

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

**ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DE CEPAS DE
Trypanosoma cruzi PERTENCENTES AO
ZIMODEMA III.**

SIMONE AKEMI KIKUCHI

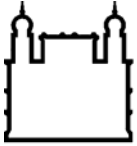
Rio de Janeiro

2007

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 Parasitária

**ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DE CEPAS DE *Trypanosoma*
cruzi PERTENCENTES AO ZIMODEMA III.**

SIMONE AKEMI KIKUCHI

**Orientadores: Dr. Octavio Fernandes
Dra. Cátia Lacerda Sodré**

RIO DE JANEIRO
2007

Kikuchi, Simone Akemi

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz,
Biologia Parasitária, 2007.

I Análise do perfil protéico de cepas de *Trypanosoma cruzi*
pertencentes ao Zimodema III

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Zimodema III. 3. Proteoma

O presente trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

Laboratório de Epidemiologia molecular de Doenças Infecciosas

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Departamento de Medicina Tropical

Laboratório de Biologia Molecular e Diagnóstico de Doenças Infecciosas

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Laboratório de Toxicologia

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica

Laboratório de Biologia Molecular

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Departamento de Ultra Estrutura Celular e Biologia Celular

*Dedico a minha família e ao meu
namorado Josué, pela paciência,
compreensão e apoio em todos os momentos.
Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Octavio Fernandes pela orientação, por me receber tão gentilmente, pelas oportunidades e apoio que me ofereceu, e principalmente, pela forma exigente, crítica e respeitosa com a qual me orientou ao longo desses dois anos.

A Dra. Cátia Sodré pela orientação, pela paciência em me ensinar as técnicas proteômicas, por ter se empenhado sempre em ajudar e pela amizade durante os momentos mais difíceis dessa jornada.

Ao Dr. Adeilton Brandão pela seriedade com que trabalha por estar sempre disposto a ajudar e pelos “papos cabeça” depois das 16hs.

Ao Dr. Jonas Perales pela colaboração na identificação das proteínas por espectrometria de massa.

A Dra. Maria de Nazaré Soeiro pela colaboração durante o processo de produção de amastigotas e tripomastigotas.

A Dra. Leila Mendonça pela oportunidade de trabalhar na Plataforma Proteômica.

A Dra. Angela Junqueira por ter cedido as cepas utilizadas neste estudo e por ter aceito realizar as correções desta dissertação.

As amigas, doutoras (ou quase!), pesquisadoras e quase orientadoras Mariângela, Aline, Nédia e Helena, não encontrei palavras que pudessem expressar todo o meu agradecimento a vocês que foram excepcionais para o meu aprendizado neste laboratório.

As novas amigas do pavilhão 26: Márcia, Melissa, Carol, Mariana Waghbi, Marianna, Renata Almeida, Renata, Dona Neiva, Talita, Patrícia e o amigo Gustavo que sempre estiveram por perto me ajudando nos momentos difíceis e nos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do Departamento de Medicina Tropical, em especial a Dona Maria.

As amigas Bia e Cíntia, pelo incentivo durante todos os dias durante realização desse trabalho e pela amizade de mais de 10 anos.

A amiga Carlinha, mais conhecida como pequena, pela amizade e pelos artigos que você conseguiu... E olha que foram muitos!!! Obrigada.

A amiga Lu (ou Luciane), não só pelo seu excelente trabalho na Pós-Graduação, mas também pela amizade que construímos.

A minha turma de mestrado pelo companheirismo, pelos churrascos na casa da Cíntia e pela união que sempre se mostraram presentes nesta turma.

A amiga Vanessa pelo apoio e pela disponibilidade em ajudar.

A FIOCRUZ por fornecer subsídios fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa: suporte financeiro, infra-estrutura e oportunidades. É um orgulho e uma honra estar neste grande centro de referência.

A todos do Laboratório de Epidemiologia Molecular que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Lista de figuras e tabelas

FIGURA 1.1	Mapa dos países endêmicos para a doença de Chagas.	4
FIGURA 1.2	Ciclo Biológico do <i>T.cruzi</i> .	6
FIGURA 1.3	Representação esquemática da correlação entre linhagem e ciclo predominante em <i>T.cruzi</i> .	12
FIGURA 1.4	Dendograma filogenético gerado após a análise do RFLP ITS-rDNA de isolados de Z III da região Amazônica.	14
FIGURA 1.5	Diagrama que Representa o Modelo Proposto da Evolução de cepas de <i>T.cruzi</i> .	17
FIGURA 4.1	Curvas de crescimento das cepas 3663 e 4167. O resultado representa a média aritmética de três experimentos.	39
FIGURA 4.2	Lâminas coradas por Giemsa referente aos dias de contagem dos parasitos para obtenção da curva de crescimento das cepas 3663 e 4167.	40
FIGURA 4.3	Caracterização molecular das cepas 3663 e 4167 através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídeo.	41
FIGURA 4.4	Cinética de infecção de células VERO pelas cepas Dm 28c (<i>T.cruzi</i> I), CL Brener (<i>T.cruzi</i> II) , 3663 (ZIII) e 4167 (ZIII) nos períodos de 24h, 48h e 72h.	42
FIGURA 4.5	Relação do número de parasitos por célula VERO infectada nos períodos de 24h, 48h e 72h.	43
FIGURA 4.6	Gel SDS-PAGE de extratos protéicos totais solúveis da forma epimastigota das cepas 3663 e 4167.	44
FIGURA 4.7	Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas das cepas 3663 e 4167.	45
FIGURA 4.8	Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 3663.	46
FIGURA 4.9	Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 4167	47
FIGURA 4.10	Análise da reprodutibilidade da eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 3663	48

FIGURA 4.11	Análise da reprodutibilidade da eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 4167.	48
FIGURA 4.12	Imagem virtual gerada pelo programa PDQuest obtida através da sobreposição de imagens dos géis das cepas 3663 e 4167 na faixa de pH 4-7.	49
FIGURA 4.13	Localização dos spots retirados dos géis de 17 cm da cepa 3663 na faixa de pH 4-7 das formas epimastigotas	50
FIGURA 4.14	Localização dos spots retirados dos géis de 17	51
FIGURA 4.15	Gráficos de intensidade dos <i>spots</i> comuns e diferenciais da cepa 3663.	56
FIGURA 4.16	Gráficos de intensidade dos <i>spots</i> comuns e diferenciais da cepa 4167.	57
FIGURA 4.17	Imagens virtuais resultante da comparação entre cepas pertencentes ao grupo:ZIII (cepas 3663 e 4167) e <i>T.cruzi</i> I (cepas D7 e Dm28c)	59
FIGURA 4.18	Imagens virtuais resultante da comparação entre cepas pertencentes ao grupo: ZIII (cepas 3663 e 4167) e <i>T.cruzi</i> II (cepas GLT e CL Brener)	60
FIGURA 4.19	Imagens virtuais geradas a partir da comparação dos géis dos grupos ZIII e <i>T.cruzi</i> I.	61
FIGURA 4.20	Imagens virtuais geradas a partir da comparação dos géis dos grupos ZIII e <i>T.cruzi</i> II.	61
FIGURA 4.21	Géis virtuais faixa de pH 4-7 onde mostra a região do gel onde esta localizada a maior concentração de <i>spots</i> entre ZIII e <i>T.cruzi</i> I e ZIII e <i>T.cruzi</i> II	62
TABELA 3.1	Informações sobre os isolados utilizados neste estudo	27
TABELA 3.2	Programa utilizado para a Focalização isoeétrica e strips de 7 e 17 cm	32
TABELA 3.3	Parâmetros utilizados no programa de busca <i>Mascot</i> visando à identificação da seqüência de peptídeos.	36
TABELA 3.4	Parâmetros utilizados no programa de busca <i>MS-Fit</i> visando à identificação da seqüência de peptídeos.	37
TABELA 4.1	Médias e desvios padrão dos resultados obtidos em três curvas de crescimento das cepas 3663 e 4167.	39

TABELA 4.2	Quantitativo da análise realizada pelo programa PDQuest entre as cepas 3663 e 4167 .	49
TABELA 4.3	Proteínas identificadas por espectrometria de massa da forma epimastigota da cepa 3663	52
TABELA 4.4	Proteínas identificadas por espectrometria de massa da forma epimastigota da cepa 4167.	53
TABELA 4.5	Proteínas identificadas na cepa 3663 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.	54
TABELA 4.6	Proteínas identificadas na cepa 4167 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.	55
TABELA 4.7	Enzimas envolvidas nas vias metabólicas disponibilizadas pelo banco de dados do KEGG.	58
TABELA 4.8	Quantitativo da análise realizada no programa PDQuest entre ZIII e <i>T.cruzi</i> I.	59
TABELA 4.9	Quantitativo da análise realizada pelo programa PDQuest entre ZIII e <i>T.cruzi</i> II.	60

