento, determinada através da contagem aleatória de 200 células por lamínula. * $p > 0,10$ (não significante).

4.2.2 Ensaio Biológicos *in vivo*

Testes parasitológicos e de imunofluorescência indireta (IFI) demonstraram que os tripomastigotas metacíclicos submetidos a diferentes condições de estresse foram capazes de infectar camundongos. Contudo, diferentes taxas de infecção foram observadas como mostrado na Tabela 4.2. Quando inoculado os tripomastigotas provenientes do estresse de temperatura, quatro de cinco camundongos (80%) apresentaram infecção, como pode ser visto no IFI, entretanto, apenas um de cada cinco (20%) apresentou testes parasitológicos positivos. Nas condições de estresse de pH, quatro em cada

cinco (80%) camundongos inoculados com tripomastigotas apresentaram infecção, conforme evidenciado pelos testes parasitológicos e IFI. Embora apenas quatro (66,7%) camundongos inoculados com tripomastigotas derivados do estresse nutricional (TAU) tenham apresentado testes parasitológicos positivos, todos os animais deste grupo apresentaram anticorpos anti-*T. cruzi* (Tabela 4.2). Todos os camundongos positivos mostraram baixos níveis de parasitemia, sendo que os valores máximos foram de 14,4 a 28,8 x 10³ parasitas/ml.

Os triatomíneos alimentados com o sangue dos camundongos infectados não mostraram parasitas em seus intestinos mesmo após 30 dias de inoculação (Tabela 4.2). O xenodiagnóstico foi negativo provavelmente pela pouca parasitemia ou até mesmo devido ao fato da baixa sensibilidade do teste, uma vez que os insetos estavam completamente ingurgitados.

Tipos de estresses	Sangue fresco positivo/total	Hemocultura positivo/total	Xenodiagnóstico positivo/total	IFI positivo/total
Temperatura	1/5	3/5	0/3	4/5
pH	4/5	4/5	0/4	4/5
TAU	4/6	4/6	0/4	6/6

Tabela 4.2. Infecção *in vivo*. Infectividade de camundongos Swiss por tripomastigotas metacíclicos do clone Dm 28c de *Trypanosoma cruzi* submetidos a diferentes condições de estresse.

4.3 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA POR MICROARRANJOS DE DNA

4.3.1 Obtenção das amostras a serem hibridizadas no microarranjo

Para a obtenção das amostras, foram selecionados parasitas da forma epimastigota em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias), epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 dias) e os epimastigotas submetidos a diferentes ensaios de estresse – estresse de temperatura, estresse de pH e estresse nutricional, respectivamente. Foram obtidas três

réplicas biológicas distintas, denominadas Exp Str 02, Exp Str 26 e Exp Str 28. Sendo que para os epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias), foi obtida apenas uma réplica biológica. RNA polissomal foi extraído de frações provenientes destas réplicas biológicas.

As amostras de RNA polissomal foram obtidas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.5). A quantidade do RNA foi estimada e todas tiveram uma razão entre a absorbância a 260 nm e a absorbância a 280 nm maior ou igual a 1,9, indicando a boa qualidade da preparação.

Como em algumas amostras o rendimento de RNA polissomal foi insuficiente realizou-se uma amplificação *in vitro* do RNA utilizando o MessageAmp™ II aRNA Kit (Ambion Inc) conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.9), partindo de 2 µg de RNA de cada amostra. Todos os RNAs amplificados tiveram uma razão entre a absorbância a 260 nm e 280 nm maior ou igual a 1,9. Na Tabela 4.3 foram listadas as quantidades totais de RNA obtidas após as amplificações.

Condição	Quantidade em µg
EPI 3 DIAS	181,6 µg
EPI 5 DIAS 02	196 µg
EPI 5 DIAS 26	246,4 µg
EPI 5 DIAS 28	203,2 µg
pH 02	200,8 µg
pH 26	227,2 µg
pH 28	176,8 µg
TEMP 02	204,8 µg
TEMP 26	160,8 µg
TEMP 28	216,8 µg
TAU 02	200 µg
TAU 26	156,8 µg
TAU 28	195,2 µg

Tabela 4.3. Quantidade total de RNA amplificado a partir de 2 µg de RNA extraído.

4.3.2 Hibridizações

Para a realização deste trabalho, o microarranjo utilizado está representado na Figura 4.1, onde está disposto um conjunto de sondas em

triplicata. Pode-se notar que cada triplicata é constituída por uma região onde o sinal é mais forte e uma região onde o sinal é mais fraco. Esta última corresponde a sondas selecionadas em bancos de dados, cujo protocolo de amplificação utiliza DNA genômico. As sondas que fornecem sinal mais forte foram amplificadas de biblioteca de cDNA.

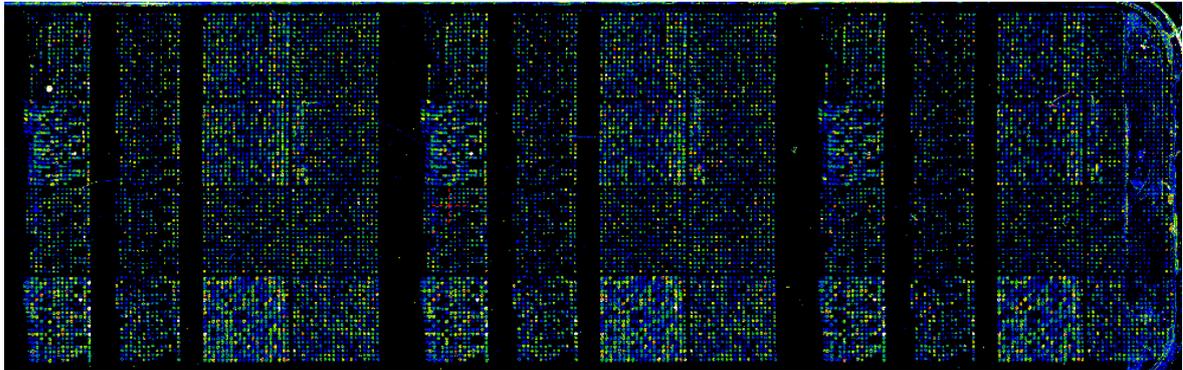


Figura 4.1. Microarranjo de *T. cruzi* versão 5.0.1 produzido no IBMP.

De acordo com o desenho experimental estabelecido para as hibridizações foram realizados 3 conjuntos de 12 hibridizações utilizando cada uma das réplicas biológicas de cada tipo de estresse. O conjunto 1 de hibridizações foi composto pelas amostras: EPI 3 dias, EPI 5 dias 02, pH 02, TAU 02 e TEMP 02. O conjunto 2, pelas amostras: EPI 3 dias, EPI 5 dias 26, pH 26, TAU 26 e TEMP 26. O conjunto 3, por EPI 3 dias, EPI 5 dias 28, pH 28, TAU 28 e TEMP 28. A Figura 4.2 esquematiza cada conjunto de hibridizações.

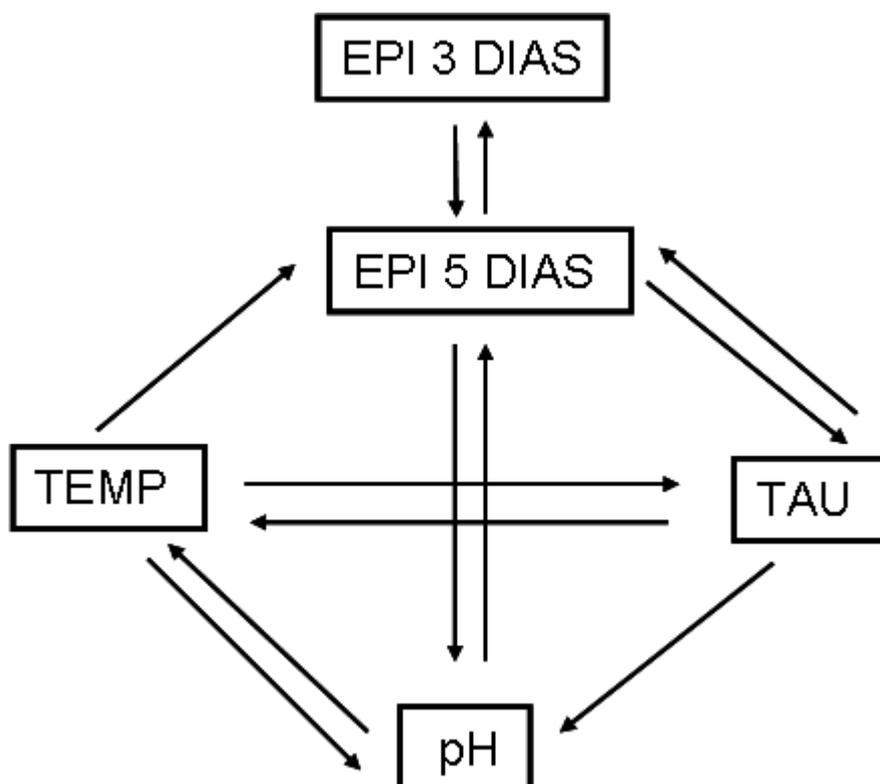


Figura 4.2. Desenho experimental das hibridizações. Cada seta representa uma hibridização. A cauda da seta indica as amostras marcadas com Cy3. A cabeça da seta indica as amostras marcadas com Cy5. Este esquema foi utilizado para cada um dos conjuntos.

Figura 4.3 mostra uma representação gráfica da intensidade do sinal emitido por um fluoróforo, sendo que a cor está associada à intensidade da fluorescência. A fluorescência mais fraca corresponde a uma cor azul e conforme ela vai ficando mais intensa as cores associadas são o verde, o amarelo, o vermelho e o branco (indicativo de saturação do sinal). Nesta figura, pode-se observar também a imagem composta, na qual as cores passam a ter outro significado: o verde significa que o sinal é mais intenso em uma amostra, o vermelho significa que a intensidade é maior na outra amostra, e o amarelo corresponde à mesma intensidade de fluorescência nas duas amostras.

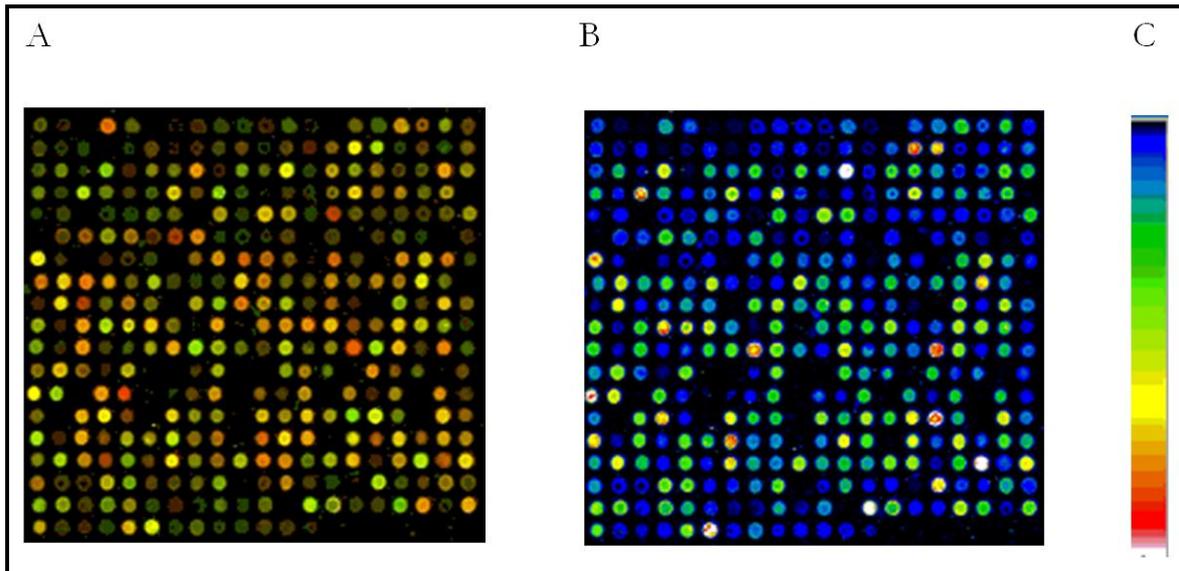


Figura 4.3. Intensidade de fluorescência em uma seção da lâmina do microarranjo de *T. cruzi*. A – Sobreposição das imagens de Cy3 e Cy5. B – Imagem da intensidade de sinal gerada por Cy3. C – escala de cores de intensidade de fluorescência.

4.3.3 Número de genes diferencialmente expressos

Foram realizadas comparações entre epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI) e cada um dos distintos estresses (pH, TEMP e TAU). Para gerar a listagem dos genes diferencialmente expressos, foram estabelecidos os critérios estabelecidos no item 3.17. O número de genes selecionados a partir de cada um destes critérios, com redundância, pode ser observado na Tabela 4.4. Enquanto, a lista dos genes selecionados para cada um dos critérios estabelecidos pode ser visualizada no item 8 (Anexo 29 a 34).

	A	B	C	D	E1	E2	E3
EPI X TAU	2	40	24	51	98	63	89
EPI X pH	3	14	8	13	22	14	19
EPI X TEMP	0	12	2	12	27	15	24

Tabela 4.4. Número de genes selecionados a partir da análise de microarranjo de DNA. Comparações entre epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI) e cada um dos tipos de estresse.

4.3.4 Seleção dos genes diferencialmente expressos

A fim de estudar um conjunto mais coeso de genes obtidos a partir das análises dos microarranjos de DNA foi selecionado o grupo de genes obtidos a partir do critério C. Desta forma, foram selecionados 32 genes que possuíam um *fold change* de 1,75, considerando as três réplicas biológicas analisadas, sendo que 2 genes eram compartilhados entre os estresse de pH e nutricional (TAU). Neste grupo, 8 genes foram obtidos a partir da comparação de epimastigotas com epimastigotas submetidos ao estresse de pH. Neste grupo, 6 genes eram considerados aumentados e 2 genes diminuídos em relação a pH. Além disso, 24 genes foram selecionados após a comparação entre epimastigotas e epimastigotas submetidos ao estresse nutricional (TAU) o qual 5 genes mostraram um perfil de aumento e 19 diminuídos nesta comparação, sendo que 2 genes eram compartilhados entre os estresses de pH e nutricional (TAU). Já para a comparação de epimastigotas com epimastigotas submetidos ao estresse de temperatura, observou-se que apenas 2 genes foram selecionados por este critério com um perfil de diminuição. Na tabela 4.5 pode-se observar tais resultados:

	Genes Aumentados	Genes Diminuídos	TOTAL
pH	6*	2	8
TAU	5*	19	24
TEMP		2	2

* redundância de 2 genes entre pH e TAU

Tabela 4 5. Número de genes selecionados a partir do critério C após a análise dos microarranjos de DNA. Apresentação dos genes com expressão aumentada e diminuída em relação à comparação de epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento e cada um dos estresses estabelecidos.

Na Tabela 4.6 pode-se observar a lista dos genes selecionados a partir do critério C. Nas colunas pode-se notar a origem de seleção do gene, os números identificadores das sondas no microarranjo do *T. cruzi* (*probe ID*), identificação do gene de acordo com as seqüências espotadas nas lâminas de microarranjo de DNA do IBMP (*probe name*) e a descrição dos genes selecionados (*gene*).

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
3538	CTG_613	10960.100001	thiolase protein-like protein, putative
7467	MG_ST_15_E12	5408.100002	Hypothetical protein, conserved
8499	Tc.00797	5414.100009	Hypothetical protein, conserved
3273	CTG_576	7180.100003	HSP70, mitochondrial precursor
4445	MG_24H_16_B12	8149.100002	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase, putative
5911	IB_ST_17_B07	8178.100003	Hypothetical protein, conserved
4662	MG_EP_03_C09	8609.100009	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative
2539	MG_24H_08_E02	8791.100006	Mitochondrial DEAD box protein, putative
1256	MG_24H_11_H04	8822.100004	Hypothetical protein, conserved
7691	IB_ST_20_F01	4881.100006	Thermolabile carboxypeptidase 1, putative
8256	Tc.01015	5669.100003	Hypothetical protein, conserved
7980	IB_MT_05_G05	5884.100002	Hypothetical protein, conserved
4715	MG_24H_20_A07	6113.100005	Hypothetical protein, conserved
1886	CTG_2413	6836.100005	Hypothetical protein, conserved
5237	IB_MT_02_D01	6854.100008	60S ribosomal protein L17, putative
9838	Tc.01991	6986.100019	Hypothetical protein, conserved
6511	MG_EP_04_C01	7118.100034	Hypothetical protein, conserved
1035	CTG_1307	7265.100003	Arginine kinase
3386	CTG_1913	7515.100005	Flagellar calcium-binding protein, putative
1828	CTG_167	7617.100056	Hypothetical protein, conserved
5930	MG_EP_02_G05	7753.100025	hypothetical protein, conserved
2133	CTG_2267	7782.100009	Hypothetical protein, conserved
7275	MG_EP_09_B11	7832.100016	Hypothetical protein, conserved
4073	MG_24H_02_F02	7885.100004	Hypothetical protein, conserved
3	CTG_1213	7984.100006	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative
1672	CTG_3634	8319.100003	Hypothetical protein, conserved
3119	CTG_1674	8347.100008	Peptidase M20/M25/M40, putative
9833	Tc.01822	8578.100003	Dna.I protein
891	CTG_3467	8621.100016	HSP70
7959	IB_ST_17_B09	8690.100004	Phosphoglycerate kinase, putative
9116	Tc.03493	8717.100019	GPI transaminidase component T1a1, putative
2799	MG_24H_07_H05	8754.100004	Hypothetical protein, conserved

Tabela 4.6. Lista de genes selecionados a partir do critério C estabelecido para os resultados das análises de microarranjo de DNA. Em preto os genes com caráter aumentados em relação à comparação dos distintos estresses com as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Em vermelho os genes diminuído mediante a mesma comparação citada acima.

4.3.5 Identificação de genes significativamente diferentes entre os estresses

Além das análises realizadas a partir dos critérios estabelecidos previamente, também foi observado um conjunto de genes obtidos pela técnica de microarranjo que mostravam diferenças de padrão de expressão entre os estresses analisados. Para gerar este grupo de genes, foi realizada análise de microarranjo comparando os estresses entre si, não utilizando as formas epimastigotas (EPI 5 DIAS) como parâmetro.

Com isso, foi selecionado estatisticamente um grupo de 11 genes significativamente diferentes entre os estresses, sendo que 3 deles também foram selecionados anteriormente pelo critério C utilizado neste trabalho (7782.t00009, 8621.t00016 e 6854.t00008). Na tabela a seguir pode-se visualizar o grupo de genes com perfis de expressão diferentes entre os estresses.

Gene ID	Descrição
8158.t00013	Heat Shock Protein 85, putative
8440.t00004	Hypothetical protein conserved
8343.t00011	Hypothetical protein conserved
7744.t00035	Hypothetical protein conserved
5798.t00008	Coronin, putative
7960.t00009	Hypothetical protein conserved
4911.t00014	Enolase, putative
8730.t00015	Hypothetical protein conserved
7782.t00009	Hypothetical protein conserved
8621.t00016	HSP70
6854.t00008	Ribosomal Protein L17, putative

Tabela 4.7. Genes significativamente diferentes entre os estresses.

A partir desta listagem é possível destacar conjuntos de genes que mostram um perfil de expressão muito interessante e que valem ser ressaltados:

- Genes que mostram uma grande amplitude de diferenças de expressão quando comparado estresse de temperatura (aumento de expressão) com estresse nutricional (diminuição de expressão). Os gráficos abaixo exemplificam tais diferenças.

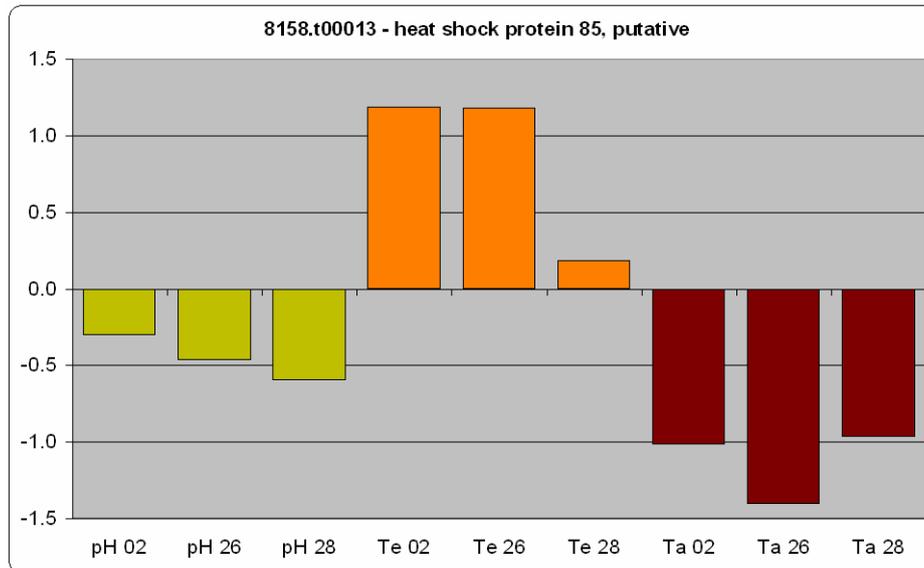


Gráfico 4.4. Gráfico comparativo do gene 8158.t00013 – Heat Shock protein 85, putative. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

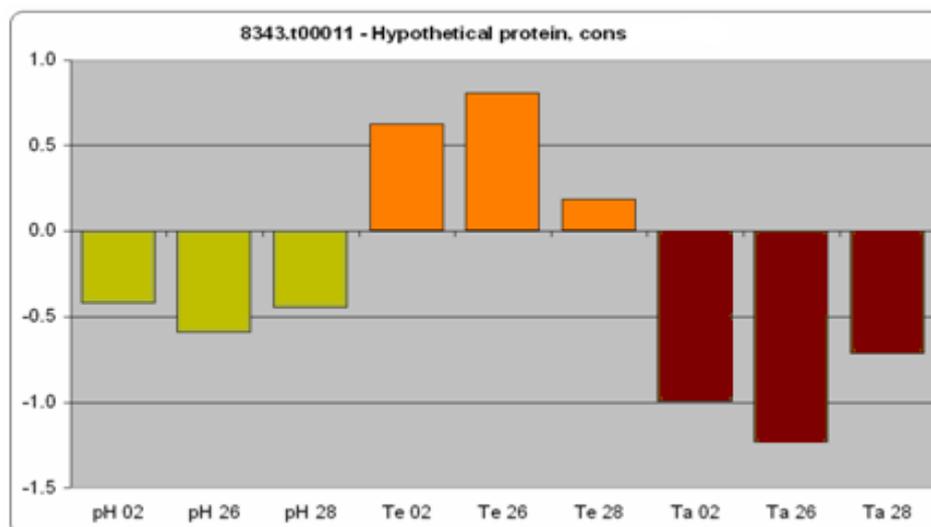


Gráfico 4.5. Gráfico comparativo do gene 8343.t00011 – Hypothetical protein, conserved. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

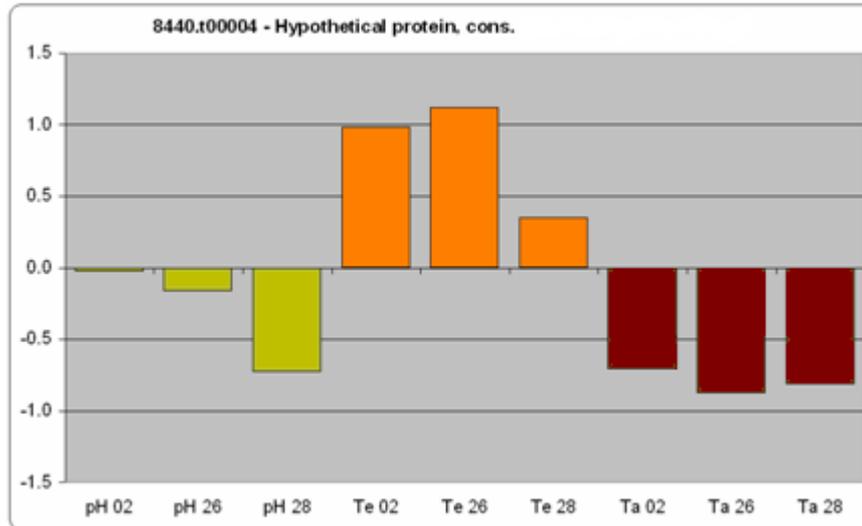


Gráfico 4.6. Gráfico comparativo do gene 8440.t00004 – Hypothetical protein, conserved. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

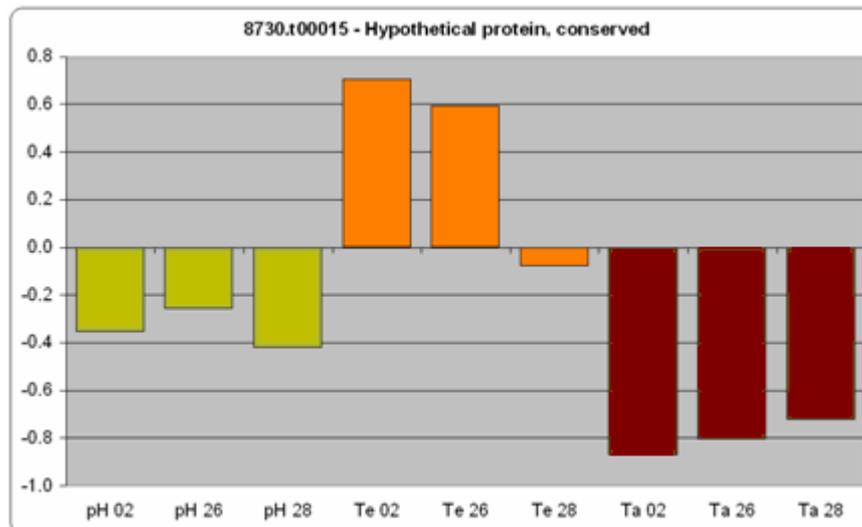


Gráfico 4.7. Gráfico comparativo do gene 8730.t00015 – Hypothetical protein, conserved. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

- Genes que possuem seu perfil diminuído em dois tipos de estresse. Neste caso, foram selecionados os genes (8621.t0016 e 6854.t0008) que mostram diminuição de expressão tanto no estresse de pH quanto no estresse nutricional.

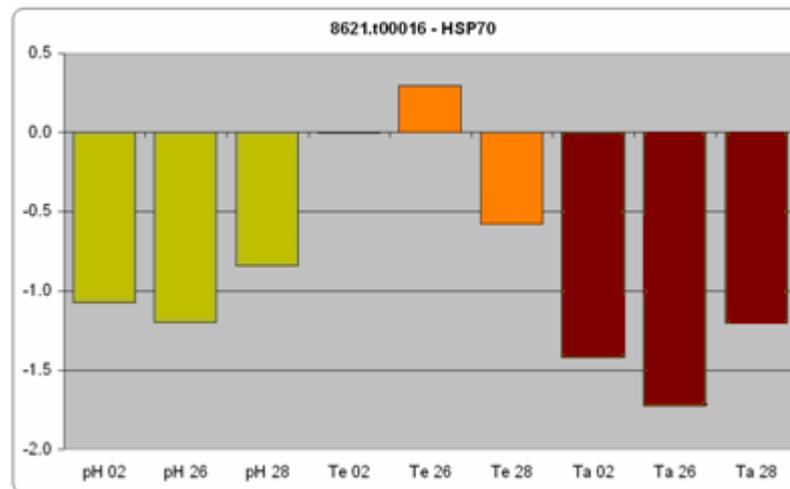


Gráfico 4.8. Gráfico comparativo do gene 8621.t00016 – HSP70. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

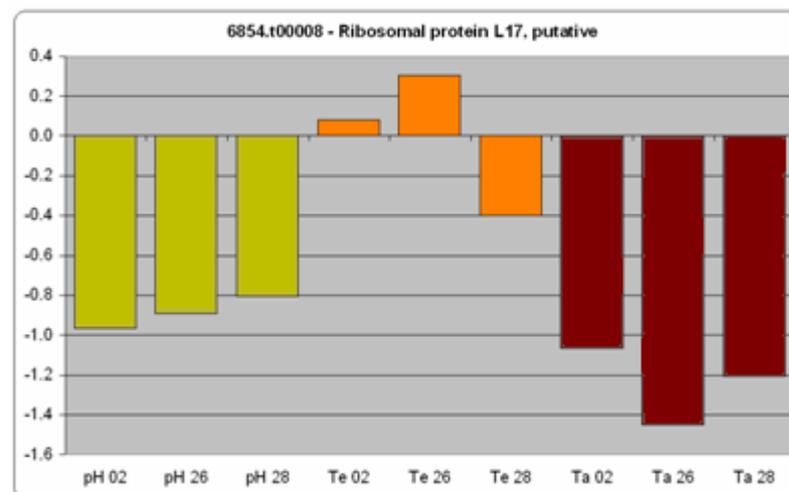


Gráfico 4.9. Gráfico comparativo do gene 6854.t00008 – Ribosomal protein L17, putative. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

- Genes que demonstram um perfil de expressão aumentado em dois tipos de estresse. Foram selecionados os genes 5798.t00008 e 7960.t00009 que mostram uma tendência de aumento de expressão no estresse de temperatura e nutricional quando comparados com o estresse de pH.

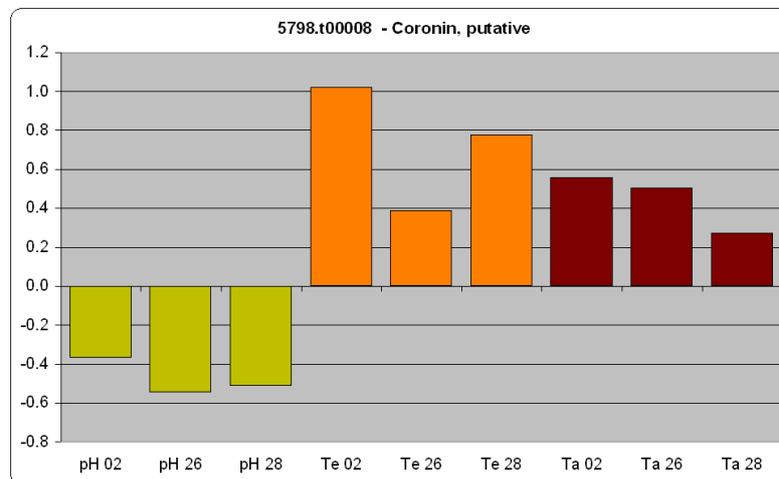


Gráfico 4.10. Gráfico comparativo do gene 5798.t00008 – Coronin, putative. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

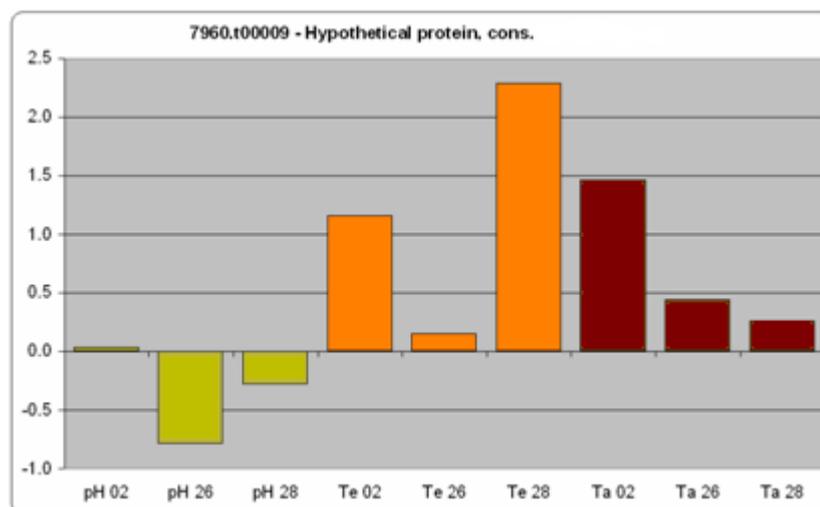


Gráfico 4.11. Gráfico comparativo do gene 7960.t00009 – Hypothetical protein conserved. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

- Gene para o qual pode ser visualizado um perfil de aumento de expressão no estresse de pH e diminuição no estresse nutricional.

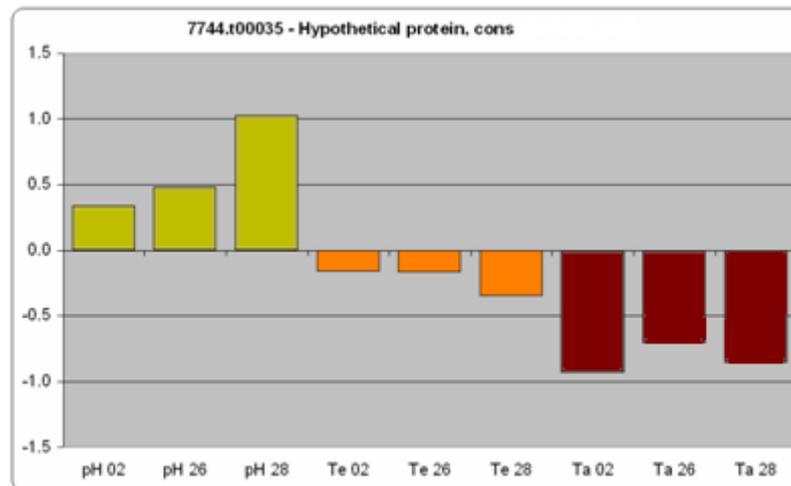


Gráfico 4.12. Gráfico comparativo do gene 7744.t00035 – Hypothetical protein conserved. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

- Gene com perfil significativo de diminuição de expressão em estresse de temperatura.

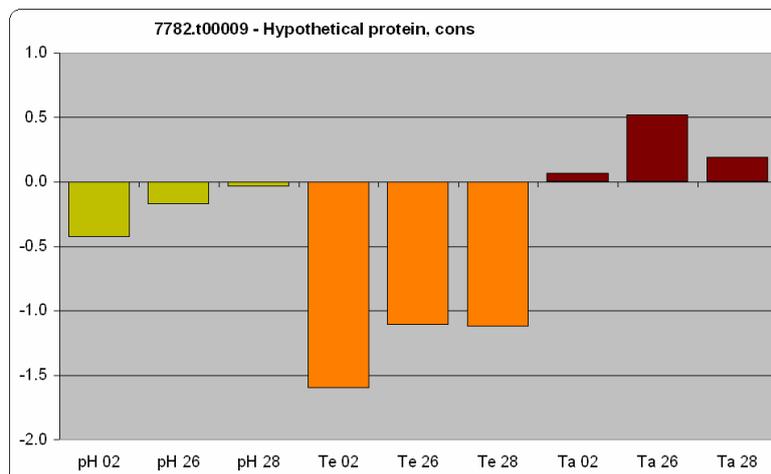


Gráfico 4.13. Gráfico comparativo do gene 7782.t00009 – Hypothetical protein conserved. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

- Gene que demonstra um perfil de diminuição de expressão em todos os estresses analisados em relação as formas epiamstigotas.

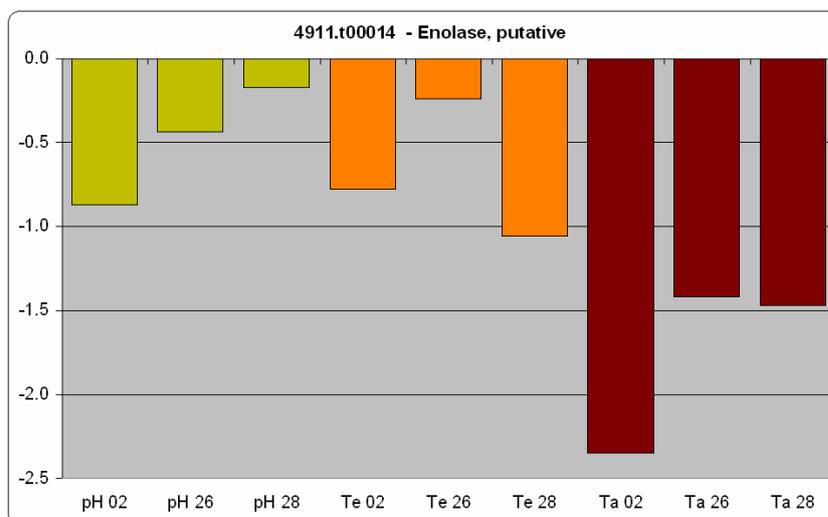


Gráfico 4.14. Gráfico comparativo do gene 4911.t00014 – Hypothetical protein conserved. Perfil de expressão do gene quando comparado os estresses estudados. pH – estresse de pH, Te – estresse de temperatura e Ta – estresse nutricional. 02, 26 e 28 dias no qual foi realizado os experimentos de estresse.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA POR PCR EM TEMPO REAL DOS GENES SELECIONADOS

A técnica do PCR em tempo real foi utilizada para confirmar os perfis de expressão dos genes selecionados pelo microarranjo de DNA descritos no item 4.3.4., Tabela 4.6. Os genes da histona H2B, da proteína ribossomal L9 e a proteína hipotética de *T. cruzi* 6733 foram utilizados como normalizadores.

Na Figura 4.4 observa-se o padrão de amplificação e da curva de dissociação encontrado para o gene 5884.t00002, ressaltando a boa qualidade das amplificações e a homogeneidade de amplificação entre as replicatas. As curvas de amplificação são referentes as triplicatas das diluições da curva padrão, triplicatas das amostras de cada um dos três experimento realizados e triplicatas do branco. Além disso, pode-se observar à curva de dissociação da amostra demonstrando a não contaminação das memas.

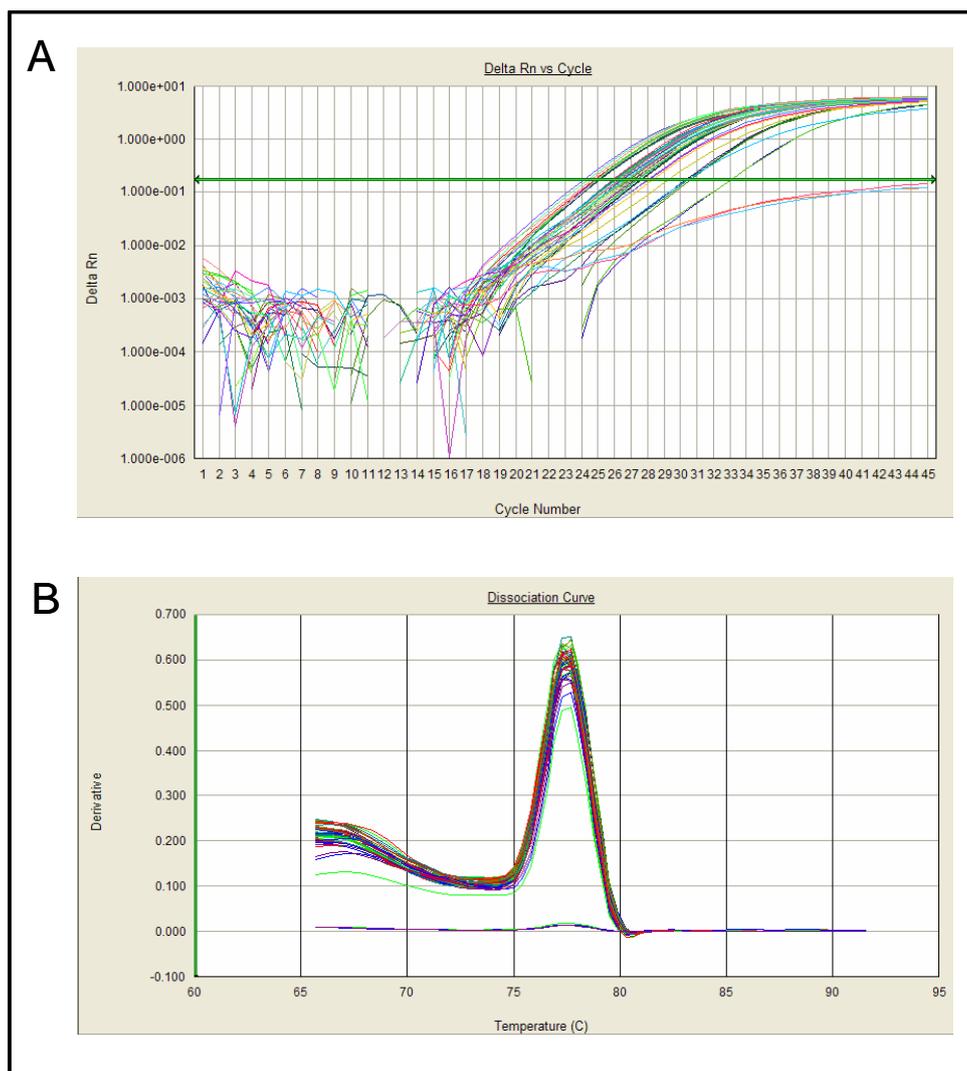


Figura 4.4. Padrão de uma Curva de Amplificação (A) e dissociação (B) para um gene analisado a partir da técnica de PCR em Tempo Real.

Os valores correspondentes dos cDNA em cada tipo de estresses, bem como, para as formas epimastigotas em final de fase exponencial de crescimento foram calculados a partir da média do valor obtido para cada reação realizada para os genes selecionados. Assim, este valor médio foi dividido pela média do valor obtido para o conjunto dos genes normalizadores (ver Tabela 4.8).

	NORMALIZADO			
	6733	L9	H2B	média
E02	0,790802	0,765813	0,651701	0,758151
pH02	0,525089	0,68784	0,648448	0,603142
TA02	0,2822	0,473372	0,36412	0,372572
TE02	0,817668	1,054508	1,100509	1,011962
E26	0,575508	0,652968	0,605242	0,620864
pH26	0,548433	0,661634	0,547895	0,597554
TA26	0,235007	0,280889	0,205317	0,225196
TE26	0,509521	0,651976	0,468499	0,531908
E28	0,650117	0,875365	0,69915	0,724349
pH28	1,05226	0,576562	0,454982	0,677889
TA28	0,293461	0,35311	0,236878	0,280568
TE28	0,806387	1,120439	1,049663	0,958543

Tabela 4.8. Exemplo de tabela representando os valores médios de um gene selecionado para análise por PCR em tempo real. Nas colunas 6733, L9 e H2B estão representados os valores médios de cada amostra (linha) para seus respectivos normalizadores. Na coluna média – valor médio calculado a partir da média dos normalizadores citados.