Lista de anexos

ANEXO 1	Meio Liver Infusion Triptose - LIT	73
ANEXO 2	Solução de Dissociação (Solução utilizada para a tripsinização das células)	74
ANEXO 3	Meio N.N.N (Novy, Macneal & Nicolle)	74
ANEXO 4	Coloração por Giemsa	75
ANEXO 5	Fixação em Bouin	75
ANEXO 6	Impregnação por prata	76
ANEXO 7	Coloração por Coomassie Coloidal (G-250)	76
ANEXO 8	Prancha referente às lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 3663 fotografadas num aumento de 20 vezes.	77
ANEXO 9	Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 3663 fotografadas num aumento de 40 vezes.	78
ANEXO 10	Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 4167 fotografadas num aumento de 20 vezes.	79
ANEXO 11	Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 4167 fotografadas num aumento de 40 vezes.	80
ANEXO 12	Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa CL Brener fotografadas num aumento de 20 vezes.	81
ANEXO 13	Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa CL Brener fotografadas num aumento de 40 vezes.	82
ANEXO 14	Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa Dm28c fotografadas num aumento de 20 vezes.	83
ANEXO 15	Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa Dm28c fotografadas num aumento de 40 vezes.	84
ANEXO 16	Via da biossíntese de alcalóides I gerada pelo banco de dados do KEGG	85
ANEXO 17	Via do metabolismo da metionina gerada pelo banco de dados do KEGG	86
ANEXO 18	Via do metabolismo da tirosina gerada pelo banco de dados do KEGG	87

ANEXO 19	Via do metabolismo da fenilalanina gerada pelo banco de dados do KEGG	88
ANEXO 20	Via do metabolismo do triptofano gerada pelo banco de dados do KEGG.	889
ANEXO 21	Via de biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano gerada pelo banco de dados do KEGG	90
ANEXO 22	Via do <i>Novobiocin biosynthesis</i> gerada pelo banco de dados do KEGG	91
ANEXO 23	Via do metabolismo do ácido selenoamino gerada pelo banco de dados do KEGG	92
ANEXO 24	Via do metabolismo do ácido cianoamino gerada pelo banco de dados do KEGG	93
ANEXO 25	Via do metabolismo da glutatona gerada pelo banco de dados do KEGG	94
ANEXO 26	Via do metabolismo do ácido aracdônico gerada pelo banco de dados do KEGG	95
ANEXO 27	Via da degradação do benzoato; via da ligação de CoA gerada pelo banco de dados do KEGG	96
ANEXO 28	Via do metabolismo do nitrogênio gerada pelo banco de dados do KEGG	97

Lista de abreviaturas

- 3'UTR - região 3' não traduzida
- ACN - acetonitrila
- APS - Persulfato de amônia
- BSA - albumina sérica bovina
- CHAPS - 3-[3-colamidopropil dimetilamonio]-1-propanosulfonato
- DNA Ácido desoxiribonucléico
- DTT - ditioneitol
- EC numbers - The Enzyme Commission*
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- Eletroforese 2D - Eletroforese bi-dimensional
- ESI - Ionização por elétron dispersão
- gRNAs - RNAs guia
- HCCA - ácido alfa-ciano-4-hidroxiâmico
- IEF- Focalização isoeletrica
- IEFb - Tampão de focalização isoeletrica
- IPG - gradiente de pH imobilizado
- KDa - Kilodáltons
- kDNA - DNA do cinetoplasto
- KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- LIT - *Liver Infusion Triptose*
- MALDI - *matrix assisted laser desorption/ionization*
- MALDI TOF-TOF Ionização por *laser* de moléculas contidas em uma matriz sólida
- MASP - proteínas associadas à mucina
- MDS - *multidimensional scaling plot*
- MLEE - análise eletroforética de multiloci isoenzimáticos
- MS - espectrometria de massa
- NNN - MacNeal, Novy e Nicole
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
- PBS - tampão salina fosfato -
- PCR - Reação Polimerásica em cadeia
- pH - Potencial de hidrogênio

pI - Ponto isoelétrico
PM – Peso molecular
PMF - Peptide mass fingerprinting
PMSF - Fenilmetilsulfonil fluorido
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*
RFLP-ITS-rDNA - *Restriction Fragment Length Polymorphis*
RNA - ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
RNAr - RNA ribossomal
SDS - sulfato de dodecil de sódio
SDS-PAGE Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB - soro fetal bovino
SMF - Sistema Fagocítico Mononuclear
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*
T. cruzi II – *Trypanosoma cruzi II*
T.cruzi I – *Trypanosoma cruzi I*
TCA - Ácido tricloroacético
TEA - Trietanolamina
TEMED - N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TFA - Ácido trifluoroacético
Tris - tris-(hidroximetil)-amino metano
ZI - Zimodema I
ZII - Zimodema II
ZIII - Zimodema I II

Sumário

Resumo	xiv
Abstract	xv
1- Introdução	1
1.1. Doença de Chagas: um breve histórico	1
1.2. A doença de Chagas	2
1.2.1. Situação atual da doença de Chagas	2
1.2.2. Origem e distribuição da doença de Chagas	3
1.3. O parasito	4
1.4. Genoma do <i>T.cruzi</i>	7
1.5. Heterogeneidade do <i>T.cruzi</i>	9
1.6. Zimodema III	13
1.7. Transcrição e Expressão Gênica em <i>T.cruzi</i>	17
1.8. Análise proteômica	18
1.8.1. Eletroforese bi-dimensional (2D)	20
1.8.2. Análise computacional dos mapas proteômicos	20
1.8.3. Análise das amostras por espectrometria de massa	21
1.9. Projeto Proteoma de <i>T. cruzi</i> desenvolvido na Fiocruz	25
2 – Objetivos	26
3 – Material e Métodos	27
3.1. Cultivo e proliferação dos parasitos	27
3.1.1. Obtenção de tripomatigotas e amastigotas em células VERO	27
3.1.2. Curva de crescimento	28
3.1.3. Tipagem molecular	29
3.1.4. Cinética de Infecção das cepas de <i>T.cruzi</i> pertencentes ao ZIII, T.cruzi I e II em células VERO.	29
3.2. Preparação do extrato protéico total solúvel	30
3.2.1. Extração das proteínas solúveis	30
3.2.2. Dosagem da concentração de proteínas no sobrenadante – Método RCDC (BIO RAD)	30
3.3. SDS – PAGE (1D)	31
3.4. Eletroforese Bidimensional (2D)	31

3.4.1 – Focalização isoelétrica (1ª dimensão)	31
3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (2ª dimensão)	33
3.5. Métodos de detecção das proteínas no gel	33
3.5.1. Coomassie Coloidal (G-250)	33
3.5.2. Impregnação por nitrato de prata	33
3.6. Análise e identificação das proteínas	33
3.6.1. Captura dos géis em um formato digital e análise das imagens obtidas	33
3.6.2. Retirada e processamento dos <i>spots</i>	34
3.6.3. Análise dos <i>spots</i> por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos	35
3.7. Mapas metabólicos	38
4 – Resultados	39
4.1. Curvas de crescimento <i>in vitro</i>	39
4.2. Caracterização molecular das cepas 3663 e 4167	40
4.3. Cinética de infecção por cepas de <i>T. cruzi</i> pertencentes ao ZIII e <i>T. cruzi</i> I e II em células VERO	41
4.4. Eletroforese Uni-dimensional (1D)	43
4.5. Eletroforese Bidimensional (2D)	44
4.6. Análise dos <i>spots</i> por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos	51
4.7. Vias metabólicas	57
4.8. Comparação do mapa de proteínas solúveis obtidas para ZIII com o mapa obtido para cepas do grupo <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II.	58
5 – Discussão	63
6 – Conclusões	72
7 - Anexos	73
8 – Referências Bibliográficas	98