Para todos os genes selecionados, a forma epimastigotas foi referência de comparação para os distintos tipos de estresses. Desta forma, os valores médios obtidos em cada um dos experimentos de estresses foram divididos pelo valor de cada epimastigota em suas respectivas réplicas biológicas (ver Tabela 4.9).

	STRESS / EPI			
	6733	L9	H2B	média
E02	1	1	1	1
pH02	0,663996	0,898183	0,995008	0,795544
TA02	0,356853	0,618129	0,558722	0,491422
TE02	1,033973	1,376978	1,688671	1,334777
E26	1	1	1	1
pH26	0,952954	1,013271	0,905249	0,962454
TA26	0,408347	0,430172	0,339231	0,362714
TE26	0,885341	0,998479	0,774068	0,856722
E28	1	1	1	1
pH28	1,61857	0,658653	0,650764	0,93586
TA28	0,451397	0,403386	0,338809	0,387338
TE28	1,240372	1,279968	1,501342	1,323317

Tabela 4.9. Exemplo de tabela representando os valores da divisão entre os valores de cada amostra pela referência (formas epimastigotas, denominada E02, E26 e E28) nas respectivas réplicas biológicas isso para cada normalizador indicado nas

colunas como **6733**, **L9** e **H2B**. Na coluna média – valor médio calculado pela média dos normalizadores citados.

Visto que os resultados obtidos nos experimentos realizados de hibridização em microarranjos de DNA citados no item 3.12 eram representados graficamente em valores de log na base 2 foi criado uma fórmula que transformava os valores absolutos obtidos no qPCR em valores de log na base 2. Assim, foi possível comparar os resultados obtidos na técnica de PCR em tempo real com os obtidos no microarranjo de DNA (Tabela 4.10).

	LOG (STRESS / EPI)2			
	6733	L9	H2B	média
E02	0	0	0	0
E26	0	0	0	0
E28	0	0	0	0
pH02	-0,59075	-0,15492	-0,00722	-0,32999
pH26	-0,06952	0,01902	-0,14361	-0,05521
pH28	0,69472	-0,60241	-0,61979	-0,09564
TA02	-1,4866	-0,69402	-0,8398	-1,02497
TA26	-1,29213	-1,21701	-1,55966	-1,4631
TA28	-1,14753	-1,30977	-1,56146	-1,36834
TE02	0,048199	0,461506	0,755889	0,416599
TE26	-0,17569	-0,0022	-0,36947	-0,2231
TE28	0,310772	0,356107	0,586252	0,404158

Tabela 4.10. Exemplo de tabela representando os valores médios de um gene selecionado para análise por PCR em tempo real. Nas colunas **6733**, **L9** e **H2B** estão representados os valores de logaritmo na base 2 da divisão dos valores de cada um dos estresses pelo valor de cada epimastigota em suas respectivas réplicas biológicas. Na coluna *média* – valor médio calculado pela média dos normalizadores citados.

Uma vez realizados os cálculos dos valores médios citados na Tabela 4.8, Tabela 4.9 e Tabela 4.10, para cada um dos genes selecionados para análise de PCR em tempo real foram gerados gráficos comparativos entre os resultados de microarranjo e PCR em tempo real ambos com valores de log na base 2.

Após estas análises comparativas foi possível observar que dos 30 genes analisados 21 mostraram correlação entre as metodologias utilizadas.

Sendo que destes, 14 possuem gráficos comparativos (Anexos 01 a 13 e Figura 4.5). Devido a ausência de gráficos referentes a alguns dos genes analisados, um total de oito ficaram sem figura da comparação. Mas através dos valores médios gerados de acordo com a tabela 4.10, constatou-se que 7 genes (5414.t00009, 5669.t00003, 6113.t00005, 7118.t00034, 7832.t00016, 8319.t00003 e 8578.t00003) (Anexo 14 a 20) dos 21 mostraram padrões similares entre microarranjo e PCR em tempo real. Enquanto, apenas um gene (6986.t000190) mostrou uma expressão diminuída em microarranjo e aumentada em RT-PCR um padrão aumentado (Anexo 21).

Um conjunto de 7 genes demonstraram uma falta de homogeneidade entre as réplicas, no entanto a maioria das réplicas apresentou resultados compatíveis com o microarranjo. Por exemplo, para o gene 10960.t00001, 2 réplicas do PCR em tempo real mostraram um perfil divergente ao dado de microarranjo. Mas é clara a tendência uma expressão aumentada na maioria das réplicas mostrando uma concordância com o que foi observado no microarranjo (Anexo 22 a 28). E apenas um gene (6854.t00008), não foi possível a realização da técnica de PCR em tempo real devido a não amplificação das amostras.

Ou seja, de modo geral, obtivemos resultados satisfatórios quanto à correlação dos dados de expressão obtidos pelo microarranjo e pelo RT-PCR. Neste caso, 28 genes analisados (93,33%) por RT-PCR confirmaram o perfil de expressão observado no microarranjo.

Para exemplificar a comparação entre os resultados obtidos no PCR em tempo real e dados de microarranjo pode-se observar a Figura 4.5. No item 8 pode-se observar todos os resultados obtidos dos genes selecionados (Anexo 01 a 28).

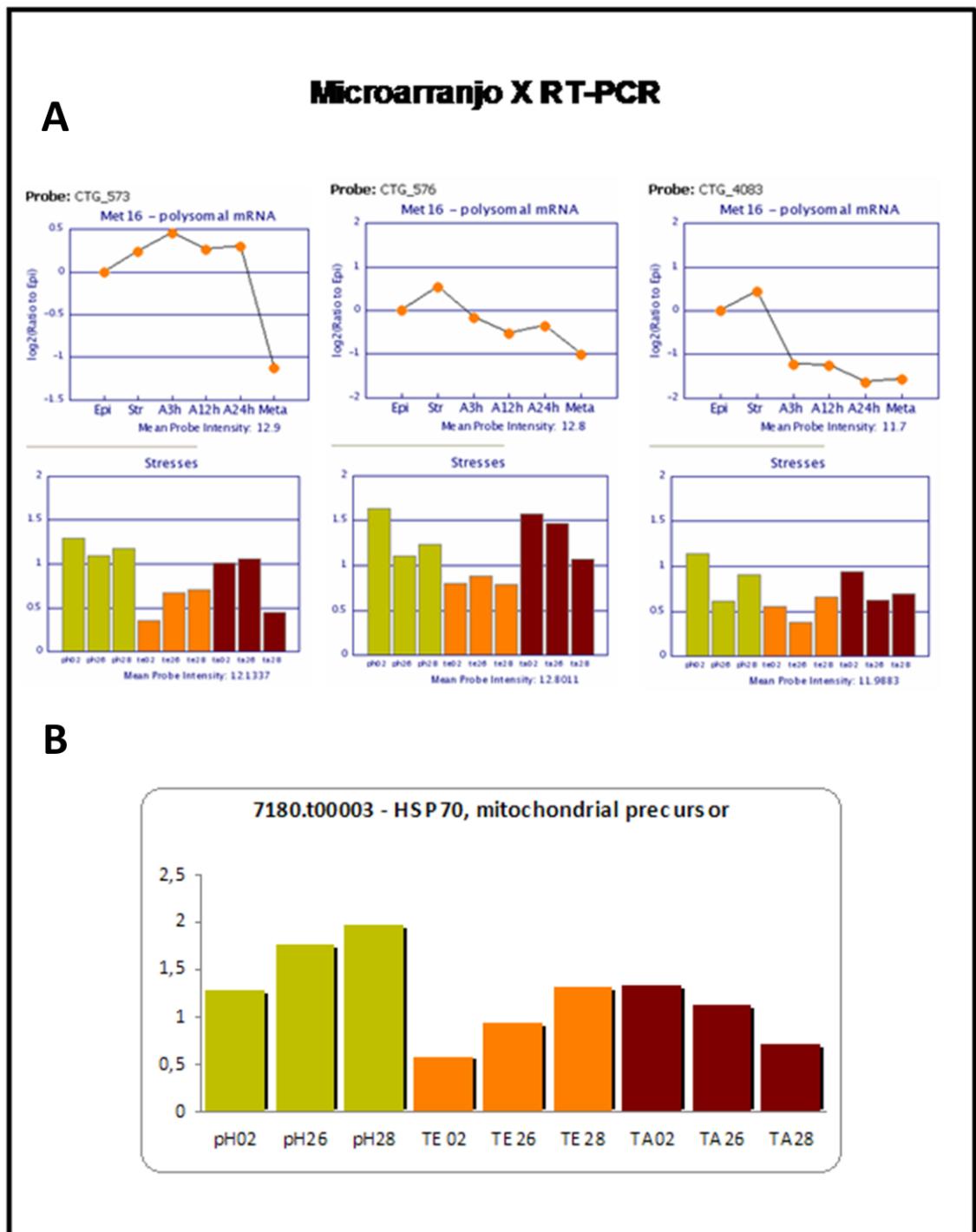


Figura 4.5. Resultados do gene 7180t.00003 – HSP 70, *mitochondrial precursor*, obtidos a partir da comparação dos resultados de microarranjo da metaciclo gênese *in vitro* do *T. cruzi* e os resultados obtidos a partir dos dados de microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B).

4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA A DIFERENTES ESTRESSES

4.5.1 Número de peptídeos e proteínas identificados após a análise de 2D Nano LC-MS/MS

Como descrito nos itens 3.19.1, 3.19.2 e 3.19.3, amostras de proteínas das formas epimastigotas em final de fase logarítmica, bem como, das distintas condições de estresse foram obtidas a partir de três experimentos independentes e digeridas com protease. Os peptídeos foram submetidos a uma análise do tipo 2D Nano LC-MS/MS e os espectros de massa gerados foram comparados aos espectros deduzidos a partir de seqüências de proteínas depositadas em banco de dados de *T. cruzi*. Conseqüentemente, estas comparações permitiu a identificação das proteínas presentes nos diferentes extratos analisados.

O número de peptídeos identificados para cada uma das réplicas das quatro populações analisadas é mostrado na Tabela 4.11. Na Tabela 4.12 pode-se observar o número de proteínas identificadas, a partir dos peptídeos gerados. Para ambos os casos foram utilizados, como linha de corte, valores de probabilidade que fossem inferiores a $5 \cdot 10^{-3}$, para garantir a confiabilidade da busca efetuada em banco de dados.

	REP1	REP2	REP3	TOTAL
EPI	1869	2082	1323	5274
pH	2799	2411	1579	6789
TAU	2445	1007	2451	5903
TEMP	2210	1933	6424	10567

Tabela 4.11. Número de peptídeos identificados nas formas epimastigotas e em cada tipo de estresses nas três réplicas biológicas analisadas, utilizando como linha de corte o valor de probabilidade de $5 \cdot 10^{-3}$.

	REP1	REP2	REP3	TOTAL
EPI	461	514	324	1299
pH	822	507	546	1875
TAU	542	282	409	1233
TEMP	431	491	667	1589

Tabela 4.12. Número de proteínas identificadas nas formas epimastigotas e em cada tipo de estresses nas três réplicas biológicas analisadas (com redundância), utilizando como linha de corte o valor de probabilidade de $5 \cdot 10^{-3}$.

4.5.2 Proteínas diferencialmente expressas entre os diferentes tipos de estresse analisados

Como o interesse principal desta técnica foi avaliar o perfil protéico nos distintos tipos de estresse em relação às formas epimastigotas, foram realizadas análises para gerar listas de proteínas diferencialmente representadas nestes experimentos.

Primeiramente, o número de peptídeos encontrados nas três réplicas biológicas de cada população foi somado, visando diminuir a influência de variações biológicas e técnicas na seleção de expressão diferencial. Portanto, foram obtidos 5274 peptídeos para as formas epimastigotas, 6789 peptídeos para os epimastigotas submetidos ao estresse de pH, 5903 peptídeos para o estresse nutricional e 10567 para o estresse de temperatura. Como pode ser observado havia uma grande diferença no número de peptídeos encontrados em cada estágio analisado.

Desta forma, os dados anteriores foram normalizados, visando incluir mais um passo de diminuição da influência das variações técnicas e biológicas na análise. A normalização foi feita dividindo-se o total de peptídeos identificados em uma população pelo total de peptídeos identificados na população com o menor número de peptídeos identificados, nesse caso epimastigotas ($n=5274$). Ao final dessa etapa, todas as populações tinham o mesmo número de peptídeos identificados. Se em uma população o número de peptídeos identificados foi aproximadamente o dobro da de epimastigotas

(n=10567 – estresse de temperatura), caso uma proteína tivesse dois peptídeos identificados em epimastigota e 4 nessa população de estresse por temperatura, após a normalização ambas populações teriam dois peptídeos identificados. A escolha de se fazer a normalização pela população com menos peptídeos foi devida ao fato de se evitar a inflação do número de peptídeos das populações com menos dados e desta maneira permitir uma avaliação comparativa entre os resultados das diferentes avaliações.

A partir desta normalização foi possível gerar listagem de proteínas diferencialmente expressas nos diferentes tipos de estresse em relação às formas epimastigotas. Caso a diferença do número de peptídeos entre os estresses (pH, TAU e TEMP) e epimastigotas (EPI) fosse maior ou igual a 3x (ou vice-versa), a proteína era selecionada. Nos casos em que a contagem de peptídeos em uma das duas populações fosse igual a zero, selecionou-se somente aquelas proteínas nas quais a contagem na outra população era igual ou superior a 3.

Desta forma, foram selecionadas 69 proteínas diferencialmente expressas em estresse de pH; 79 proteínas diferencialmente expressas em estresse nutricional (TAU) e 103 proteínas diferencialmente expressas em estresse de temperatura, lembrando que estas análises foram feitas sempre em relação a EPI 5 DIAS, levando em consideração as redundâncias existentes entre as proteínas diferenciais presentes em cada um dos estresses (Tabela 4.13). A lista completa destas proteínas diferencialmente expressas em cada um dos estresses pode ser visualizada na Tabela 4.14, Tabela 4.15 e Tabela 4.16.

	Proteínas Aumentadas	Proteínas Diminuídas	TOTAL
pH	34	35	69
TAU	31	48	79
TEMP	28	75	103

Tabela 4.13. Número de proteínas diferencialmente expressas nos distintos tipos de estresse.

IBMPid	Descrição	GeneID	Epi	pH	TAU	Temp	Total	Status pH
SG01524	40S ribosomal protein S12, putative	7648.t00002	3,0	9,3	9,8	7,0	29,1	1
SG02374	hypothetical protein, conserved	5539.t00005	4,0	14,8	3,6	6,0	28,3	1
SG01475	60S ribosomal protein L9, putative	4949.t00001	1,0	5,4	7,1	4,5	18,1	1
SG01844	hypothetical protein, conserved	7018.t00012	1,0	4,7	5,4	5,5	16,5	1
SG02515	hypothetical protein, conserved	6996.t00041	1,0	6,2	3,6	5,5	16,3	1
SG02653	Hsc70-interacting protein (Hip), putative	7717.t00021	1,0	6,2	3,6	3,5	14,3	1
SG01428	glucokinase 1, putative	8328.t00010	1,0	5,4	7,1	1,5	15,1	1
SG02621	10 kDa heat shock protein, putative	5730.t00003	1,0	3,9	3,6	4,5	12,9	1
SG06219	hypothetical protein, conserved	7541.t00027	1,0	3,9	4,5	3,0	12,3	1
SG02710	hypothetical protein, conserved	5910.t00001	1,0	3,1	2,7	4,0	10,8	1
SG03053	ubiquitin-activating enzyme E1, putative	6288.t00025	1,0	3,9	5,4	0,5	10,7	1
SG00336	hypothetical protein, conserved	7444.t00011	1,0	3,9	0,9	3,0	8,8	1
SG02709	hypothetical protein, conserved	5516.t00002	1,0	3,1	0,0	3,5	7,6	1
SG02468	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative metallo-peptidase, Clan ME, Family M16, putative	7074.t00001	1,0	3,9	0,9	2,5	8,3	1
SG02473	succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor, putative	4935.t00036	1,0	4,7	0,9	1,5	8,1	1
SG00960	40S ribosomal protein S6, putative	6866.t00017	1,0	3,1	1,8	2,0	7,9	1
SG02255	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative	4937.t00001	1,0	3,1	0,9	0,5	5,5	1
SG00374	60S ribosomal subunit protein L31, putative	5966.t00010	1,0	3,1	0,9	0,0	5,0	1
SG01536	orotidine-5-phosphate decarboxylase/rotae phosphoribosyltransferase, putative OMPDCase-OPRTase, putative	7191.t00006	1,0	3,1	0,9	0,0	5,0	1
SG03065	hypothetical protein, conserved	6770.t00011	0,0	7,8	0,0	17,0	24,7	1
SG02458	proteasome activator protein PA26, putative	4779.t00001	0,0	7,0	8,9	6,5	22,4	1
SG01465	ribosomal protein S26, putative	4759.t00002	0,0	4,7	1,8	4,5	10,9	1
SG01872	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	7025.t00003	0,0	3,9	2,7	3,0	9,6	1
SG00359	hypothetical protein	7742.t00004	0,0	9,3	0,9	0,0	10,2	1
SG02347	proteasome alpha 1 subunit, putative	6837.t00004	0,0	3,9	1,8	2,5	8,2	1
SG02436	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor, putative ADP/ATP translocase 1, putative	6853.t00016	0,0	5,4	0,0	2,0	7,4	1
SG00452	dynamamin, putative vacuolar sortin protein 1, putative	7617.t00002	0,0	3,1	1,8	1,0	5,9	1
SG02671	gamma-glutamylcysteine synthetase, putative	7407.t00022	0,0	3,9	2,7	0,0	6,6	1
SG02656	dynein light chain, putative	7143.t00060	0,0	3,1	0,9	1,5	5,5	1
SG02528	thioredoxin, putative	6996.t00020	0,0	3,1	0,9	1,0	5,0	1
SG02673	mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative	7531.t00002	0,0	3,1	0,0	1,5	4,6	1
SG02761	inorganic pyrophosphatase, putative	7617.t00082	0,0	3,1	0,0	1,0	4,1	1
SG02680	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	3811.t00001	0,0	3,9	0,0	0,0	3,9	1
SG02990	MCAK-like kinesin, putative	4921.t00006	0,0	3,1	0,0	0,0	3,1	1
SG04478	hypothetical protein, conserved	8534.t00021	14,0	0,0	3,6	7,0	24,6	-1
SG06185	hypothetical protein, conserved	7409.t00003	5,0	0,0	1,8	5,0	11,8	-1
SG00532	hypothetical protein, conserved	7684.t00004	5,0	0,0	1,8	2,0	8,8	-1
SG07725	dynein heavy chain, cytosolic, putative	8421.t00001	7,0	0,0	0,0	1,5	8,5	-1
SG00542	hypothetical protein, conserved	8565.t00019	4,0	0,0	1,8	2,0	7,8	-1
SG01512	ribosomal protein L37, putative	7127.t00055	4,0	0,0	0,9	0,5	5,4	-1
SG01958	nucleolar RNA-binding protein, putative	7417.t00007	4,0	0,0	0,9	0,5	5,4	-1
SG04405	hypothetical protein, conserved	6952.t00012	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG08000	hypothetical protein, conserved	5781.t00003	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG06533	hypothetical protein, conserved	8565.t00008	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG02176	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	5414.t00001	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG02638	hypothetical protein, conserved	6996.t00055	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG05711	hypothetical protein, conserved	8557.t00002	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG02498	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100), putative	7820.t00005	9,0	1,6	13,4	8,0	31,9	-1
SG01193	dihydroliipoamide branched chain transacylase, putative	5901.t00009	8,0	2,3	7,1	5,0	22,5	-1
SG00807	kinesin, putative	6974.t00008	13,0	3,1	0,0	4,5	20,6	-1
SG01331	protein kinase, putative mitogen-activated protein kinase, putative	6853.t00021	7,0	2,3	3,6	2,0	14,9	-1
SG02945	fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative	7038.t00007	7,0	1,6	2,7	2,0	13,2	-1
SG03696	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit, putative	5613.t00011	5,0	1,6	2,7	3,0	12,2	-1
SG01931	calpain-like cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	8502.t00001	5,0	0,8	0,9	4,0	10,7	-1

IBMPid	Descrição	GeneID	Epi	pH	TAU	Temp	Total	Status pH
SG02588	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor, putative	6889.t00016	5,0	0,8	1,8	3,5	11,1	-1
SG02565	hypothetical protein, conserved	7561.t00015	7,0	1,6	0,0	2,0	10,6	-1
SG00588	flagellar calcium-binding protein, putative	5387.t00002	3,0	0,8	1,8	3,5	9,1	-1
SG02360	hypothetical protein, conserved	6869.t00021	6,0	1,6	2,7	1,0	11,2	-1
SG00480	small GTP-binding protein Rab1, putative	4716.t00003	3,0	0,8	3,6	2,5	9,8	-1
SG02023	lysyl-tRNA synthetase, putative	7944.t00003	4,0	0,8	4,5	1,0	10,2	-1
SG02691	ATP-dependent zinc metallopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MA(E), family M41, putative	6858.t00008	6,0	0,8	0,9	1,5	9,2	-1
SG02642	proteasome alpha 5 subunit, putative	4893.t00017	5,0	1,6	1,8	0,5	8,8	-1
SG01630	hypothetical protein, conserved	8587.t00001	6,0	0,8	2,7	0,0	9,5	-1
SG05270	imidazolonepropionase, putative	7853.t00014	3,0	0,8	3,6	0,5	7,8	-1
SG02371	aminopeptidase P, putative metallo-peptidase, clan MG, family M24, putative	5984.t00005	3,0	0,8	2,7	0,5	7,0	-1
SG02686	hypothetical protein, conserved	4821.t00012	4,0	0,8	0,0	1,0	5,8	-1
SG00944	ubiquitin-like protein, putative	8808.t00002	3,0	0,8	0,9	0,5	5,2	-1
SG02530	calpain cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	6998.t00020	3,0	0,8	0,0	1,0	4,8	-1
SG03050	dynein, putative	8765.t00018	3,0	0,8	0,0	0,0	3,8	-1

Tabela 4.14. Proteínas diferencialmente expressas nas formas epimastigotas submetidos ao estresse de pH. Na coluna IBMPid número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP. Seguido pela descrição da proteína identificada (descrição), identificador no genoma do T. cruzi (gene ID). Nas colunas denominadas Epi, pH, TAU e Temp os valores normalizados dos peptídeos. Na coluna Status pH os números 1 representa as proteínas com expressão aumentadas no estresse em questão e o número -1 as proteínas com expressão diminuídas.

IBMPid	Descrição	GeneID	Epi	pH	TAU	Temp	Total	Status TAU
SG02155	poly(A)-binding protein, putative polyadenylate-binding protein, putative	7739.t00014	5,0	9,3	15,2	17,5	47,0	1
SG01524	40S ribosomal protein S12, putative	7648.t00002	3,0	9,3	9,8	7,0	29,1	1
SG01475	60S ribosomal protein L9, putative	4949.t00001	1,0	5,4	7,1	4,5	18,1	1
SG03726	hypothetical protein, conserved	5075.t00002	2,0	3,9	7,1	5,0	18,0	1
SG01844	hypothetical protein, conserved	7018.t00012	1,0	4,7	5,4	5,5	16,5	1
SG02515	hypothetical protein, conserved	6996.t00041	1,0	6,2	3,6	5,5	16,3	1
SG02653	Hsc70-interacting protein (Hip), putative	7717.t00021	1,0	6,2	3,6	3,5	14,3	1
SG02309	hypothetical protein, conserved	7579.t00010	2,0	3,9	6,3	3,0	15,1	1
SG01428	glucokinase 1, putative	8328.t00010	1,0	5,4	7,1	1,5	15,1	1
SG02621	10 kDa heat shock protein, putative	5730.t00003	1,0	3,9	3,6	4,5	12,9	1
SG06219	hypothetical protein, conserved	7541.t00027	1,0	3,9	4,5	3,0	12,3	1
SG01748	14-3-3 protein, putative	7898.t00018	1,0	2,3	3,6	4,0	10,9	1
SG00949	L-threonine 3-dehydrogenase, putative	7529.t00001	1,0	2,3	3,6	4,0	10,9	1
SG03053	ubiquitin-activating enzyme E1, putative	6288.t00025	1,0	3,9	5,4	0,5	10,7	1
SG01497	60S ribosomal protein L13a, putative	6849.t00002	1,0	1,6	4,5	1,0	8,0	1
SG00982	hypothetical protein, conserved	7678.t00015	1,0	2,3	3,6	0,5	7,4	1
SG01332	protein kinase A regulatory subunit, putative	6860.t00015	1,0	1,6	4,5	0,0	7,0	1
SG01448	protein kinase, putative	8634.t00006	1,0	0,8	3,6	0,5	5,8	1
SG02458	proteasome activator protein PA26, putative	4779.t00001	0,0	7,0	8,9	6,5	22,4	1
SG04206	synaptojanin (N-terminal domain), putative inositol/phosphatidylinositol phosphatase, putative	7739.t00006	0,0	0,0	19,7	0,0	19,7	1
SG05795	chaperonin HSP60, putative	5641.t00003	0,0	1,6	3,6	5,0	10,1	1
SG01884	t-complex protein 1, delta subunit, putative	8171.t00020	0,0	1,6	4,5	4,0	10,0	1
SG02357	ubiquitin-conjugating enzyme-like, putative	4858.t00005	0,0	2,3	4,5	1,0	7,8	1
SG01051	aminopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MG, family M24, putative	6853.t00020	0,0	2,3	3,6	1,5	7,4	1
SG07415	hypothetical protein, conserved	7147.t00005	0,0	2,3	3,6	1,0	6,9	1
SG01168	hypothetical protein, conserved	7130.t00010	0,0	2,3	3,6	1,0	6,9	1
SG01849	25 kDa translation elongation factor 1-beta	8185.t00010	0,0	0,0	3,6	2,5	6,1	1
SG01078	hypothetical protein, conserved	4754.t00003	0,0	0,8	3,6	1,5	5,8	1
SG00957	NADH-dependent fumarate reductase, putative	4592.t00004	0,0	0,0	4,5	0,5	5,0	1
SG03013	enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor, putative	7617.t00013	0,0	0,0	3,6	1,0	4,6	1
SG03104	hypothetical protein, conserved	5334.t00002	0,0	0,0	3,6	0,0	3,6	1
SG00807	kinesin, putative	6974.t00008	13,0	3,1	0,0	4,5	20,6	-1
SG01952	RNA-binding protein, putative	8069.t00006	4,0	4,7	0,0	4,5	13,2	-1
SG02565	hypothetical protein, conserved	7561.t00015	7,0	1,6	0,0	2,0	10,6	-1
SG02699	proteasome alpha 2 subunit, putative	1112.t00001	5,0	3,1	0,0	2,0	10,1	-1
SG00827	ATP-dependent RNA helicase, putative	8458.t00009	5,0	3,9	0,0	1,0	9,9	-1
SG07725	dynein heavy chain, cytosolic, putative	8421.t00001	7,0	0,0	0,0	1,5	8,5	-1
SG01566	translation initiation factor, putative	8653.t00006	3,0	3,1	0,0	1,0	7,1	-1
SG00172	NADH-cytochrome B5 reductase, putative	8794.t00004	4,0	2,3	0,0	1,0	7,3	-1
SG01518	40S ribosomal protein S24E, putative	7431.t00015	3,0	1,6	0,0	1,5	6,1	-1
SG02686	hypothetical protein, conserved	4821.t00012	4,0	0,8	0,0	1,0	5,8	-1
SG05100	ubiquitin hydrolase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	7617.t00012	3,0	3,1	0,0	0,0	6,1	-1
SG02530	calpain cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	6998.t00020	3,0	0,8	0,0	1,0	4,8	-1
SG01022	RNA-binding protein, putative	6853.t00007	4,0	1,6	0,0	0,0	5,6	-1
SG03050	dynein, putative	8765.t00018	3,0	0,8	0,0	0,0	3,8	-1
SG04405	hypothetical protein, conserved	6952.t00012	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG08000	hypothetical protein, conserved	5781.t00003	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG06533	hypothetical protein, conserved	8565.t00008	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1

IBMPid	Descrição	GeneID	Epi	pH	TAU	Temp	Total	Status TAU
SG02176	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	5414.t00001	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG02638	hypothetical protein, conserved	6996.t00055	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG05711	hypothetical protein, conserved	8557.t00002	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1
SG02368	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative	6222.t00001	12,0	8,5	1,8	3,5	25,8	-1
SG00515	40S ribosomal protein S17, putative	7887.t00007	9,0	7,8	2,7	5,0	24,4	-1
SG01815	hypothetical protein, conserved	6916.t00003	7,0	8,5	1,8	6,0	23,3	-1
SG04478	hypothetical protein, conserved	8534.t00021	14,0	0,0	3,6	7,0	24,6	-1
SG02278	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, putative	6086.t00016	10,0	6,2	2,7	5,0	23,9	-1
SG00952	cysteine peptidase inhibitor, putative chagasin, putative	5393.t00008	6,0	5,4	1,8	6,0	19,2	-1
SG01205	Gim5A protein, putative glycosomal membrane protein, putative	7739.t00057	8,0	5,4	0,9	5,0	19,3	-1
SG00683	hypothetical protein, conserved	4805.t00009	8,0	3,9	1,8	4,5	18,2	-1
SG02667	chaperonin alpha subunit, putative	6143.t00004	6,0	5,4	0,9	3,5	15,8	-1
SG01537	nitrilase, putative	5829.t00004	6,0	3,9	0,9	4,5	15,3	-1
SG02170	hypothetical protein, conserved	4859.t00002	3,0	3,9	0,9	5,0	12,8	-1
SG02151	chaperonin, putative T-complex protein 1, theta subunit, putative	6869.t00005	3,0	3,1	0,9	4,5	11,5	-1
SG04506	tyrosyl or methionyl-tRNA synthetase, putative	7003.t00003	3,0	2,3	0,9	4,5	10,7	-1
SG01931	calpain-like cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	8502.t00001	5,0	0,8	0,9	4,0	10,7	-1
SG02669	hypothetical protein, conserved	5615.t00002	6,0	2,3	1,8	1,0	11,1	-1
SG02764	leucyl-tRNA synthetase, putative	5766.t00001	3,0	1,6	0,9	3,0	8,4	-1
SG02641	UV excision repair RAD23-like protein, putative	7110.t00006	3,0	2,3	0,9	2,0	8,2	-1
SG02445	nucleolar protein, putative	6154.t00006	5,0	3,1	0,9	0,5	9,5	-1
SG01550	hypothetical protein, conserved	8422.t00011	3,0	3,1	0,9	1,5	8,5	-1
SG02691	ATP-dependent zinc metallopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MA(E), family M41, putative	6858.t00008	6,0	0,8	0,9	1,5	9,2	-1
SG02626	lectin, putative	6841.t00002	3,0	1,6	0,9	2,0	7,4	-1
SG01775	hypothetical protein, conserved	7552.t00008	4,0	2,3	0,9	1,0	8,2	-1
SG00564	histone H3 variant, putative	6974.t00015	4,0	1,6	0,9	1,0	7,4	-1
SG02961	p21 antigen protein, putative	5408.t00004	3,0	2,3	0,9	1,0	7,2	-1
SG01060	hypothetical protein, conserved	7744.t00027	4,0	1,6	0,9	0,0	6,4	-1
SG01512	ribosomal protein L37, putative	7127.t00055	4,0	0,0	0,9	0,5	5,4	-1
SG00944	ubiquitin-like protein, putative	8808.t00002	3,0	0,8	0,9	0,5	5,2	-1
SG01958	nucleolar RNA-binding protein, putative	7417.t00007	4,0	0,0	0,9	0,5	5,4	-1

Tabela 4.15. Proteínas diferencialmente expressas nas formas epimastigotas submetidos ao estresse nutricional (TAU). Na coluna IBMPid número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP. Seguido pela descrição da proteína identificada (descrição), identificador no genoma do *T. cruzi* (gene ID). Nas colunas denominadas Epi, pH, TAU e Temp os valores normalizados dos peptídeos. Na coluna Status TAU os números 1 representa as proteínas com expressão aumentadas no estresse em questão e o número -1 as proteínas com expressão diminuídas.

IBMPid	Descrição	GeneID	Epi	pH	TAU	Temp	Total	Status	Temp
SG02155	poly(A)-binding protein, putative polyadenylate-binding protein, putative	7739.t00014	5,0	9,3	15,2	17,5	47,0	1	
SG01568	hypothetical protein, conserved	5738.t00007	2,0	3,9	4,5	7,0	17,3	1	
SG01475	60S ribosomal protein L9, putative	4949.t00001	1,0	5,4	7,1	4,5	18,1	1	
SG01844	hypothetical protein, conserved	7018.t00012	1,0	4,7	5,4	5,5	16,5	1	
SG02515	hypothetical protein, conserved	6996.t00041	1,0	6,2	3,6	5,5	16,3	1	
SG04385	cyclophilin, putative	6934.t00008	2,0	3,9	3,6	6,5	15,9	1	
SG02653	Hsc70-interacting protein (Hip), putative	7717.t00021	1,0	6,2	3,6	3,5	14,3	1	
SG02621	10 kDa heat shock protein, putative	5730.t00003	1,0	3,9	3,6	4,5	12,9	1	
SG02710	hypothetical protein, conserved	5910.t00001	1,0	3,1	2,7	4,0	10,8	1	
SG01748	14-3-3 protein, putative	7898.t00018	1,0	2,3	3,6	4,0	10,9	1	
SG00949	L-threonine 3-dehydrogenase, putative	7529.t00001	1,0	2,3	3,6	4,0	10,9	1	
SG01496	60S acidic ribosomal protein P2, putative	6761.t00007	1,0	2,3	1,8	4,0	9,1	1	
SG02384	chaperone DnaJ protein, putative	8343.t00003	1,0	0,8	2,7	3,5	8,0	1	
SG02709	hypothetical protein, conserved	5516.t00002	1,0	3,1	0,0	3,5	7,6	1	
SG02612	RNA-binding protein, putative	7206.t00022	1,0	0,0	1,8	4,5	7,3	1	
SG05204	hypothetical protein, conserved	7766.t00001	1,0	0,8	0,0	4,0	5,8	1	
SG00393	RNA-binding protein, putative	6191.t00027	1,0	0,0	0,9	4,0	5,9	1	
SG03065	hypothetical protein, conserved	6770.t00011	0,0	7,8	0,0	17,0	24,7	1	
SG02458	proteasome activator protein PA26, putative	4779.t00001	0,0	7,0	8,9	6,5	22,4	1	
SG01465	ribosomal protein S26, putative	4759.t00002	0,0	4,7	1,8	4,5	10,9	1	
SG05795	chaperonin HSP60, putative	5641.t00003	0,0	1,6	3,6	5,0	10,1	1	
SG01884	t-complex protein 1, delta subunit, putative	8171.t00020	0,0	1,6	4,5	4,0	10,0	1	
SG02503	ATP synthase F1 subunit gamma protein, putative	4893.t00008	0,0	2,3	1,8	5,0	9,1	1	
SG00548	alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative	4766.t00001	0,0	1,6	0,9	5,0	7,4	1	
SG02024	protein disulfide isomerase, putative	5730.t00001	0,0	1,6	0,0	4,0	5,5	1	
SG00421	ribose 5-phosphate isomerase, putative	7797.t00014	0,0	0,8	1,8	3,5	6,1	1	
SG03809	hypothetical protein, conserved	7617.t00045	0,0	1,6	0,0	4,0	5,5	1	
SG02864	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase, putative	8359.t00020	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0	1	
SG02103	hypothetical protein, conserved	4897.t00003	4,0	4,7	1,8	0,0	10,4	-1	
SG01630	hypothetical protein, conserved	8587.t00001	6,0	0,8	2,7	0,0	9,5	-1	
SG02999	replication factor A, 51kDa subunit, putative	8538.t00006	3,0	3,1	1,8	0,0	7,9	-1	
SG01060	hypothetical protein, conserved	7744.t00027	4,0	1,6	0,9	0,0	6,4	-1	
SG05100	ubiquitin hydrolase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	7617.t00012	3,0	3,1	0,0	0,0	6,1	-1	
SG02602	mitochondrial RNA binding protein 1, putative	5790.t00006	3,0	1,6	1,8	0,0	6,3	-1	
SG01022	RNA-binding protein, putative	6853.t00007	4,0	1,6	0,0	0,0	5,6	-1	
SG03050	dynein, putative	8765.t00018	3,0	0,8	0,0	0,0	3,8	-1	
SG04405	hypothetical protein, conserved	6952.t00012	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1	
SG08000	hypothetical protein, conserved	5781.t00003	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1	
SG06533	hypothetical protein, conserved	8565.t00008	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1	
SG02176	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	5414.t00001	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1	
SG02638	hypothetical protein, conserved	6996.t00055	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1	
SG05711	hypothetical protein, conserved	8557.t00002	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-1	
SG02247	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor, putative	8509.t00006	24,0	11,7	14,3	6,5	56,4	-1	
SG00632	adenosine 5'-monophosphoramidase, putative	8632.t00016	10,0	9,3	8,0	3,0	30,4	-1	
SG02542	mitochondrial RNA binding protein, putative	7145.t00006	8,0	11,7	8,0	2,0	29,7	-1	
SG01615	microtubule-associated protein, putative	6169.t00008	9,0	7,0	9,8	2,0	27,8	-1	
SG01474	40S ribosomal protein S9, putative	4940.t00003	11,0	7,0	6,3	3,0	27,2	-1	
SG02368	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative	6222.t00001	12,0	8,5	1,8	3,5	25,8	-1	
SG00986	casein kinase, putative	7292.t00002	8,0	8,5	5,4	2,5	24,4	-1	
SG02637	mitochondrial RNA-binding protein 2, putative MRP2, putative gBP25, putative	7083.t00026	8,0	6,2	2,7	2,5	19,4	-1	
SG00282	60S ribosomal protein L18, putative	4556.t00004	6,0	4,7	5,4	2,0	18,0	-1	
SG02842	RNA-binding protein, putative	5573.t00004	6,0	4,7	4,5	2,0	17,1	-1	
SG02529	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase, putative	4826.t00002	3,0	7,0	6,3	0,5	16,7	-1	
SG02968	cytochrome b5, putative	7091.t00019	4,0	5,4	5,4	1,0	15,8	-1	
SG00486	ribosomal protein L3, putative	4865.t00012	4,0	6,2	3,6	1,0	14,8	-1	
SG01331	protein kinase, putative mitogen-activated protein kinase, putative	6853.t00021	7,0	2,3	3,6	2,0	14,9	-1	
SG06411	tyrosyl-tRNA synthetase, putative	8251.t00018	5,0	5,4	2,7	1,0	14,1	-1	
SG01479	60S ribosomal protein L6, putative	5506.t00005	5,0	4,7	3,6	1,0	14,2	-1	
SG02354	reiske iron-sulfur protein precursor, putative	8486.t00012	5,0	4,7	2,7	1,5	13,8	-1	

IBMPid	Descrição	GeneID	Epi	pH	TAU	Temp	Total	Status Temp
SG02945	fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative	7038.t00007	7,0	1,6	2,7	2,0	13,2	-1
SG01686	carboxypeptidase, putative metallo-peptidase, clan MA(E), family M32, putative	4935.t00016	7,0	3,1	2,7	1,0	13,8	-1
SG01484	ubiquitin/ribosomal protein S27a, putative	5915.t00008	3,0	3,9	4,5	1,0	12,3	-1
SG05977	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative	6191.t00014	4,0	4,7	1,8	1,0	11,4	-1
SG02565	hypothetical protein, conserved	7561.t00015	7,0	1,6	0,0	2,0	10,6	-1
SG02669	hypothetical protein, conserved	5615.t00002	6,0	2,3	1,8	1,0	11,1	-1
SG02360	hypothetical protein, conserved	6869.t00021	6,0	1,6	2,7	1,0	11,2	-1
SG02497	seryl-tRNA synthetase, putative	6064.t00001	4,0	4,7	1,8	0,5	10,9	-1
SG02023	lysyl-tRNA synthetase, putative	7944.t00003	4,0	0,8	4,5	1,0	10,2	-1
SG00827	ATP-dependent RNA helicase, putative	8458.t00009	5,0	3,9	0,0	1,0	9,9	-1
SG02522	asparagine synthetase A, putative	4671.t00001	3,0	2,3	2,7	1,0	9,0	-1
SG02908	putative phosphotyrosyl phosphate activator protein, putative	6495.t00009	3,0	3,1	1,8	1,0	8,9	-1
SG02445	nucleolar protein, putative	6154.t00006	5,0	3,1	0,9	0,5	9,5	-1
SG02691	ATP-dependent zinc metallopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MA(E), family M41, putative	6858.t00008	6,0	0,8	0,9	1,5	9,2	-1
SG02642	proteasome alpha 5 subunit, putative	4893.t00017	5,0	1,6	1,8	0,5	8,8	-1
SG02471	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, putative	6903.t00007	3,0	1,6	3,6	0,5	8,6	-1
SG01775	hypothetical protein, conserved	7552.t00008	4,0	2,3	0,9	1,0	8,2	-1
SG07725	dynein heavy chain, cytosolic, putative	8421.t00001	7,0	0,0	0,0	1,5	8,5	-1
SG00305	cytochrome c oxidase VIII (COX VIII), putative	8680.t00011	3,0	3,1	1,8	0,5	8,4	-1
SG01835	hypothetical protein, conserved	8656.t00008	4,0	1,6	2,7	0,5	8,7	-1
SG00484	centrin, putative Ca2+-binding EF-hand protein, putative	7685.t00006	3,0	1,6	2,7	1,0	8,2	-1
SG02186	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein, putative	6976.t00001	2,0	2,3	2,7	0,5	7,5	-1
SG00564	histone H3 variant, putative	6974.t00015	4,0	1,6	0,9	1,0	7,4	-1
SG01566	translation initiation factor, putative	8653.t00006	3,0	3,1	0,0	1,0	7,1	-1
SG00673	hypothetical protein, conserved	4707.t00007	3,0	1,6	1,8	1,0	7,3	-1
SG02961	p21 antigen protein, putative	5408.t00004	3,0	2,3	0,9	1,0	7,2	-1
SG06052	asparaginyl-tRNA synthetase, putative	6996.t00035	2,0	3,1	1,8	0,5	7,4	-1
SG05270	imidazolonepropionase, putative	7853.t00014	3,0	0,8	3,6	0,5	7,8	-1
SG00172	NADH-cytochrome B5 reductase, putative	8794.t00004	4,0	2,3	0,0	1,0	7,3	-1
SG02371	aminopeptidase P, putative metallo-peptidase, clan MG, family M24, putative	5984.t00005	3,0	0,8	2,7	0,5	7,0	-1
SG01501	ribosomal protein L21E (60S), putative	6931.t00018	3,0	1,6	1,8	0,5	6,8	-1
SG02686	hypothetical protein, conserved	4821.t00012	4,0	0,8	0,0	1,0	5,8	-1
SG01173	aminopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MF, family M17, putative	7875.t00024	2,0	2,3	0,0	0,5	4,8	-1
SG01512	ribosomal protein L37, putative	7127.t00055	4,0	0,0	0,9	0,5	5,4	-1
SG00944	ubiquitin-like protein, putative	8808.t00002	3,0	0,8	0,9	0,5	5,2	-1
SG02627	hypothetical protein, conserved	5668.t00003	2,0	2,3	0,0	0,5	4,8	-1
SG02530	calpain cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	6998.t00020	3,0	0,8	0,0	1,0	4,8	-1
SG01958	nucleolar RNA-binding protein, putative	7417.t00007	4,0	0,0	0,9	0,5	5,4	-1
SG05545	hypothetical protein	8257.t00002	2,0	0,0	1,8	0,5	4,3	-1
SG02721	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8, putative	7402.t00031	2,0	1,6	0,0	0,5	4,1	-1
SG01176	hypothetical protein, conserved	8421.t00013	2,0	0,0	0,0	0,5	2,5	-1
SG06282	hypothetical protein, conserved	7740.t00002	2,0	0,0	0,0	0,5	2,5	-1
SG08036	hypothetical protein, conserved	7414.t00007	2,0	0,0	0,0	0,5	2,5	-1
SG00314	succinate dehydrogenase, putative	6451.t00003	2,0	0,0	0,0	0,5	2,5	-1

Tabela 4.16. Proteínas diferencialmente expressas nas formas epimastigotas submetidos ao estresse temperatura (Temp). Na coluna IBMPid número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP. Seguido pela descrição da proteína identificada (descrição), identificador no genoma do *T. cruzi* (gene ID). Nas colunas denominadas Epi, pH, TAU e Temp os valores normalizados dos peptídeos. Na coluna Status Temp os números 1 representam as proteínas com expressão aumentadas no estresse em questão e o número -1 as proteínas com expressão diminuídas.

Após a retirada da redundância, a distribuição dessas proteínas diferencialmente expressas nos diferentes estresses em relação a epimastigotas pode ser visto no Gráfico 4.15. De maneira geral, a intersecção entre os diferentes estresses é menor do que a quantidade de proteínas identificadas em somente um dos diferentes estresses.

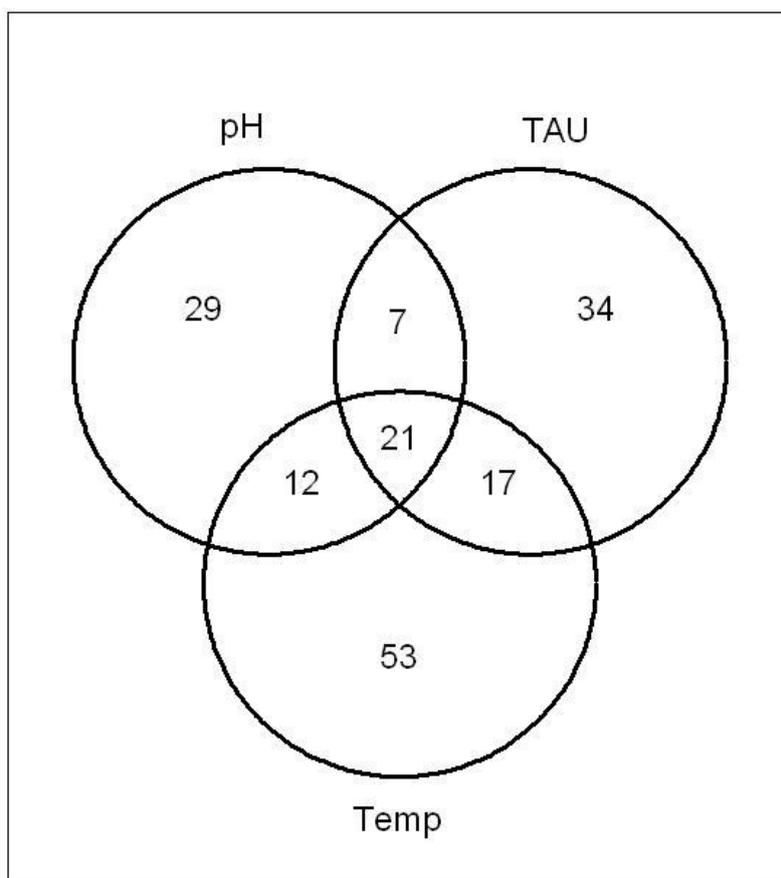


Gráfico 4.15. Diagrama de Venn demonstrando as proteínas diferencialmente expressas nos distintos tipos de estresse em relação à EPI 5 dias

Após esta análise e retirada a redundância, 173 proteínas foram selecionadas como sendo diferencialmente expressas nos ensaios de estresses propostos. Portanto, três situações foram descritas:

- a) Proteínas representadas por serem compartilhadas pelos três estresses (n=21).

b) Proteínas presentes em apenas dois tipos de estresse, neste caso, 7 proteínas foram selecionadas como sendo comuns ao estresse de pH e estresse nutricional (TAU); 12 proteínas eram compartilhadas pelo estresse de pH e temperatura e 17 proteínas estavam presentes tanto no estresse nutricional quanto no de temperatura.

c) Proteínas associadas exclusivamente a um dos estresses realizados. As proteínas presentes apenas no estresse de pH (n=29); proteínas presente somente no estresse nutricional (n=34) e proteínas exclusivas do estresse de temperatura (n=53).

A visualização destas representações de proteínas pode ser observada nas tabelas abaixo:

SG	Descrição
SG02621	10 kDa heat shock protein, putative
SG01475	60S ribosomal protein L9, putative
SG02691	ATP-dependent zinc metallopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MA(E), family M41, putative
SG02530	calpain cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative
SG07725	dynein heavy chain, cytosolic, putative
SG03050	dynein, putative
SG02176	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative
SG02653	Hsc70-interacting protein (Hip), putative
SG01844	hypothetical protein, conserved
SG02515	hypothetical protein, conserved
SG04405	hypothetical protein, conserved
SG08000	hypothetical protein, conserved
SG06533	hypothetical protein, conserved
SG02638	hypothetical protein, conserved
SG05711	hypothetical protein, conserved
SG02565	hypothetical protein, conserved
SG02686	hypothetical protein, conserved
SG01958	nucleolar RNA-binding protein, putative
SG02458	proteasome activator protein PA26, putative
SG01512	ribosomal protein L37, putative
SG00944	ubiquitin-like protein, putative

Tabela 4.17. Proteínas presentes nos três tipos de estresses realizados. Na coluna SG número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP.

SG	Descrição
SG01524	40S ribosomal protein S12, putative
SG01931	calpain-like cysteine peptidase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative
SG01428	glucokinase 1, putative
SG06219	hypothetical protein, conserved
SG04478	hypothetical protein, conserved
SG00807	kinesin, putative
SG03053	ubiquitin-activating enzyme E1, putative

Tabela 4.18. Proteínas representadas em dois tipos de estresses distintos (estresse de pH e estresse nutricional). Na coluna SG número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP.

SG	Descrição
SG02371	aminopeptidase P, putative metallo-peptidase, clan MG, family M24, putative
SG02945	fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic, putative
SG02710	hypothetical protein, conserved
SG02709	hypothetical protein, conserved
SG03065	hypothetical protein, conserved
SG02360	hypothetical protein, conserved
SG01630	hypothetical protein, conserved
SG05270	imidazolonepropionase, putative
SG02023	lysyl-tRNA synthetase, putative
SG02642	proteasome alpha 5 subunit, putative
SG01331	protein kinase, putative mitogen-activated protein kinase, putative
SG01465	ribosomal protein S26, putative

Tabela 4.19. Proteínas presentes em dois tipos de estresses (estresse de pH e temperatura). Na coluna SG número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP.

SG	Descrição
SG01748	14-3-3 protein, putative
SG02368	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative
SG00827	ATP-dependent RNA helicase, putative
SG05795	chaperonin HSP60, putative
SG00564	histone H3 variant, putative
SG02669	hypothetical protein, conserved
SG01775	hypothetical protein, conserved
SG01060	hypothetical protein, conserved
SG00949	L-threonine 3-dehydrogenase, putative
SG00172	NADH-cytochrome B5 reductase, putative
SG02445	nucleolar protein, putative
SG02961	p21 antigen protein, putative
SG02155	poly(A)-binding protein, putative polyadenylate-binding protein, putative
SG01022	RNA-binding protein, putative
SG01884	t-complex protein 1, delta subunit, putative
SG01566	translation initiation factor, putative
SG05100	ubiquitin hydrolase, putative cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative

Tabela 4.20. Proteínas presentes tanto em estresse nutricional quanto no estresse de temperatura. Na coluna SG número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP.

SG	Descrição
SG03696	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit, putative
SG02588	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor, putative
SG00960	40S ribosomal protein S6, putative
SG00374	60S ribosomal subunit protein L31, putative
SG02436	ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor, putative ADP/ATP translocase 1, putative
SG02498	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100), putative
SG02680	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
SG01193	dihydrolipoamide branched chain transacylase, putative
SG00452	dynammin, putative vacuolar sortin protein 1, putative
SG02656	dynein light chain, putative
SG00588	flagellar calcium-binding protein, putative
SG02671	gamma-glutamylcysteine synthetase, putative
SG02255	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative
SG00359	hypothetical protein
SG02374	hypothetical protein, conserved
SG00336	hypothetical protein, conserved
SG06185	hypothetical protein, conserved
SG00532	hypothetical protein, conserved
SG00542	hypothetical protein, conserved
SG02761	inorganic pyrophosphatase, putative
SG02990	MCAK-like kinesin, putative
SG02673	mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative
SG02468	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative metallo-peptidase, Clan ME, Family M16, putative
SG01536	orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase, putative OMPDCase-OPRTase, putative
SG02347	proteasome alpha 1 subunit, putative
SG01872	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative
SG00480	small GTP-binding protein Rab1, putative
SG02473	succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor, putative
SG02528	thioredoxin, putative

Tabela 4.21. Proteínas diferencialmente expressas presentes somente no estresse de pH. Na coluna SG número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP.

SG	Descrição
SG01849	25 kDa translation elongation factor 1-beta
SG00515	40S ribosomal protein S17, putative
SG01518	40S ribosomal protein S24E, putative
SG01497	60S ribosomal protein L13a, putative
SG01051	aminopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MG, family M24, putative
SG02667	chaperonin alpha subunit, putative
SG02151	chaperonin, putative T-complex protein 1, theta subunit, putative
SG00952	cysteine peptidase inhibitor, putative chagasin, putative
SG03013	enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor, putative
SG01205	Gim5A protein, putative glycosomal membrane protein, putative
SG03726	hypothetical protein, conserved
SG02309	hypothetical protein, conserved
SG00982	hypothetical protein, conserved
SG07415	hypothetical protein, conserved
SG01168	hypothetical protein, conserved
SG01078	hypothetical protein, conserved
SG03104	hypothetical protein, conserved
SG01815	hypothetical protein, conserved
SG00683	hypothetical protein, conserved
SG02170	hypothetical protein, conserved
SG01550	hypothetical protein, conserved
SG02626	lectin, putative
SG02764	leucyl-tRNA synthetase, putative
SG00957	NADH-dependent fumarate reductase, putative
SG01537	nitrilase, putative
SG02699	proteasome alpha 2 subunit, putative
SG01332	protein kinase A regulatory subunit, putative
SG01448	protein kinase, putative
SG02278	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, putative
SG01952	RNA-binding protein, putative
SG04206	synaptojanin (N-terminal domain), putative inositol/phosphatidylinositol phosphatase, putative
SG04506	tyrosyl or methionyl-tRNA synthetase, putative
SG02357	ubiquitin-conjugating enzyme-like, putative
SG02641	UV excision repair RAD23-like protein, putative

Tabela 4.22. Proteínas diferencialmente expressas representadas exclusivamente no estresse nutricional. Na coluna SG número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP.

SG	Descrição
SG02471	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component, putative
SG02529	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase, putative
SG01474	40S ribosomal protein S9, putative
SG01496	60S acidic ribosomal protein P2, putative
SG00282	60S ribosomal protein L18, putative
SG01479	60S ribosomal protein L6, putative
SG00632	adenosine 5'-monophosphoramidase, putative
SG00548	alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative
SG01173	aminopeptidase, putative metallo-peptidase, clan MF, family M17, putative
SG02522	asparagine synthetase A, putative
SG06052	asparaginyl-tRNA synthetase, putative
SG02503	ATP synthase F1 subunit gamma protein, putative
SG01686	carboxypeptidase, putative metallo-peptidase, clan MA(E), family M32, putative
SG00986	casein kinase, putative
SG00484	centrin, putative Ca2+-binding EF-hand protein, putative
SG02384	chaperone DnaJ protein, putative
SG04385	cyclophilin, putative
SG02968	cytochrome b5, putative
SG00305	cytochrome c oxidase VIII (COX VIII), putative
SG02721	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8, putative
SG02864	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase, putative
SG05545	hypothetical protein
SG01568	hypothetical protein, conserved
SG05204	hypothetical protein, conserved
SG03809	hypothetical protein, conserved
SG02103	hypothetical protein, conserved
SG01835	hypothetical protein, conserved
SG00673	hypothetical protein, conserved
SG02627	hypothetical protein, conserved
SG01176	hypothetical protein, conserved
SG06282	hypothetical protein, conserved
SG08036	hypothetical protein, conserved
SG01615	microtubule-associated protein, putative
SG02602	mitochondrial RNA binding protein 1, putative
SG02542	mitochondrial RNA binding protein, putative
SG02637	mitochondrial RNA-binding protein 2, putative MRP2, putative gBP25, putative
SG02186	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase-like protein, putative
SG05977	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative
SG02024	protein disulfide isomerase, putative
SG02908	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B, putative phosphotyrosyl phosphate activator protein, putative
SG02354	reiske iron-sulfur protein precursor, putative
SG02999	replication factor A, 51kDa subunit, putative
SG02247	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor, putative
SG00421	ribose 5-phosphate isomerase, putative
SG01501	ribosomal protein L21E (60S), putative
SG00486	ribosomal protein L3, putative
SG02612	RNA-binding protein, putative
SG00393	RNA-binding protein, putative
SG02842	RNA-binding protein, putative
SG02497	seryl-tRNA synthetase, putative
SG00314	succinate dehydrogenase, putative
SG06411	tyrosyl-tRNA synthetase, putative
SG01484	ubiquitin/ribosomal protein S27a, putative

Tabela 4.23. Proteínas diferencialmente expressas presentes apenas no estresse de temperatura. Na coluna SG número identificador utilizado pelo laboratório de Bioinformática no IBMP.

As proteínas diferencialmente expressas nos diferentes tipos de estresse foram submetidas a um agrupamento hierárquico. Cabe salientar que as análises de agrupamento foram feitas a partir de comparações dos estresses tendo como referência os epimastigotas (EPI 5 DIAS). Na observação geral do gráfico é possível notar que a maior parte das proteínas possui um perfil de diminuição entre os estresses e em menor proporção também há uma tendência de perfis aumentados em algumas proteínas. Esta análise mostrou uma dinâmica complexa de variados padrões de representação das proteínas selecionadas como diferenciais nos estresses. Em muitos casos, as alterações parecem ser tênues e, em outros, mais acentuadas (Figura 4.6). Ainda assim, alguns padrões interessantes sobressaem, como por exemplo:

- Grupo de proteínas com padrão coeso de diminuição (cor verde) em todos os estresses (Figura 4.7).
- Grupo de proteínas com padrão coeso de aumento (cor vermelha) em todos os estresses (Figura 4.8).
- Algumas proteínas mostram um padrão de aumento ou diminuição em apenas um dos tipos de estresse (Figura 4.9).
- Outras possuem um padrão de aumento ou diminuição em dois tipos de estresse em relação a um tipo de estresse que tem um padrão de expressão igual (cor preta) à forma epimastigota, portanto, aparece ilustrado na cor preta (Figura 4.10).

A fim de melhor visualizar as descrições citadas acima pode-se observar as figuras a seguir.

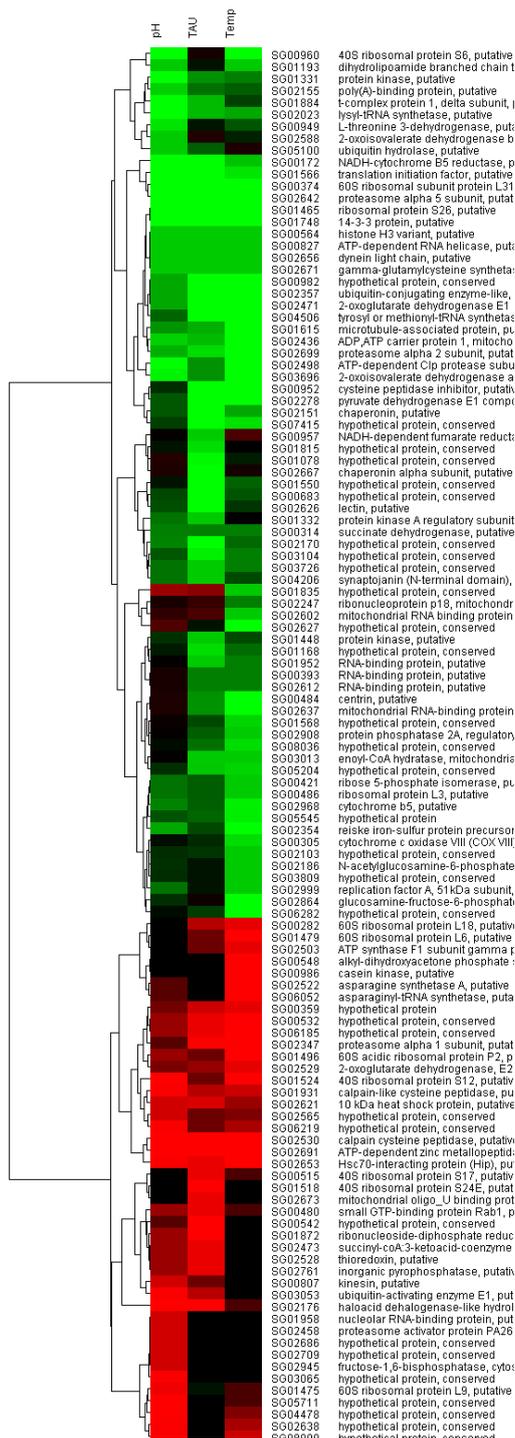


Figura 4.6. Visualização geral dos resultados do agrupamento das proteínas diferencialmente expressas nos estresses de pH, nutricional (TAU) e temperatura (Temp). A cor vermelha representa aumento, verde a diminuição e em preto, expressão igual às formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (EPI 5 DIAS – referência).

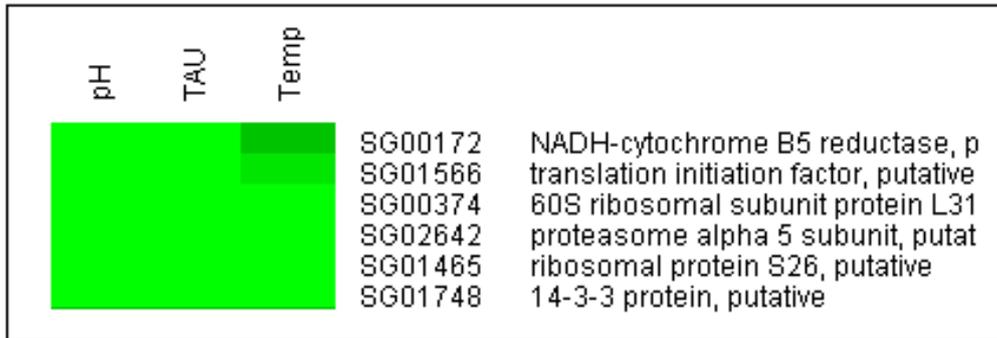


Figura 4.7. Visualização parcial dos resultados do agrupamento das proteínas diferencialmente expressas nos estresses de pH, nutricional (TAU) e temperatura (Temp) mostrando um padrão de diminuição da expressão (cor verde).

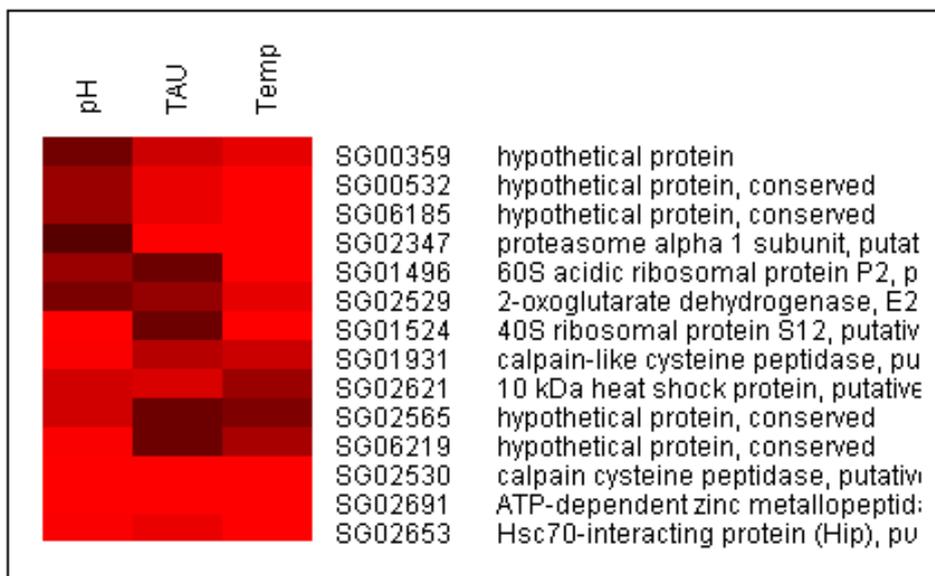


Figura 4.8. Visualização parcial dos resultados do agrupamento das proteínas diferencialmente expressas nos estresses de pH, nutricional (TAU) e temperatura (Temp) mostrando um padrão de aumento da expressão (cor vermelha).

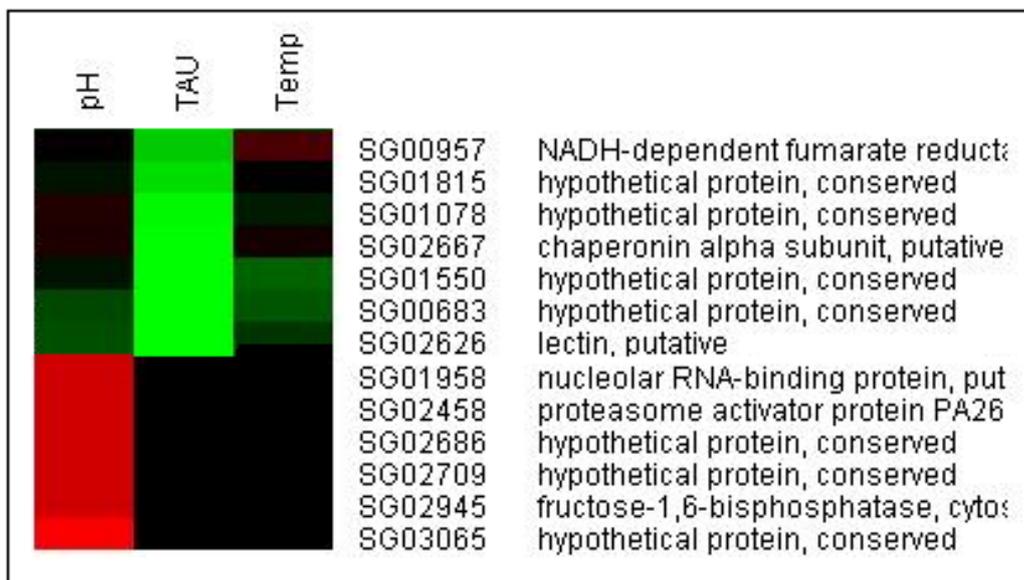


Figura 4.9. Visualização parcial dos resultados do agrupamento das proteínas diferencialmente expressas nos estresses de pH, nutricional (TAU) e temperatura (Temp) mostrando um padrão de expressão de diminuição (cor verde) ou aumento (cor vermelha) em apenas um tipo de estresse.

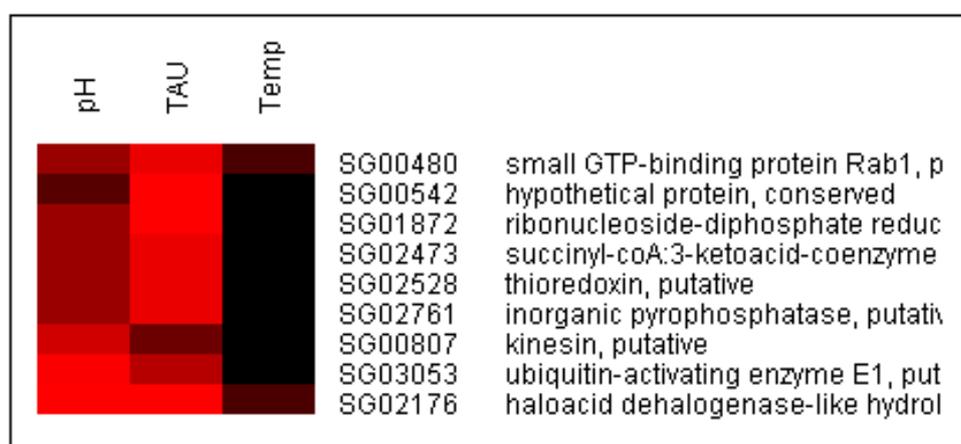


Figura 4.10. Visualização parcial dos resultados do agrupamento das proteínas diferencialmente expressas nos estresses de pH, nutricional (TAU) e temperatura (Temp) mostrando um padrão de expressão de aumento (cor vermelha) em dois tipos de estresse.

4.5.3 Comparações entre os dados de microarranjo e proteômica do *T. cruzi*

Os dados fornecidos pelo estudo de proteoma do *T. cruzi* quando submetidos aos diferentes tipos de estresse foram analisados e comparados com os dados de microarranjo deste trabalho. Desta forma, as proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir da técnica de proteômica, como já mencionado no item anterior, foram avaliadas com relação ao padrão de expressão diferencial obtido no microarranjo. Cabe salientar que os genes identificados neste trabalho como sendo diferencialmente expressos pelo critério C de análise não tiveram correlação com as 173 proteínas diferencialmente expressas.

Sendo assim, foi analisado um conjunto de 173 proteínas selecionadas com sendo diferencialmente expressas pela proteômica. Dessas 173 proteínas, 117 (67%) apresentaram sondas no microarranjo, em um total de 251 sondas (2,1 sondas por proteína).

Na Figura 4.11 é possível visualizar a comparação entre os dados de proteômica e microarranjo em relação às 117 proteínas avaliadas. Na metade esquerda do gráfico estão representados os dados de microarranjo e na metade direita, os dados de proteômica, é possível observar uma intensidade forte de expressão diferencial (aumento ou diminuição) na metade direita.

É muito evidente que os dados de microarranjo, por outro lado, não demonstram nenhum sinal de modulação forte. Na verdade, a modulação do sinal, de maneira geral, está ausente. Esse resultado demonstra que as diferenças vistas nas quantidades de peptídeos avaliados pela proteômica não apresentam nenhuma correlação com os resultados do microarranjo.

Uma outra informação acessória, porém muito importante, que é passível de ser vista na figura 4.11, é a correlação dos dados de microarranjo referente às diferentes sondas que hibridam com o gene codificador da mesma proteína. Podemos identificar esses elementos ao ver o mesmo código para

cada uma das linhas do gráfico (SG08000, por exemplo, na primeira linha do gráfico). Como para uma determinada proteína poderia haver mais de uma sonda no microarranjo, tal redundância se explica. No entanto, devido ao nível de ruído inerente à técnica, não necessariamente sondas do mesmo gene seriam agrupadas. No entanto, é possível verificar um grande grau de agrupamento das sondas distintas referentes ao mesmo gene. Esse resultado demonstra a grande qualidade da parte técnica do microarranjo, pois a conclusão subjacente a esse resultado é a eliminação de grande parte do ruído.

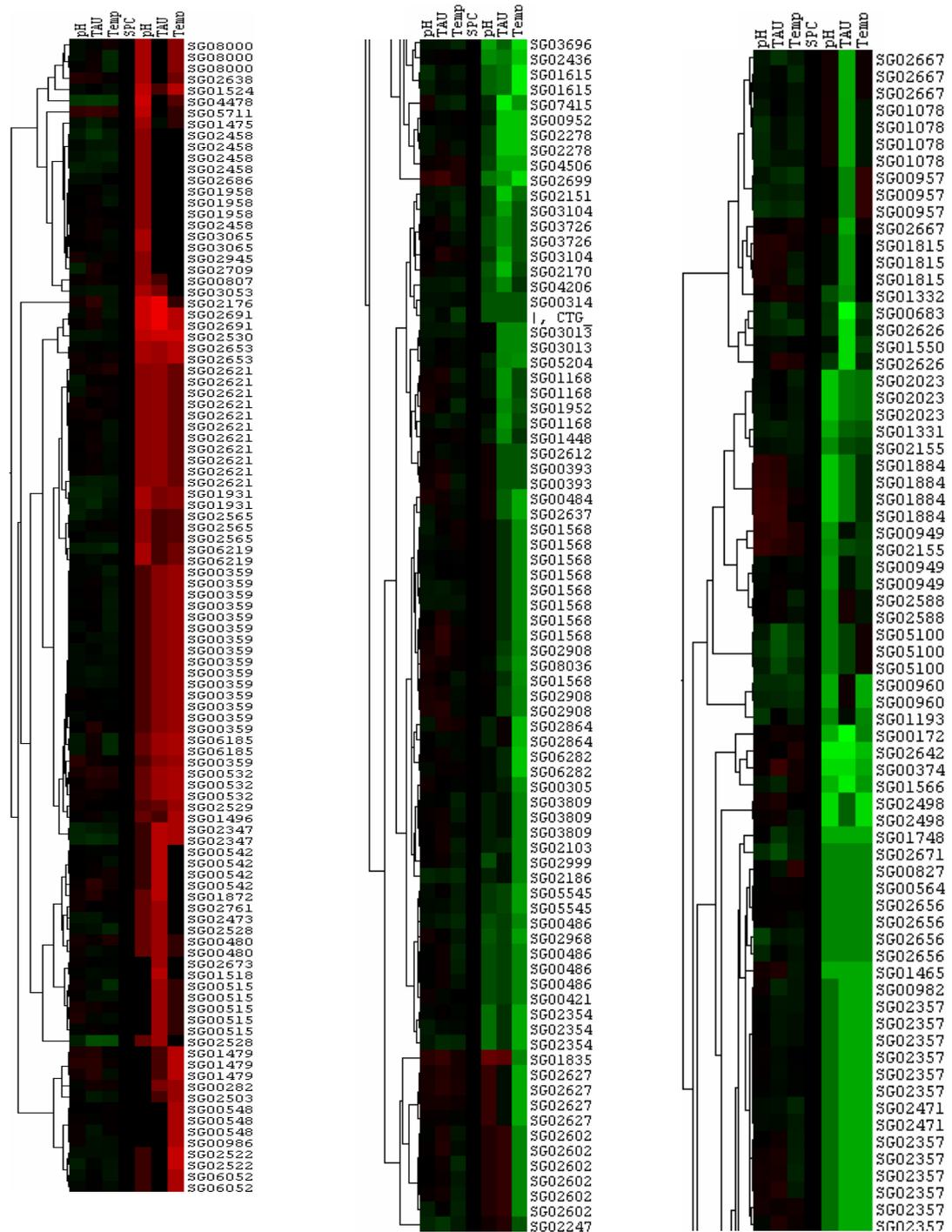


Figura 4.11. Visualização dos resultados do agrupamento dos dados de microarranjo e proteômica. A cor vermelha representa aumento, verde a diminuição e preto expressão igual em ambos os experimentos. O gráfico pode ser visualizado em duas partes. A metade esquerda representa os experimentos de microarranjo para os estresses de pH, nutricional (TAU) e temperatura (Temp). E a metade direita os dados de proteômica também para os estresses propostos.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo analisar a resposta do *T. cruzi* a diferentes modalidades de estresse. A fim de verificar o comportamento dos parasitas diante das condições de estresse propostas neste trabalho, foram adaptados os procedimentos descritos originalmente para a metaciclologênese *in vitro* alterando a etapa de estresse nutricional por outras formas de estresse (estresse de pH e estresse de temperatura). Inicialmente, verificamos a taxa de metaciclologênese e posteriormente a capacidade de infecção dos metacíclicos obtidos através de ensaios de infecção em cultura de células *Vero* (*in vitro*) e camundongos (*in vivo*). Além desta avaliação, buscamos obter dados de expressão gênica diferencial por técnicas de genômica funcional, como microarranjos de DNA e proteômica.

O estresse nutricional tem um importante papel no disparo da diferenciação celular do *Trypanosoma cruzi* (Goldenberg *et al.*, 1987), ocorrendo naturalmente nas porções terminais do intestino do inseto vetor onde há escassez de alimento. A sobrevivência destas células, neste microambiente, depende de respostas adaptativas que exigem flexibilidade de metabolismo e de comportamento, as quais culminam na diferenciação celular para a forma tripomastigota metacíclica. A metaciclologênese *in vitro* (Contreras *et al.*, 1985) mimetiza estas condições encontradas no vetor. Importantes mudanças ocorrem no programa de expressão gênica do parasita durante este processo, desta forma, investigar os mecanismos de regulação da expressão gênica durante a metaciclologênese em *T. cruzi* é fundamental para o melhor entendimento de seus mecanismos moleculares que até o momento não foram totalmente elucidados.

Durante a metaciclologênese *in vitro*, entre o estresse nutricional e a adesão das células, é provável que ocorram simultaneamente eventos associados à estabilidade diferencial das moléculas de RNA e à sua associação aos polissomos. A metaciclologênese é um fenômeno complexo, onde deve estar ocorrendo uma reprogramação da expressão gênica. As

alterações na quantidade e estabilidade dos transcritos podem ser progressivas ao longo do processo ou tão rápidas que não são observadas quando analisadas amostras de um período de tempo muito pequeno.

In vitro, a metacicloênese pode ser induzida pela transferência de células epimastigotas em fase logarítmica de crescimento para um meio quimicamente definido, denominado TAU, que não apresenta qualquer fonte de carbono (estresse nutricional). Após esta etapa, os parasitas são transferidos para o meio de diferenciação que consiste do mesmo meio TAU acrescido de 3 aminoácidos e glicose denominado TAU3AAG. Ao longo deste processo, é possível isolar células em diferentes estágios de diferenciação (Contreras *et al.*, 1.985; Goldenberg *et al.*, 1.987; Bonaldo *et al.*, 1.988; Contreras *et al.*, 1.988).

A fim de verificar o comportamento dos parasitas diante das condições de estresses propostas nesse trabalho foram adaptados os procedimentos descritos originalmente para a metacicloênese *in vitro* alterando a etapa de estresse nutricional por outras formas de estresse, como descrito nos itens 3.3.3.1, 3.3.3.2 e 3.3.3.3.

Após a análise das taxas de metacicloênese, notamos que a diferenciação celular ocorre normalmente, apesar de um retardo no período de tempo inicial de 48 horas nos estresse de pH e temperatura em relação ao estresse nutricional. Estes experimentos indicam que os parasitas submetidos ao estresse de pH e temperatura necessitaram de um período de tempo maior que aqueles submetidos ao estresse nutricional, sugerindo que ao menos para a forma epimastigota, a metacicloênese é disparada de forma distinta entre os estresses testados. Com o decorrer do tempo estas diferenças foram minimizadas e todos os tipos de estresses mostraram igual capacidade de diferenciação celular. Os Gráfico 4.1, Gráfico 4.2 e Gráfico 4.3, contidos neste trabalho mostram tais resultados.

Uma das explicações para ocorrência do retardo nos tempos iniciais de metacicloênese *in vitro* nos estresses de pH e temperatura, pode ser devido à necessidade de um período de tempo maior para que o parasita reorganize sua

expressão gênica até que possa aumentar progressivamente a taxa de diferenciação celular. Além disso, possivelmente o estresse nutricional seja mais eficaz no disparo da diferenciação do que os outros estresses.

De toda forma, a metaciclologênese é induzida pelos estresses testados e sendo assim, nos interessamos em observar se os tripomastigotas metacíclicos provenientes das diferentes modalidades de estresse eram capazes de infectar células *in vitro* e também *in vivo*. Para tanto, experimentos para avaliar a capacidade de infecção dos metacíclicos obtidos *in vitro* foram realizados em colaboração com a Universidade Federal de Santa Catarina.

As Tabela 4.1 e Tabela 4.2, demonstraram que os parasitas foram capazes de infectar e se multiplicar em células *Vero*, assim como, infectar os camundongos testados. Os testes parasitológicos mostraram que independente do estresse imposto, os camundongos foram passíveis de infecção, mesmo mostrando um baixo nível de parasitemia, apesar da quantidade de metacíclicos inoculada em cada animal foi suficiente para causar uma alta parasitemia. Devido a este fato, a baixa carga parasitaria pode ter influenciado diretamente nos resultados de pesquisa em sangue fresco e na hemocultura. Já quando vetores foram utilizados para sugar os camundongos infectados, os resultados mostraram que mesmo após um longo período, estes não apresentaram parasitas no seu conteúdo intestinal. O xenodiagnóstico negativo pode ser devido à escassez da parasitemia, uma vez que os insetos estavam completamente ingurgitados.

A outra explicação para a baixa parasitemia seria o fato de os camundongos terem sido inoculados por metacíclicos ao invés de tripomastigotas sanguíneos. Para testar isto, é necessário repetir os ensaios utilizando tripomastigotas sanguíneos da cepa *Dm28c* para nos certificarmos desta hipótese.

Dados da literatura mostram que em alguns organismos a resposta ao estresse pode influenciar de maneira incisiva na regulação da expressão gênica. Ashe, et al. (2000) investigaram o efeito da depleção de glicose

sobre a síntese protéica. A depleção de glicose é conhecida como sendo chave na regulação da expressão gênica que leva à repressão transcricional de genes. Neste estudo, foi visto que a retirada de glicose do meio de crescimento leva a uma rápida inibição da síntese protéica e que este efeito foi prontamente revertido após readição de glicose no meio. A capacidade de responder às mudanças no ambiente nutricional é essencial para a flexibilidade do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*. A via de transdução de sinal que controla essa flexibilidade pode ser induzida por níveis de nutrientes específicos tais como aminoácidos e glicose. Em geral, estas alterações na expressão gênica são mais comumente associadas ao controle da transcrição destes genes, mas também podem ser evidenciadas modificações pós-traducionais, sendo que os nutrientes também controlam o nível de síntese protéica nas células. A ausência de aminoácidos ou purinas provoca uma inibição geral da tradução, bem como, uma ativação de muitos genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos. A fosforilação da subunidade α fator 2 de iniciação da tradução (eIF2) fornece um mecanismo fundamental para diminuição da síntese protéica, em resposta à privação de nutriente ou estresse nos mamíferos e células de levedura. A proteína quinase GCN2 de *S. cerevisiae* contribui para o controle traducional da expressão gênica de células quando há a privação de aminoácidos, fosforilando o eIF 2 α (Sattlegger & Hinnebusch, 2005).

Desta forma, é possível supor que a submissão do *T. cruzi* aos estresses propostos neste trabalho possa gerar respostas diferentes quanto à alteração da regulação da expressão gênica do parasita. Para avaliar isto, utilizamos ensaios de microarranjo para obter o perfil da expressão gênica após submissão dos parasitas aos estresses testados.

O microarranjo é uma metodologia largamente utilizada de análise da expressão de genes de um organismo. Sucintamente, ele consiste na utilização de sondas de DNA que representam o maior número possível dos genes do genoma imobilizados em uma superfície. O RNA da célula que se quer estudar é convertido em cDNA ou cRNA que podem ser marcados com fluoróforos.

Após a hibridização, as sondas para os genes que foram transcritos formam híbridos com as moléculas marcadas. A análise da fluorescência emitida permite avaliar a expressão dos genes. No nosso laboratório os microarranjos são utilizados para o estudo da expressão gênica do *T. cruzi* e contém como sondas e produtos de PCR. O microarranjo de *T. cruzi* utilizado nesse trabalho foi inteiramente desenvolvido no Instituto de Biologia Molecular do Paraná.

No *T. cruzi*, estudos indicam que o controle da expressão gênica é pós-transcricional (Ávila et al., 2003, Dallagiovanna et al., 2001, Fragoso et al., 2003). Esta regulação pode ser pela degradação seletiva de espécies de mRNA. Alternativamente, a associação seletiva de algumas espécies de mRNAs aos polissomas foi observada em *T. cruzi* como um mecanismo pós-transcricional onde o mRNA de vários genes permanece estável no citoplasma e o controle da tradução ocorre pelo do acesso aos ribossomos. De acordo com estes casos, a comparação entre populações de RNA total de diferentes tipos celulares não revelaria diferenças na expressão gênica. Para exemplificar esta regulação polissomal, tem-se o gene que codifica uma proteína com domínios de ligação à quitina (Dallagiovanna et al., 2001) e o gene da metacicloproteína (Ávila et al., 2001).

Em *T. cruzi*, a transcrição policistrônica gera um mistura complexa de transcritos, onde apenas uma fração é traduzida. Isolar desta fração os transcritos diferencialmente expressos, segregando-os daqueles traduzidos de modo constitutivo e simultâneo, demandou o desenvolvimento de recursos tecnológicos adequados.

No presente trabalho, as comparações entre as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento e as populações submetidas aos diferentes tipos de estresse foram realizadas utilizando apenas RNA polissomal de três réplicas biológicas distintas e hibridizadas no microarranjo do *T. cruzi*. Buscamos desta forma, avaliar as diferenças biológicas observadas nos estresses propostos pelo conjunto de mRNAs associados a síntese de proteínas

Análises prévias a este trabalho mostraram que o RNA polissomal têm um importante papel na diferenciação do *T. cruzi*: na metaciclogênese, o número de genes diferencialmente expressos chega a ser 10 vezes maior em mRNA polissomal do que em mRNA total; em outros processos de diferenciação do *T. cruzi*, é muito provável que o mecanismo mobilização polissomal seja atuante (Probst, 2005).