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, é largamente distribuído no continente americano. Estudos baseados no perfil eletroforético de isoenzimas, propuseram que o *T. cruzi* fosse classificado em 3 zimodemas (ZI, ZII e ZIII), onde ZI e ZIII estariam relacionados ao ciclo silvestre e ZII ao ciclo doméstico. Posteriormente, através de diversas técnicas de biologia molecular, observou-se um claro dimorfismo entre os isolados, levando ao agrupamento das cepas em duas grandes linhagens filogenéticas: *T. cruzi* I (que se correlaciona ao ZI) e *T. cruzi* II (que se correlaciona ao ZII). Dados ecológicos e moleculares sugerem que as cepas pertencentes ao ZIII estejam mais relacionadas a *T. cruzi* I do que *T. cruzi* II, mas na realidade a posição de ZIII permanece controversa. Um dendrograma filogenético baseado em alguns alvos genômico revelou uma dicotomia clara em ZIII, definindo dois subgrupos (ZIII-A e ZIII-B). Deste modo, a análise proteômica de cepas pertencentes ao ZIII em comparação com *T. cruzi* I e II pode contribuir para elucidar esta questão. Este trabalho tem como objetivo principal definir o mapa de proteínas solúveis das cepas pertencentes ao zimodema III (3663 – ZIII-A e 4167 – ZIII-B), ressaltando as diferenças existentes entre os subgrupos ZIII-A e ZIII-B. Para isto foram utilizadas as técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Foi feita a padronização de protocolos para a obtenção de extratos protéicos das formas epimastigotas e da separação das proteínas por eletroforese bidimensional. As células (3×10^9 cultivadas em meio LIT) foram ressuspensas em PBS e submetidas a quatro ciclos alternados de congelamento e descongelamento na presença de coquetel de inibidores de proteases. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com TCA e lavadas com acetona fria. O precipitado foi solubilizado utilizando uma solução contendo CHAPS, Uréia, DTT e anfólitos. Os ensaios de eletroforese bidimensional foram feitos nas faixas de pH 3-10 e 4-7 em géis de poliacrilamida 12% e corados por impregnação pela prata ou Coomassie Blue G-250. Os ensaios realizados na faixa de pH 3-10, revelaram uma grande diversidade de *spots* entre as cepas 3663 e 4167. Entretanto, quando a faixa de pH foi diminuída (4-7) houve um aumento no número de *spots* revelados. A análise computacional das imagens dos géis das cepas 3663 e 4167 mostrou a presença de 300 e 325 *spots* respectivamente, sendo 181 comuns a ambos. Uma diversidade considerável na expressão de proteína bem como na intensidade de vários *spots* também foi observada entre as cepas estudadas. A maioria das proteínas identificadas por espectrometria de massa foi classificada em três grupos funcionais: metabolismo, organização celular e destino de proteína. Diversidade também foi encontrada quando se comparou os perfis de ZIII com os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, onde ZIII compartilha 155 *spots* com *T. cruzi* I e 137 *spots* com *T. cruzi* II. Os resultados definem o mapa proteômico e a classificação de algumas proteínas de isolados ZIII considerando os sub-grupos genômicos circulantes na natureza.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is widely distributed in the American continent. It circulates among humans, vectors, sylvatic and domestic reservoirs. Studies based on enzyme electrophoresis profile clustered *T. cruzi* isolates into 3 zymodemes (ZI, ZII and ZIII). Molecular techniques showed a dimorphism among the isolates, grouping them into *T. cruzi* I (related to ZI) and *T. cruzi* II (related to ZII). Ecological and molecular data suggest that ZIII strains are more related to *T. cruzi* I than *T. cruzi* II, but their exact phylogeny is an unresolved issue. A phenetic dendrogram based on some genomic targets revealed a clear dichotomy in ZIII, defining two subgroups (ZIII-A and ZIII- B). So, proteomic analysis of ZIII strains compared to *T. cruzi* I and II could contribute to elucidate this question. The present work describes the standardization of a protocol in order to obtain reproducible extraction and separation of soluble proteins using two dimensional gel electrophoresis from different ZIII strains (3663-ZIII-A and 4167- ZIII-B). Epimastigotes were grown in LIT medium at 28 °C. Cells (3×10^9) washed with PBS and then lysed by freezing/thawing in PBS buffer and protease inhibitor cocktail. Total proteins were precipitated with TCA and washed with cold acetone. The pellet was resuspended in buffer containing Urea, CHAPS, DTT and ampholytes. Proteins were separated over pH gradients 3-10 and 4-7, resolved in 12% SDS-PAGE and visualized by silver staining or Coomassie Blue G-250. The experiments carried out in pH 3-10, revealed a great diversity of spots between 3663 and 4167. Further separation using a narrow pH range (4-7) showed an increase in number of spots. According to the gel image analysis, 3663 and 4167 presented 300 and 325 spots respectively, but only 181 were common to both. A considerable diversity in protein expression as well as in the intensity of several spots also occurs between the two different strains studied. The majority of the identified proteins by mass spectrometry fell into three major functional groups: metabolism, cellular organization and protein destination. Variation was also found when ZIII was compared to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups, where ZIII shared 155 spots with *T. cruzi* I and 137 spots with *T. cruzi* II. The results define the proteomic map and the classification of some ZIII proteins considering the genomic subgroups circulating in the environment.

1.INTRODUÇÃO

1.1 - Doença de Chagas: um breve histórico

Existem várias evidências que a doença de Chagas e seus vetores já eram conhecidos por certas civilizações andinas pré-colombianas. Foram detectados sequências de DNA específicas de *T. cruzi* em tecidos provenientes de múmias chilenas datadas de 2000 anos atrás (Ferreira *et al.*, 2000). Acredita-se que a expansão principal da doença humana tenha ocorrido no século XVII, com as migrações dos colonizadores europeus para as regiões do interior da América Latina (Schofield *et al.*, 1994). Estes deslocamentos demográficos propiciaram os contatos entre homens, vetores, agentes e reservatórios, que finalmente resultaram na ocorrência de enfermidades, como a tripanossomíase, a malária, as leishmanioses etc (Dias, 2000).

Há mais de 99 anos, importantes descobertas mudaram o entendimento da doença de Chagas, proporcionando o avanço de novas abordagens para os estudos da relação entre o parasito e o seu hospedeiro. Em 1908, Carlos Chagas pesquisou a existência de um inseto hematófago, que tinha um comportamento típico de chupar os humanos na face enquanto estes dormiam atribuindo-lhe a possibilidade de transmitir algum tipo de parasito ao homem e outros vertebrados, o que o levou a detectar a presença de flagelados no intestino posterior deste inseto. Posteriormente, descobriu a capacidade deste flagelado presente no inseto de infectar primatas. Estes flagelados foram reconhecidos como uma nova espécie, primeiramente nomeada de *Schizotrypanum cruzi* (em homenagem a Oswaldo Cruz); subseqüentemente renomeado como *Trypanosoma cruzi* (Wendel & Brener, 1992). Em 1909, Chagas descreveu a infecção humana, a morfologia do parasito na corrente sanguínea, o ciclo de vida no trato digestivo do vetor invertebrado, o cultivo em ágar-sangue e a transmissão de flagelados dos insetos vetores para os vertebrados (Chagas , 1909). Já em 1916, ele caracterizou o acometimento do sistema digestivo na doença, especialmente em aspectos relacionados a megaesôfago e disfagia.

Hoje sabe-se da existência de uma grande heterogeneidade em relação ao *T.cruzi* responsáveis pela infecção no homem e em outros vertebrados, fazendo-se necessário a elucidação de muitos processos envolvidos na transmissão da doença, assim como, no entendimento das diferentes manifestações clínicas.

1.2 - A doença de Chagas

1.2.1 - Situação atual da Doença de Chagas

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente causal da doença de Chagas, uma enfermidade crônica e endêmica que assola regiões pobres, sobretudo no interior do Brasil e o tratamento não é eficaz em todos os casos. Estimativas indicam que, no âmbito da América Latina, 16-18 milhões de pessoas estão infectadas e cerca de 100 milhões vivem em áreas de risco de infecção em 21 países das Américas Latina e Central (WHO, 2002). A tripanossomíase americana continua sendo um problema relevante e prioritário de saúde pública na América Latina. Dados recentes indicam que aproximadamente 200.000 novos casos e 21.000 mortes são registrados a cada ano (Morel, 2000; WHO, 2002; Vinhaes & Schofield, 2003). Apesar dos importantes avanços no controle do inseto vetor nos países do Cone Sul, por iniciativa da Organização Pan-Americana de Saúde e da Organização Mundial de Saúde (OMS) que levam à queda na incidência da infecção (Schofield & Dias, 1999), ainda existem dois problemas críticos: o tratamento de casos crônicos e o alto percentual de casos agudos em alguns países da América Latina (Medrano-Mercado *et al.*, 1996). As pessoas mais afetadas pela doença de Chagas são as muito pobres, que vivem em casas de pau-a-pique, um habitat perfeito para os insetos. A enfermidade mata cerca de 50 mil pessoas todos os anos no continente americano e é a terceira enfermidade tropical mais prevalente, depois da malária e da esquistossomose (http://www.dndi.org.br/Portugues/doenca_chagas.aspx).

A doença de Chagas apresenta diferentes perfis de morbidade e mortalidade nas diferentes regiões geográficas, mas em todas, devido o seu caráter crônico e às formas clínicas - cardíacas e digestivas leva a um elevado impacto econômico pelos custos de internação, licença-saúde e óbitos precoces, (WHO, 2000).