A partir deste estudo de análise do perfil de RNA polissomal durante a metaciclogênese pode-se verificar que o número de sondas diferencialmente expressas ao longo da diferenciação aumenta significativamente. Desta forma, é possível notar que durante o estresse nutricional há um número relativamente pequeno de sondas diferencialmente expressas em comparação com as formas aderidas ao longo da metaciclogênese. Estas observações podem ser vista na figura abaixo.

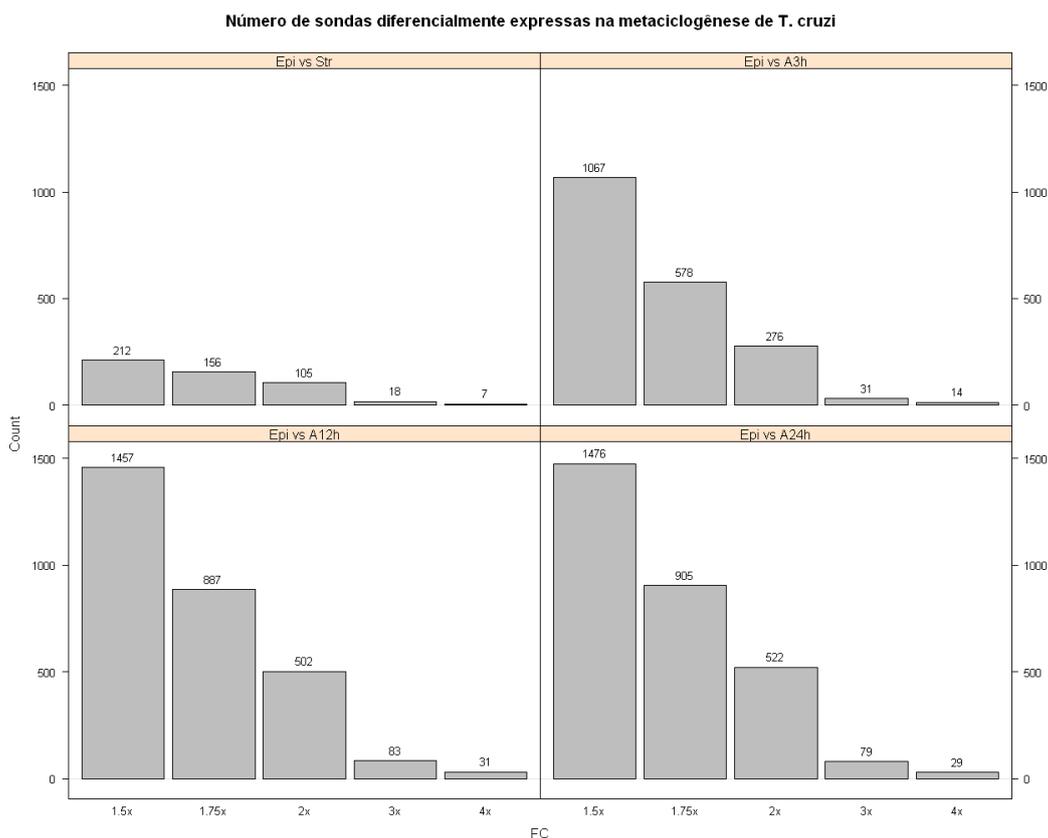


Figura 5.1. Representação do número de genes diferencialmente expressos durante a metaciclogênese do *T. cruzi* em comparação com as formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, considerando os diferentes *fold changes*.

Através a tecnologia de microarranjo de DNA foi possível selecionar um grande número de genes nas modalidades de estresses propostos. Para uma melhor visualização dos resultados foram criados critérios de seleção, como descrito em materiais e métodos (item 3.17), que variavam de acordo com os valores de *fold change* e a exclusão ou não de algumas das réplicas biológicas analisadas.

Com o objetivo de estudar um grupo de genes cujo padrão de expressão era mais coeso, além de ser um critério mais estrigente, onde não foi excluído nenhum dos experimentos realizados, optamos pelo critério C de seleção. A partir desta escolha foi selecionado um conjunto de 32 genes diferencialmente expressos nas condições de estresse impostas em comparação com as formas

epimastigotas (EPI 5DIAS). Foi observado que neste conjunto, a maioria dos genes (n=24) selecionados estavam presente no estresse nutricional, com um perfil de aumento e diminuição. Já quando observado os estresses de pH (n=8) e temperatura (n=2) poucos foram selecionados por este critério. Uma explicação para este fato pode ser associada ao fato do estresse nutricional estar mais fortemente associado ao disparo da diferenciação celular em nosso modelo. Esta hipótese pode ser corroborada pelos ensaios de metaciclogênese *in vitro* e nos ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo* onde via de regra os resultados eram mais expressivos para este estresse do que nos outros avaliados.

Apesar dos genes apresentarem padrões de expressões aumentados e diminuídos nos estresses propostos, foi possível verificar que neste conjunto a resposta ao estresse era muito similar entre as modalidades propostas. Ou seja, a maioria dos genes tinha uma resposta comum aos estresses realizados cujos padrões de expressões tendiam a um aumento ou diminuição, não mostrando divergência entre os perfis dos genes. Exceto para três genes (7782.t00009, 8621.t00016 e 6854.t00008) inclusos neste critério que apresentaram padrões de expressão distintos.

Apesar da similaridade da regulação dos genes selecionados entre os estresses alguns genes (ou grupos de genes) mostraram importantes diferenças em relação a intensidade desta modulação, como por exemplo, os genes que codificam as enzimas da via glicolítica. Um padrão de expressão diminuída foi observado nos três estresses estudados, mas está mais evidente que no estresse nutricional (TAU), a queda no perfil de expressão das enzimas é mais drástica.

Da mesma forma, em *T. cruzi*, foi observada a diminuição das enzimas glicolíticas associada ao aumento de algumas enzimas do ciclo de *Krebs* e citocromos na transição de formas amastigotas extracelulares para epimastigotas (Cazzulo et al., 1985), sendo que um perfil semelhante foi observado na diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos

(Urbina et al., 1990; Adroher et al., 1988). A resposta do *T. cruzi* a inibidores da glicólise ou da fosforilação oxidativa foi diferente em fases diferentes de cultura de *T. cruzi*, devido a possíveis diferenças na adaptação a microambientes durante seu ciclo evolutivo (Carneiro & Caldas, 1982).

O ambiente do lúmen do intestino do hospedeiro invertebrado é rico em proteínas e o *T. cruzi* possui diversos transportadores e enzimas envolvidas na degradação de aminoácidos (Sylvester & Krassner, 1976; Cazzuolo et al., 1979; Urbina & Azavache, 1984). No entanto, epimastigotas consomem preferencialmente glicose, mesmo em presença de proteínas (Cazzuolo et al., 1985). A influência de prolina, aspartato e glutamato no processo de metaciclogênese é conhecida (Contreras et al., 1985; Homsy et al., 1989; Krassner et al., 1990).

Em trabalhos do nosso grupo que estudaram todo o processo de metaciclogênese *in vitro*, através de análises de microarranjo, mostraram que a via glicolítica apresenta-se fortemente diminuída mesmo nos primeiros momentos da metaciclogênese (gliceraldeído-3-fosfato, enzima málica, enolase) (Probst, 2005). No decorrer da metaciclogênese, essa inibição aumenta, tanto em intensidade quanto em número de genes pertencentes à via que são inibidos, e há maior representatividade do mRNA polissomal para esses dois quesitos (número de genes e intensidade da diminuição).

Nos resultados obtidos no microarranjo dos diferentes tipos de estresse obtivemos HSPs com perfil de expressão diminuídos e aumentados. Sendo assim, a HSP85 apresentou um padrão de aumento significativo para o estresse de temperatura e perfil de expressão diminuída para os estresses de pH e nutricional. Isso pode indicar uma resposta normal do organismo à elevação da temperatura a qual as células foram submetidas. Além disso, também obtivemos um padrão de aumento para HSP70 (7180.t0003), possivelmente devido a resposta aos estresses que o parasita foi imposto, entretanto, também foi observado a diminuição nas HSP 70 em outro gene pertencente a esta família (8621.t00016) . Como descrito na literatura após um

choque térmico pode haver uma inibição da tradução e transcrição e esta proteína pode estar envolvida com a recuperação destes mecanismos, já a HSP100 está relacionada com a infecção do vetor de *Leishmania* (Feder & Hofmann, 1999).

Como já mencionado na introdução deste trabalho as HSPs são induzidas em resposta ao estresse, de temperatura principalmente. Membros dessa família estão presentes em células sem estresse (não sujeitas a estresses intra ou extracelulares) e estão envolvidas na moldagem de proteínas, translocação, montagem e desmontagem de proteínas, e são denominados chaperoninas. Essas proteínas são importantes em tripanossomatídeos, que alternam baixas temperaturas nos insetos e temperaturas de 37°C na corrente sanguínea. Van Der Ploeg et al. (1985) identificaram aumento de 25 a 100 vezes para HSP70 e HSP83 quando compararam formas sanguíneas e procíclicas de *T. brucei*. Em *Leishmania*, a exposição ao calor induziu à diferenciação de promastigotas (adaptada ao inseto) a amastigotas (adaptada ao hospedeiro mamífero). Argaman et al. (1994) demonstraram a regulação dos níveis de HSP83 induzidos durante a diferenciação como sendo regulados pós-transcricionalmente, através de mudanças no *turn-over* do mRNA, sendo que a degradação nos parasitas era dependente da síntese protéica ativa. É interessante notar que as HSPs são um dos poucos exemplos conhecidos de proteínas de tripanossomatídeos que podem ser moduladas fisiologicamente (Vanhamme & Pays, 1995).

Partindo do princípio que as técnicas de PCR em tempo real (RT-PCR) e microarranjo já são bem estabelecidas e visando validar os dados provenientes do conjunto de genes selecionados a partir do critério C de análise foi utilizado o RT-PCR para obter informações sobre o evento biológico em questão, os estresses (pH, temperatura e nutricional).

Desta forma, o PCR em tempo real, além de validar os dados, teve como principal função confirmar que o critério C adotado para selecionar os genes diferencialmente expressos por microarranjos estava correto.

Várias técnicas permitem quantificar mRNA, tais como Northern Blot, hibridização *in situ*, análise de microarranjos e PCR em Tempo Real quantitativo (qRT - PCR). Este último método revelou-se muito útil, em virtude da sua precisão, dinâmica e sensibilidade. Além disso, o PCR em tempo real é rápido, fácil de usar, e altamente reprodutível, exigindo quantidades mínimas de RNA, não manipulação pós - PCR, e evita o uso de radioatividade (Radonic, et al., 2004). No entanto, em qualquer uma dessas abordagens, torna-se necessário o controle inicial do RNA.

Neste trabalho foram utilizados para análise de PCR em tempo real, os RNA polissomal extraídos das formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento e os parasitas submetidos aos distintos tipos de estresse nas três réplicas biológicas realizada.

A escolha dos normalizadores para análise dos resultados do RT-PCR é extremamente importante para a avaliação dos dados e diminuição de erros experimentais. Os normalizadores escolhidos neste estudo foram a proteína ribossomal L9, histona H2B e a proteína hipotética 6733. O fato destes normalizadores não terem variação em sua expressão gênica durante a fase de estresse foi à motivação desta escolha.

A partir das comparações entre os resultados obtidos pela técnica de PCR em tempo real e microarranjo foi possível concluir que 93,33% dos genes analisados mostraram concordância com os perfis de expressões obtidas no microarranjo. Demonstrando assim a confiabilidade dos resultados gerados pelo microarranjos dos diferentes tipos de estresses na seleção de genes diferencialmente expressos. Uma descrição sucinta das características destes genes encontra-se relacionada abaixo.

Genes com perfil de expressão aumentando nos estresses:

Thiolase protein-like protein, putative – 10960.t00001

Dois tipos diferente de tiolases (Yang, et al., 1990) são encontradas, ambas em eucariotos e procariotos: 3-cetoacetil-CoA Tiolase (tiolase I) e

acetoacetil-CoA tiolase (tiolase II). Estas proteínas estão envolvidas em vias de degradação, tais como, dos ácidos graxos e beta-oxidação. A tiolase II esta envolvida em vias biosintéticas, tais como, síntese de poli beta-hidrobutirato ou biogênese de esteróides. Em eucariotos existem duas formas da tiolase I: uma localizada na mitocôndria e outra localizada nos peroxissomos (Baker, et al., 1991).

HSP70, mitochondrial precursor – 7180.t00003 (perfil aumentado) e HSP 70 – 8621.t00016 (perfil diminuído em estresse de pH e nutricional)

Estas chaperoninas ajudam no dobramento de muitas proteínas. HSP70 auxiliam no dobramento envolvendo ciclos repetitivos de ligação e liberação do substrato. A atividade das HSP70 são dependentes de ATPs. Estas proteínas são compostas por duas regiões: a amino terminal tem um domínio ATPase e a carboxiterminal é uma região de ligação ao substrato (Craig, 1989). Em muitas espécies existem muitas proteínas pertencentes a família das HSP70. Algumas destas proteínas são expressas sob condições de estresse (estritamente induzido), enquanto que algumas são expressas constitutivamente em células sob condições normais. As HSP70 podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares tais como: núcleo, citoplasma (cy-HSP70), mitocôndria (mt-HSP70), retículo endoplasmático (grp78), dentre outros (Flaherty, et al., 1990; Snutch, et al., 1988; Krautz, et al., 1998).

Nos tripanosomatídeos as HSP70 mostram uma regulação estágio-específica, com aumento do nível de expressão em formas do parasita presentes no hospedeiro mamífero. Smejkal *et al.* observou que leishmanias apresentavam um aumento de infectividade quando exposta à elevadas temperaturas. Apesar de se ter muitas informações sobre a expressão das HSP70 em *T.cruzi* poucos estudos estão relacionados à HSP 70 mitocondrial, mtp70, deste parasita, ou melhor em eucariotos. A proteína mtp70 foi encontrada associada com DNA do cinetoplasto de tripanossomas e, portanto, pode desempenhar um papel importante na regulação da função mitocondrial por

interferir na importação de proteínas, na montagem de complexos protéicos na matriz e metabolismo de ácidos nucléicos (Olson, et al., 1994).

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase, putative – 8149.t00002

As peptidil-prolil isomerases (PPIase) são seqüências altamente conservadas e são proteínas multifuncionais que estão presentes em muitos tipos de células com uma distribuição consideravelmente divergentes filogeneticamente. A nível celular, PPIases estão em compartimentos, livres no citoplasma e/ou ancoradas às membranas. Diversas modificações pós-traducional, como a glicosilação, modificações N - terminais e fosforilação constituem as características funcionais adicional do PPIases. Dobramento, montagem e tráfico de proteínas no meio intracelular são reguladas por PPIases. Estas enzimas aceleram a taxa de dobramento de proteínas *in vitro* e têm a capacidade de ligar proteínas e agir como chaperonas. Alguns PPIases são subunidades co-regulatórias de complexos moleculares incluindo as proteínas de choque térmico, receptores glicocorticóides e os canais iônicos. Pode-se classificar as PPIases para as seguintes superfamílias de proteínas: o ciclofilinas (CsA – ligação de proteínas) e os FKBP (FK506/rapamycin-ligação de proteínas) (Galat, 1993).

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative – 8609.t00009

Esta enzima catalisa a conversão de glicerol-3-fosfato em fosfato dehidroacetona. Em eucariotos, a forma mitocondrial da GPD participa do transporte do fosfato glicerol em conjunção com uma GPD NAD - dependente citoplasmática. Este mecanismo é responsável pela preservação de um equilíbrio redox. Neste ambiente, a enzima mostrou um aumento da atividade na presença de cálcio. Estas enzimas são proteínas de aproximadamente 60 a 70 KDa que contêm um provável domínio ligador de FAD em suas extremidades N - terminais. Esta enzima em mamíferos difere das proteínas de bactérias e leveduras por ter uma região ligadora de cálcio *EF-hand* na extremidade C-terminal.

Genes com perfil de expressão diminuído:

Thermostable carboxypeptidase 1, putative – 4881.t00006

As carboxipeptidases (CPs) podem ser divididas em três grandes grupos, as serina carboxipeptidase, metalocarboxipeptidase e cisteína carboxipeptidase, baseado na natureza do resíduo de aminoácido do sítio ativo da enzima.

As metalopeptidases são caracterizadas pela exigência de um íon de metal divalente para sua atividade. A *Thermostable carboxypeptidase 1* pertence a família das peptidases M32, é diferenciada das outras metalocarboxipeptidases por conter um motivo ligador de íons de metal (HEXXH). O papel biológico das metalocarboxipeptidase ainda não foi estabelecido, enquanto que nos mamíferos esta proteína tem um papel chave na maioria dos processos biológicos tais como: degradação de proteínas, proteólises, maturação de peptídeos, dentre outros (Lee, et al., 2006).

60S ribosomal protein L17, putative – 6854.t00008 (perfil de diminuição notadamente evidenciado nos stresses de pH e nutricional)

Cerca de 2/3 do ribossomo é composto por RNA e 1/3 por proteínas. As proteínas são nomeadas de acordo com a subunidade do ribossomo as quais elas pertencem – subunidade menor (S1 a S31) e subunidade maior (L1a L44). Muitas proteínas ribossomais, particularmente da subunidade maior, tem uma composição globular com um domínio *surfaced-exposed* com longas projeções *finger-like* que se estendem até o núcleo do rRNA a fim de estabilizar a estrutura. Esta família inclui a proteína L17 de eucariotos.

Arginine kinase – 7265.t00003

Arginina quinase é uma fosfotransferase que catalisa a interconversão entre Fosfoarginina e ATP. Esta enzima está presente em alguns invertebrados e é um sistema análogo a Creatina quinase nos vertebrados. Fosfoarginina atua como um reservatório energético devido ao fosfato de alta energia pode

ser rapidamente transferido à ADP quando a renovação do ATP é exigida. É importante notar que Arginina quinase está ausente em hospedeiros mamíferos do *T. cruzi*, deste modo, esta enzima pode ser um alvo potencial na Doença de Chagas. Foi demonstrado que superexpressão da arginina quinase aumenta capacidade de sobrevivência do *T. cruzi* sob condições de estresse de pH e estresse nutricional. Além disso, quando heterólogos da arginina quinase é expressa em organismos desprovido de qualquer tipo de fosfato de alta energia, como a levedura e bactérias, eles também tornam - se mais tolerantes à condições estresse de pH e nutricional, provavelmente devido ao efeito de tamponamento do ATP à fosfoarginina (Miranda, et al., 2006).

Flagellar calcium-binding protein, putative – 7515.t00005

A *Flagellar calcium-binding* FCaBP) é uma proteína de 24 – kDa altamente imunogênica que é encontrada no flagelo do *T. cruzi*. FCaBP contém quatro domínios EF – hand, mas são os domínios EF - 3 e EF – 4 que se ligam ao cálcio. A proteína é modificada na porção N - terminal pela adição de miristato e palmitato, ambas as quais são necessários para associação com parte interna da membrana flagelar. Esta proteína que está associada à membrana flagelar do *T. cruzi* está envolvida com a regulação de mudanças de conformação do flagelo moduladas por cálcio. (Buchanan, et al., 2005).

O flagelo é uma estrutura de mobilidade celular, reconhecimento/adesão celular e endocitose. A família das adenilato ciclases foi localizada ao longo do flagelo. A atividade das ciclases varia durante o ciclo de vida dos tripanossomos. Os íons de cálcio parecem regular uma das isoformas de adenilato ciclase. Nas células de mamíferos, uma calmodulina - dependente de adenilato ciclase foi descrita, mas não há evidências disponíveis que possa sugerir que calmodulina module a ciclase dos tripanossomas (Wu, et al., 1994).

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative – 7984.t00006

Esta proteína tem uma importante função na glicólise e gliconeogênese por reverter a oxidação e fosforilação de D-gliceraldeído-3-fosfato para 1,3-

difosfo-glicerato. Esta enzima é um tetrâmero de subunidades idênticas, cada uma contendo dois domínios de função conservada: um domínio ligador de NAD e um domínio catalítico altamente conservado. GAPDH possui muitas funções não-glicolítica, e seu papel depende de sua localização. Por exemplo, a translocação da GAPDH ao núcleo funciona como um mecanismo de sinalização para a morte programada das células, ou apoptose.

Peptidase M20/M25/M40, putative – 8347.t00008

Esta família inclui um conjunto de metalopeptidases que pertencendo a famílias das peptidase. A família M20 são as Glutamato carboxipeptidase. A família peptidase M20/M25/M40 é um grupo de proteínas constituído por metalopeptidases e homólogos não-peptidase. Estas peptidases possuem dois sítios catalíticos para o íon zinco ligados por His/Asp, Asp, Glu, Asp/Glu e His (Rawlings & Barrett, 1995).

DnaJ protein – 8578.t00003

DnaJ domínios (J - domínios) estão associados com o sistema das HSP70 e é sabido que este domínio medeia interações. Os domínios DnaJ, são portanto, parte do sistema das chaperonas (*fold*ing de proteína).

Em eucariotos, proteínas homólogas à bacteriana estão envolvidos na regulação da Hsp70, chaperonas moleculares, que estão envolvidas em uma variedade vias de biogênese de proteínas. Foi caracterizado o gene de DnaJ de *T. cruzi*, denominado *TcJ6*, codifica uma proteína que apresenta alta homologia com a seqüência *Sis1* de *Saccharomyces Cerevisiae* uma co – chaperona recrutada no início da tradução. A proteína *TcJ6* possui 36,5 kDa e não apresenta diferenças no padrão de expressão durante diferenciação do parasita e está associada à fração citoplasmática, além de estar associado à subunidade 80S do ribossomo. Além disso, a *TcJ6* de *T. cruzi* também foi encontrada preferencialmente concentrada em torno do núcleo. Isto sugere que a *TcJ6* está associado ao retículo endoplasmático. Enfim, estes dados sugerem

que a DnaJ de tripanossoma está envolvida no início de tradução em *Trypanosoma cruzi* (Salmon, et al., 2001).

Phosphoglycerate kinase, putative – 8690.t00004

A fosfoglicerato quinase (PGK) é uma enzima que catalisa a formação de ATP à ADP e vice versa. É o segundo passo da segunda fase da glicólise, 1,3-difosfoglicerato é convertido em 3-fosfoglicerato formando uma molécula de ATP. Se o inverso ocorrer, uma molécula de ADP pode ser formada. Esta reação é essencial da maioria das células para formação de ATP em aerobiose, para a fermentação em anaerobiose e fixação de carbono em plantas.

No *Trypanosoma brucei* o metabolismo energético difere significativamente do seu hospedeiro, não só porque se compreende distintas enzimas e vias metabólicas, mas também porque algumas enzimas glicolíticas estão localizadas em organelas chamados glicossomos. Esta proteína está presente além da forma glicossomal também na forma citosólica. O metabolismo energético muda drasticamente durante o complexo ciclo de vida deste parasita (Hellemond, et al., 2005). A presença de PGK também foi detectada em *L. major* (McKog, et al., 1997). Em *T. cruzi*, 80% da atividade da PGK está no citosol e 20% no glicossomo. Assim como, em *T. brucei* foram encontradas três isoformas para a PGK, denominadas PGKA, B e C em *T. cruzi*. A PGKC está presente na matriz solúvel do glicossoma, já PGKA esta presente na superfície interna da membrana do glicossoma (Concepcion, et al., 2001).

Mitochondrial DEAD box protein, putative – 8791.t00006

Membros desta família incluem as helicases DEAD e DEAH box. As helicases estão envolvidas no enovelamento dos ácidos nucléicos. As helicases com domínio DEAD box estão associadas em vários aspectos com o metabolismo de RNA, *splicing* de pré mRNA, biogênese de ribossomos, transporte entre núcleo-citoplasma, tradução e degradação de RNA. DEAD box

representam uma versão especial do motivo B de proteínas ligadoras de ATP. A esta família incluem o fator de iniciação eIF -4 de eucariotos, PRP5 de levedura, PRP28 e MSS116 proteínas se *splicing*, proteína DHH1, DRS1, possível RNA helicase de *Echerichia coli*, dentre outras (Schmid, et al., 1992).

Além dos genes descritos acima também foram detectados uma grande porcentagem de proteínas hipotéticas na análise dos genes selecionados pelos critérios estabelecidos pelo microarranjos dos diferentes tipos de estresse. Isso impossibilita uma visão funcional destas proteínas e que provavelmente existam proteínas importantes – afinal são reguladas – compartilhadas muitas vezes por organismos próximos filogeneticamente, que ainda precisam ser definidas caracterizadas em relação ao(s) seu(s) papel(is) funcional. Em *T. cruzi*, aproximadamente 50% dos genes codificadores de proteínas foram associados a algum tipo de função – com base na similaridade com outras proteínas já caracterizadas ou com domínios funcionais (El-Sayed, 2005).

A grande quantidade de genes diferencialmente expressos detectados neste trabalho cuja função é desconhecida reflete o atual conhecimento sobre o genoma/transcriptoma do *Trypanosoma cruzi*. Uma análise realizada foi a identificação de domínios protéicos presentes no banco de dados PFAM. Algumas proteínas hipotéticas apresentaram domínios interessantes, mas seu número é relativamente pequeno – geralmente os domínios são encontrados uma única vez – impossibilitando a realização de análises comparativas. De qualquer forma, a identificação de possíveis funções pode dar indícios para elucidação de algumas proteínas hipotéticas.

Apesar da presença de domínios nas proteínas hipotéticas indicando possíveis funções a estas, seriam necessário ensaios funcionais biológicos para se aprofundar e certificar o papel destas proteínas. Nesse sentido, a utilização da metodologia de *Gene Ontology* (GO) poderia ajudar na elucidação das funções das proteínas hipotéticas. Visto que o GO é uma estrutura hierárquica em níveis, como uma árvore filogenética que busca integrar o

conhecimento sobre a função, processo biológico associado ou componente celular das proteínas e dos seus genes codificadores.

De qualquer forma, para inferir possíveis funções a estas proteínas hipotéticas selecionadas, os seguintes domínios foram encontrados:

Proteínas Hipotéticas com perfil de expressão aumentado:

Proteína hipotética conservada – 5408.t00002 – domínio SAC3/GANP/Nin1/mts3/eiF-3 p 25 family – esta vasta família inclui diversas proteínas envolvidas em grandes complexos.

Proteína hipotética conservada – 5414.t00009 – domínio Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type – os domínios Zinc finger estão envolvidos com a ligação ao DNA, existem diferentes tipos, dependendo da posição dos resíduos de cisteína. As proteínas que contêm este domínio podem estar envolvidas com o ciclo celular.

Proteína hipotética conservada – 8178.t00003 – *Major Facilitator Superfamily* – dentre as diversas famílias de transportadores somente duas esta presente aos mesmo tempo em todas as classificações dos organismos. Estas são a superfamília ATP-Binding Cassette (ABC) e a superfamília Major Facilitator (MFS). Os transportadores MFS são polipeptídeos secundários que são capazes de transportar pequenos solutos.

Proteína hipotética conservada – 8822.t00004 - possui o domínio Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A synthase (HMG-CoA Synthase) – A HMG-CoA synthase catalisa a condensação da acetil Co A com a acetoacetil Co A para produzir a HMG-Co A e Co A. Nos vertebrados esta proteína possui duas isoformas localizada em diferentes compartimentos subcelulares, uma forma citosólica envolvida com a síntese de colesterol e outra forma mitocondrial responsável pela biogênese de corpos cetônicos.

Proteínas Hipotéticas com perfil de expressão diminuído:

Proteína hipotética conservada – 6113.t00005 – possui um domínio *M protein repeat* – uma pequena repetição que é encontrada em muitas cópias em proteínas M de bactérias. As proteínas M ligam a IgA e parecem estar associadas a fator de virulência.

Proteína hipotética conservada – 6836.t00005, 7885.t00004 e 8754.t00004 – domínio Sacaropina desidrogenase – envolvida com o metabolismo de aminoácidos.

Proteína hipotética conservada– 6986.t00019 – possui um domínio GATse, glutamina aminotransferase, classe II, um grupo de enzimas biosintéticas que são capazes de catalisar a remoção do grupamento amônia das glutaminas e então este grupo pode ser transferido para ser substrato de um novo grupamento.

Proteína hipotética conservada– 7118.t00034 – A família WD - 40 que possui repetições curtas de ~ 40 motivos aminoácidos e muitas vezes terminam em um Trp - Asp (WD). As proteínas WD pertencem a uma grande família encontrada em todos os eucariotos e estão envolvidos em uma variedade de funções desde transdução de sinal, regulação da transcrição para o controle do ciclo celular e apoptose. Em linhas gerais uma função comum de todas as proteínas de repetição WD é coordenar a união de multi-complexos, onde as unidades de repetições servem de alça rígida para interações de proteínas (Gottschalk *et al.*, 1999).

Proteína hipotética conservada – 7617.t00056 – possui um domínio *F-box* tem um papel crucial no recrutamento de substratos alvos destinados ao sistema ubiquitina – proteassomo e está diretamente ligado a proteína E3 ligase que é responsável pela marcação de proteínas alvos para sua subsequente degradação pelo proteassoma 26S.

Proteína hipotética conservada – 7753.t00025 – domínio Timidilato quinase (dTMP quinase) que catalisa a fosforilação de timidina 5'-monofosfato (dTMP) em timidina 5'-difosfato (dTDP) na presença de magnésio e ATP.

Proteína hipotética conservada – 7782.t00009 – domínio de processamento de RNA – ligação de RNA – muitas proteínas de eucariotas são conhecidas por se ligar a simples fita de RNA, estas são chamadas de RNP1 (*RNA-binding region*) ou RRM (*RNA recognition motif*). As RRM são encontradas em uma variedade de proteínas ligadoras de RNA, incluindo as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs), proteínas envolvidas na regulação do *splicing* alternativo e as “pequenas ribonucleoproteínas nucleares” (snRNPs).

Proteína hipotética conservada – 8319.t00003 – *Anquirin repeat* – é um dos mais comuns motivos de interação entre proteínas – proteínas na natureza. Eles possuem um grande número de funcionalidades em diversas proteínas de eucariotas. Estas repetições são encontradas em proteínas com funções diversas, tais como, iniciadores da transcrição, regulares do ciclo celular, citoesqueleto, transportadores de íons e transdutores de sinal.

Proteína hipotética conservada – 5669.t00003, 5884.t00002, 7832.t00016 e 8717.t00019 – não há informações no banco de dados Pfam para tais proteínas.

Devido ao fato dos genes selecionados no critério C terem na sua maioria uma resposta semelhante quando os estresses foram submetidos, decidimos verificar um grupo de genes que teriam perfis de expressão distintos quando realizado comparações apenas entre os estresses excluindo da análise as formas epimastigotas. Desta forma, foi possível a seleção de um conjunto de 11 genes que são significativamente diferentes entre os estresses e é possível sugerir que tenham funções específicas na resposta ao estresse.

Análises em nosso banco de dados CruzeGeneDB mostraram que os genes que codificam as proteínas hipotéticas conservadas 8440.t00004,

8343.t00011, 7744.t00035 e 8730.t0015 não possuíam informações alguma sobre domínios, sendo assim, não foi possível inferir prováveis funções a estas. O conjunto dos genes 7782.t00009, 8621.t00016 e 6854.t00008 também foram selecionados pelo critério C de análise do microarranjo (já descritos). As descrições dos outros genes selecionados podem ser vista abaixo:

HSP 85 – 8158.t00013

Esta proteína mostra um perfil de expressão aumentado em estresse de temperatura e diminuição de expressão em estresse nutricional. Este fato pode ser explicado com dados provenientes da literatura que mostram que eventos de resposta ao estresse nas células geram a expressão de proteínas de choque térmico. Dados da literatura mostram que quando células de murino L929 foram expostas rapidamente a uma elevação de temperatura (43 °C) foram expressas, preferencialmente, as HSP 85 e HSP 69. Isso pode ser explicado pelo fato destas proteínas servirem com uma proteção da célula contra efeitos letais de hipertermia (Lanks, 1983).

Além disso, níveis elevados de HSP 85 no citoplasma da célula de murino davam indícios que a proteína estava sendo regulada por glicose. Estudos feitos em leveduras também mostram que o metabolismo de glicose pode estar envolvido na regulação das HSPs (Lanks, 1983). Sendo assim podemos supor que o fato do padrão de expressão diminuído no estresse nutricional é decorrente do fato que foi observado que em trabalhos do nosso grupo que a via glicolítica apresenta-se fortemente diminuída principalmente nos primeiros momentos da metaciclologênese (estresse nutricional) (Tese de Christian Probst).

Coronin, putative – 5798.t00008

Esta proteína mostra um perfil de expressão aumentado em estresse de temperatura e nutricional, mas um perfil de diminuição no estresse de pH. Sabe-se que essa proteína apresenta três módulos WD, justapostos em sua extremidade aminoterminal. Possui ortólogos em *T. brucei* e *L. major*. As

coroninas são reguladores altamente conservados do citoesqueleto de actina que foram inicialmente descritas em *Dictyostelium discoideum*, no qual elas se localizam em estruturas semelhantes a coroas ricas em actina, na superfície dorsal das células (De Hostos *et al.*, 1991). A polimerização da actina ocorre através da formação de redes de actina, em um processo altamente regulado, sendo que as coroninas seriam um desses fatores de regulação (Utrecht & Bear, 2006).

Proteína Hipotética conservada – 7960.t00009

Esta proteína mostra um perfil de expressão aumentado em estresse de temperatura e nutricional, mas uma expressão de diminuição no estresse de pH. Dados da literatura mostram que em tripanossomatídeos a endocitose e a exocitose são restritas a bolsa flagelar. CRAM é uma proteína transmembranar rica em cisteína, localizada na bolsa flagelar do *T. brucei* e potencialmente funciona como receptor ou um componente essencial para a captação de lipoproteínas (Qiao, *et al.*, 2006). CRAM super expressa na forma de procíclica do *T. brucei*. CRAM é conservada em várias espécies de protozoários, inclusive em *T. cruzi* (Yang, *et al.*, 2000). Acredita-se que a bolsa flagelar seja um local de captação de nutrientes e macromoléculas possivelmente mediados por receptores de endocitose (Lee, *et al.*, 1990).

Enolase – 4911.t00014

Esta proteína mostra um perfil de expressão diminuição em todos os estresses, mas esta diminuição é mais evidente em estresse nutricional. A Enolase catalisa a conversão reversível de 2-fosfoglicerato (2PGA) para fosfoenolpiruvato (PEP) na glicólise e gliconeogênese. Enolases de uma ampla variedade de organismos foram caracterizadas e suas sequências são altamente conservadas. Em alguns casos, a expressão da enolase varia de acordo com condições metabólicas ou do desenvolvimento. Em tripanossomatídeos, a enolase é, ao contrário da maioria das enzimas glicolíticas, não compartimentalizada nos glicossomos (organela característica destes protozoários). É possível imaginar que a enzima, nestes parasitas, tem

um papel regulatório, em contraste com as enolases clássicas, desde a sua reação produto/substrato, PEP, como ficou demonstrado para as formas procíclicas de *T. brucei*. Durante a glicólise, parte da PEP é redirecionada para o glicossomo, onde é convertido em succinato, através de um percurso PEP carboxiquinase (PEPCK). A ocorrência destas reações dentro do glicossomo é considerada necessária para controlar o ATP / ADP e o balanço redox dentro da organela. Outra parte do PEP é convertida em piruvato pela piruvato quinase citosólica. Este piruvato então entra na mitocôndria ou é convertido em alanina pela alanina aminotransferase citosólica. Além disso, em *Trypanosoma cruzi*, foram detectados genes que codificam as fosfoenolpiruvato (Quiñones, et al., 2007).

Os mecanismos de regulação da expressão gênica em *T. cruzi* devem ocorrer após o término da transcrição, no que é denominada regulação pós-transcricional. Tal regulação possui diversos pontos potenciais de ocorrência, como por exemplo, no *trans-splicing*, exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma, degradação citoplasmática dos mRNAs (cuja meia-vida entre a produção e degradação do RNA seria o principal elemento na determinação da quantidade de proteína que deverá ser produzida), associação à maquinaria de tradução (controle do acesso dos mRNAs citoplasmáticos à maquinaria pode atuar de forma seletiva, criando assim, um mecanismo de controle pós-transcricional da expressão gene-específica) e estabilidade protéica. Sendo assim, o controle da expressão gênica a nível pós-transcricional em *T. cruzi* resulta em uma baixa correlação entre o nível mRNA e proteínas.

Desta forma, um número maior de proteínas poderiam de uma maneira mais efetiva estar atuando no parasita em resposta as condições de estresses a qual este foi submetido e que não puderam ser evidenciados com a utilização da técnica de microarranjos. Deste modo, resolvemos utilizar adicionalmente a ferramenta de proteômica a fim de analisarmos os perfis de proteínas nos diferentes tipos de estresses e buscar evidências de outras proteínas com expressão diferencial nestas condições estudadas.

O termo proteômica em seu âmbito geral pode ser definido como a análise em larga escala do estudo dos produtos gênicos envolvendo somente as proteínas. Mas combinar o estudo das proteínas com a análise de mRNAs, abordagens genômicas (microarranjos) e análise de interações de proteínas por duplo híbrido pode se ter uma resposta biológica mais completa para uma determinada pergunta científica (Patterson & Aebersold, 2003).

A proteômica *High-Throughput* tem por objetivo o estudo dinâmico das mudanças de expressão das proteínas de um organismo inteiro, tecido específico ou o compartimento celular sob certa condição. Conseqüentemente, os dois principais objetivos da abordagem proteômica são identificar proteínas derivadas de misturas complexas extraídas de uma célula e quantificar o nível de expressão das proteínas identificadas (Hogan, et al., 2006).

A espectrometria de massa (MS) tornou-se uma ferramenta primordial na realização destes objetivos. Tendo a capacidade de identificar proteínas através de informações geradas a partir do *tandem* da espectrometria de massa (MS/MS) e a medição da expressão de proteínas por métodos quantitativos de MS. Recentemente, esta abordagem esta sendo sucessivamente aplicada em muitos estudos e é capaz identificar de 500 – 1000 proteínas por experimento. Sendo confiavelmente capaz de detectar e estimar a expressão relativa (proteínas diferencialmente expressas em distintas condições) de proteínas com alta e média abundância. Além de medir a expressão absoluta (quantificação) de uma simples proteína em uma mistura de complexos protéicos. Entretanto, o nível de precisão ainda não pode ser avaliado, visto que os métodos proteômicos são limitados pelo o número e concentração de proteínas que pode ser resolvidas (Hogan, et al., 2006).

Esta ferramenta já está sendo utilizada em diversos organismos, como no caso do *Trypanosoma cruzi* (Parodi-Talice et al., 2007, Atwood, et al., 2005, Parodi-Talice, et al., 2004, Paba et al., 2004, Paba et al., 2004). Esta abordagem se torna interessante no caso dos tripanossomatídeos, devido ao

seu controle pós-transcricional, permitindo assim a análise do perfil proteômico nos seus diferentes estágios de desenvolvimento.

Após a análise dos dados foi observado que havia uma grande variabilidade no número de peptídeos identificados, muito provavelmente devido a variações técnicas e biológicas sofridas ao longo do processo. Com foi possível visualizar nos resultados obtidos foram identificados 5274 peptídeos para as formas epimastigota em contra partida foram identificados 10567 peptídeos para o estresse de temperatura. Desta forma, foram feitas normalizações nos dados de proteômica dos distintos tipos de estresse para tentar minimizar estas variações. Listas com proteínas diferencialmente expressas nos estresses em relação à epimastigotas foram geradas resultando em um conjunto de 173 proteínas.

Entretanto, um número maior de proteínas foi identificado no estresse de temperatura (n=103) em relação ao estresse de pH (n=69) e nutricional (n=79) conflitando com os resultados obtidos no microarranjo que mostravam que a expressão de genes diferencialmente expressos era maior em estresse nutricional. Um da hipótese que pode ser levantada diz respeito ao número muito maior de peptídeos identificados no estresse de temperatura, mesmo com a normalização efetuada, pode ter influenciado nestes achados. Adicionalmente, com a técnica de proteômica utilizada não foi possível identificar todas as proteínas presentes nos estresses, deste modo, informações relevantes foram perdidas e estão diretamente associadas a limitações inerentes a utilização desta metodologia.

Os dados de proteômica foram comparados com os dados de microarranjo. Cabe salientar que o microarranjo identifica diferenças entre as populações de RNA. Não necessariamente a quantidade diferente de RNA corresponde a quantidades diferentes de proteínas. Além disto, a proteômica ainda é uma técnica bem menos sensível que o microarranjo onde as diferenças no conteúdo proteico de células distintas podem não ser diretamente quantificáveis pelo estudo do proteoma. Finalmente, a técnica de

microarranjo possui um caráter mais quantitativo do que as técnicas de proteômica utilizadas neste trabalho. Estes métodos apresentam diferenças metodológicas importantes, principalmente com relação à sensibilidade, especificidade e capacidade de quantificação, além de estarem avaliando representações distintas da expressão gênica. Portanto, a concordância entre resultados de dois estudos metodologicamente diferentes reforça a confiabilidade dos resultados obtidos pelo microarranjo. A ausência de concordância, todavia, pode refletir as características de cada técnica, além de, como já mencionado, alterações à nível pós-traducional acontecem constantemente dependendo de alterações sofridas no microambiente no momento da análise das proteínas.

De toda forma, como já mencionados nos resultados dentro do conjunto das 173 proteínas diferencialmente expressas, 67% possuíam sondas equivalentes no microarranjo das modalidades de estresses analisadas neste trabalho.

Cabe salientar com foi observado nos resultados apresentados no item 4.5.3, às proteínas diferencialmente expressas mostram pouca modulação no microarranjo. As modulações que ocorrem no microarranjo são em geral pequenas e não tão expressivas. Sendo assim, pode-se supor que este fato deve-se muito provavelmente, a mudanças sutis no nível de RNA quando o parasita é submetido ao estresse.

Já quando observado os dados de proteômica pode-se notar que há padrão coeso de aumento ou diminuição em todos os tipos de estresse, padrões de aumento ou diminuição em dois tipos de estresse em relação a um terceiro ou até mesmo perfis de aumento ou diminuição em apenas um dos estresses propostos, desta forma, é possível inferir que há uma tendência a perfis claros de expressão quando avaliamos os resultados dos experimentos de LC-MS/MS. Cabe ressaltar que em relação aos dados obtidos por nossa equipe com a utilização da plataforma de microarranjos durante a diferenciação celular do *Trypanosoma cruzi* (diferenciação de epimastigotas para

tripomastigotas metacíclicos), no caso dos genes diferencialmente selecionados no estresse nutricional, estes são em número significativamente menor do que os observados em tempos mais avançados da diferenciação. Estes dados em conjunto com nossas observações neste trabalho podem indicar que poucos genes têm sua expressão modulada em resposta ao estresse no nível dos mRNAs associados aos polissomas, comparativamente ao número de genes evidenciados em tempos mais avançados da metaciclogênese. Adicionalmente, existem fortes indícios de proteínas com expressão diferencial selecionados neste trabalho com a utilização de metodologias de proteômica, cujos mRNAs correspondentes apresentam tendência de ausência de modulação. Estes dados em conjunto indicam uma potencial importância da regulação pós-tradicionais no disparo da diferenciação celular das formas epimastigotas.

Estas observações devem ser validadas e uma das iniciativas que estamos iniciando e a utilização de metodologias de proteômica quantitativa, bem como, de metodologias convencionais para o estudo da regulação da expressão de genes e proteínas selecionados neste projeto, visando compreender o papel destes, na resposta as condições experimentais avaliadas no processo de diferenciação do parasita.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho analisou algumas condições de estresses utilizando ferramentas de Genômica Funcional, bem como, ensaios biológicos. A metodologia de metaciclôgenese *in vitro* foi utilizada para verificar a capacidade do *T. cruzi* de se diferenciar perante as modalidades de estresse propostos. Além disso, ensaios biológicos *in vitro* com células *Vero* e *in vivo* com camundongos foram realizados para verificar a capacidade de infecção dos parasitas. Todos estes ensaios efetuados tiveram resultados satisfatórios em relação ao objetivo pela qual foram propostos.

A ferramenta de microarranjo de DNA foi utilizada e através dela foi possível:

Identificar grupos de genes diferencialmente expressos a partir de três réplicas biológicas independentes das distintas condições de estresses estudados.

Os genes diferencialmente expressos nos estresses analisados em relação às formas epimastigotas foram selecionados com alto nível de estringência.

Os genes selecionados mostravam, em geral, uma resposta similar nos estresses estudados. Além disso, também foram selecionados genes significativamente diferentes entre os estresses através de uma análise específica.

Obtivemos um grau elevado de confirmação dos dados de microarranjos utilizando a metodologia de PCR em tempo real (> 90%).

Adicionalmente foram utilizadas ferramentas de análise em larga escala de proteínas para avaliar este perfil nas diferentes condições de estresse estudadas gerando informações adicionais sobre proteínas potencialmente diferencialmente expressas nestes estresses, gerando como resultados:

173 proteínas mostraram indícios de expressão diferencial nos estresses estudados em relação as formas epimastigotas.

Observou-se um padrão mais complexo de expressão diferencial do que aquele observado no microarranjo.

Apesar destas proteínas diferencialmente expressas serem candidatas a caracterização funcional, ainda há a necessidade de confirmação por outras técnicas de biologia molecular para a validação dos resultados obtidos.

Quando foi realizada a comparação dos dados da proteômica com os dados provenientes do microarranjo foi visto que, das 173 proteínas selecionadas na proteômica, 117 (67%) apresentaram sondas no microarranjo. Além disso, os dados de microarranjo não mostram nenhum sinal de modulação para as proteínas selecionadas pela proteômica.

Com isso, podemos inferir que estes dados em conjunto indicam uma potencial importância da regulação pós-traducional no disparo da diferenciação celular das formas epimastigotas.

Portanto, os dados obtidos neste trabalho com estas duas metodologias estão sendo agora validados visando aumentar nosso conhecimento sobre estes genes e seu papel na resposta as condições experimentais avaliadas, assim como seu papel na diferenciação celular do *Trypanosoma cruzi*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbot, A. News briefing: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*, 1999 ; 402 :715-720.

Abuin G, Freitas-Júnior LHG, Colli W, Alves MJM e Schenckman S. Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the pos-transcriptional level by labile protein factors. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274 (19): 13041-13047.

Adroher FJ, Osuna A, Lupianez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1988, 267(1): 252-261.

Aebersold R, Goodlet DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.*, 2001; 101:269-295.

Aebersold, R. Constellations in a cellular universe. *Nature*, 2003; 422:115-116.

Agabian, N. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*, 1990; 61: 1157-1160.

Akopyants, NS, Matlib, RS, Bukanova, EN, Smeds, MR, Brownstein, BH, Stormo, GD, Beverley, SM. (2004). Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*, 2004, 136, 71-86.

Almeida R, Gilmartin BJ, McCann SH, Norrish A, Ivens AC, Lawson D, Levick MP, Smith DF, Dyal SD, Vetrie D, Freeman TC, Coulson RM, Sampaio I, Schneider H, Blackwell JM. Expression profiling of the *Leishmania* life cycle:

cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Mol Biochem Parasitol.*, 2004, 136, 87-100.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.

Alvarez VE, Kosec G, Sant'Anna C, Turk V, Cazzulo JJ, Turk B. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 2008 Feb 8;283(6):3454-64.

Aly R, Argaman M, Pinelli E e Shapira M. Intergenic sequences from the heat-shock protein 83-encoding gene cluster in *Leishmania mexicana amazonensis* promote and regulate reporter gene expression in transfected parasites. *Gene*, 1993; 127(2): 155-163.

Amato, Neto V, Yasuda, MAS, Amato, VS. Doença de Chagas Aguda. Em : Dias, J.C.P., Coura, J.R. (eds.). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro, Fiocruz Editora, 1997; pp 127-134.

Andrade AF, Esteves MJ, Angluster J, Gonzales-Perdomo M, Goldenberg S. Changes in cell-surface carbohydrates of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis under chemically defined conditions. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 2845-9.

Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 1990; 61, 1277-87.

Aranda A, Maugeri D, Uttaro AD, Opperdoes F, Cazzulo JJ, Nowicki C. The malate dehydrogenase isoforms from *Trypanosoma brucei*: Subcellular localization and differential expression in bloodstream and procyclic forms. *Int J Parasitol.* 2006;36(3):295-307.

Argaman M, Aly R, Shapira, M. Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated post-transcriptionally. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1994,64(1):95-110.

Ashe MP, Long SK, Sachs AB. Glucose Depletion Rapidly Inhibits Translation Initiation in Yeast. *Molecular Biology of the Cell* 2000; 11: 833–848.

Aslund L, Carlsson L, Henriksson J, Rydaker M, Toro GC, Galanti N e Pttersson U. A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1994; 65: 317-330.

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

Ávila AR, Yamada-Ogatta SF, da Silva Monteiro V, Krieger MA, Nakamura CV, de Souza W e Goldenberg S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2001; 117(2):169-77.

Ávila AR, Dallagiovanna B, Yamada-Ogatta SF, Monteiro-Góes V, Fragoso SP, Krieger MA, Goldenberg S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet Mol Res* 2003; 2(1):159-68.

Baker ME, Billheimer JT, Strauss JF 3rd. Similarity between the amino-terminal portion of mammalian 58-kD sterol carrier protein (SCPx) and *Escherichia coli* acetyl-CoA acyltransferase: evidence for a gene fusion in SCPx. *DNA Cell Biol*. 1991; 10(9):695-8

Baptista CS, Vencio RZ, Abdala S, Valadares MP, Martins C, de Braganca Pereira CA, Zingales B. DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 138, 183-94.

Barderi P, Campetella O, Frasch AC, Santomé JA, Hellman U, Pettersson U, Cazzulo JJ. The NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochem J*. 1998; 330:951-8.

Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Reviews: Tibtech*, 1999; 17:121-127.

Beard CA, Wrightsman RA e Manning JE. Stage and strain specific expression of the tandemly repeated 90 kDa surface antigen gene family in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1988; 28: 227-234.

Belli SI. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol* 2000; 30:679-687.

Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J, Bruchhaus I. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*. 2003, 3(9):1811-29

Berberof M, Vanhamme L e Pays E. *Trypanosoma brucei*: a preferential splicing at the inverted polyadenylation site of the VSG mRNA provides further evidence for coupling between trans-splicing and polyadenylation. *Exp. Parasitol.*, 1995; 80: 563-567.

Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003; 19, 185-93.

Bonaldo, MC, Souto-Padron, T, De Souza, W, and Goldenberg, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell. Biol.* 1988; 106: 1349-1358.

Bonaldo MC, d'Escoffier LN, Salles J, Goldenberg, S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* matacyclogenesis. *Experimental Parasitology* 1991; 73:44-51.

Borst, P, Van der Ploeg M, Van Hoek JFM, Tas J e James J. On the content and ploidy of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1982; 6: 13-23.

Boveris A & Stoppani AO. Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Experient.*, 1977 33: 1306-1308.

Brems S, Guilbride DL, Gundlesdodjir-Planck D, Busold C, Luu VD, Schanne M, Hoheisel J, Clayton C. The transcriptomes of *Trypanosoma brucei* Lister 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 139, 163-72.

Brener, Z., Andrade, Z. (eds.). *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Editora Guanabara Koogan 1979; pp 1-41.

Brown SD, Huang J e Van der Ploeg LH. The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters. *Mol. Cell Biol.*, 1992; 12: 2644-2652.

Buchanan KT, Ames JB, Asfaw SH, Wingard JN, Olson CL, Campana PT, Araújo AP, Engman DM. A flagellum-specific calcium sensor. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (48):40104-11.

Cagney, G, Amiri, S, Premawaradena, T, Lindo, M, Emili, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. *Proteome Science*, 2003; 1:1-15.

Cahill DJ, Nordhof, E, O'Brien J, Klose J, Eickhoff H, Lehrach H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). *Proteomics from protein sequence to function*. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.1-22.

Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 1964; 6: 93-100.

Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch AC, Pettersson U, e Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*

is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1992; 50: 225-234.

Cannata JJB and Cazzulo JJ. Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1984; 11:37-49.

Cançado JR. *In*: Brenner Z, Andrade AZ e Barral-Netto M (eds) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2^a Ed. Guanabara Koogan SA 2000.

Carle GF, Frank M e Olson MV. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*, 1986; 232: 65-68.

Carneiro M, Caldas RA. Evidence for three respiratory terminals in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Tropica*. 1982, 39(1): 41-49.

Carvalho TM, de Souza W (1989) Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct* 14, 383-92.

Carvalho EF, de Castro FT, Rondinelli E, Soares CM e Carvalho JF. HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. *J. Cell. Physiol.*, 1990; 143(3):439-44.

Cash, P. Proteomics: the protein revolution. *Biologist*, 2002; 49:58-62.

Cash F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. *Anal. Chimica Acta*, 1998; 372:121-145.

Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2001; 12(2):323-37.

Cazzulo JJ, De Cazzulo BM, Higa AI, Segura EL. NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. *Compendium of Biochemic and Physiology*, 1979. 64(1):129-131.

Cazzulo JJ, Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJB. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Molecular Biochemical and Parasitology*. 1985, v. 16, 329-343.

Cazzulo BMF, Martínez J, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ. Effects of protease inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 124:81-86.

Chagas, C. Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* gen.n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida no homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1909; 1:159-218.

Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R e Childs G. Making and Reading Microarrays. *Nature Genetics*, 1999; 21:15-19.

Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ e Davis RW. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle *Mol. Cell.*, 1998; 2(1): 65-73.

Clayton CE, Fueri JP, Itzhaki JE, Bellofatto V, Sherman DR, Wisdom GS, Vijayasarathy S e Mowatt MR. Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.*, 1990; 10: 3036-3047.

Concepcion JL, Adje CA, Quinones W, Chevalier N, Dubourdieu M, Michels PA. The expression and intracellular distribution of phosphoglycerate kinase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 118(1):111-21

Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 1985 Jan14; (1):83-96.

Contreras, V.T, Salles, J.M, Thomas, N, Morel, C.M. e Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol. Biochem. Parasitol.,16: 315-327.

Contreras, VT, Araujo-Jorge, TC, Bonaldo, MC, Thomas, N, Barbosa, HS, Meirelles, MNL. e Goldenberg, S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1988; 83(1):123-133.

Cornelissen AW, Evers R, Grondal EJ, Hammer A, Jess W e JKö. Transcription and RNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. Acta Leiden., 1989; 58: 75-96.

Cornelissen AW, Backes S, Evers R, Grondal EJ, Jess W e JKö. Transcription analysis in *Trypanosoma brucei*. Biochem. Soc. Trans., 1990; 18: 710-714.

Coughlin BC, Texeira SM, Kirchhoff LV e Donelson JE. Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3' - untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. J. Biol. Chem., 2000; 275(16): 12051-12060.

Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O, Bonfante C, Campos JE, Santos L, Devera R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; 44:159-65.

Curotto-de-Lafaille MA e Wirth DA. Creation of null/+ mutants of the alpha-tubulin gene in *Leishmania enriettii* by gene cluster deletion. J. Biol. Chem., 1992; 267: 23839-23846.

Craig EA. Essential roles of 70kDa heat inducible proteins. *Bioessays*. 1989; 11(2-3):48-52

Dallagiovanna B, Plazanet-Menut C, Ogatta SF, Ávila AR, Krieger MA e Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like

proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.*, 2001; 99(1):7-16.

Delgado-Olivares L, Díaz-Acosta A, Membrillo-Hernández J. Un acercamiento a las condiciones ambientales de vida de *Escherichia coli*. Respuesta al estrés oxidativo y térmico en condiciones de limitación de oxígeno y fase estacionaria. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 2006; 48 (2): 162-172.

Denicola-Seoane A, Rubbo H, Rodriguez D & Radi R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992, 304: 279-286.

De Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Guggenheim R, Gerisch G. (1991) Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J* 1991 10; 3:4097-4104.

De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Ver. Citol.*, 1984; 86:197-283.

Dias, JCP. Mecanismos de transmissão. Em: *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Zigman Brener; Zilton Andrade e Manoel Barral-Neto ed. Guanabara Koogan 1979.

Dias, JCP. Acute Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1984; 79 (supl): 17-26.

Dias JC. Ecological aspects of the vectorial control of Chagas' disease in Brazil. *Cad Saúde Publica* 1994; 10(2):352-8.

Dias, JCP, Coura, J.R. Epidemiologia. Em: Dias, J.C.P., Coura, J.R. (eds.). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ Editora, 1997; pp33-36.

Dias JCP. In: Brenner Z, Andrade AZ e Barral-Netto M (eds) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Ed. Guanabara Koogan AS 2000.

Diehl S, Diehl F, El-Sayed NM, Clayton C, Hoheisel JD. Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA-microarray. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 123, 115-23.

Di Noia JM, Sánchez DO e Frasch ACC. The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270(41): 24146-24149.

Di Noia JM, D' Orso I, Sánchez DO e Frasch ACC). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275(14); 10218-10227.

Dragon EA, Sias SR, Kato EA e Gabe JD. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.*, 1987; 7: 1271-1275.

Dudoit S, Gentleman RC, Quackenbush J. Open source software for the analysis of microarray data. *Biotechniques* (Supl), 2003; 45-51.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P e Trent J. Expression Profiling using cDNA array. *Nature Genetics*, 1999; 21:10-14.

Dunn, M. Proteome Analysis. Disponível em: <<http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/1998/dunn.htm>>

Elias MCQB, Marques-Porto R, Freymüller E e Schenckman S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2001; 112: 79-90.

El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2002, 2(8):1007-17.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC *et al*. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005a; 309, 409-15.

Esteves MG, Gonzales-Perdomo M, Salviano CS, Angluster J, Goldenberg S. Changes in fatty acid composition associated with differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 50(1-2):31-34.

Evers R, Hammer A, Köck J, Jess W, Borst P, Mémet S e Cornelissen AW. *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. *Cell*, 1989; 56: 585-597.

Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:243-82.

Figueiredo RCBQ, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol* 2000; 86(6):1213-1218.

Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*. 1990; 346(6285):623-8.

Fonager J, Beedholm R, Clark BF, Rattan SI. Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp Gerontol*. 2002, 37(10-11):1223-8.

Fragoso SP, Mattei D, Hines JC, Ray D e Goldenberg S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1998; 94: 197-204.

Fragoso SP, Plazanet-Menut C, Carreira MA, Motta MC, Dallagiovanna B, Krieger MA e Goldenberg S. Cloning and characterization of a gene a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., 2003; 126: 113-117.

Furger A, Schürch N, Kurath U e Roditti I. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulation RNA stability and translation. Mol. Cell. Biol., 1997; 17(8): 4372-4380.

Galat A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. Eur J Biochem. 1993; 216(3):689-707

Gale Jr M, Carter V e Parsons M. Translational control mediates the developmental regulation of *Trypanosoma brucei* NRK protein kinase. J. Biol. Chem., 1994; 269 (60): 31659-31665.

Garcia S, Ramos CO, Senra JFV, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de Carvalho AC, Ribeiro dos Santos R, Soares MBP. Treatment with Benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. antimicrobial agents and chemotherapy 2005 Apr; 49(4)1521-528.

Garlapati S, Dahan E, Shapira M. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. Mol Bioch Parasitol 1999; 100: 95–101.

Gatlin CL, Turecek F. Quantitative electrospray ionization mass spectrometric studies of ternary complexes of amino acids with Cu(2+) and phenanthroline. J Mass Spectrom. 2000; 35(2):172-7.

Gibson WC, Swinkels BS e Borst P. Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. J. Mol. Biol., 1988; 201: 315-325.

Goldenberg S, Contreras VT, Salles JM, Bonaldo MC, Lima Franco MPA, Linss J, Lafaille J, Valle D e Morel CM. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1984; 79 (suppl): 39-44.

Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MPA, Katzin AM, Colli W e Morel C. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. FEBS, 1985; 180(2): 265-270.

Goldenberg S, Contreras VT, Bonaldo MC, Salles JM, Lima Franco MPA, Lafaille J, Gonzales-Pedromo M, Linss J. e Morel CM. *In vitro* differentiation systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. In: Molecular Strategies of Parasitic Invasion, 1987; p. 203-212.

Goldenberg, S. *Trypanosoma cruzi* as a model system for studying cell differentiation. Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design, 1990; 1-6.

Goldenberg, S., Krieger, MA.-Doença de Chagas: Novas perspectivas no diagnóstico imunológico 1997; 1(1):26-27.

Gontijo, ED, Dias, JCP. Mortalidade por doença de Chagas em Minas Gerais: Análise preliminar do período de 1978-1989. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 1994; 27 (supl II): 119-120.

Gonzales-Perdomo M, Romero P, Goldenberg S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. Exp Parasitol 1988; 66:205-212.

Gottschalk A, Neubauer G, Banroques J, Mann M, Luhrmann R, Fabrizio P. Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. EMBO J. 1999; 18(16):4535-48.

Graefe SEB, Wiesgigl M, Gaworski I, Macdonald A, Clos J. Inhibition of hsp90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation 2002; Eukariotic Cell 1(6):936–943.

Graham SV e Barry JD. Transcriptional regulation of metacyclic variant surface glycoprotein gene expression during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. Mol. Cell Biol., 1995; 15: 5945-5956.

Graham SV, Wymer B e Barry JD. Activity of a trypanosome metacyclic variant surface glycoprotein gene promoter is dependent upon life cycle stage and chromosomal context. Mol. Cell. Biol., 1998; 18(3): 1137-1146.

Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2002; 66:39-63.

Grondal EJ, Evers R, Kosubek K e Cornelissen AW. Characterization of the RNA polymerases of *Trypanosoma brucei*: trypanosomal mRNAs are composed of transcripts derived from both RNA polymerase II and III. EMBO J., 1989; 8: 3383-3389.

Guerrero AS, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, Singh M, Alves MJM & Flohé L. His-tagged tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as tool for drug screening. Appl. Microbiol. Biotech. 2000, 53: 410-414.

Guimarães, AC Cardiopatia Crônica: Insuficiência cardíaca. Em: Dias, JCP, Coura, JR (eds.). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 1997; 223-236.

Guimond C, Trudel N, Brochu C, Marquis N, El Fadili A, Peytavi R, Briand G, Richard D, Messier N, Papadopoulou B, Corbeil J, Bergeron MG, Legare D, Ouellette M. Modulation of gene expression in Leishmania drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. Nucleic Acids Res. 2003; 31, 5886-96.

Hancock WS, Wu SL, Stanley R, Gombocz EA. Publishing large proteome datasets: scientific policy meets emerging technologies. Trends Biotech., 2002; 20:S39-S44.

Haynes P, Yates JR. Review article: Proteome profiling – pitfalls and progress. *Yeast*, 2000; 17:81-87.

Heath S, Hieny S, Sher A. A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 43(1):133-141.

Hecker H, Betschart B, Bender K, Burri M e Schlimme W. he chromatin of trypanomes. *Int. J. Parasitol.*, 1994; 24(6): 809-819.

Hehl A, Vassella E, Braun R e Roditi I. A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 370-374.

Hellemond JJ, Bakker BM, Tielens AG. Energy metabolism and its compartmentation in *Trypanosoma brucei*. *Adv Microb Physiol*. 2005; 50:199-226.

Hilgers V, Texeira V e Roy Parker. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 2006; 12:1835–1845.

Hoare, C.A. e Wallace, F.G. (1996). Developmental stages of trypanosomatid flagellate: a new terminology. *Nature*, 212: 1385-1386.

Hogan JM, Higdon R, Kolker E. Experimental standards for high-throughput proteomics. *OMICS*. 2006; 10(2):152-7

Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 1989; 36(2):150-153.

Hug M, Carruthers VB, Hartmann C, Sherman DS, Cross GA e Clayton C. A possible role for the 3'-untranslated region in developmental regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993; 61: 87-95.

Isola ELD, Lammel EM, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi*: differentiation to metacyclic trypomastigotes in the presence of ADP-ribosyltransferase inhibitors. *Exp Parasitol* 1987; 64:424-429.

Janz L e Clayton C. The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Mol. Cell Biol.*, 1994; 14: 5804-5811.

Jess W, Hammer A e Cornelissen AW. Complete sequence of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*. *FEBS*, 1989; 249(1): 123-128.

Jocelyn H e Ilag L. Dividing and conquering proteomics. *Proteomics*, 2002; 96-98.

Johnson PJ, Kooter JM, e Borst P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*, 1987; 51: 273-81.

Johnston DA, Blaxter MR, Degraeve WM, Foster J, Ivens AC e Melville SE. Genomics and the biology of parasites. *Bioassays*, 1999; 21: 131-147.

Jungblut, PR. Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 2001; 3, 831-840.

Kleffmann T, Schmidt J, Schaub G. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote matacyclogenesis. *J Euk Microbiol* 1998 45(5):648-555.

Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today* 2000; 16:381-7.

Kooter JM e Borst P. Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic. Acids. Res.*, 1984; 12: 9457-9472.

Kooter JM, Van der Spek HJ, Wagter R, d'Oliveira CE, Van der Hoeven F, Johnson P J and Borst P. The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigens in *T. brucei*. *Cell*, 1987; 51(2): 261-72.

Kopke, A. Proteomics – a new drug discovery tool. Disponível em:

<<http://www.wita-proteomics.com>>

Krassner SM, Granger B, Lee P, Guerra C, Le T, Luc K-O. Action of exogenous potassium and calcium ions on *in vitro* metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 1991; 38(6):602-608.

Krautz GM, Peterson JD, Godsel LM, Krettli AU, Engman DM. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Feb;58(2):137-43.

Krieger S, Schwarz W, Ariyanagam MR, Fairlamb A, Krauth-Siegel L. & Clayton CE. (2000). Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increase sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.*, 35(3):542-52.

Lanks KW. Metabolite regulation of heat shock protein levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Sep;80(17):5325-9.

Lebowitz JH, Smith HQ, Rusche L e Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Developt.*, 1993; 7: 996-1007.

Lee MG, Bihain BE, Russell DG, Deckelbaum RJ, Van der Ploeg LH. Characterization of a cDNA encoding a cysteine-rich cell surface protein located in the flagellar pocket of the protozoan *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* 1990 Sep;10(9):4506-17

Lee HS, Kim YJ, Bae SS, Jeon JH, Lim JK, Kang SG, Lee JH. Overexpression and characterization of a carboxypeptidase from the

hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006; 70(5):1140-7.

Lee MG. A RNA polymerase II promoter in the HSP70 locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 1220-1230.

Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol.* 2007, 152(1):35-46.

Leroux A, Fleming-Canepa X, Aranda A, Maugeri D, Juan J. Cazzulo, Marco A. Sánchez and Cristina Nowicki. Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania* spp. *Mol and Bioch Parasit*, 2006; 149, 1:74-85.

Levine, N.D, Corliss, J.O, Cox, F.E.G, Deroux, G, Grain, J, Honigberg, B.M, Leedale, G.F, Loeblich, A.R, Lom, F, Lynn, D, Merinfeld, E.G, Page, F.C, Poljansky, G, Sprague, V, Vavra, J. e Wallace, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 1980; 27:37-58.

Linss J, Goldenberg S, Urbina JA, e Amzel LM. Cloning and characterization of the gene coding for the ATP-dependent phospho-enol-pyruvate carboxykinase in *Trypanosoma cruzi*: comparison of primary and predicted secondary structure with the host GTP-dependent enzyme. *Gene*, 1993; 136: 69-77.

Lodish H, Berk A, Lawrence Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D e Darnell J. In: *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W.H. Freeman and Company 2000.

Lopez MF. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. *J. Chromatography B*, 1999; 722:191–202.

Lu HY e Buck GA. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1991; 44: 109-114.

Lüdemann H, Dormeyer M, Sticherling C, Stallmann D, Follmann H & Krauth-Siegel, RL. *T. brucei*, triparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. FEBS, 1998, 431: 318-385.

Luo H, Gilinger G, Mukherjee D e Bellofatto V. Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and a tripartite architecture that includes an initiator element. J. Biol. Chem., 1999; 274(45): 31947-31954.

MacCoss MJ, Wu CC, Yates JR 3rd. Probability-based validation of protein identifications using a modified SEQUEST algorithm. Anal Chem. 2002; 1;74(21):5593-9

Maingon R, Gerke R, Rodriguez M, Urbina J, Hoenicka J, Negri S, Aguirre T, Nehlin J, Knapp T e Crampton, J. The tubulin genes of *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Biochem., 171: 1988; 285-291.

Maslow DA e Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. Parasitol. Today, 1995; 11 (1): 30-32.

Matte A, Sivaraman J, Ekiel I, Gehring K, Jia Z Cygler, M. Contribution of structural genomics to understanding the biology of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 2003; 185: 3994-4002.

Matthews KR, Tschudi C e Ullu EA. A common polypirimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNAs in trypanosomes. Genes Develop., 1994; 8: 491-501.

Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA e Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 2003; 131, 55-64.

Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, Pereira CA. *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. Experimental Parasitology. 2006; 114: 341–344.

Miura Y. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2004 Sep;45(3):357-72.

McKoy G, Badal M, Prescott Q, Lux H, Hart DT. Characterisation of phosphoglycerate kinase genes in *Leishmania major* and evidence for the absence of a third closely related gene or isoenzyme. *Mol Biochem Parasitol*. 1997; 90(1):169-81

Moffett LK, Stefan H e Kenneth DS. RNA editing: getting U into RNA. *TIBS.*, 1997; 22: 162-166.

Nogueira N, Bianco C, Cohn Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 1975; 142:225-229.

Nolan DP, Rolin S, Rodriguez JR, Abbeele JVD, Pays E. Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *Eur J Biochem* 2000; 267:18-27.

Nozaki T e Cross GA. Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1995; 75: 55-67.

Oliver, S. Guilt-by-association goes global. *Nature*, 2000; 403:601-603.

Olson CL, Nadeau KC, Sullivan MA, Winqvist AG, Donelson JE, Walsh CT, Engman DM. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 1994; 269(5):3868-74.

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

Paba J, Ricart CA, Fontes W, Santana JM, Teixeira AR, Marchese J, Williamson B, Hunt T, Karger BL, Sousa MV. Proteomic analysis of

Trypanosoma cruzi developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. J Proteome Res. 2004b May-Jun;3(3):517-24.

Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. Nature, 2000; 405, p.837-846.

Parodi-Talice A, Durán R, Arrambide N, Prieto V, Piñeyro MD, Pritsch O, Cayota A, Cerveñansky C, Robello C. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: Trypanosoma cruzi. Int J Parasitol. 2004; 34(8):881-6.

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

Pasion SG, Hines JC, Xiu O, Mahmood R e Ray DS. Sequences within the 5' untranslated region regulate the levels of a kinetoplast DNA topoisomerase mRNA during the cell cycle. Mol. Cell. Biol., 1996; 16(2): 6724-6735.

Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. Nat Genet. 2003; 33 Suppl:311-23.

Pays E, Tebabi P, Pays A, Coquelet H, Revelard P, Salmon D e Steinert M. The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *T. brucei*. Cell, 1989; 57: 835-845.

Pays E, Coquelet H, Tebabi P, Pays A, Jefferies D, Steinert M, Koenig E, Williams RO e Roditi I. *Trypanosoma brucei*: constitutive activity of the VSG and procyclin gene promoters. EMBO J., 1990; 9(10): 3145-3151.

Pays E e Nolan DP. Expression and function surface protein in *Trypanosma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol., 1998; 91: 3-36.

Probst, CM. Descrição da Metaciclo genese do Trypanosoma cruzi pelo uso de microarranjos de DNA. 2005. Tese de Doutorado.

Puigbó, J.J., Acquatella H, Giordano H, Suárez C. Analisis de los factores de riesgo em la cardiopatia chagássica crónica. Em: Madoery, R., Madoery, C., Cámara, M. L. (orgs.). Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Congresso Nacional de Medicina, 1993; pp 57-78.

Quadroni, M e James, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). Proteomics from protein sequence to function. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.151-169.

Qiao X, Chuang BF, Jin Y, Muranjan M, Hung CH, Lee PT, Lee MG. Sorting signals required for trafficking of the cysteine-rich acidic repetitive transmembrane protein in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. 2006 Aug;5(8):1229-42.

Quiñones W, Peña P, Domingo-Sananes M, Cáceres A, Michels PA, Avilan L, Concepción JL. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Exp Parasitol*. 2007 Jul;116(3):241-51.

Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313(4):856-62.

Rassi A e Luquetti AO. Specific Treatment for *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease). *American Trypanosomiasis*. Tyler KM and Miles MA; Kluwer Academic Publishers, London 2003. 118-125.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol*. 1995; 248:183-228.

Revelard P, Lips S e Pays E. Alternative splicing within and between alleles of the ATPase gene 1 locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993; 62: 93-101.

Rhee SG, Kang SW, Netto LE, Seo MS, Standtman ER. A family of novel peroxidases, peroxiredoxins. *Biofactors*. 1999, 10: 207-210.

Rolin S, Hanocq-Quertier J, Paturiaux-Hanocq F, Nolan DP, Pays E. Mild acid stress as a differentiation trigger in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 93:251–262.

Rudenko G, Bishop D, Gottesdiener K e Van der Ploeg LH. Alpha-amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, 1989; 8: 4259-4263.

Rudenko G, Le Blancq S, Smith J, Lee MG, Rattray A e Van der Ploeg LH. Procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes located in an unusually small alpha-amanitin-resistant transcription unit: PARP promoter activity assayed by transient DNA transfection of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.*, 1990; 10: 3492-3504.

Rudenko G, Chung HM, Pham VP e Van der Ploeg LH. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, 1991; 10(11): 3387-3397.

Ruiz FA, Rodrigues CO, Docampo R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2001; 276(28): 26.114–26.121.

Salmon D, Montero-Lomeli M, Goldenberg S. A DnaJ-like protein homologous to the yeast co-chaperone Sis1 (Tcj6p) is involved in initiation of translation in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 2001; 276(47):43970-9.

Sanchez-Moreno M, Rodriguez-Cabezas N, Fernandez-Becerra C, Mesa-Valle C, Osuna A. Induction of stress proteins in the plant trypanosome *Phytomonas characias*. *Parasitol Res.* 1997;83(8):771-5.

Sattlegger E and Hinnebusch AG. Polyribosome Binding by GCN1 Is Required for Full Activation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2_ Kinase

GCN2 during Amino Acid Starvation. The Journal of Biological Chemistry. 2005; 280(16): 16514–16521.

Savill, NJ e Higgs PG. A theoretical study of random segregation of minicircles in trypanosomatids. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 1999; 22; 266 (1419): 611-620.

Saxena A, Worthey EA, Yan S, Leland A, Stuart KD, Myler PJ Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. Mol Biochem Parasitol 2003; 129, 103-14.

Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, Volpin H, Myler PJ, Zilberstein D. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. Mol Biochem Parasitol. 2007, 152(1):53-65.

Schaub, G.A. (1994). Pathogenicity of trypanosomatids on insects. Parasitol. Today, 10: 463-468.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995; 270, 467-70.

Schmuñis, G.A. A Tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. Em: *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Zigman Brener; Zilton Andrade e Manoel Barral-Neto ed. Guanabara Koogan 2000.

Schwartz DC e Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. Cell, 1984; 37: 67-75.

Schwartz H, Mitulovic G, Soest RV, Gils M, Verberkmoes N, Hettich R. Rapid analysis of bacterial, yeast and plant proteomes using 2-D nano LC/MS/MS. PharmaGenomics, 2002; 20-24.

Shapiro TA e Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Ver. Microbiol.*, 1995; 49: 117-143.

Sherman DR, Janz L, Hug M e Clayton C. Anatomy of the PARP gene promoter of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, 1991; 10: 3379-3386.

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996; 93:14440-14445.

Schwartz JH. The many dimensions of cAMP signaling. *PNAS* 2001; 98(24):13.482–13.484

Schmid A, Krömer S, Heldt HW, Benz R. Identification of two general diffusion channels in the outer membrane of pea mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1112(2):174-80.

Smimidt, A. & Krauth-Siegel, R. L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 11: 1239-59.

Smith GK Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3, art 3.

Snutch TP, Heschl MF, Baillie DL. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: a molecular genetic characterization. *Gene*. 1988; 64(2):241-55.

Soares, MJ, Souto-Padron, T, Bonaldo, MC, Goldenberg, S e De Souza, W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research.*, 1989; 75: 522-527.

Soares MJ. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:139-141.

Steinert, P, Dittmar, K, Kalisz, H.M, Montemartini, M, Nogoceke, E, Rohde, M, Singh, M. & Flohe, L. Cytoplasmatic localization of the trypanothione peroxidase system in *Crithidia fasciculata*. Free Radic. Biol. Med. 1999, 7-8, 844-849.

Storino, R., Barragán, H. Epidemiología. Em: Storino, R., Milei, J. (eds.). Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Mosby Ed, 1994; pp 51-74.

Sutton RE and Boothroyd JC. Evidence for trans-splicing in trypanosomes. Cell, 1986; 47: 527-535.

Swindle J e Tait A. Trypanosomatid genetics in Molecular Biology of Parasitic Protozoa by Deborah F. Smith and Marilyn Parsons Oxford University, 1996.

Sylvester D, Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Compendium of Biochemical Physiology. 1976, 55: 443-447.

Texeira SM, Kirchhoff LV e Donelson JE. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem., 1995; 270(38): 22586-22594.

Tetaud E, Bringaud F, Chabas S, Barrett MP e Baltz T. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994; 91: 8278-8282.

Thomas MC, García-Pérez JL, Alonso C e López MC. Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. DNA Cell Biol., 2000. 19 (1): 47-57.

Toma HK, Ceravolo IP, Guerra HL, Steindel M, Romanha AJ. *Trypanosoma cruzi*: parasitemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite-cell interaction. Int. J. Parasitol., 2000; 30:593-597.

Tomás AM e Kelly JM. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1996; 76: 91-103.

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

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76, 4350-4.

Tusher VG, Tibshirani R e Chu R. Significance analysis of microarray applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98 (9): 5116-5121.

Tyler-Cross RE, Short SL, Floeter-Winter LM e Buck GA. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1995; 72: 23-31.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31: 472-81.

Uetrecht AC, Bear JE. Coronins: the return of the crown. *Trends in Cell Biol* 2006; 16(8): 421-426.

Urbina JÁ, Azavache V. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes. II. NAD⁺/dependent glutamate dehydrogenase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1984, 11: 241-255.

Urbina, JA, Osorno CE, Rojas A. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopicolinic acid: in vitro and in vivo studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1990, 282(1): 91-99.

Urbina JA. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today 1994; 10:107-110.

Urmenyi TP, De Castro FT, Carvalho JF, De Souza W e Rondinelli E. Transcriptional and post-transcriptional control of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. DNA Cell Biol, 1992; 11: 101-109.

Vanhamme L, Berberof M, Le Ray D e Pays E. Stimuli of differentiation regulate RNA elongation in the transcription units for the major stage-specific antigens of *Trypanosoma brucei*. Nucleic. Acids. Res., 1995; 23: 1862-1869.

Vanhamme L e Pays E. Control of gene expression in trypanosomes. Microbiol. Rev., 1995; 59 (2): 223-240.

Van Der Ploeg LH, Giannini SH, Cantor CR. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. Science. 1985;228(4706): 1443-1446.

Vassella E, Braun R e Roditi I. Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes. Nucleic Acids Res., 1994; 22(8): 1359-1364.

Walder JA, Eder PS, Engman DM, Brentano ST, Walder RY, Knutzon DS, Dorfman DM e Donelson JE. The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. Science, 1986; 233: 569-571.

Wilkins MR, Hochstrasser DF. Thinking bigproteome studies in a postgenome era 1996. Disponível em: <<http://www.abrf.org/Proteome.html>>

Wilkinson, S, Temperton, N, Mondragon, A & Kelly, J.M. Distinct Mitochondrial and cytosolic enzymes mediate Tripanothione-dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 2000, 275(11), 8220-8225.

Wu Y, Deford J, Benjamin R, Lee MG, Ruben L. The gene family of EF-hand calcium-binding proteins from the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* 1994; 15;304:833-41.

Yang SY, Yang XY, Healy-Louie G, Schulz H, Elzinga M. Nucleotide sequence of the *fadA* gene. Primary structure of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase from *Escherichia coli* and the structural organization of the *fadAB* operon. *J Biol Chem.* 1990; 265(18):10424-9

Yang H, Russell DG, Zheng B, Eiki M, Lee MG. Sequence requirements for trafficking of the CRAM transmembrane protein to the flagellar pocket of African trypanosomes. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(14):5149-63.

Zeledón, R., Bolaños, R. e Rojas, M. (1984). Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Tropica*, 41: 39-43.

Zingales B, Pereira ME, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, Vargas N, Cano MI, da Silveira JF, Nehme NS, Morel CM, Brener Z, Macedo A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop* 1997; 68, 159-73.

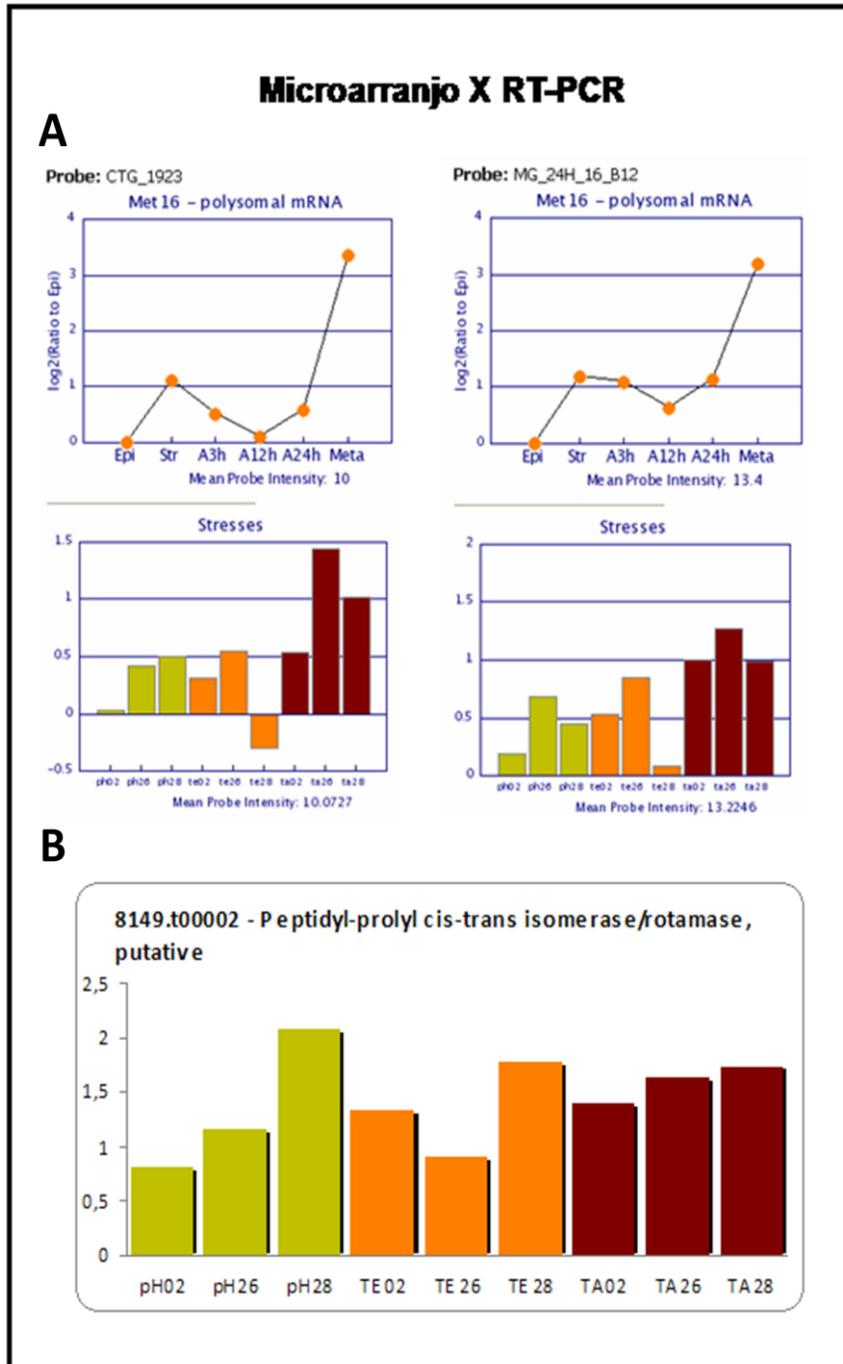
Zomerdijk JCBM, Ouellette M, ten Asbroek AL, Kieft R, Bommer AM, Clayton CE e Borst P. The promoter for a variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, 1990; 9: 2791-2801.

Zomerdijk, J.CB.M, Kieft, R. e Borst, P. (1991). Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 353: 772-775.