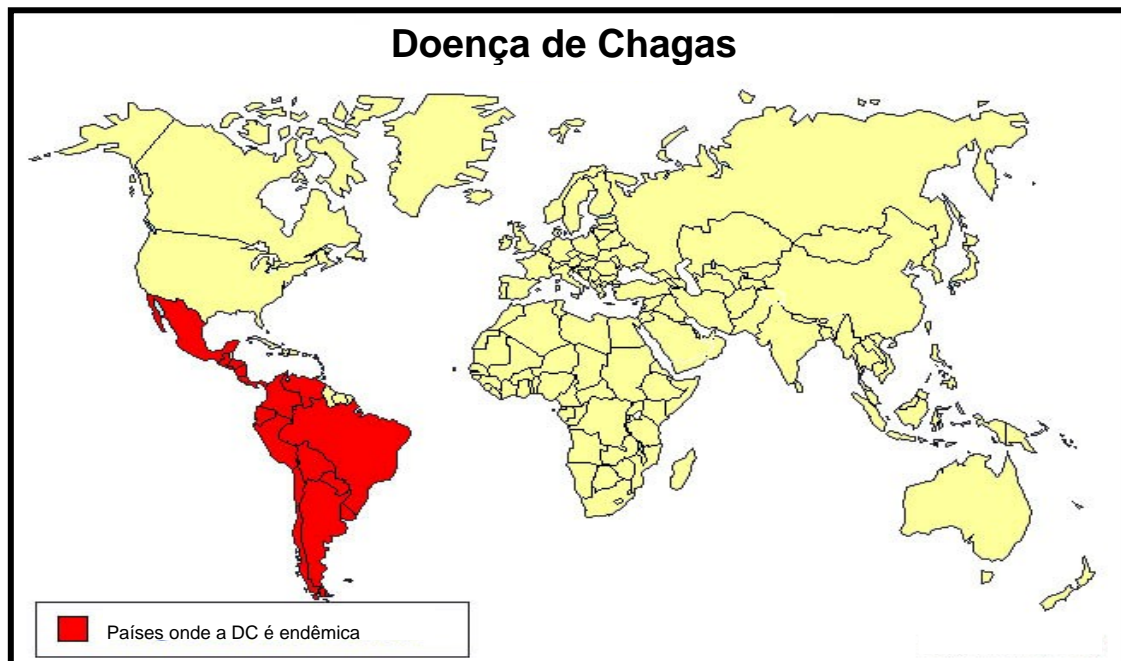
A doença de Chagas apresenta uma fase aguda e outra crônica. A fase aguda caracteriza-se por um quadro febril, de alta parasitemia e de curta duração, podendo variar de alguns dias a cerca de dois meses. Os principais sintomas da doença de Chagas na fase aguda são febre, edemas de face e de extremidades e linfadenopatia. Nesta fase, as lesões são principalmente em resposta à ruptura das células hospedeiras pelo *T. cruzi*. Na fase crônica da doença, observa-se uma baixa parasitemia e um quadro muitas vezes assintomático podendo durar anos ou até décadas (Cançado *et al.*, 2005).

Com relação ao tratamento, a principal dificuldade é a abordagem terapêutica dos casos crônicos. Em se tratando de moléculas com propriedades terapêuticas contra o *T. cruzi*, observa-se que os medicamentos usados atualmente são os mesmos desde 1968, não havendo muitas modificações na conduta clínica (Brener *et al.*, 2000). Dentro deste contexto, Nifurtimox (Lampit[®], Bayer 2502; <http://www.bayer.com/>) e Benznidazol (Rochagan[®], Radamil[®], Roche 7-1051; <http://www.roche.com/>) aparecem com relativo destaque no tratamento da doença de Chagas. Nenhum dos dois é considerado ideal devido a uma série de restrições, como: (i) baixa eficácia na fase crônica da doença; (ii) significativas variações regionais na eficácia, devido ao surgimento de resistência do *T. cruzi*; (iii) alta taxa de abandono do tratamento devido aos efeitos colaterais causados pelos medicamentos; (iv) longo período de tratamento (30 a 60 dias) e (v) necessidade de monitoramento sob supervisão médica especial. Em países pobres, onde não é possível estabelecer programas de detecção em massa e o tratamento é muito caro, crianças com menos de 12 anos são normalmente as únicas a receberem tratamento. As crianças têm uma chance maior de se beneficiarem com o tratamento, por ser menos provável que já estejam acometidas por lesões crônicas. Há pouquíssima pesquisa sendo desenvolvida atualmente para encontrar medicamentos menos tóxicos e mais eficazes que possibilitem o tratamento de pacientes com doença de Chagas (http://www.dndi.org.br/Portugues/doenca_chagas.aspx).

1.2.2 - Origem e distribuição da doença de Chagas

Originalmente, a doença de Chagas era uma enzootia de animais silvestres, onde mais de 100 espécies entre marsupiais, quirópteros, roedores, edentados, carnívoros e primatas albergavam o *T. cruzi*. Por outro lado, numerosas espécies de triatomíneos silvestres se encarregavam de transmitir o *T. cruzi* entre eles, criando um ciclo silvestre de infecção. O processo de adaptação dos triatomíneos ao domicílio humano dependeu de dois fatores que se complementaram: a necessidade alimentar do barbeiro e suas mutações genéticas ao longo do tempo. Com o desmatamento e rareamento dos animais silvestres, suas fontes naturais de alimentação, os triatomíneos passaram a alimentar-se dos animais domésticos e do homem, adaptando-se ao peridomicílio e ao domicílio (Aragão *et al.*, 1983; Forattini *et al.*, 1980). A dispersão do *T. cruzi* é bastante ampla no continente americano, particularmente a enzootia silvestre, que se estende desde a latitude de 42° N, nos Estados Unidos, até o paralelo 49° S nas regiões meridionais do Chile e da Argentina, incluindo as Guianas e o Caribe. A distribuição geográfica da doença de Chagas endêmica (Dias *et al.*, 1997), como já previsto

por Carlos Chagas, em 1909, ocorre em todas as áreas onde há triatomíneos antropofílicos adaptados ao domicílio humano, do México ao sul da Argentina. Dessa forma, a circulação original do *T. cruzi* compreende apenas a América, em especial a América Latina, e a distribuição geográfica da doença de Chagas se superpõe ao mapa dos triatomíneos domiciliados (Dias *et al.*, 2000) (Figura 1.1).



WHO/CTD, Maio 1996

Figura 1.1: Países endêmicos para a doença de Chagas em 1996.

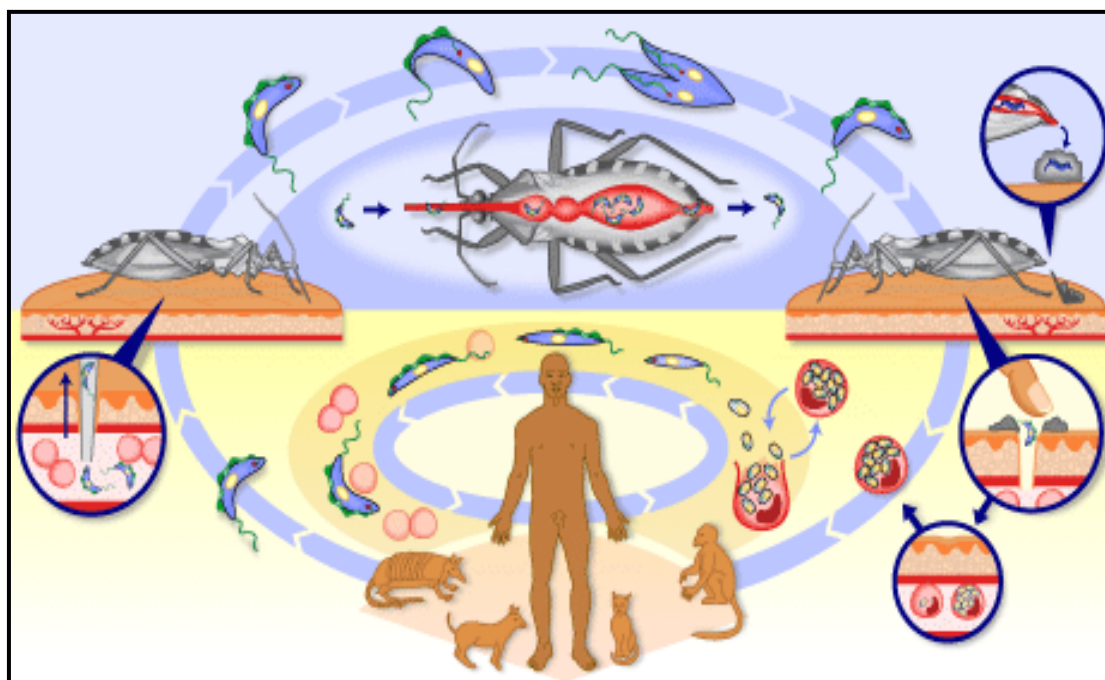
1.3 - O parasito

O *T. cruzi*, um parasito hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, possui uma estrutura particular, o cinetoplasto, que corresponde a uma condensação de DNA localizado dentro da mitocôndria única e ramificada. Por pertencer à seção Stercoraria dentro do gênero *Trypanosoma*, apresenta um desenvolvimento no intestino do inseto vetor que culmina com a liberação de formas infectivas pelas fezes (Hoare *et al.*, 1972; Souza *et al.*, 2000). O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida bastante complexo incluindo formas evolutivas distintas (amastigota, tripomastigota e epimastigota) e requer a participação de um hospedeiro invertebrado, da família Triatominae e de um mamífero vertebrado (Hoare *et al.*, 1964). Considera-se que a transmissão inicialmente envolva a interação de triatomíneos e animais silvestres, sendo este ciclo denominado ciclo silvestre do parasito. Quando o homem penetra no ambiente silvestre e natural onde circula o *T. cruzi*, a

sua respectiva infecção pode evoluir para doença de Chagas transformando a enzootia numa antropozoonose.

Em condições naturais, formas infectantes do parasito são transmitidas pelos vetores através do contato com as fezes e urina contaminada, com a pele e mucosa do hospedeiro vertebrado. Quando um triatomíneo deposita as fezes na pele lesada ou mucosa sã, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram ativamente em uma célula do Sistema Fagocítico Mononuclear (SMF). Estas formas se transformam em amastigotas e se multiplicam intensamente por divisão binária, rompem a célula e caem na corrente sangüínea sob a forma tripomastigota que penetram em células vizinhas ou em outras distantes como células musculares e nervosas. Dentro destas novas células se transformam novamente em amastigota e continuam o ciclo. Durante o hábito alimentar do inseto no hospedeiro humano, as formas tripomastigotas são absorvidas e no intestino do hospedeiro invertebrado se transformam em epimastigotas. Ao migrarem para a porção posterior do intestino do inseto, as formas epimastigotas sofrem metaciclogênese e originam novamente os tripomastigotas metacíclicos (Figura 1) (Buscaglia & Di Noia, 2003).

Segundo Coura e cols. (Coura *et al.*, 2002) a transmissão oral da doença de Chagas também pode ser observada. Os autores demonstraram que mais da metade dos casos agudos da doença de Chagas registrados de 1968 a 2000 na Amazônia brasileira podem ser atribuídos a microepidemias oriundas de transmissão oral através de alimentos contaminados. A fonte potencial no alimento contaminado foi identificada como sendo insetos triatomíneos ou fezes provenientes dos mesmos (por exemplo, triturados em caldo de cana ou em suco de açaí).



TDR/Wellcome Trust

Figura 1.2: Ciclo Biológico do *T. cruzi*.

A doença de Chagas no homem apresenta um curso bastante variado (Rassi *et al.*, 1979). Em virtude desta grande variabilidade clínica e epidemiológica, tem sido sugerido que fatores genéticos e imunológicos dos pacientes influenciam na evolução clínica da doença. Por outro lado, acredita-se que características genéticas da população de parasitos envolvidos, também tenham um papel importante no desenvolvimento das formas clínicas (Macedo & Pena, 1998).

Na transmissão vetorial do *T. cruzi*, o ciclo de maior importância epidemiológica é o doméstico, pois perpetua a infecção em seres humanos (Schmuñis *et al.*, 2000). O ciclo doméstico é resultante do contato entre o homem e o vetor, envolvendo a colonização de ecótopos artificiais pelos triatomíneos. Normalmente, essa colonização é resultante de modificações sociais e ecológicas no meio ambiente, provocadas pelo próprio homem. Neste ciclo, o parasitismo pode causar importantes danos aos hospedeiros vertebrados, com alto grau de morbidade e mortalidade nas pessoas infectadas (Dias *et al.*, 1992). O vetor cresce e multiplica-se em fendas de paredes, buracos do telhado, debaixo e atrás dos móveis, dos quadros e outros pontos das residências com paredes de barro ou tijolo cru, de palha ou junco. Os principais reservatórios do parasito são os seres humanos, cães, gatos e, em alguns países as cobaias (Schmuñis *et al.*, 2000).

O ciclo silvestre do *T. cruzi* envolve a interação de vetores e hospedeiros silvestres em ecótopos naturais do continente americano. No âmbito silvestre, tem-se registrado mais de 100 espécies de pequenos mamíferos infectados naturalmente com *T. cruzi*, uma relação aparentemente muito antiga, que proporciona real equilíbrio entre hospede e hospedeiro, sem dano para nenhuma espécie (Barreto *et al.*, 1979; Ryckman *et al.*, 1986). A maior importância é dada aos reservatórios capazes de aproximar-se dos seres humanos, especialmente alguns marsupiais (gambás, em geral) e ratos. Esses animais não só trazem o parasito para o peridomicílio do homem, na procura de alimento e abrigo, como também ajudam na dispersão dos triatomíneos que, freqüentemente, os carregam em suas pelagens. Os animais silvestres citados como reservatórios naturais para *T. cruzi* são: os marsupiais (gambás, marmotas e cuícas), os desdentados (tatus), os roedores (ratos e cobaias silvestres), os carnívoros (gatos, cachorros do mato, pequenas raposas etc.), os primatas (vários tipos de macacos) e os lagomorfos (coelhos e lebres) (Dias *et al.*, 2000). Os marsupiais são classicamente considerados como os mais importantes reservatórios silvestres de *T. cruzi* e podem representar o grupo de ligação entre os ciclos silvestre e doméstico do parasito (Fernandes *et al.*, 1999).

O terceiro ciclo é o peridoméstico, no qual intervêm mamíferos (roedores domésticos, marsupiais, gatos e cães), que, circulam livremente nas residências e triatomíneos silvestres atraídos às casas pela luz e pelo alimento. Este ciclo peridoméstico serve de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (Schmuñis *et al.*, 2000).

1.4. Genoma do *T. cruzi*

Como ocorre nos eucariontes, o *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria. Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, albergando uma rede complexa de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto ou kDNA (Silveira *et al.*, 2000).

Uma característica interessante do *T. cruzi* é o fato do tamanho do genoma variar extensivamente entre cepas, e clones da mesma cepa (Henriksson *et al.*, 1996).

A análise da cinética de renaturação de DNA de *T. cruzi* mostrou que aproximadamente 9–14% do DNA total do parasito é composto por seqüências altamente repetitivas (Requena *et al.*, 1996).

O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função denominadas de minicírculo e maxicírculo. Os maxicírculos possuem cerca de 40.000 pb de tamanho, e o número de cópias por célula varia de 20 a 50. Os genes das proteínas mitocondriais e dos RNAr mitocondriais estão localizados no maxicírculo. Portanto, pode-se considerar o maxicírculo como sendo análogo ao DNA mitocondrial dos demais eucariontes (Silveira *et al.*, 2000).

Os minicírculos possuem cerca de 1.400 pb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por células. No cinteplasto, os minicírculos aparecem entrelaçados entre si, tal como acontece entre os anéis de uma malha. Os minicírculos possuem 4 regiões de 120 a 160 pb de sequência bastante conservada entre si e que estão dispostas em ângulo de 90° uma em relação à outra. Estas regiões contêm a origem de replicação do DNA e são também conservadas entre diferentes isolados e cepas de *T. cruzi*. As regiões variáveis têm cerca de 280 a 320 pb (Silveira *et al.*, 2000). As seqüências presentes nos minicírculos não codificam peptídeos. Demonstrou-se que segmentos das seqüências variáveis são transcritas gerando pequenos RNAs denominados RNAs guia (gRNAs), moléculas que estão envolvidas no processo de editoração dos RNAm das enzimas mitocondriais. Neste processo, a maioria dos transcritos dos genes provenientes dos maxicírculos só podem ser traduzidos em proteínas após a adição ou deleção de resíduos de uridina (Stuart *et al.*, 1995; Hajduk *et al.*, 1996).

O seqüenciamento completo do genoma de *T. cruzi*, juntamente com o de outros tripanossomatídeos foi concluído em 2005, porém ainda não foi possível realizar a montagem completa devido ao grande número de seqüências repetitivas (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005a e 2005b). A cepa escolhida para o seqüenciamento foi a CL Brener, em função de sua caracterização experimental estar bem estabelecida, ter sido isolado de *Triatoma infestans*, um vetor altamente domiciliado; por ser infectiva para camundongos; por ter tropismo preferencial pelo coração e células musculares; por mostrar uma fase aguda claramente definida em humanos acidentalmente infectados e finalmente, por ser susceptível às drogas usadas no tratamento clínico da doença de Chagas (Zingales *et al.*, 1997). Este clone parece ser geneticamente estável, no que diz respeito ao comportamento de uma série de caracteres fenotípicos e genotípicos (isoenzimas, esquizodema, RAPD e impressão digital de DNA) (Zingales *et al.*, 1997).

De acordo com os dados do seqüenciamento, *T. cruzi* é um organismo diplóide cujo genoma compreende cerca de 60 Mb com aproximadamente 12.000 genes (El-Sayed *et al.*, 2005a)

Também foi demonstrado que pelo menos 50% do genoma do parasito é constituído de seqüências repetitivas consistindo principalmente de famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas. A maior das famílias gênicas codifica proteínas de superfície como membros da superfamília da trans-sialidases, mucinas, proteínas associadas à mucina (MASP) e a glicoproteína de superfície gp 63. Todas estas proteínas são *T. cruzi*-específicas e representam 18% do total de genes codificantes de proteína no genoma do parasito. Inúmeras classes de moléculas sinalizadoras estão ausentes em tripanossomatídeos, incluindo receptores de serpentina, proteínas heterotriméricas G, domínios de interação SH2 e SH3 e fatores de regulação transcricional. Ainda dentro deste contexto, foram identificadas 167 proteína kinases distintas (El-Sayed *et al.*, 2005).