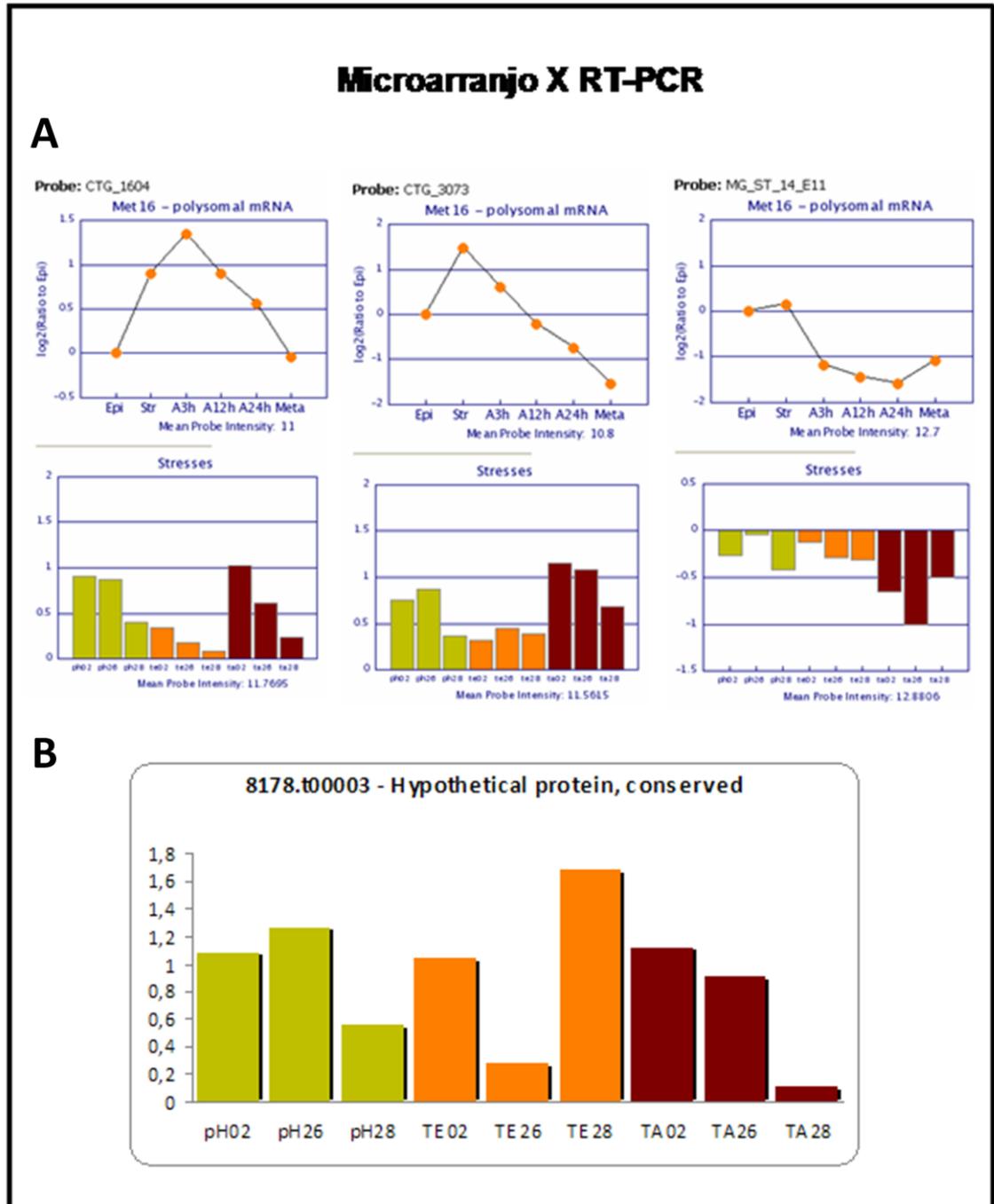
Zwierzynski TA, e Buck GA. RNA-protein complexes mediate *in vitro* capping of the spliced-leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 5626-5630.

8 ANEXOS

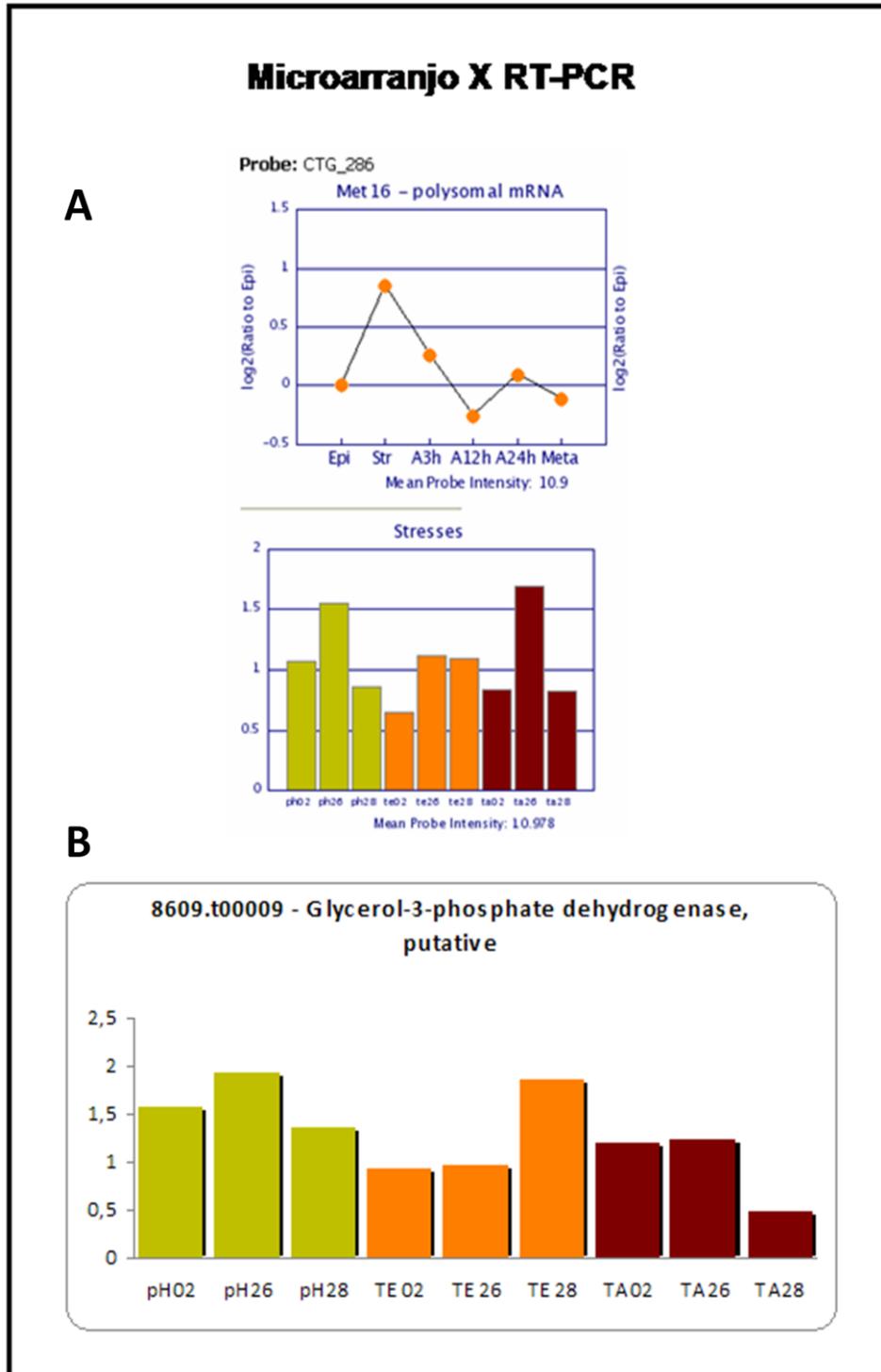
Anexo 01. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclogênese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 8149.t00002 – peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase, putative.



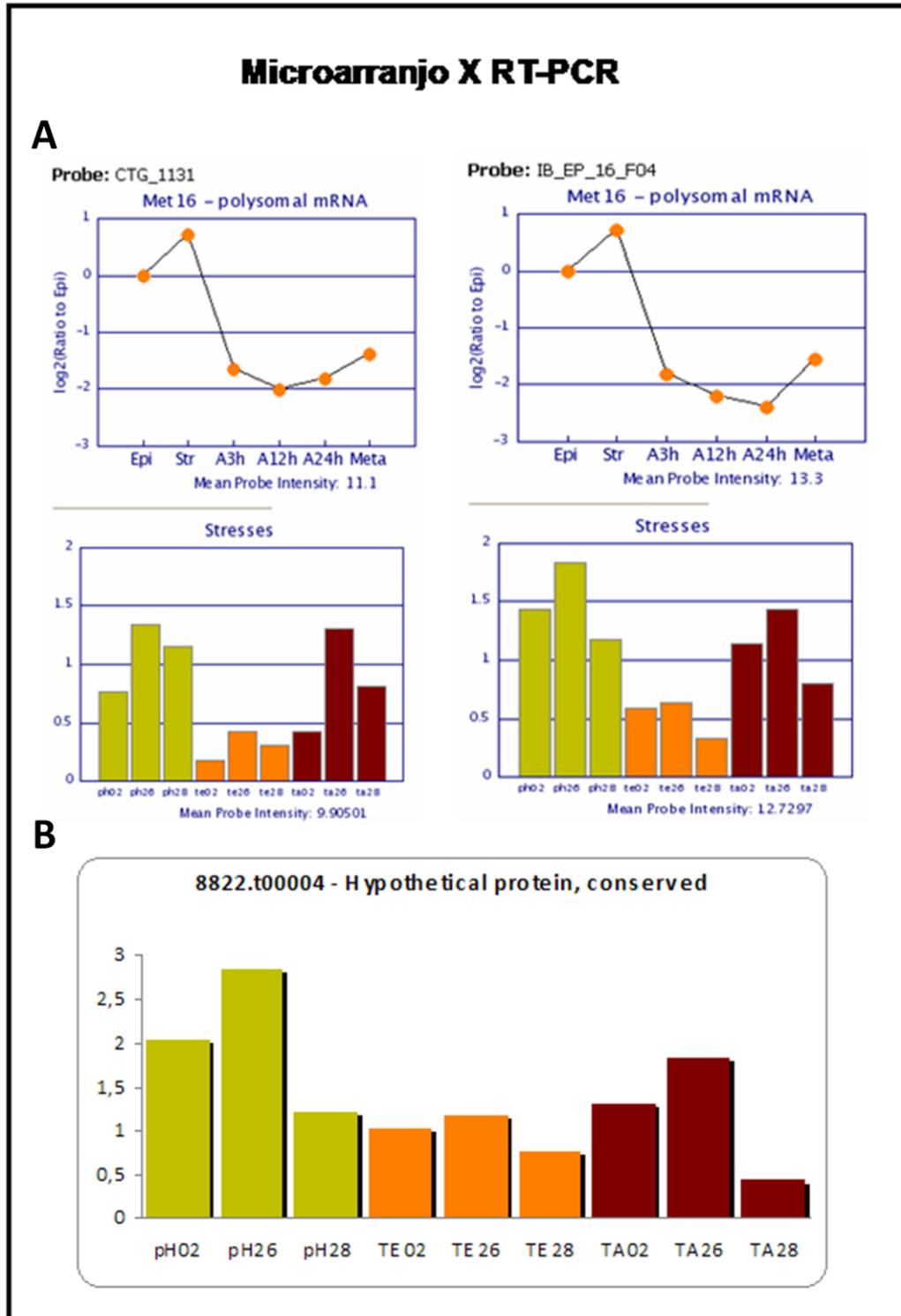
Anexo 02. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 8178.t00003 – hypothetical protein, conserved.



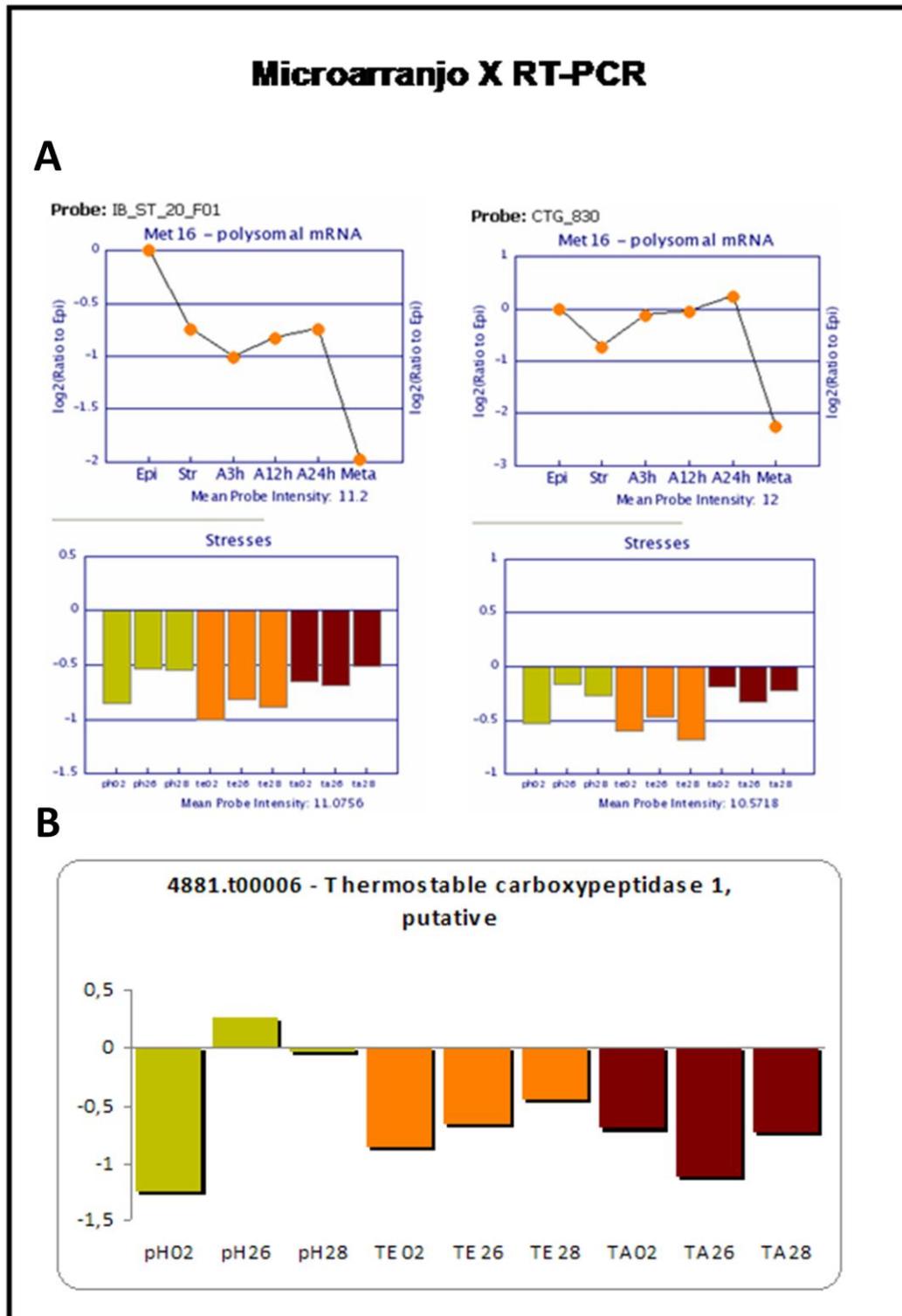
Anexo 03. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 8609.t00009 – glycerol-3-phosphate dehydrogenase, putative.



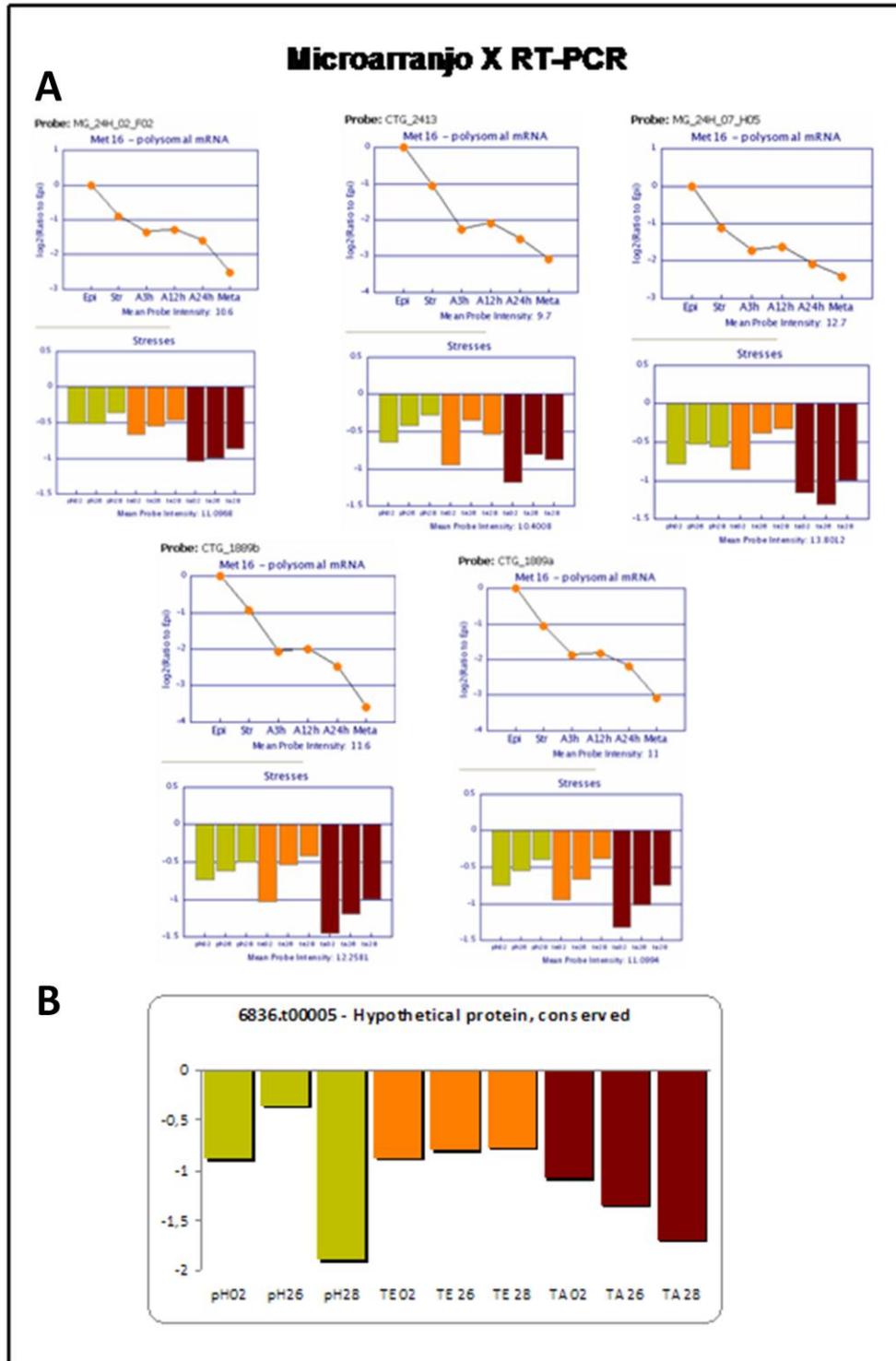
Anexo 04. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 8822.t00004 – hypothetical protein conserved.



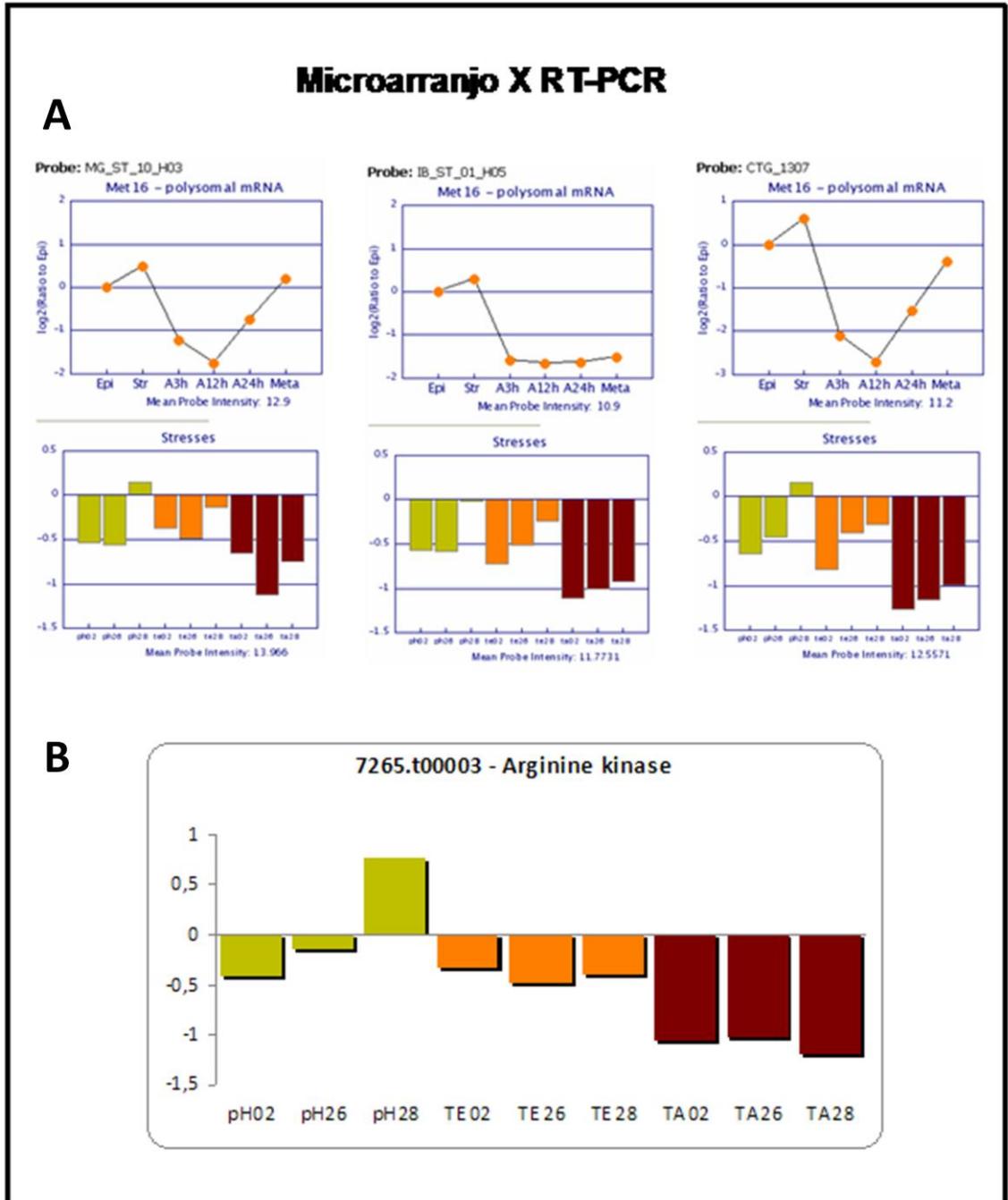
Anexo 05. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 4881.t00006 – thermostable carboxypeptidase 1, putative.



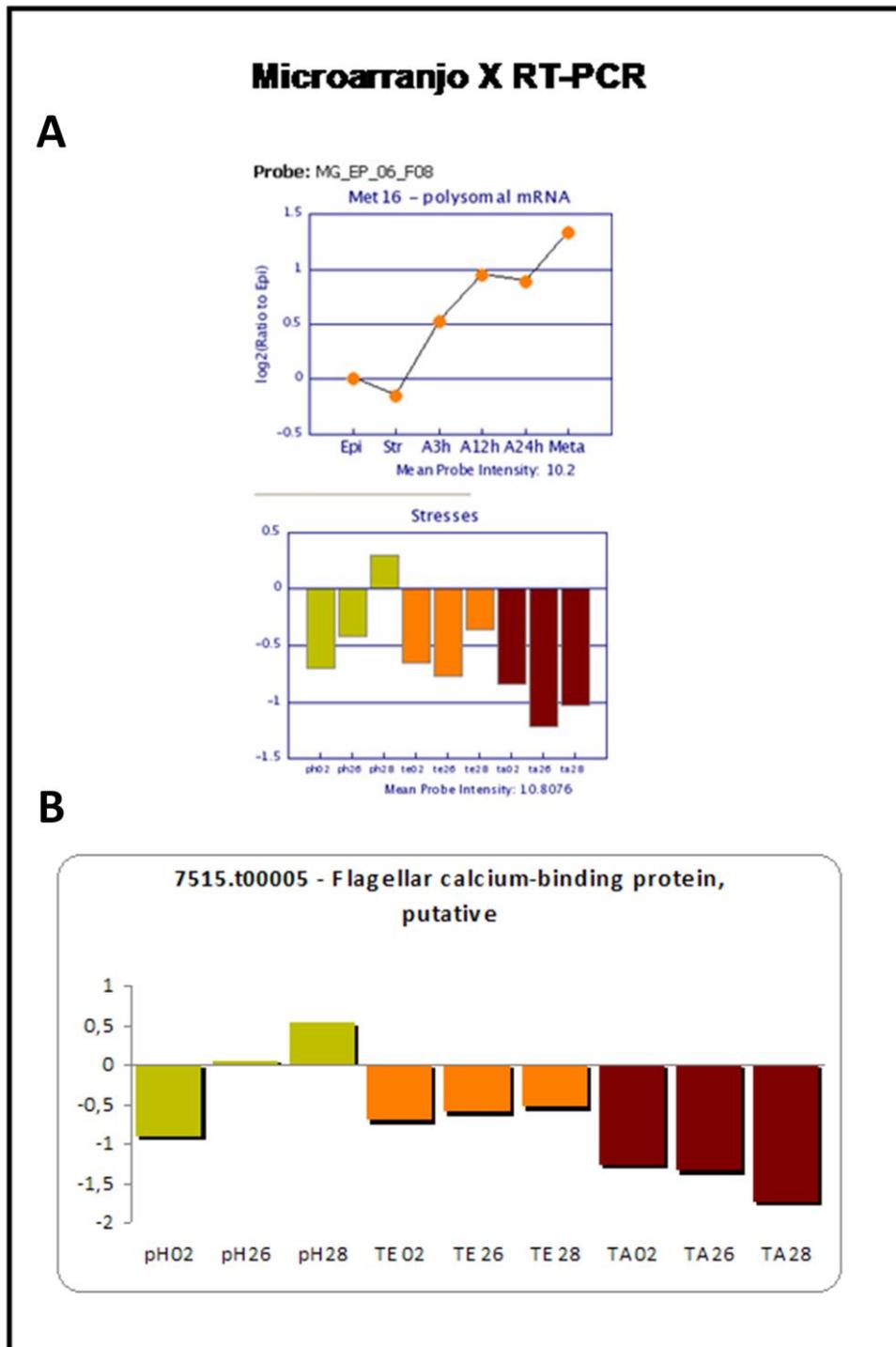
Anexo 06. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 6836.t00005 – hypothetical protein conserved.



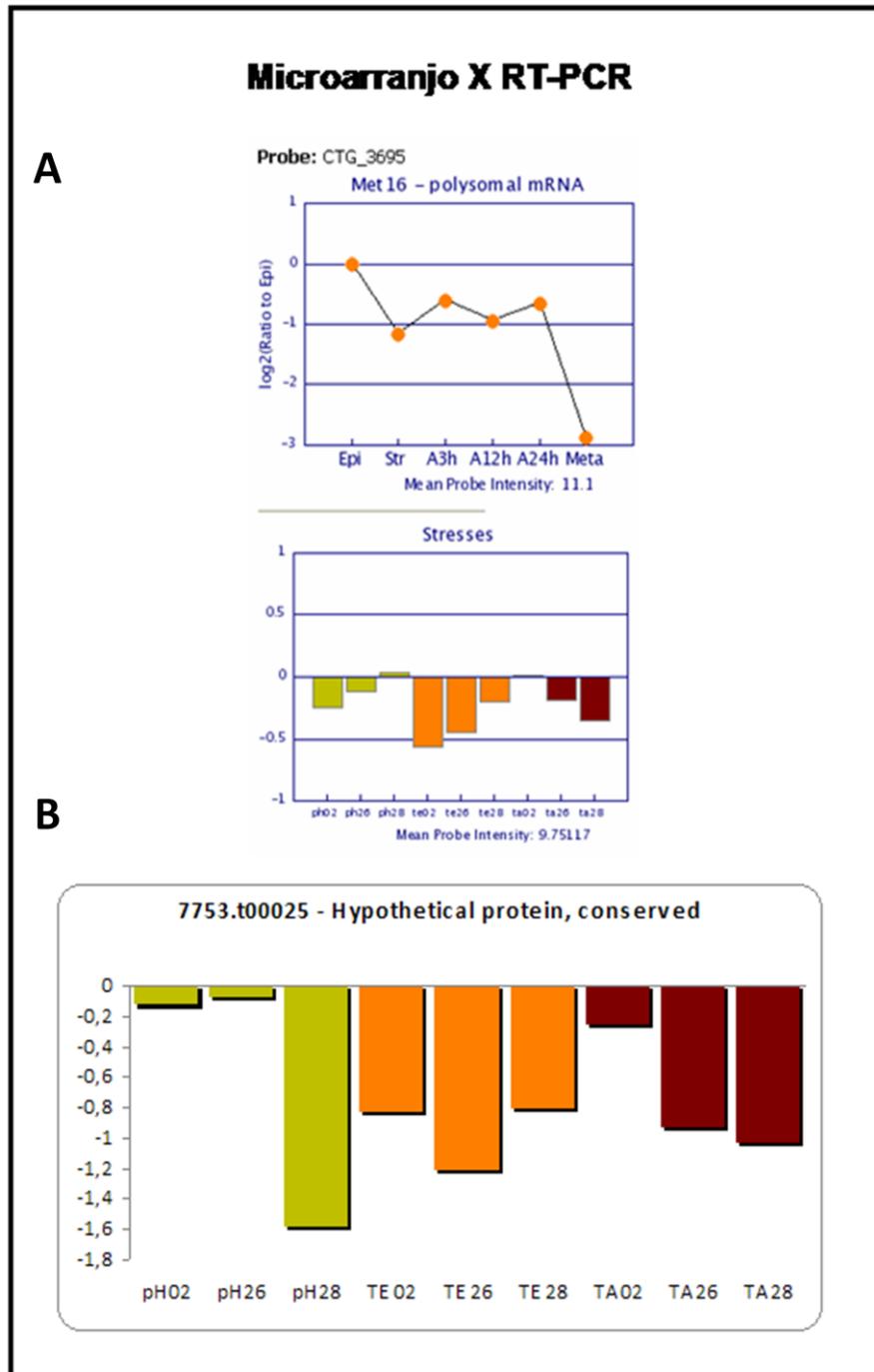
Anexo 07. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 7265.t00003 – Arginine kinase.



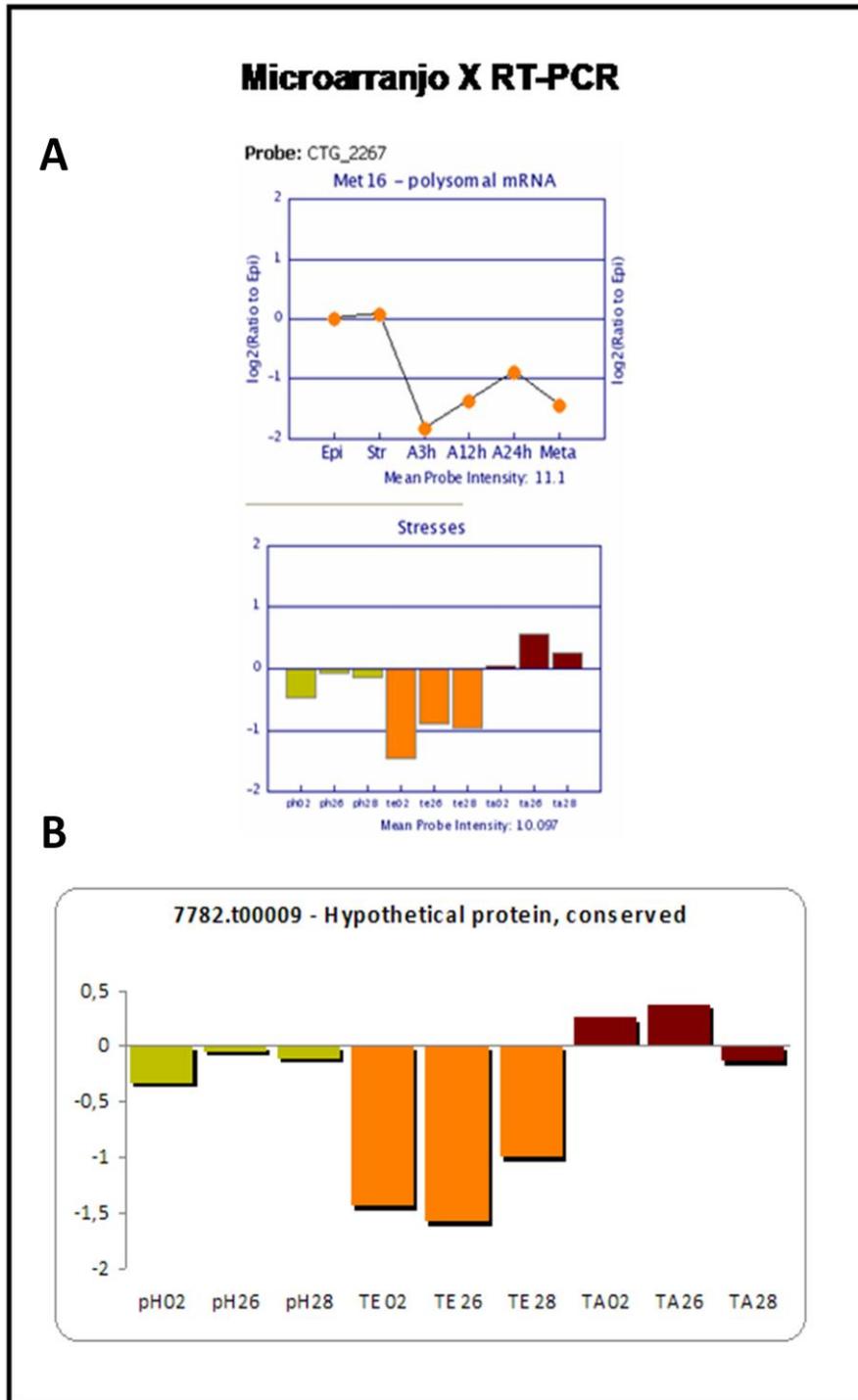
Anexo 08. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 7515.t00005 – flagellar calcium-binding protein, putative.



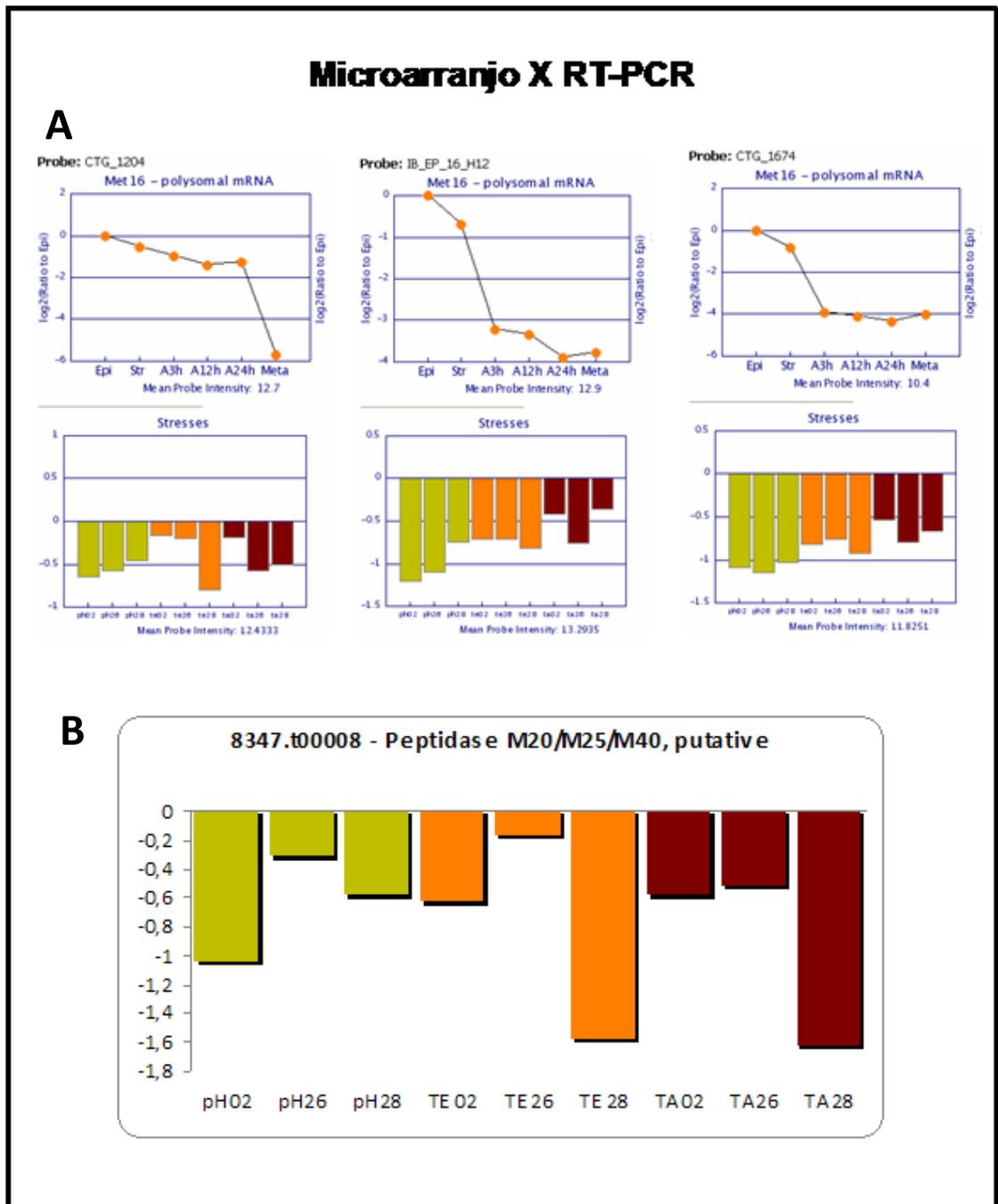
Anexo 09. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 7753.t00025 – hypothetical protein conserved.



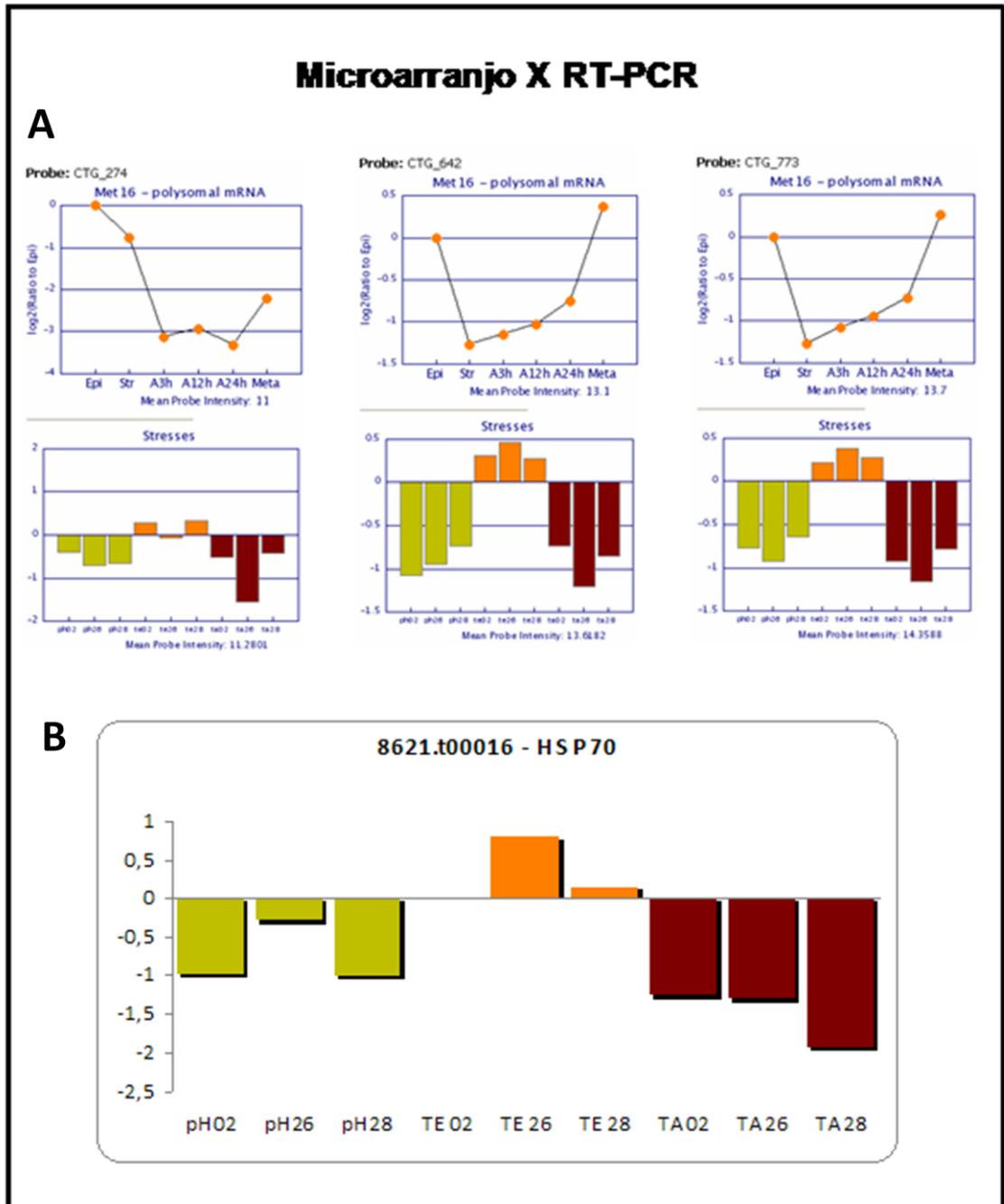
Anexo 10. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 7782.t00009 – hypothetical protein conserved.