1.5. Heterogeneidade do *T. cruzi*

O *T. cruzi* é uma espécie heterogênea constituída por um conjunto de populações de parasitos (cepas) que circulam entre diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados, silvestres e domésticos (Brener *et al.*, 1977; Morel *et al.*, 1986; Zingales *et al.*, 1998). Em 1996, Coura e cols, utilizaram o termo “complexo cruzi” na intenção de descrever de forma objetiva a diversidade observada no parasito. O mesmo grupo re-propõe a idéia em 2003 propondo a identificação do *T. cruzi* como sendo “complexo cruzi” (Devera *et al.*, 2003).

Cepas são isolados obtidos de uma infecção natural e mantidos em laboratório. Por sua vez, uma cepa pode ser constituída por uma ou mais populações clonais (Morel *et al.*, 1980; De Araújo & Chiari, 1970; Macedo *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1998). Estudos experimentais com isolados de *T. cruzi* mostraram uma grande diversidade intra-específica evidenciada por diferenças na morfologia de formas sangüíneas (Brener, 1965), virulência e patogenicidade (Lauria-Pires *et al.*, 1997; Tekiel *et al.*, 1997), cinética de crescimento (Deane, 1984), susceptibilidade a agentes quimioterápicos (Haberkorn *et al.*, 1972; Brener *et al.*, 1976; Filardi & Brener, 1987 e Murta *et al.*, 1998), constituição antigênica e propriedades bioquímicas (Bongertz & Dvorak, 1983; Zingales *et al.*, 1984), propriedades imunológicas (Braga *et al.*, 1993) e infectividade em células hospedeiras (Doyle *et al.*, 1984).

Com base nos resultados do comportamento biológico em animais experimentais, assim como estudos bioquímicos e moleculares, diversos autores têm mostrado diferenças intra-específicas de amostras do *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros e de várias áreas geográficas (Bice & Zelodon, 1970; Petana & Coura, 1974; Miles *et al.*, 1977, Melo &

Brener, 1978; Morel *et al.* 1980; Andrade, 1985; Araújo & Chiari, 1988; Carneiro *et al.*, 1991; Macedo & Pena, 1998).

As análises de zimodemas, um método bioquímico para detecção da variação eletroforética de isoenzimas, têm sido usadas por diversos autores para identificar populações de parasitos. Diferenças isoenzimáticas entre estoques de *T. cruzi* foi primeiramente estudado por Toyé, em 1974, usando aspartato e alanina aminotransferases. Neste artigo, o autor descreve as diferenças nos padrões eletroforéticos de seis enzimas entre isolados de *T. cruzi* provenientes de ciclos silvestres, domésticos e regiões adjacentes de uma área endêmica da doença de Chagas (Toyé, 1974).

Baseando-se no polimorfismo observado nos perfis eletroforéticos de seis enzimas, Miles e cols (1977; 1978) caracterizaram três perfis de enzimas pertencentes a grupos de parasitos (zimodema), onde o zimodema I (ZI) e zimodema III (ZIII) estão relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e zimodema II (ZII) com o ciclo doméstico do parasito (Miles *et al.*, 1978). À medida que o número de isoenzimas analisadas foi sendo ampliado e subpopulações que circulam entre vertebrados domésticos, silvestres e invertebrados foram estudadas, observou-se um alto grau de heterogeneidade (Miles *et al.* 1980; Bogliolo *et al.* 1986; Tibareyenc *et al.* 1986, Tibareyenc & Ayala, 1988; Barnabé *et al.*, 2000).

Miles e cols. (1977) caracterizaram grupos de *T. cruzi* de ciclos silvestres e domésticos transmitidos por diferentes vetores provenientes da cidade de São Felipe, Bahia. Zimodema I (ZI) foi principalmente encontrado em gambá e em espécies de triatomíneos silvestres. Outros isolados, provenientes de casos agudos e crônicos da doença de Chagas e triatomíneos domiciliados, foram identificados como ZII. Posteriormente, Miles e cols., (1978) estudaram os seis primeiros casos da fase aguda da doença de Chagas encontrados na região Amazônica, Brasil, demonstrando que dois dos seis casos associaram-se com ZI previamente encontrado em São Felipe. Os outros quatro casos (todos encontrados na mesma casa) mostraram um padrão de isoenzimas, caracterizados como ZIII. Posteriores caracterizações, de mais 60 isolados de *T. cruzi* de mamíferos e vetores silvestres, demonstraram que estes estoques pertenciam ao ZI. Por sua vez, o ZIII tem sido ocasionalmente encontrado em ciclos enzoóticos que limitam a floresta Amazônica. Assim, os três grupos de *T. cruzi* encontrados podem infectar o homem no Brasil (Miles e cols., 1978). Miles não conseguiu identificar uma correlação entre as tipagens em zimodemas e as formas clínicas da doença.

Os padrões de zimodemas também contribuíram para os estudos evolutivos em *T. cruzi*. Tibareyenc & Ayala (1988) analisaram 524 amostras de diferentes regiões da América

Latina através dos padrões gerados por 15 isoenzimas. Os resultados obtidos sugeriram uma estrutura clonal e diplóide para o *T. cruzi*. Estudos utilizando análise eletroforética de multiloci isoenzimáticos (MLEE) foram realizados posteriormente (Tibayrenc & Ayala, 1986; 1988). Estes estudos genotípicos foram baseados na análise isoenzimática de aproximadamente 500 cepas do *T. cruzi*, isoladas desde os Estados Unidos até o Chile. Com o estudo de 15 loci genéticos de 121 cepas do parasito, foram identificados 43 clones naturais, sugerindo uma grande variedade de genótipos isoenzimáticos entre as cepas do *T. cruzi* (Tibayrenc & Ayala, 1986). Estudos posteriores compararam estes múltiplos genótipos isoenzimáticos com os zimodemas ZI, ZII e ZIII descritos por Miles (1980), concluindo que estes três zimodemas não são suficientes para demonstrar a variabilidade real do parasito, permanecendo apenas válidos para as cepas de referência (Tibayrenc & Ayala, 1988).

Com o avanço tecnológico da biologia molecular, novas técnicas foram desenvolvidas, permitindo o estudo da diversidade de *T. cruzi* em nível de DNA. Essa abordagem é vantajosa, pois mostra um maior grau de polimorfismo em comparação com os padrões de isoenzimas. A variabilidade genética em *T. cruzi* já foi evidenciada em relação ao kDNA, à organização cromossômica e ao DNA nuclear.

A partir da avaliação de padrões eletroforéticos de bandas representativas de fragmentos do DNA do cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi* após digestão com enzimas de restrição foi possível determinar agrupamentos denominados de esquizodemas (Morel *et al.*, 1980). A comparação entre os esquizodemas com os zimodemas já descritos, demonstrou visível variação de esquizodemas entre as cepas de um mesmo zimodema (Morel *et al.*, 1980). Avaliando isolados do parasito de diferentes origens, Morel e cols (1986) demonstraram a existência de populações heterogêneas entre pacientes chagásicos, representando uma mistura de cepas.

O gene de mini-exon está presente no genoma nuclear dos kinetoplastída em torno de 200 cópias organizadas em sequências repetitivas do tipo *tandem* e é constituído por três regiões: uma altamente conservada correspondente aos *exon* (39pb), outra com 98% de identidade denominada *introns* (73pb) e uma região intergênica muito divergente. A amplificação da região intergênica do mini-exon pela Reação Polimerásica em cadeia (PCR) em diferentes cepas de *T. cruzi* demonstrou um dimorfismo com produtos amplificados de 300pb e 350pb definindo também dois grupos principais (Murthy *et al.*, 1992, Santos *et al.*, 1996). Análises comparativas de seqüências do gene 24S α rRNA de *T. cruzi* mostraram dimorfismo semelhante ao proposto com o gene de mini-exon (Souto & Zingales, 1993). Posteriormente, estes dois grupos foram denominados de: *T. cruzi* I que se correlaciona ao ZI

e *T. cruzi* II que se correlaciona ao ZII (Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1998a, 1999). Inicialmente, acreditava-se que o grupo *T. cruzi* I era encontrado somente no ciclo silvestre da doença e o *T. cruzi* II no ciclo doméstico (Fernandes *et al.*, 1998a; Zingales *et al.*, 1998). Entretanto, Fernandes e cols (1999) revelaram a presença de ambos os grupos no ciclo silvestre da doença e preferência da associação de linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi* com diferentes hospedeiros, ilustrando a complexidade do ciclo do parasito na natureza (Devera *et al.*, 2003) (Figura 1.3).