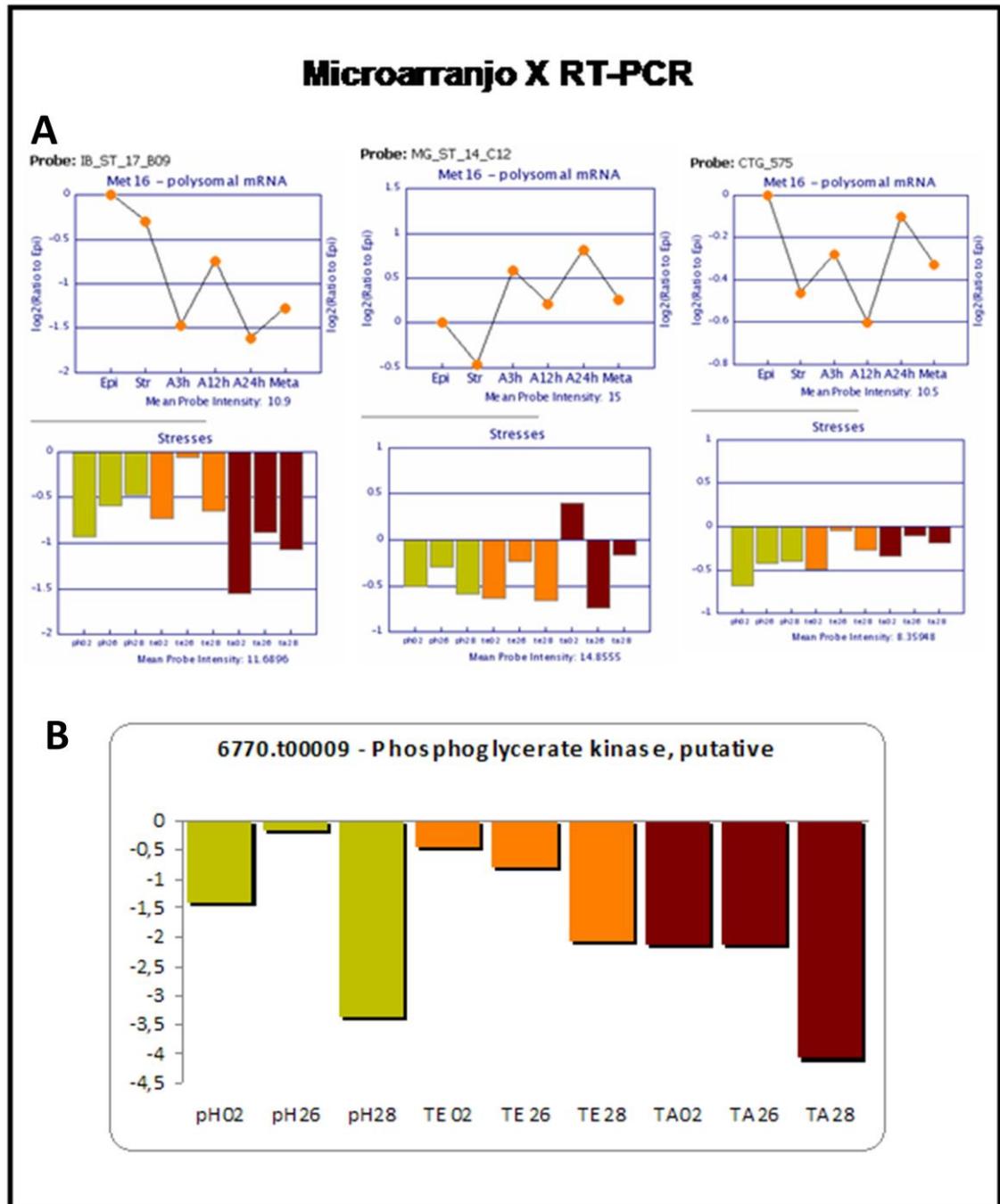
Anexo 11. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclógenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 8347.t00008 – peptidase M20/M25/M40, putative



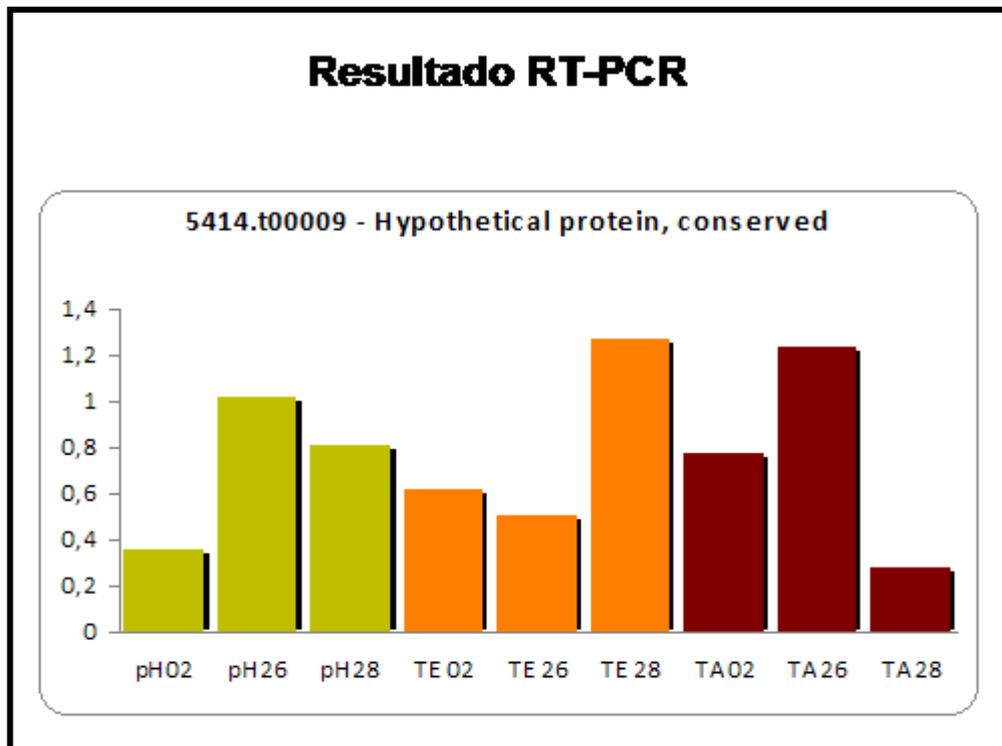
Anexo 12. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 8621.t00016 – HSP70.



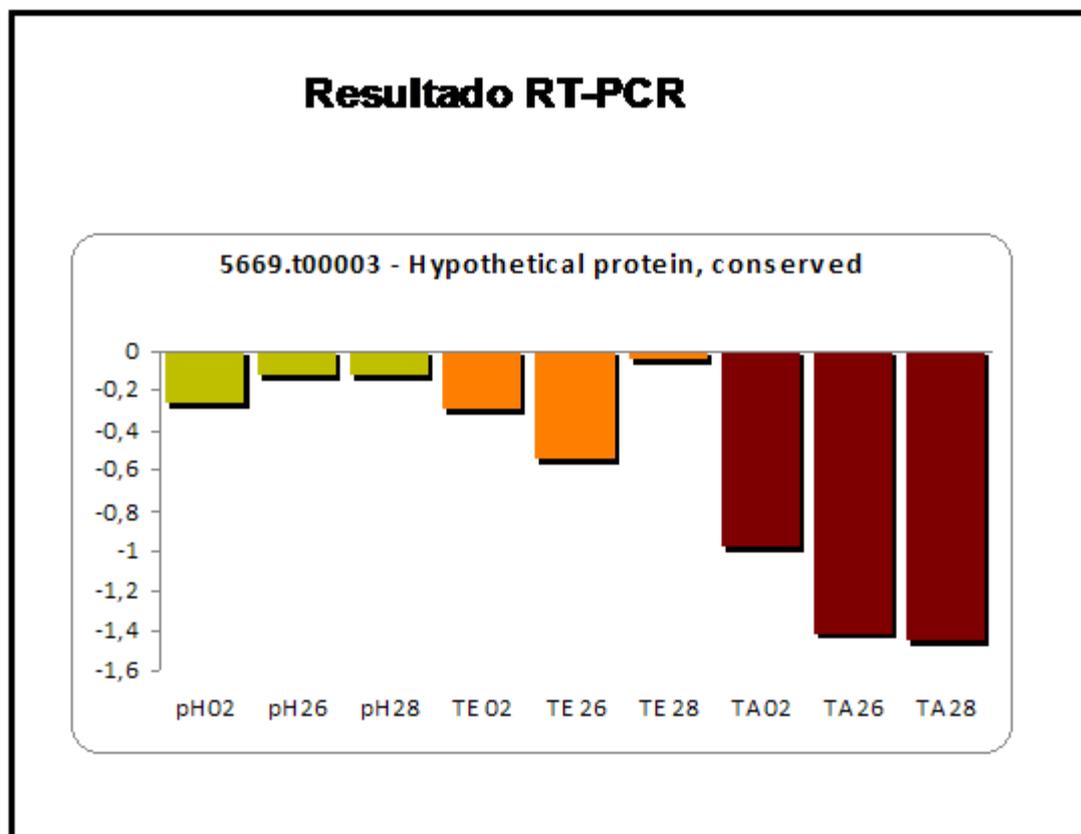
Anexo 13. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 6770.t00009 – phosphoglycerate kinase, putative.



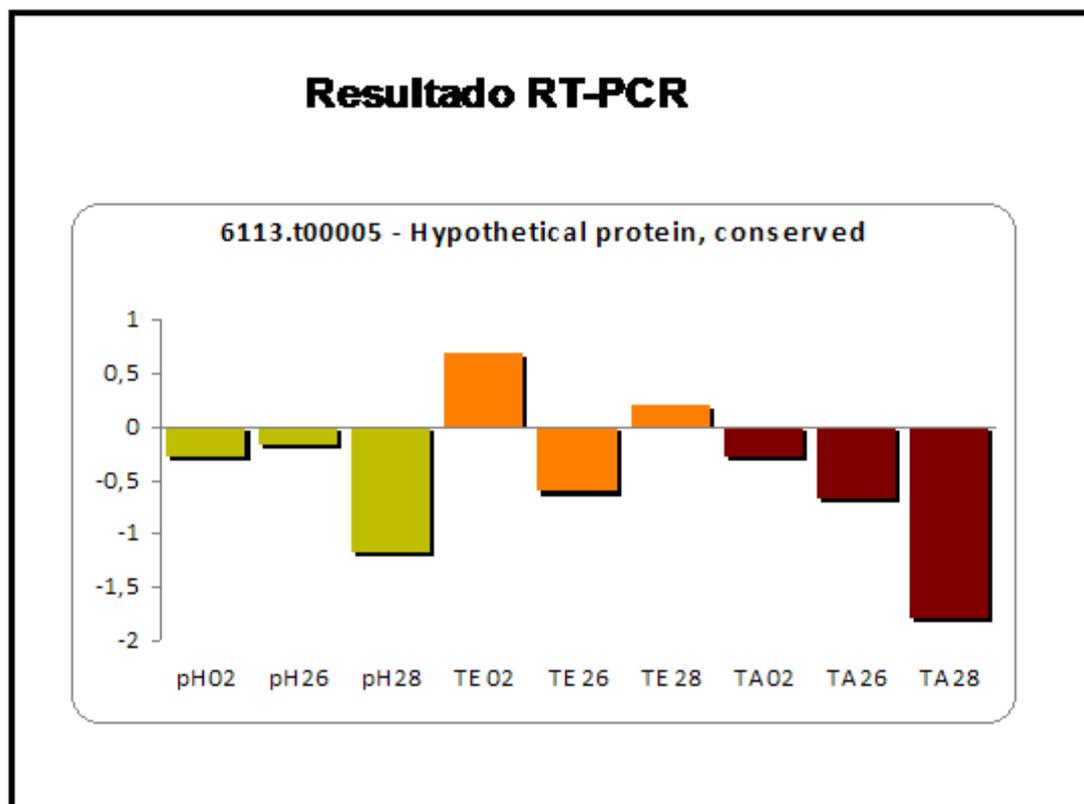
Anexo 14. Resultado de RT-PCR do gene 5414.t00009 – hypothetical protein, conserved.



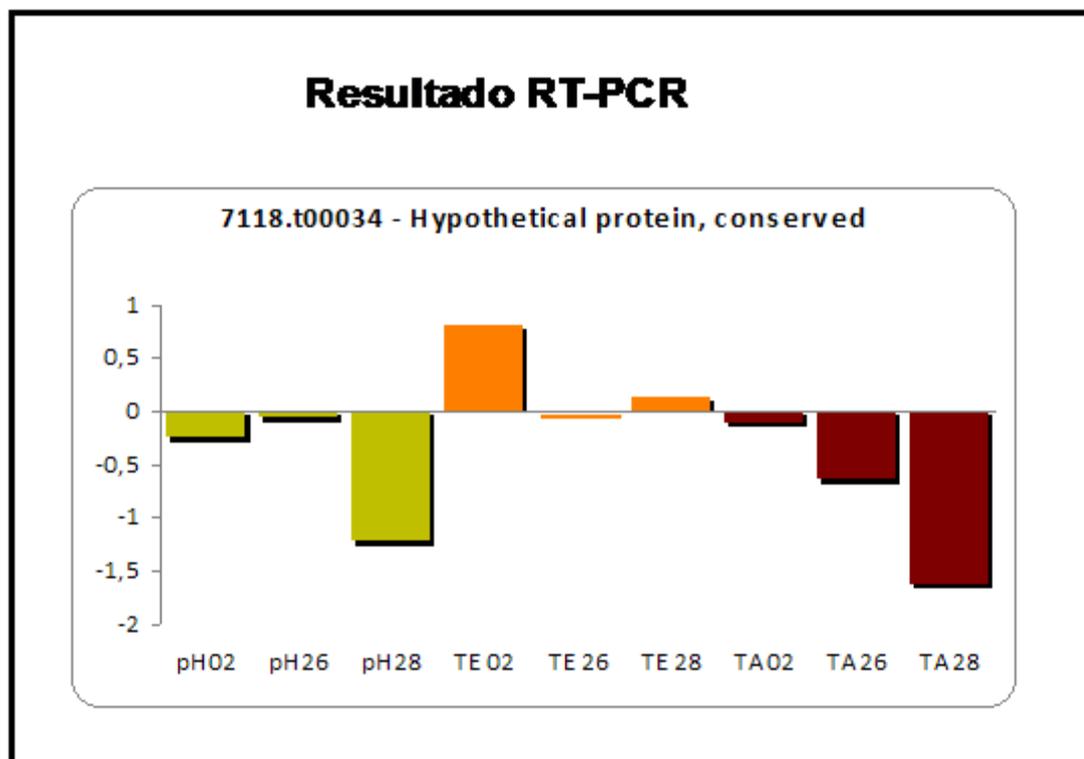
Anexo 15. Resultado de RT-PCR do gene 5669.t00003 – hypothetical protein, conserved.



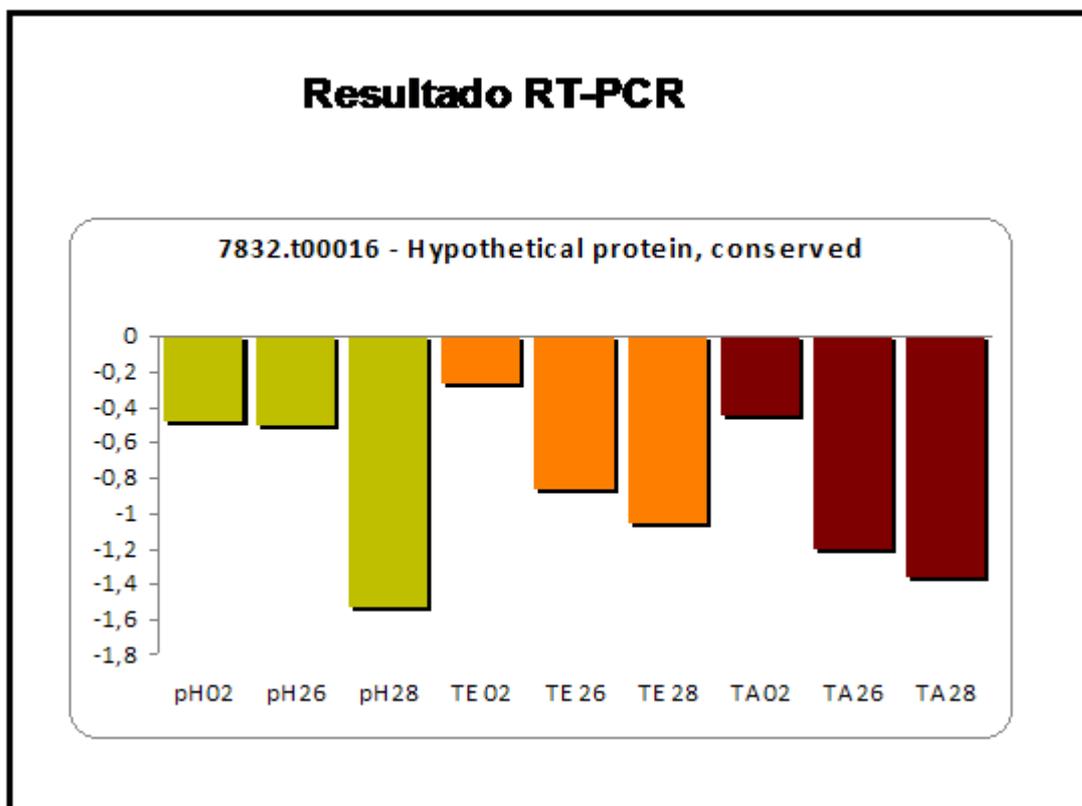
Anexo 16. Resultado de RT-PCR do gene 6113.t00005 – hypothetical protein conserved.



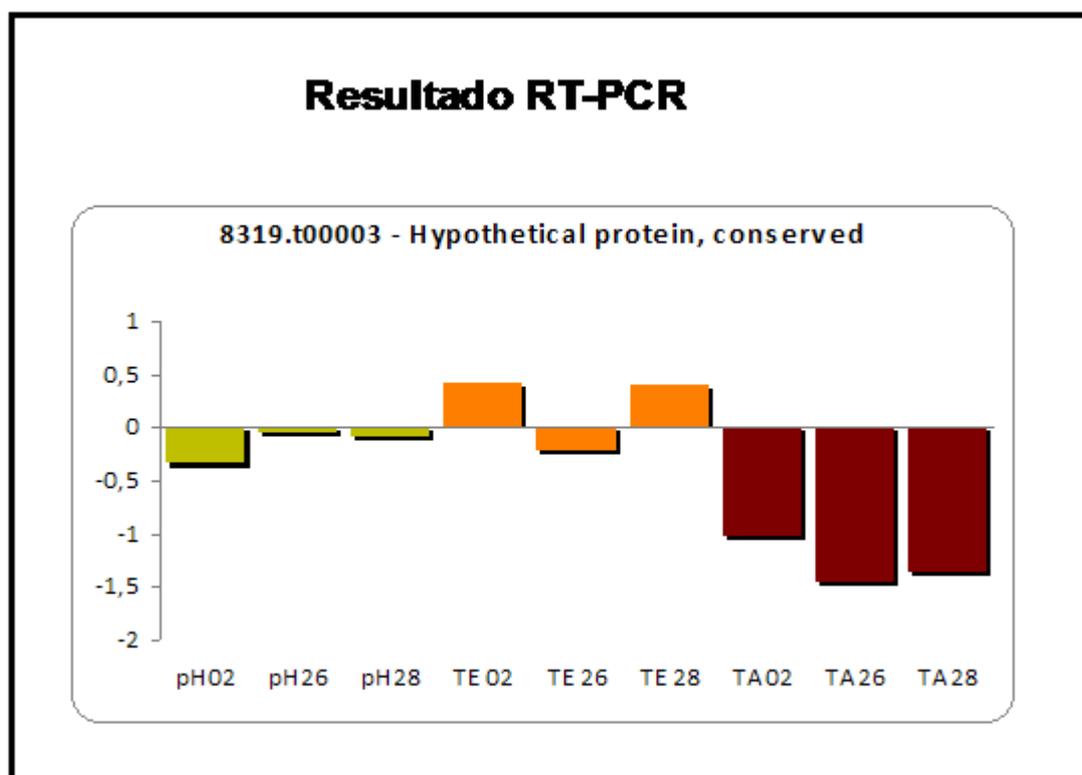
Anexo 17. Resultado de RT-PCR do gene 7118.t00034 – hypothetical protein conserved.



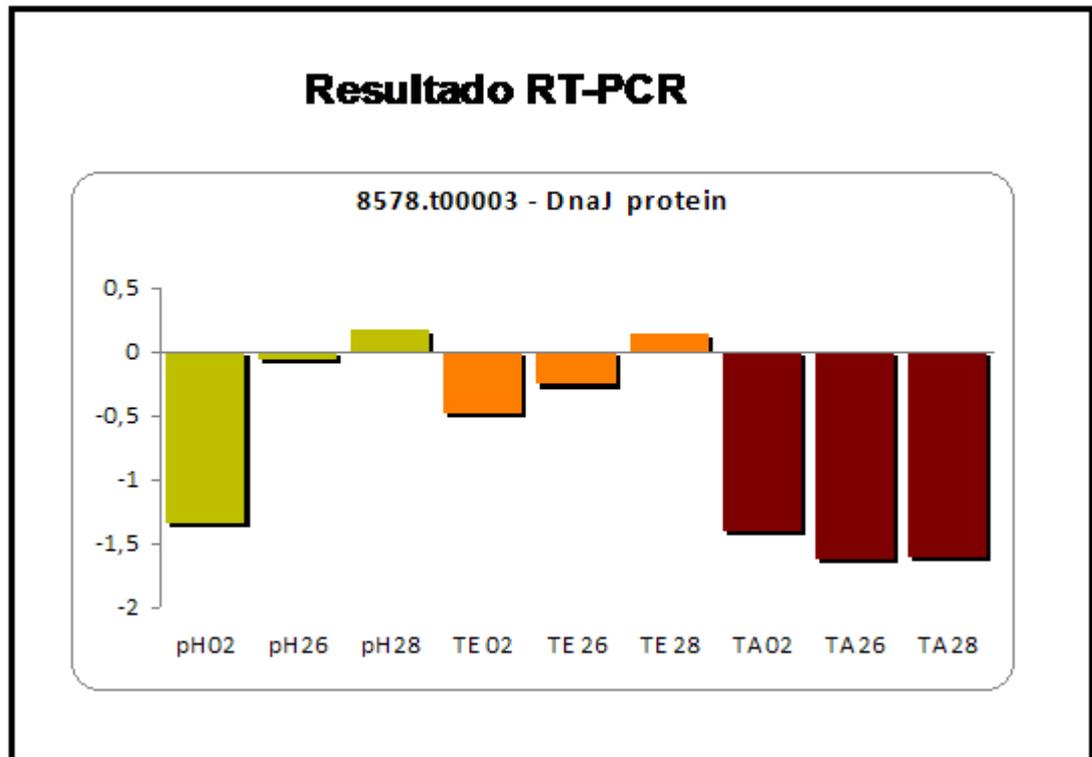
Anexo 18. Resultado de RT-PCR do gene 7832.t00016 – hypothetical protein conserved.



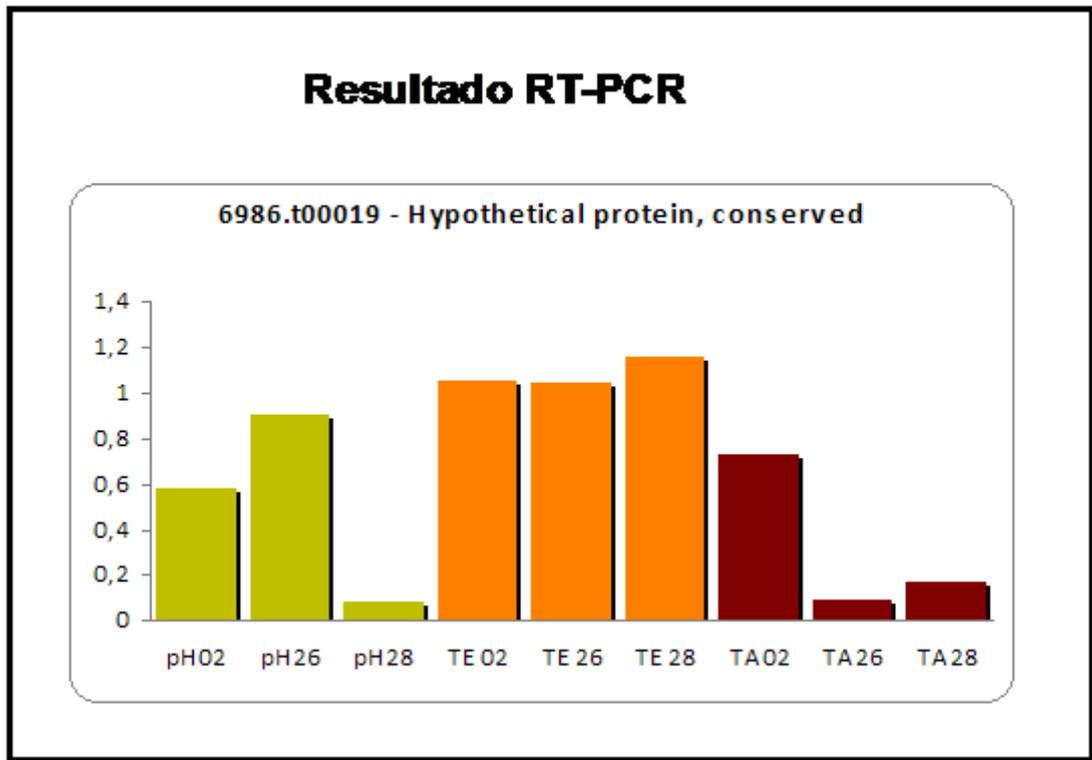
Anexo 19. Resultado de RT-PCR do gene 8319.t00003 – hypothetical protein conserved.



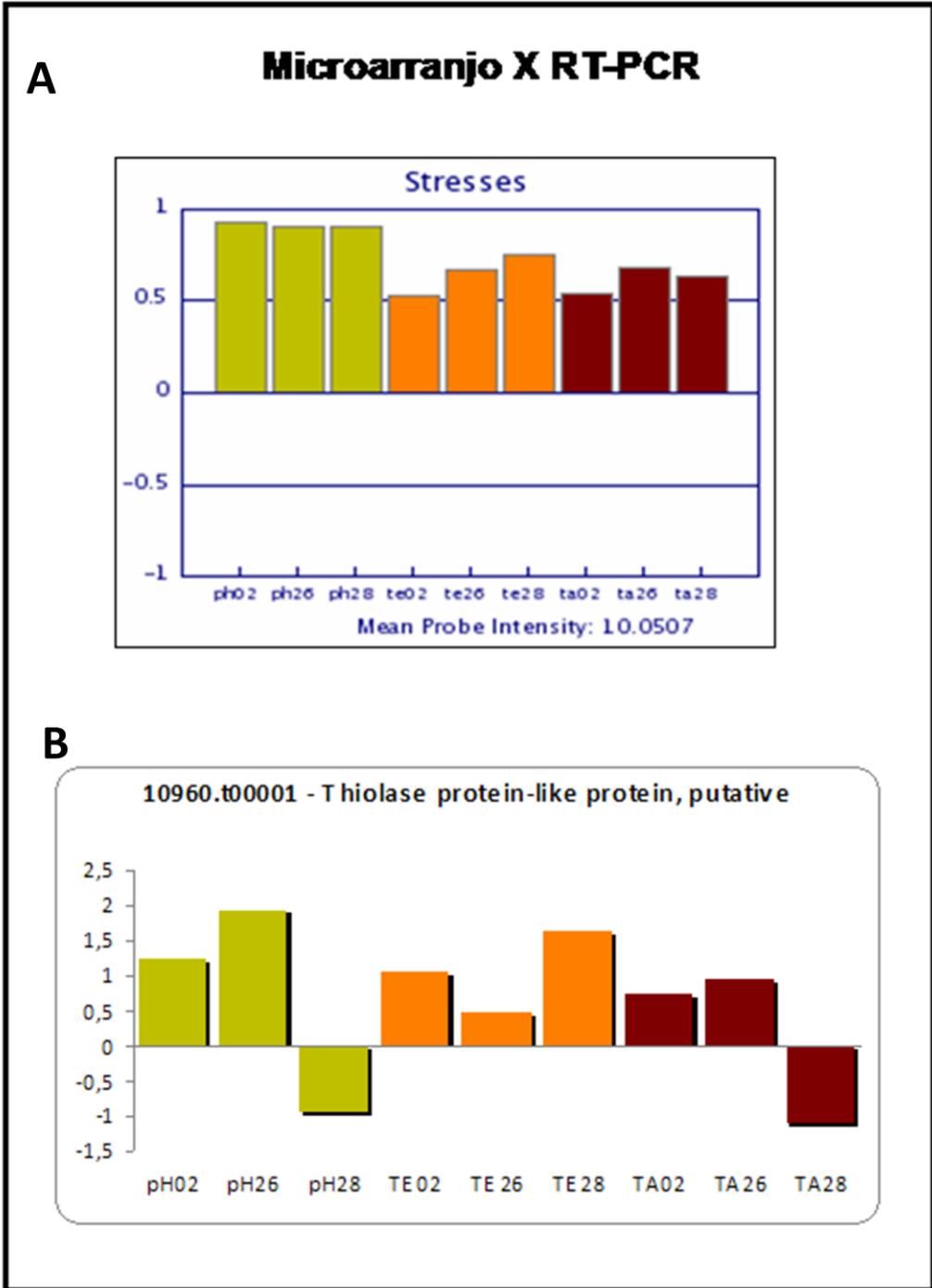
Anexo 20. Resultado de RT-PCR do gene 8578.t00003 – DnaJ protein.



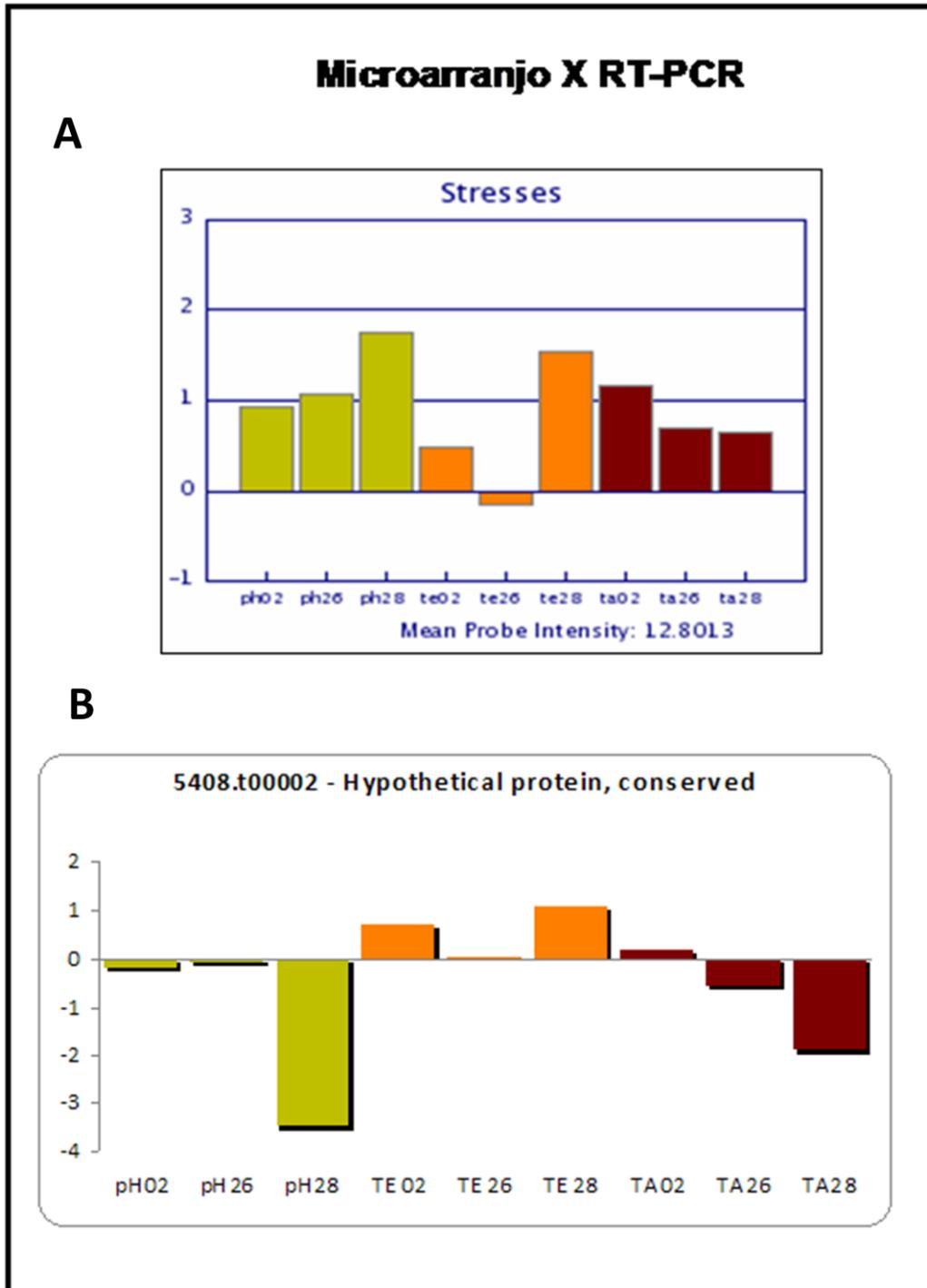
Anexo 21. Resultado de RT-PCR do gene 6986.t00019 – hypothetical protein conserved.



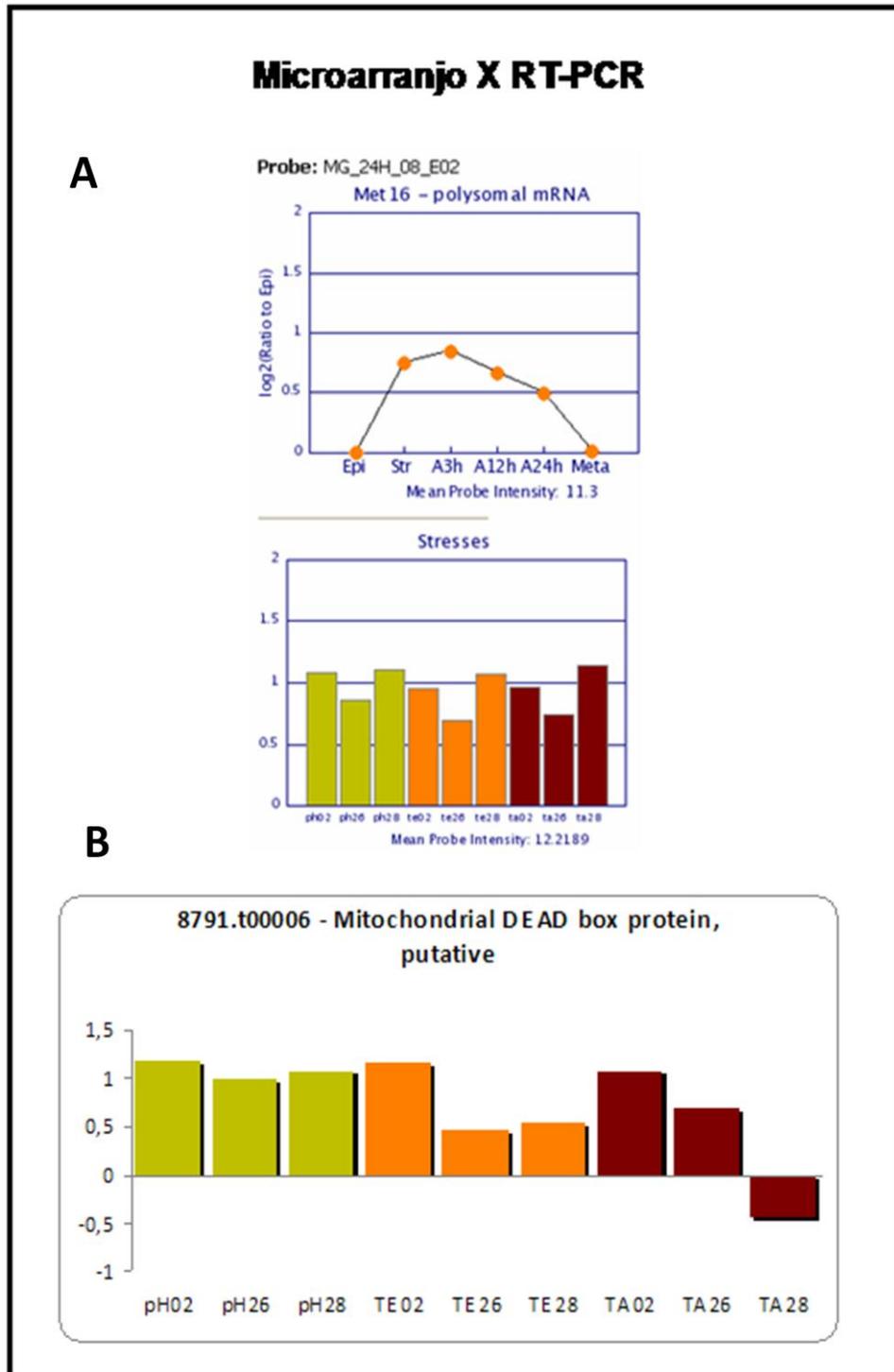
Anexo 22. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 10960.t00001– thiolase protein-like protein, putative.



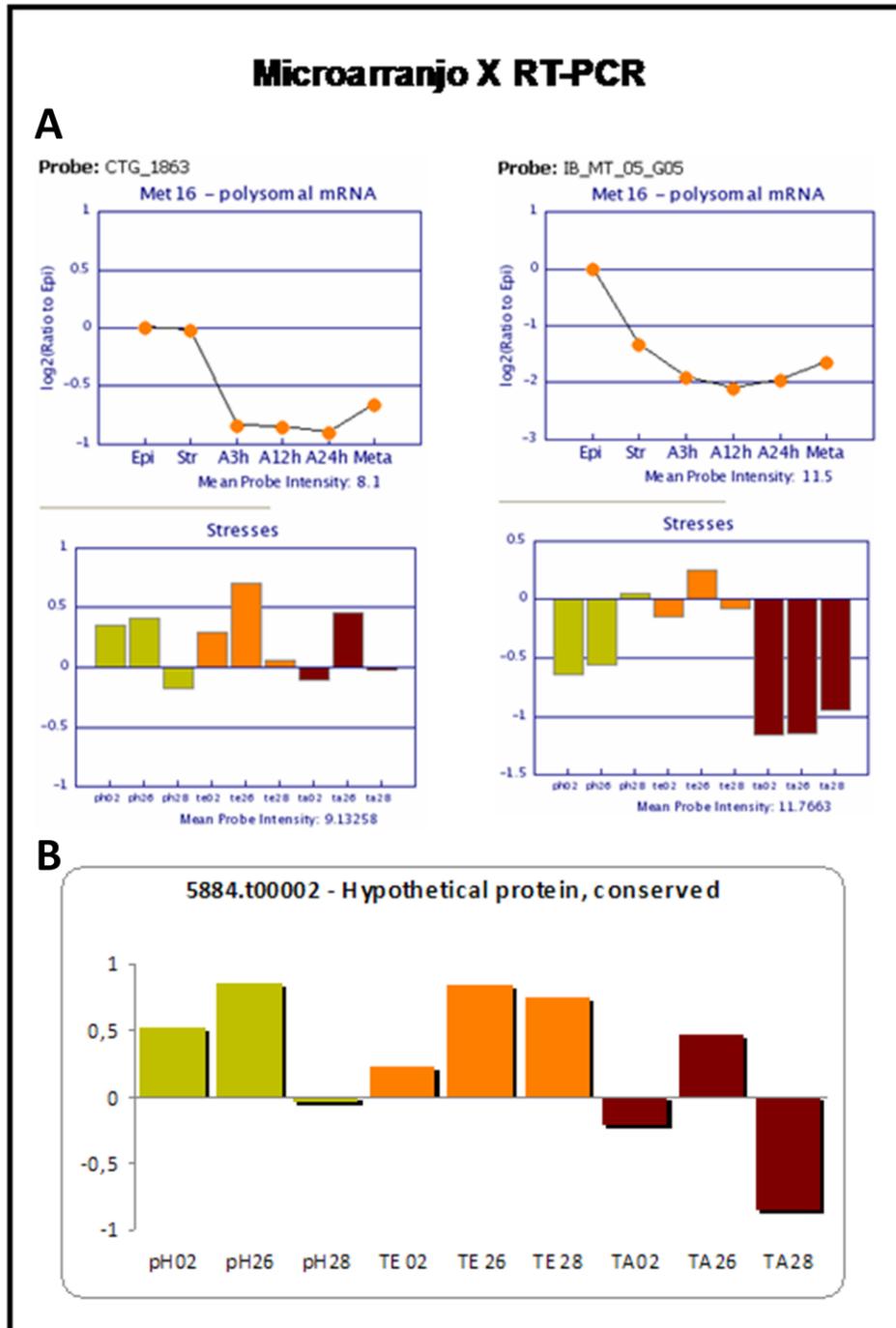
Anexo 23. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclogênese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 5408.t00002– hypothetical protein, conserved.