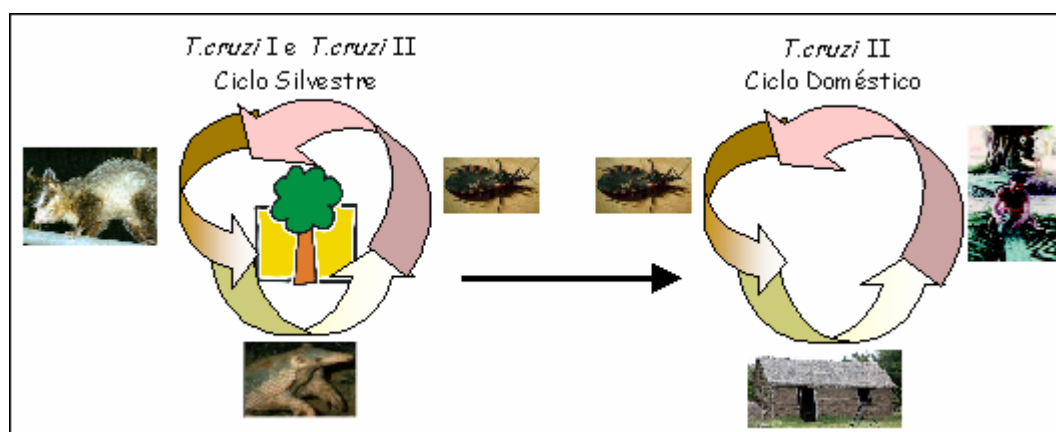


Figura 1.3: Representação esquemática da correlação entre linhagem e ciclo predominante em *T. cruzi* (adaptado de Zingales *et al.*, 1998)

O estudo da doença de Chagas na região de Amazônica, tem demonstrado que diversos isolados de *T. cruzi* têm sido caracterizados recentemente como ZIII, baseado em padrões de isoenzimas e numa inserção no espaçador não transcrito do gene mini do exon (Fernandes *et al.*, 1998b, 2001).

Devera e cols (2003) sumarizaram todas as características biológicas e moleculares que têm sido utilizadas no estudo da grande diversidade encontrada em diferentes isolados do parasito, descrevendo de forma pontual que ainda existem algumas lacunas a serem preenchidas, como por exemplo, em relação ao questionamento sobre a origem filogenética do ZIII. No que se refere ao ZIII, ainda não existe um consenso sobre a sua origem filogenética. Trabalhos mais recentes utilizando técnicas moleculares sugeriram que o ZIII está mais próximo filogeneticamente de *T. cruzi* I do que de *T. cruzi* II. Desta forma, *T. cruzi* I e ZIII parecem estar compartilhando rotas funcionais comuns (Brandão & Fernandes, 2006)

1.6. Zimodema III

Em 1977, Miles e cols., utilizando a mobilidade eletroforética de 6 enzimas, caracterizaram grupos de *T. cruzi* de ciclos silvestres e domésticos transmitidos por diferentes vetores provenientes da cidade de São Felipe, Bahia. Um grupo de cepas, nomeado de Z1, foi principalmente encontrado em gambá e em espécies de triatomíneos silvestres. Um segundo grupo de isolados, provenientes de casos agudos e crônicos da doença de Chagas, porcos da índia e triatomíneos domiciliados, foi identificado como Z2. Posteriormente, Miles e cols., (1978) compararam os zimodemas encontrados em São Felipe com os seis primeiros casos da fase aguda da doença de Chagas encontrados na região do Amazonas, Brasil. Os dados mostraram que dois dos seis casos do Amazonas associaram-se com o Z1 encontrado em São Felipe. Interessante notar, que não havia sido reportada a presença de isolados humanos neste zimodema. Os outros quatro casos (todos encontrados na mesma casa) mostraram um novo padrão de isoenzimas, caracterizados como ZIII. Posteriores caracterizações, de mais 60 isolados de *T. cruzi* de mamíferos e vetores silvestres, demonstraram seus agrupamentos no Z1. Por sua vez, o ZIII têm sido ocasionalmente encontrado em ciclos enzoóticos que limitam a floresta Amazônica. Assim, os autores concluíram que os três grupos de *T. cruzi* encontrados podem infectar o homem no Brasil, todos os três zimodemas podem causar a forma aguda da doença de Chagas e apenas o ZII causaria a síndrome crônica da doença de Chagas no estado da Bahia (Miles e *et al.*, 1978). Em uma caracterização mais extensiva de isolados de *T. cruzi* do Brasil, com um número maior que 18 enzimas, mostrou uma maior complexidade e heterogeneidade nos três zimodemas propostos (Miles *et al.*, 1980).

Brisse e cols (2000a), analisando 50 isolados de *T. cruzi* por MLEE (*Multi Locus Enzyme Electrophoresis*) (22 diferentes *loci* gênicos) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (20 iniciadores aleatórios), mostraram que isolados podiam ser agrupados em 2 grupos bem definidos, o primeiro grupo pertencente à *T. cruzi* I e o segundo subdividido em 5 subgrupos 2a - 2e. No subgrupo 2a estava incluído o isolado CANIII (ZIII); no subgrupo 2b o isolado Esmeraldo (ZII); no subgrupo 2c os isolados M6421 e M5631 (ZIII com *locus* ASAT com perfil de ZI); no subgrupo 2d o ZII boliviano e no subgrupo 2e, a cepa CL Brener. Os subgrupos 2d e 2e apresentaram uma heterozigidade em três *loci*, confirmando o padrão híbrido da cepa CL Brener. Para uniformizar a nomenclatura proposta pelo comitê, os autores propuseram a designação de linhagens I e IIa-IIe. *T. cruzi* I corresponderia a ZI ; *T. cruzi* IIb-e a ZII e *T. cruzi* IIa a ZIII. Os mesmos autores (Brisse *et al.*,

2000b) desenvolveram um método de identificação baseado na PCR utilizando iniciadores específicos a partir dos fragmentos obtidos do perfil de RAPD, que discriminam os seis grupos de *T. cruzi*.

Com o objetivo de achar uma correspondência entre as linhagens encontradas por Souto *et al.* (1996) usando os marcadores RNA ribossomal 24S α , gene de mini-exon e RAPD que definiram *T. cruzi* I e II e o perfil de MLEE e RAPD de Brisse *et al.* (2000a,b). Brisse *et al.* (2001) utilizaram todos os marcadores em conjunto associados ao *ribotyping* proposto por Stothard *et al.* (1998) para caracterizar 50 isolados, confirmando assim os seis grupos (*T. cruzi* I, *T. cruzi* IIa-IIe).

A posição de ZIII em relação aos grupos *T. cruzi* I e II continua controversa. Alguns autores consideram que ZIII está mais perto filogeneticamente do *T. cruzi* I do que do *T. cruzi* II (Miles *et al.*, 1981; Fernandes *et al.* 1998b; Brandão & Fernandes, 2006). Enquanto outros autores sugerem que ZIII esteja mais perto filogeneticamente do *T. cruzi* II (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000; Machado & Ayala, 2001; Toma *et al.*, 2005).

Através de estudos filogenéticos baseados no perfil de RFLP-ITS-rDNA (*Restriction Fragment Length Polymorphis*) com isolados de ZIII da Amazônia brasileira, demonstrou-se uma clara dicotomia entre isolados deste grupo que permitiu dividir esse grupo em dois subgrupos denominados ZIII A e ZIII B, em que a distância genética mostrou um baixo nível de heterogeneidade. (Figura 1.4, Mendonça, 2002). As cepas foram tipadas amplificando a região intergênica do gene de mini-exon por PCR multiplex que distinguiu o ZIII do *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e *T. rangeli* (Fernandes *et al.*, 2001).

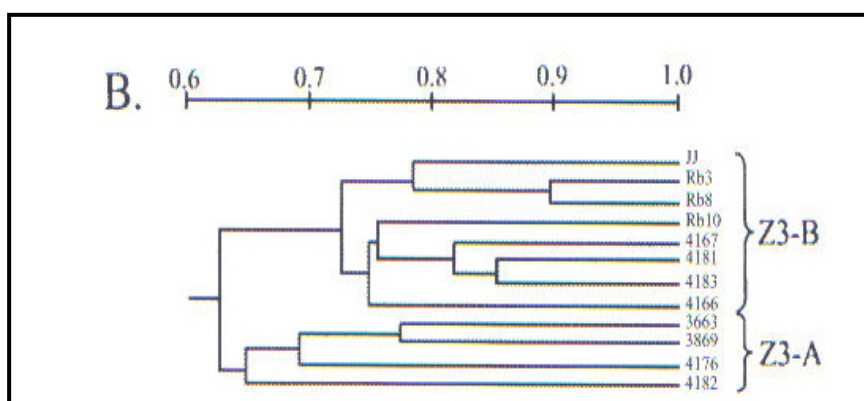


Figura 1.4: Dendrograma filogenético gerado após a análise do RFLP ITS-rDNA (4 enzimas distintas) de isolados de Z III da região Amazônica. Onde a cepa 3663 está alocada como ZIII-A e 4167 como ZIII-B.