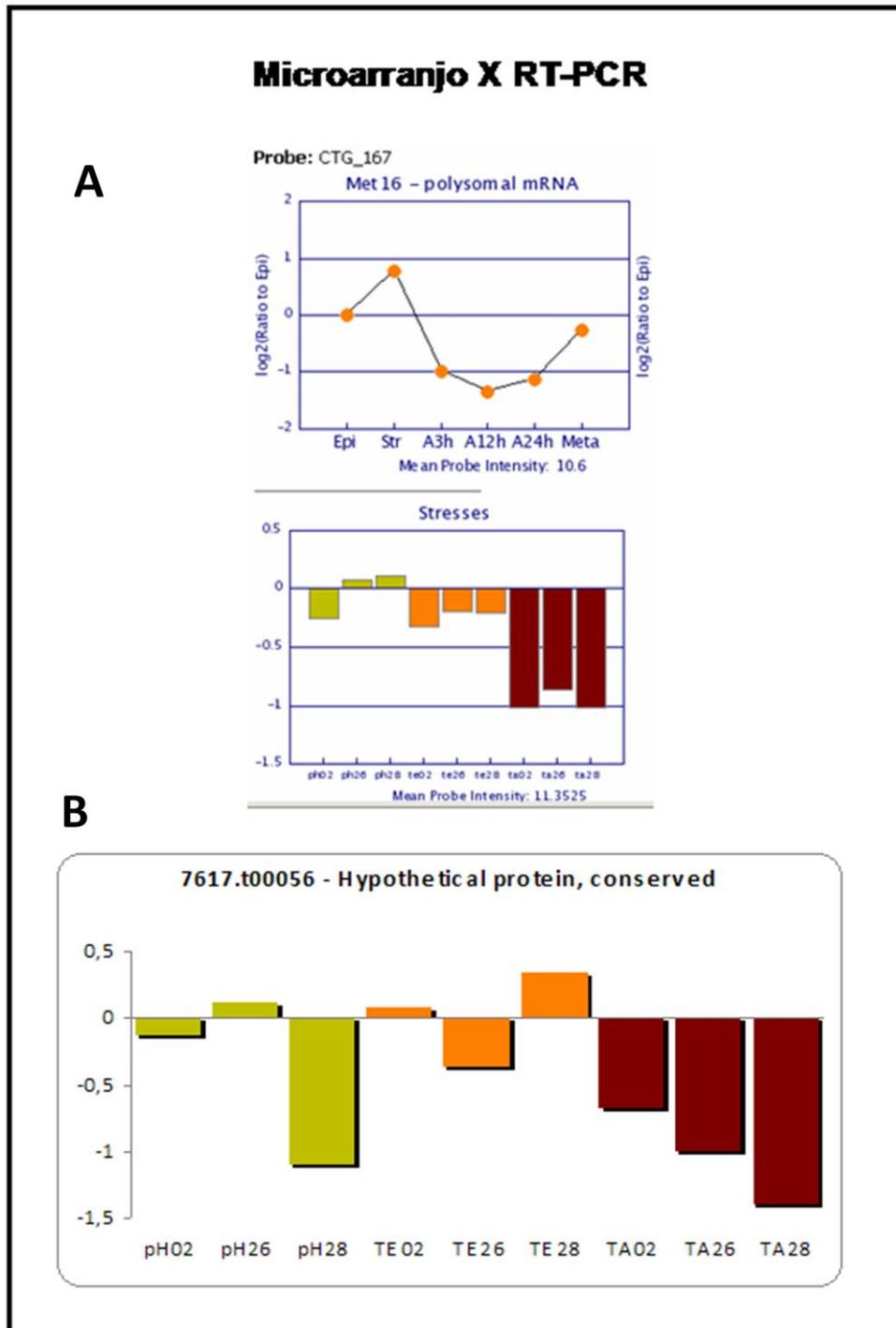
Anexo 24. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 8791.t00006 – mitochondrial DEAD box protein, putative.



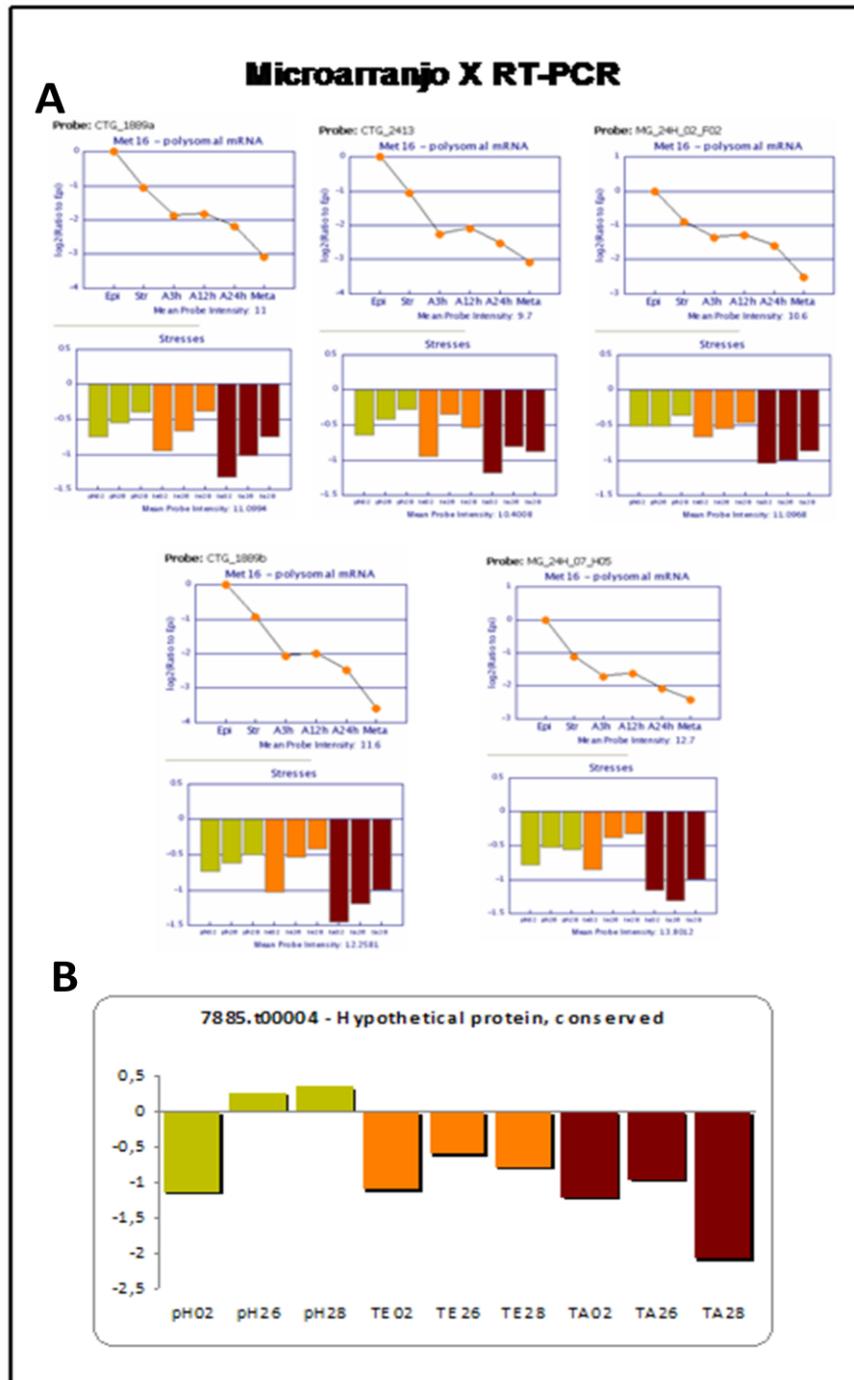
Anexo 25. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 5884.t00002 – hypothetical protein conserved.



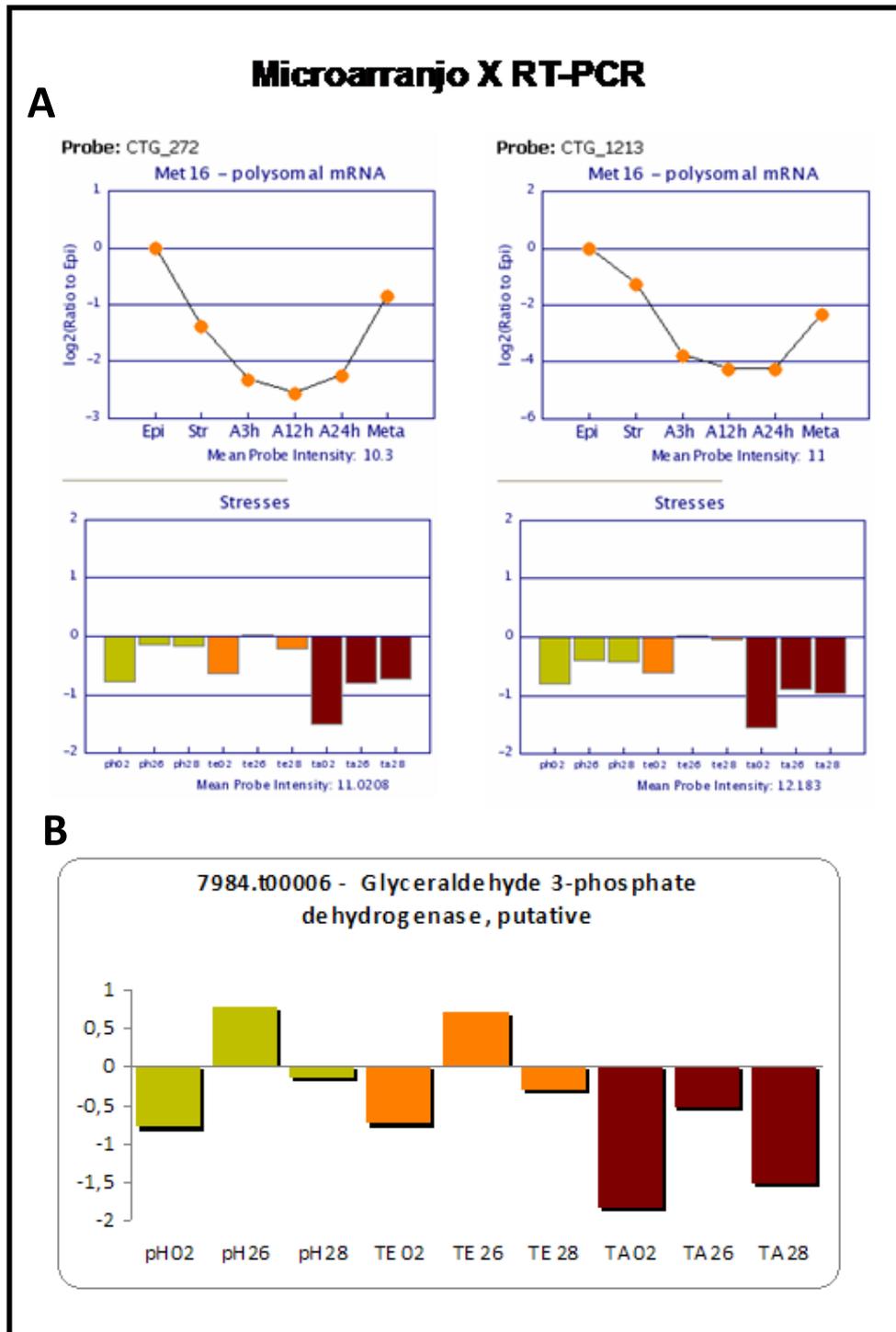
Anexo 26. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 7617.t00056 – hypothetical protein conserved.



Anexo 27. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 7885.t00004 – hypothetical protein conserved.



Anexo 28. Comparação dos resultados de microarranjo da metaciclôgenese *in vitro* e do microarranjo dos diferentes tipos de estresse (A) com os resultados de RT-PCR (B) do gene 7984.t00006 – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative.



Anexo 29. Lista de genes selecionados a partir do critério A estabelecido para os resultados das análises de microarranjo de DNA. Em preto os genes com caráter aumentados em relação à comparação dos distintos estresses com as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Em vermelho os genes diminuído mediante a mesma comparação citada acima.

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
3273	CTG_576	7180.t00003	HSP70, mitochondrial precursor
1256	MG_24H_11_H04	8822.t00004	hypothetical protein, conserved
3947	CTG_3176	8822.t00004	hypothetical protein, conserved
7705	MG_EP_06_F08	7515.t00005	flagellar calcium-binding protein, putative
3119	CTG_1674	8347.t00008	peptidase M20/M25/M40, putative

Anexo 30. Lista de genes selecionados a partir do critério B estabelecido para os resultados das análises de microarranjo de DNA. Em preto os genes com caráter aumentados em relação à comparação dos distintos estresses com as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Em vermelho os genes diminuído mediante a mesma comparação citada acima.

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
2514	CTG_524	3262.t00001	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase,
590	CTG_228	4667.t00004	ATPase alpha subunit, putative
7467	MG_ST_15_E12	5408.t00002	hypothetical protein, conserved
11081	Tc.01050	5738.t00006	hypothetical protein, conserved
9657	Tc.03759	6532.t00013	sugar tranporter, putative
3273	CTG_576	7180.t00003	HSP70, mitochondrial precursor
1895	CTG_3172	7368.t00003	hypothetical protein, conserved
7521	MG_24H_16_F08	7477.t00001	hypothetical protein, conserved
7731	MG_ST_14_G07	7813.t00004	nucleoside transporter 1, putative
2089	CTG_1403	7960.t00009	hypothetical protein, conserved
1082	CTG_1923	8149.t00002	peptidyl-prolyl cis-trans
2861	CTG_1370	8158.t00013	HSP85
2923	CTG_3073	8306.t00005	hypothetical protein, conserved
3641	CTG_1856	8445.t00004	ATP synthase, alpha chain, mitochondrial
487	MG_24H_08_D09	8565.t00016	hypothetical protein, conserved
4662	MG_EP_03_C09	8609.t00009	glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
357	CTG_286	8609.t00009	glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
1256	MG_24H_11_H04	8822.t00004	hypothetical protein, conserved
2987	CTG_433	2120.t00001	69 kDa paraflagellar rod protein, putative
8996	Tc.00186	4649.t00002	cyclophilin, putative
3413	CTG_2383	4911.t00014	enolase, putative
1405	CTG_3391	4940.t00004	fructose-bisphosphate aldolase,
7980	IB_MT_05_G05	5884.t00002	hypothetical protein, conserved
4715	MG_24H_20_A07	6113.t00005	hypothetical protein, conserved
3894	CTG_1889b	6836.t00005	hypothetical protein, conserved
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative aminotripeptidase,
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative
9838	Tc.01991	6986.t00019	hypothetical protein, conserved
6246	MG_EP_02_B07	7146.t00001	cytosolic malate dehydrogenase, putative

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
3279	CTG_764	7149.t00016	S-adenosylmethionine synthetase, putative
1035	CTG_1307	7265.t00003	arginine kinase
7706	MG_ST_10_C06	7515.t00005	flagellar calcium-binding protein, putative
2316	CTG_1252	7832.t00005	hypothetical protein, conserved
7275	MG_EP_09_B11	7832.t00016	hypothetical protein, conserved
8363	Tc.04148	7882.t00008	hypothetical protein, conserved
5403	IB_EP_12_D11	7939.t00002	hexokinase, putative
7278	MG_24H_14_H12	8152.t00001	paraflagellar rod protein 3, putative
893	CTG_1974c6	8299.t00008	hypothetical protein, conserved
2419	CTG_3100	8304.t00012	D-isomer specific 2-hydroxyacid
1672	CTG_3634	8319.t00003	hypothetical protein, conserved
4873	MG_EP_05_B06	8347.t00008	peptidase M20/M25/M40, putative
6754	MG_24H_18_C08	8434.t00003	actin, putative
6679	IB_ST_20_E01	8557.t00003	hypothetical protein, conserved
9833	Tc.01822	8578.t00003	DnaJ protein
891	CTG_3467	8621.t00016	HSP70
11378	Tc.02086	8633.t00013	fatty acid elongase
7959	IB_ST_17_B09	8690.t00004	phosphoglycerate kinase, putative
6448	IB_MT_06_F07	8736.t00002	NUP1-protein
2799	MG_24H_07_H05	8754.t00004	hypothetical protein, conserved

Anexo 31. Lista de genes selecionados a partir do critério D estabelecido para os resultados das análises de microarranjo de DNA. Em preto os genes com caráter aumentados em relação à comparação dos distintos estresses com as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Em vermelho os genes diminuído mediante a mesma comparação citada acima.

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
590	CTG_228	4667.t00004	ATPase alpha subunit, putative
5988	MG_ST_05_D10	4763.t00015	hypothetical protein, conserved
7467	MG_ST_15_E12	5408.t00002	hypothetical protein, conserved
8499	Tc.00797	5414.t00009	hypothetical protein, conserved
11081	Tc.01050	5738.t00006	hypothetical protein, conserved
9657	Tc.03759	6532.t00013	sugar transporter, putative
1962	CTG_4257	6969.t00008	DNA topoisomerase IA, putative
1162	CTG_3462	6986.t00043	alanine aminotransferase, putative
3273	CTG_576	7180.t00003	HSP70, mitochondrial precursor
1895	CTG_3172	7368.t00003	hypothetical protein, conserved
3174	CTG_3059	7638.t00018	hypothetical protein, conserved
3499	CTG_4492	7813.t00004	nucleoside transporter 1, putative
2855	CTG_1545	7887.t00004	acyl-CoA dehydrogenase, putative
3797	CTG_55	7980.t00007	p22 protein precursor, putative
5740	IB_MT_04_H02	8073.t00018	aldose 1-epimerase-like protein, putative
4445	MG_24H_16_B12	8149.t00002	peptidyl-prolyl cis-trans
2923	CTG_3073	8306.t00005	hypothetical protein, conserved
1615	CTG_2733	8370.t00029	hypothetical protein, conserved
4662	MG_EP_03_C09	8609.t00009	glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
1256	MG_24H_11_H04	8822.t00004	hypothetical protein, conserved
7691	IB_ST_20_F01	4881.t00006	thermostable carboxypeptidase 1, putative
3413	CTG_2383	4911.t00014	enolase, putative
1405	CTG_3391	4940.t00004	fructose-bisphosphate aldolase,
5470	MG_24H_20_E01	5360.t00006	UTP-glucose-1-phosphate
8256	Tc.01015	5669.t00003	hypothetical protein, conserved
7980	IB_MT_05_G05	5884.t00002	hypothetical protein, conserved
4715	MG_24H_20_A07	6113.t00005	hypothetical protein, conserved
1886	CTG_2413	6836.t00005	hypothetical protein, conserved
5237	IB_MT_02_D01	6854.t00008	60S ribosomal protein L17, putative
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative aminotripeptidase,
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative
9838	Tc.01991	6986.t00019	hypothetical protein, conserved

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
12206	Tc.03844	7006.t00003	myo-inositol-1 phosphatase, putative
9590	Tc.02043	7007.t00001	dolichyl-phosphate beta-D-
6511	MG_EP_04_C01	7118.t00034	hypothetical protein, conserved
3279	CTG_764	7149.t00016	S-adenosylmethionine synthetase, putative
1035	CTG_1307	7265.t00003	arginine kinase
5391	IB_EP_11_H06	7508.t00002	glutamate dehydrogenase, putative
7705	MG_EP_06_F08	7515.t00005	flagellar calcium-binding protein, putative
1828	CTG_167	7617.t00056	hypothetical protein, conserved
5930	MG_EP_02_G05	7753.t00025	hypothetical protein, conserved
2133	CTG_2267	7782.t00009	hypothetical protein, conserved
7275	MG_EP_09_B11	7832.t00016	hypothetical protein, conserved
8363	Tc.04148	7882.t00008	hypothetical protein, conserved
4073	MG_24H_02_F02	7885.t00004	hypothetical protein, conserved
626	CTG_291	7939.t00002	hexokinase, putative
9808	Tc.01632	7972.t00008	hypothetical protein, conserved
3	CTG_1213	7984.t00006	glyceraldehyde 3-phosphate
7440	IB_MT_09_H08	8158.t00013	HSP85
10150	Tc.03197	8179.t00006	hypothetical protein, conserved
2419	CTG_3100	8304.t00012	D-isomer specific 2-hydroxyacid
1672	CTG_3634	8319.t00003	hypothetical protein, conserved
4873	MG_EP_05_B06	8347.t00008	peptidase M20/M25/M40, putative
3410	CTG_2431	8434.t00003	actin, putative
6679	IB_ST_20_E01	8557.t00003	hypothetical protein, conserved
9833	Tc.01822	8578.t00003	DnaJ protein
2763	CTG_642	8621.t00016	HSP70
7959	IB_ST_17_B09	8690.t00004	phosphoglycerate kinase, putative
9116	Tc.03493	8717.t00019	GPI transaminidase component Tta1,
7236	IB_EP_16_D05	8739.t00011	heat shock protein DnaJ, putative
2799	MG_24H_07_H05	8754.t00004	hypothetical protein, conserved
5641	MG_EP_06_D05	8765.t00018	dynein, putative

Anexo 32. Lista de genes selecionados a partir do critério E1 estabelecido para os resultados das análises de microarranjo de DNA. Em preto os genes com caráter aumentados em relação à comparação dos distintos estresses com as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Em vermelho os genes diminuído mediante a mesma comparação citada acima.

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
3538	CTG_613	10960.t00001	thiolase protein-like protein, putative
590	CTG_228	4667.t00004	ATPase alpha subunit, putative
5988	MG_ST_05_D10	4763.t00015	hypothetical protein, conserved
7467	MG_ST_15_E12	5408.t00002	hypothetical protein, conserved
8499	Tc.00797	5414.t00009	hypothetical protein, conserved
3268	CTG_802	5491.t00001	amino acid transporter, putative
5716	MG_ST_05_H07	5631.t00001	syntaxin, putative
11081	Tc.01050	5738.t00006	hypothetical protein, conserved
9657	Tc.03759	6532.t00013	sugar transporter, putative
1727	CTG_4489	6721.t00001	glutamate dehydrogenase, putative
1962	CTG_4257	6969.t00008	DNA topoisomerase IA, putative
1162	CTG_3462	6986.t00043	alanine aminotransferase, putative
2658	CTG_2912	7031.t00008	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, putative
11954	Tc.03886	7143.t00001	hypothetical protein
3273	CTG_576	7180.t00003	HSP70, mitochondrial precursor
1895	CTG_3172	7368.t00003	hypothetical protein, conserved
1639	CTG_3185	7431.t00002	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-
3174	CTG_3059	7638.t00018	hypothetical protein, conserved
6934	MG_ST_08_G07	7767.t00001	NADH-dependent fumarate reductase,
3499	CTG_4492	7813.t00004	nucleoside transporter 1, putative
10835	Tc.01426	7842.t00003	hypothetical protein, conserved
2855	CTG_1545	7887.t00004	acyl-CoA dehydrogenase, putative
3797	CTG_55	7980.t00007	p22 protein precursor, putative
9775	Tc.00103	8001.t00005	hypothetical protein
5740	IB_MT_04_H02	8073.t00018	aldose 1-epimerase-like protein, putative
4445	MG_24H_16_B12	8149.t00002	peptidyl-prolyl cis-trans
4184	MG_ST_08_B06	8178.t00003	hypothetical protein, conserved
2923	CTG_3073	8306.t00005	hypothetical protein, conserved
1615	CTG_2733	8370.t00029	hypothetical protein, conserved
3641	CTG_1856	8445.t00004	ATP synthase, alpha chain, mitochondrial
4662	MG_EP_03_C09	8609.t00009	glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
357	CTG_286	8609.t00009	glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
574	CTG_180	8726.t00013	folate/pteridine transporter, putative
11306	Tc.04506	8765.t00017	hypothetical protein, conserved
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
1256	MG_24H_11_H04	8822.t00004	hypothetical protein, conserved
9112	Tc.03491	1689.t00001	hypothetical protein

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
894	CTG_3320	4586.t00001	chaperone DNAJ protein
663	CTG_391	4705.t00003	hypothetical protein
543	CTG_1551	4777.t00001	hypothetical protein, conserved
5430	MG_EP_04_C10	4821.t00008	phosphatidyltransferase, putative
7691	IB_ST_20_F01	4881.t00006	thermostable carboxypeptidase 1, putative
3413	CTG_2383	4911.t00014	enolase, putative
1405	CTG_3391	4940.t00004	fructose-bisphosphate aldolase,
5470	MG_24H_20_E01	5360.t00006	UTP-glucose-1-phosphate
11587	Tc.00828	5439.t00003	C-14 sterol reductase, putative
2170	CTG_3353	5577.t00002	methylthioadenosine phosphorylase,
1408	CTG_3644	5609.t00008	hypothetical protein, conserved
8512	Tc.00969	5618.t00001	ATP-dependent Clp protease subunit, heat
8256	Tc.01015	5669.t00003	hypothetical protein, conserved
1854	CTG_1891	5784.t00018	hypothetical protein, conserved
9805	Tc.01112	5790.t00006	mitochondrial RNA binding protein 1,
1754	MG_24H_05_B07	5824.t00004	hypothetical protein, conserved
10041	Tc.00391	5882.t00003	proteasome beta 2 subunit, putative
7980	IB_MT_05_G05	5884.t00002	hypothetical protein, conserved
2587	CTG_1550	6080.t00005	S-adenosylhomocysteine hydrolase,
4715	MG_24H_20_A07	6113.t00005	hypothetical protein, conserved
7447	IB_EP_12_B09	6169.t00004	dynein light chain, putative
8531	Tc.01466	6177.t00004	signal peptidase type I, putative serine
4444	MG_ST_06_E06a	6380.t00026	hypothetical protein, conserved
2570	CTG_1061	6823.t00002	hypothetical protein, conserved
1886	CTG_2413	6836.t00005	hypothetical protein, conserved
5237	IB_MT_02_D01	6854.t00008	60S ribosomal protein L17
6932	IB_MT_08_A10	6890.t00024	pretranslocation protein, alpha subunit,
2011	MG_24H_07_C03	6979.t00011	peptidase T, putative aminotripeptidase,
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative
9838	Tc.01991	6986.t00019	hypothetical protein, conserved
1866	CTG_2402	7006.t00001	ABC transporter, putative
12206	Tc.03844	7006.t00003	myo-inositol-1 phosphatase, putative
9590	Tc.02043	7007.t00001	dolichyl-phosphate beta-D-
6408	IB_EP_16_E11	7029.t00005	hypothetical protein, conserved
5467	MG_EP_10_A08b	7029.t00006	vesicular-fusion ATPase-like protein,
5929	MG_24H_12_E02	7098.t00028	methylthioadenosine phosphorylase,
6511	MG_EP_04_C01	7118.t00034	hypothetical protein, conserved
1887	CTG_272	7148.t00006	glyceraldehyde 3-phosphate
2078	CTG_1441	7149.t00016	S-adenosylmethionine synthetase, putative
7022	IB_ST_17_F04	7265.t00003	arginine kinase
2171	CTG_3504	7452.t00003	hypothetical protein, conserved
5391	IB_EP_11_H06	7508.t00002	glutamate dehydrogenase, putative
7706	MG_ST_10_C06	7515.t00005	flagellar calcium-binding protein, putative

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
1828	CTG_167	7617.t00056	hypothetical protein, conserved
8757	Tc.00410	7617.t00075	hypothetical protein, conserved
2852	CTG_1587	7622.t00009	eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-
7210	MG_EP_04_H05	7626.t00010	ubiquitin activating enzyme, putative
6015	MG_24H_18_H02	7633.t00006	UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent
8064	IB_MT_02_C06	7667.t00001	condensin subunit 1, putative
2321	CTG_1032	7696.t00009	T-complex protein 1, beta subunit, putative
11691	Tc.04116	7744.t00035	hypothetical protein, conserved
5930	MG_EP_02_G05	7753.t00025	hypothetical protein, conserved
505	CTG_839	7773.t00018	hypothetical protein, conserved
2133	CTG_2267	7782.t00009	hypothetical protein, conserved
8252	Tc.01012	7811.t00014	hypothetical protein, conserved
7275	MG_EP_09_B11	7832.t00016	hypothetical protein, conserved
8363	Tc.04148	7882.t00008	hypothetical protein, conserved
4073	MG_24H_02_F02	7885.t00004	hypothetical protein, conserved
65	CTG_1787	7939.t00002	hexokinase, putative
9808	Tc.01632	7972.t00008	hypothetical protein, conserved
3	CTG_1213	7984.t00006	glyceraldehyde 3-phosphate
7172	IB_EP_16_H12	8038.t00012	peptidase M20/M25/M40, putative
1295	CTG_1298	8070.t00009	trypanothione synthetase, putative
2861	CTG_1370	8158.t00013	HSP85
747	MG_24H_07_H02	8165.t00017	hypothetical protein, conserved
10150	Tc.03197	8179.t00006	hypothetical protein, conserved
2419	CTG_3100	8304.t00012	D-isomer specific 2-hydroxyacid
1672	CTG_3634	8319.t00003	hypothetical protein, conserved
4873	MG_EP_05_B06	8347.t00008	peptidase M20/M25/M40, putative
3119	CTG_1674	8347.t00008	peptidase M20/M25/M40, putative
463	CTG_657	8434.t00003	actin, putative
2324	CTG_1256	8434.t00003	actin, putative
6679	IB_ST_20_E01	8557.t00003	hypothetical protein, conserved
9833	Tc.01822	8578.t00003	DnaJ protein
4044	CTG_773	8621.t00016	HSP70
4044	CTG_773	8621.t00016	HSP70
6512	IB_MT_08_C10	8632.t00008	hypothetical protein, conserved
4160	IB_EP_16_B07	8648.t00010	glycosomal malate dehydrogenase,
7959	IB_ST_17_B09	8690.t00004	phosphoglycerate kinase, putative
9116	Tc.03493	8717.t00019	GPI transaminidase component Tta1,
7236	IB_EP_16_D05	8739.t00011	heat shock protein DnaJ, putative
2799	MG_24H_07_H05	8754.t00004	hypothetical protein, conserved
5641	MG_EP_06_D05	8765.t00018	dynein, putative
5957	MG_ST_16_H12	8824.t00005	lysophospholipase, putative

Anexo 33. Lista de genes selecionados a partir do critério E2 estabelecido para os resultados das análises de microarranjo de DNA. Em preto os genes com caráter aumentados em relação à comparação dos distintos estresses com as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Em vermelho os genes diminuído mediante a mesma comparação citada acima.

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
590	CTG_228	4667.t00004	ATPase alpha subunit, putative
5988	MG_ST_05_D10	4763.t00015	hypothetical protein, conserved
7467	MG_ST_15_E12	5408.t00002	hypothetical protein, conserved
8499	Tc.00797	5414.t00009	hypothetical protein, conserved
11081	Tc.01050	5738.t00006	hypothetical protein, conserved
9657	Tc.03759	6532.t00013	sugar transporter, putative
1962	CTG_4257	6969.t00008	DNA topoisomerase IA, putative
1162	CTG_3462	6986.t00043	alanine aminotransferase, putative
2658	CTG_2912	7031.t00008	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, putative
3273	CTG_576	7180.t00003	HSP70, mitochondrial precursor
1895	CTG_3172	7368.t00003	hypothetical protein, conserved
3174	CTG_3059	7638.t00018	hypothetical protein, conserved
6934	MG_ST_08_G07	7767.t00001	NADH-dependent fumarate reductase,
3499	CTG_4492	7813.t00004	nucleoside transporter 1, putative
2855	CTG_1545	7887.t00004	acyl-CoA dehydrogenase, putative
3797	CTG_55	7980.t00007	p22 protein precursor, putative
5740	IB_MT_04_H02	8073.t00018	aldose 1-epimerase-like protein, putative
4445	MG_24H_16_B12	8149.t00002	peptidyl-prolyl cis-trans
2923	CTG_3073	8306.t00005	hypothetical protein, conserved
1615	CTG_2733	8370.t00029	hypothetical protein, conserved
3641	CTG_1856	8445.t00004	ATP synthase, alpha chain, mitochondrial
4662	MG_EP_03_C09	8609.t00009	glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
574	CTG_180	8726.t00013	folate/pteridine transporter, putative
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
1256	MG_24H_11_H04	8822.t00004	hypothetical protein, conserved
663	CTG_391	4705.t00003	hypothetical protein
7691	IB_ST_20_F01	4881.t00006	thermostable carboxypeptidase 1, putative
3413	CTG_2383	4911.t00014	enolase, putative
1405	CTG_3391	4940.t00004	fructose-bisphosphate aldolase,
5470	MG_24H_20_E01	5360.t00006	UTP-glucose-1-phosphate
8256	Tc.01015	5669.t00003	hypothetical protein, conserved
7980	IB_MT_05_G05	5884.t00002	hypothetical protein, conserved
2587	CTG_1550	6080.t00005	S-adenosylhomocysteine hydrolase,
4715	MG_24H_20_A07	6113.t00005	hypothetical protein, conserved
8531	Tc.01466	6177.t00004	signal peptidase type I, putative serine
1886	CTG_2413	6836.t00005	hypothetical protein, conserved
5237	IB_MT_02_D01	6854.t00008	60S ribosomal protein L17, putative

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative aminotripeptidase,
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative
9838	Tc.01991	6986.t00019	hypothetical protein, conserved
12206	Tc.03844	7006.t00003	myo-inositol-1 phosphatase, putative
9590	Tc.02043	7007.t00001	dolichyl-phosphate beta-D-
5929	MG_24H_12_E02	7098.t00028	methylthioadenosine phosphorylase,
6511	MG_EP_04_C01	7118.t00034	hypothetical protein, conserved
1887	CTG_272	7148.t00006	glyceraldehyde 3-phosphate
2078	CTG_1441	7149.t00016	S-adenosylmethionine synthetase, putative
7022	IB_ST_17_F04	7265.t00003	arginine kinase
5391	IB_EP_11_H06	7508.t00002	glutamate dehydrogenase, putative
7705	MG_EP_06_F08	7515.t00005	flagellar calcium-binding protein, putative
1828	CTG_167	7617.t00056	hypothetical protein, conserved
5930	MG_EP_02_G05	7753.t00025	hypothetical protein, conserved
2133	CTG_2267	7782.t00009	hypothetical protein, conserved
7275	MG_EP_09_B11	7832.t00016	hypothetical protein, conserved
8363	Tc.04148	7882.t00008	hypothetical protein, conserved
4073	MG_24H_02_F02	7885.t00004	hypothetical protein, conserved
65	CTG_1787	7939.t00002	hexokinase, putative
9808	Tc.01632	7972.t00008	hypothetical protein, conserved
3	CTG_1213	7984.t00006	glyceraldehyde 3-phosphate
1295	CTG_1298	8070.t00009	trypanothione synthetase, putative
7440	IB_MT_09_H08	8158.t00013	HSP85
10150	Tc.03197	8179.t00006	hypothetical protein, conserved
2419	CTG_3100	8304.t00012	D-isomer specific 2-hydroxyacid
1672	CTG_3634	8319.t00003	hypothetical protein, conserved
4873	MG_EP_05_B06	8347.t00008	peptidase M20/M25/M40, putative
6754	MG_24H_18_C08	8434.t00003	actin, putative
6679	IB_ST_20_E01	8557.t00003	hypothetical protein, conserved
9833	Tc.01822	8578.t00003	DnaJ protein
2763	CTG_642	8621.t00016	HSP70
7959	IB_ST_17_B09	8690.t00004	phosphoglycerate kinase, putative
9116	Tc.03493	8717.t00019	GPI transaminidase component Tta1,
7236	IB_EP_16_D05	8739.t00011	heat shock protein DnaJ, putative
2799	MG_24H_07_H05	8754.t00004	hypothetical protein, conserved
5641	MG_EP_06_D05	8765.t00018	dynein, putative

Anexo 34. Lista de genes selecionados a partir do critério E3 estabelecido para os resultados das análises de microarranjo de DNA. Em preto os genes com caráter aumentados em relação à comparação dos distintos estresses com as formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento. Em vermelho os genes diminuído mediante a mesma comparação citada acima.

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
3538	CTG_613	10960.t00001	thiolase protein-like protein, putative
590	CTG_228	4667.t00004	ATPase alpha subunit, putative
5988	MG_ST_05_D10	4763.t00015	hypothetical protein, conserved
7467	MG_ST_15_E12	5408.t00002	hypothetical protein, conserved
8499	Tc.00797	5414.t00009	hypothetical protein, conserved
3268	CTG_802	5491.t00001	amino acid transporter, putative
5716	MG_ST_05_H07	5631.t00001	syntaxin, putative
11081	Tc.01050	5738.t00006	hypothetical protein, conserved
9657	Tc.03759	6532.t00013	sugar transporter, putative
1727	CTG_4489	6721.t00001	glutamate dehydrogenase, putative
1962	CTG_4257	6969.t00008	DNA topoisomerase IA, putative
1162	CTG_3462	6986.t00043	alanine aminotransferase, putative
2658	CTG_2912	7031.t00008	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, putative
11954	Tc.03886	7143.t00001	hypothetical protein
3273	CTG_576	7180.t00003	HSP70, mitochondrial precursor
1895	CTG_3172	7368.t00003	hypothetical protein, conserved
1639	CTG_3185	7431.t00002	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-
3174	CTG_3059	7638.t00018	hypothetical protein, conserved
6934	MG_ST_08_G07	7767.t00001	NADH-dependent fumarate reductase,
3499	CTG_4492	7813.t00004	nucleoside transporter 1, putative
2855	CTG_1545	7887.t00004	acyl-CoA dehydrogenase, putative
3797	CTG_55	7980.t00007	p22 protein precursor, putative
9775	Tc.00103	8001.t00005	hypothetical protein
5740	IB_MT_04_H02	8073.t00018	aldose 1-epimerase-like protein, putative
4445	MG_24H_16_B12	8149.t00002	peptidyl-prolyl cis-trans
5911	IB_ST_17_B07	8178.t00003	hypothetical protein, conserved
2923	CTG_3073	8306.t00005	hypothetical protein, conserved
1615	CTG_2733	8370.t00029	hypothetical protein, conserved
3641	CTG_1856	8445.t00004	ATP synthase, alpha chain, mitochondrial
4662	MG_EP_03_C09	8609.t00009	glycerol-3-phosphate dehydrogenase,
574	CTG_180	8726.t00013	folate/pteridine transporter, putative
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
2539	MG_24H_08_E02	8791.t00006	mitochondrial DEAD box protein, putative
1256	MG_24H_11_H04	8822.t00004	hypothetical protein, conserved
9112	Tc.03491	1689.t00001	hypothetical protein
663	CTG_391	4705.t00003	hypothetical protein
543	CTG_1551	4777.t00001	hypothetical protein, conserved
5430	MG_EP_04_C10	4821.t00008	phosphatidyltransferase, putative
7691	IB_ST_20_F01	4881.t00006	thermostable carboxypeptidase 1, putative
3413	CTG_2383	4911.t00014	enolase, putative

ProbeID	ProbeName	Gene ID	Gene
1405	CTG_3391	4940.t00004	fructose-bisphosphate aldolase,
5470	MG_24H_20_E01	5360.t00006	UTP-glucose-1-phosphate
11587	Tc.00828	5439.t00003	C-14 sterol reductase, putative
2170	CTG_3353	5577.t00002	methylthioadenosine phosphorylase,
1408	CTG_3644	5609.t00008	hypothetical protein, conserved
8512	Tc.00969	5618.t00001	ATP-dependent Clp protease subunit, heat
8256	Tc.01015	5669.t00003	hypothetical protein, conserved
9805	Tc.01112	5790.t00006	mitochondrial RNA binding protein 1,
1754	MG_24H_05_B07	5824.t00004	hypothetical protein, conserved
7980	IB_MT_05_G05	5884.t00002	hypothetical protein, conserved
2587	CTG_1550	6080.t00005	S-adenosylhomocysteine hydrolase,
4715	MG_24H_20_A07	6113.t00005	hypothetical protein, conserved
7447	IB_EP_12_B09	6169.t00004	dynein light chain, putative
8531	Tc.01466	6177.t00004	signal peptidase type I, putative serine
4444	MG_ST_06_E06a	6380.t00026	hypothetical protein, conserved
2570	CTG_1061	6823.t00002	hypothetical protein, conserved
1886	CTG_2413	6836.t00005	hypothetical protein, conserved
5237	IB_MT_02_D01	6854.t00008	60S ribosomal protein L17, putative
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative aminotripeptidase,
7519	MG_EP_10_B06a	6979.t00011	peptidase T, putative
9838	Tc.01991	6986.t00019	hypothetical protein, conserved
12206	Tc.03844	7006.t00003	myo-inositol-1 phosphatase, putative
9590	Tc.02043	7007.t00001	dolichyl-phosphate beta-D-
5929	MG_24H_12_E02	7098.t00028	methylthioadenosine phosphorylase,
6511	MG_EP_04_C01	7118.t00034	hypothetical protein, conserved
1887	CTG_272	7148.t00006	glyceraldehyde 3-phosphate
2078	CTG_1441	7149.t00016	S-adenosylmethionine synthetase, putative
7022	IB_ST_17_F04	7265.t00003	arginine kinase
2171	CTG_3504	7452.t00003	hypothetical protein, conserved
5391	IB_EP_11_H06	7508.t00002	glutamate dehydrogenase, putative
7706	MG_ST_10_C06	7515.t00005	flagellar calcium-binding protein, putative
1828	CTG_167	7617.t00056	hypothetical protein, conserved
8757	Tc.00410	7617.t00075	hypothetical protein, conserved
2852	CTG_1587	7622.t00009	eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-
7210	MG_EP_04_H05	7626.t00010	ubiquitin activating enzyme, putative
6015	MG_24H_18_H02	7633.t00006	UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent
8064	IB_MT_02_C06	7667.t00001	condensin subunit 1, putative
2321	CTG_1032	7696.t00009	T-complex protein 1, beta subunit, putative
11691	Tc.04116	7744.t00035	hypothetical protein, conserved
5930	MG_EP_02_G05	7753.t00025	hypothetical protein, conserved
2133	CTG_2267	7782.t00009	hypothetical protein, conserved
8252	Tc.01012	7811.t00014	hypothetical protein, conserved
7275	MG_EP_09_B11	7832.t00016	hypothetical protein, conserved
8363	Tc.04148	7882.t00008	hypothetical protein, conserved
4073	MG_24H_02_F02	7885.t00004	hypothetical protein, conserved
65	CTG_1787	7939.t00002	hexokinase, putative
9808	Tc.01632	7972.t00008	hypothetical protein, conserved
3	CTG_1213	7984.t00006	glyceraldehyde 3-phosphate
7172	IB_EP_16_H12	8038.t00012	peptidase M20/M25/M40, putative
1295	CTG_1298	8070.t00009	trypanothione synthetase, putative
2861	CTG_1370	8158.t00013	HSP85
747	MG_24H_07_H02	8165.t00017	hypothetical protein, conserved
10150	Tc.03197	8179.t00006	hypothetical protein, conserved
2419	CTG_3100	8304.t00012	D-isomer specific 2-hydroxyacid
1672	CTG_3634	8319.t00003	hypothetical protein, conserved
4873	MG_EP_05_B06	8347.t00008	peptidase M20/M25/M40, putative
463	CTG_657	8434.t00003	actin, putative
6679	IB_ST_20_E01	8557.t00003	hypothetical protein, conserved
9833	Tc.01822	8578.t00003	DnaJ protein
4044	CTG_773	8621.t00016	HSP70
6954	MG_EP_02_D11	8648.t00010	glycosomal malate dehydrogenase,
7959	IB_ST_17_B09	8690.t00004	phosphoglycerate kinase, putative
9116	Tc.03493	8717.t00019	GPI transaminidase component Tta1,
7236	IB_EP_16_D05	8739.t00011	heat shock protein DnaJ, putative
2799	MG_24H_07_H05	8754.t00004	hypothetical protein, conserved
5641	MG_EP_06_D05	8765.t00018	dynein, putative
5957	MG_ST_16_H12	8824.t00005	lysophospholipase, putative

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)