Na Amazônia Brasileira há predomínio absoluto do *T.cruzi* I e ZIII silvestres, este resultado é corroborado pela análise de isolados de *T.cruzi* de mamíferos e triatomíneos silvestres de indivíduos com doença de Chagas, realizadas por Miles *et al.*, (1981b) e Povia *et al.*, (1984).

O ZIII é predominantemente silvestre e encontra-se distribuído na Região Amazônica com registros também na Bahia (Barrett *et al.* 1980), Venezuela (Miles *et al.*, 1981), Colômbia (Saraiva *et al.* 1987) e USA (Brisse, Barnabé & Tibayrenc 2000). É freqüentemente isolado de animais silvestres como o tatu (como *Dasyus novemcinctus*) (Povia *et al.* 1984) O ZIII é raro, com uma distribuição larga, mas esporádica (Miles & Cibulskis 1986), tendo sido isolado em poucas espécies de triatomíneos: *P.geniculatus*, *Rhodnius robustus* e *R.brethesi*. A descrição dos isolados de ZIII em humanos é esporádica e os estoques obtidos são de pacientes na fase aguda da doença de Chagas (Miles & Cibulskis, 1986).

Estudos baseado no perfil de 24 isoenzimas sugerem que ZIII esteja mais perto de *T.cruzi* I do que *T.cruzi* II (Ready & Miles, 1980). Análises baseadas em riboprinting, permitiu a construção de uma matriz onde um grupo continha isolados ZI e outro ZII e um ZIII; os outros isolados ZIII permaneceram intermediários entre esses dois grupos (Stothard *et al.*,1998).

Recentemente, Brandão & Fernandes (2006) procurando uma nova evidência desta divergência entre *T.cruzi* estudaram a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene calmodulina. Este gene é essencial, pois modula o metabolismo de cálcio em várias atividades celulares (Hoelfling & Ikura , 2002). Foram observadas várias mutações localizadas no segmento de 330pb da 3'UTR dos quais três eventos de inserção/eliminação importantes, são eles: a presença do dinucleotídeo AG em isolados de ZIII, a ausência de 13 bases purinas em ZIII e cinco grupamentos de GT em *T.cruzi* II. Essas mutações em 3'UTR do gene da calmodulina levantam a possibilidade que *T.cruzi* I e o ZIII estejam compartilhando vias funcionais comuns se comparados com os isolados de *T.cruzi* II (Brandão & Fernandes, 2006).

A estrutura populacional de *T. cruzi* esta distante de ser completamente entendida. Embora a existência de dois grupos seja bem aceita, incertezas sobre a existência ou não de um terceiro grupo ancestral tem sido levantada (Pedroso *et al.*,2003; Brisse *et al.*, 2003; Sturm *et al.*, 2003). As cepas que pertencem ao ZIII ou ao grupo rDNA 1/2 não podem ser classificadas como *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II. Baseado em dados de microsatélite - *multidimensional scaling plot* (MDS), os parasitos foram divididos em quatro grupos: *T. cruzi* I (MDS-cluster A), *T. cruzi* II ou sublinhagem IIb como denominado por Brisse *e cols.*.

(Brisse *et al.*, 2000) (MDS-cluster C), um terceiro grupo de cepas de *T. cruzi* contém cepas classificadas como ZIII e sublinhagem de IIc (Brisse *et al.*, 2000) (MDS-cluster B) e um último grupo com cepas híbridas propostas por Tibayrenc em 1996 e depois classificado como IID e sublinhagens IIe por Brisse e cols (Brisse *et al.*, 2000) (MDS-cluster BH).

Análises por RFLP do gene mitocondrial COII (citocromo oxidase subunidade II) demonstrou que todas as cepas agrupadas no grupo B e BH (ZIII e as cepas híbridas) pertenciam ao mesmo grupo mitocondrial B (Freitas *et al.* 2006). Sequências de dois outros genes mitocondriais, CYb (maxicircle cytochrome b) (Brisse *et al.*, 2003) e ND1 (NADH desidrogenase subunidade I) (Machado *et al.*, 2001), obtido do *GenBank*, confirmou esta observação mostrando que de fato o híbrido (sublinhagens IID e IIe) e as cepas de ZIII (sublinhagem IIc) foram agrupadas em conjunto no mesmo grupo mitocondrial B. Neste artigo é demonstrado que o grupo mitocondrial B é uma terceira divisão filogenética de *T. cruzi*, distinto de *T. cruzi* I (grupo mitocondrial A) e *T. cruzi* II (grupo mitocondrial C). As análises com todos os marcadores nucleares, isoenzimas (Miles *et al.*, 1978), RAPD (Brisse *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2003), microsátélites (Oliveira *et al.*, 1998), e várias à base de sequência nuclear (Fernandes *et al.* 1999; Zingales *et al.*, 1991; Machado *et al.*, 2001; Augusto-Pinto *et al.*, 2003) e mitocondrial (Brisse *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2001) identificaram 141 haplótipos diferente que podem ser agrupados em três haplogrupos.

Todas as cepas que pertencem ao *T. cruzi* I (MDS-cluster A, Figura 1.5) comprovou ser Z/Z (isto é, teve dois haplótipos que pertencem a haplogrupo Z). De mesmo modo, todas as cepas no MDS-cluster C (Figura 1.5) tiveram genótipos Y/Y e aqueles no MDS-cluster B tiveram genótipos X/X. Assim, esses dados não corroboram a sugestão feita por Sturm e cols (Sturm *et al.*, 2003); isto é: a sublinhagem IIc (MDS-cluster B) é um híbrido. Ao contrário, todas as cepas no MDS-cluster BH tiveram genótipos X/Y, confirmando seu caráter híbrido. A proximidade de números de haplótipos é altamente correlacionada com a proximidade genética. Baseado nesses resultados foi proposto o seguinte cenário da evolução das populações de *T. cruzi* (Figura 1.5). No passado, existiram três grupos ancestrais (MDS cluster A, C, e B na Figura 1.5). É interessante observar que esta proposta combina com a inicial sugestão feita por Miles e cols (Miles *et al.*, 1978) há quase 30 anos com base em estudos de isoenzimas. Provavelmente, *T. cruzi* II e *T. cruzi* III tiveram nichos ecológicos sobrepostos e, assim, as condições necessárias para hibridização. Pelo menos dois eventos de hibridização produziram a progênie evolutivamente viável.

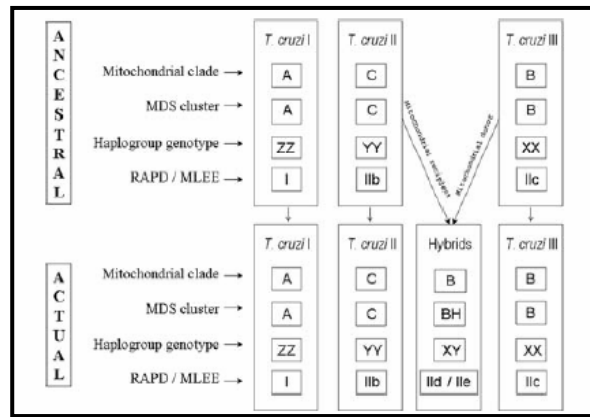


Figura 1.5: Diagrama que Representa o Modelo Proposto da Evolução de cepas de *T. cruzi* (Freitas *et al.*, 2006)

Em ambos os eventos, o doador citoplasmático do efeito descendência (como identificado pelo grupo mitocondrial das cepas híbridas) foi *T. cruzi* III. Contudo, o modelo simples proposto por Freitas e cols., (representado na Figura 1.5) deve ser útil para propor e testar hipóteses evolutivas e patogenéticas. Embora, como mostrado conclusivamente neste estudo (Freitas *et al.*, 2006) e também por outros (Brisse *et al.*, 2003, Machado *et al.*, 2001), eventos de hibridização claramente ocorreram na história evolutiva de *T. cruzi*; eles parecem ter sido só ocasional e, posteriormente, terem sido estabilizado por propagação clonal (Macedo *et al.*, 1998, Tibayrenc *et al.*, 2003).

1.7. Transcrição e Expressão Gênica em *T. cruzi*

A transcrição de genes que codificam proteínas em tripanossomatídeos é policistrônica (Johnson *et al.*, 1987), ou seja, os genes são transcritos em única unidade contendo cópias do mesmo gene ou genes cuja função e padrão de expressão são distintos. Os RNAm individuais são gerados por um mecanismo denominado *trans-splicing* onde duas moléculas de RNA separadas são reunidas para formar um transcrito maduro. Assim, o pré-RNAm é unido em sua extremidade 5' a um pequeno RNA denominado mini-exon. Em paralelo a esse processo, ocorre a poliadenilação na extremidade 3'.

O *T. cruzi* possui diferentes hospedeiros durante o seu ciclo. Para conseguir sobreviver em diferentes ambientes, o parasito necessita alterar precisamente a expressão de seus genes codificantes para diferentes proteínas, através da modulação do seu genoma. As alterações na bioquímica e morfologia do parasito de um estágio do ciclo de vida para outro é resultado de

mudanças programadas na expressão gênica como resposta as mudanças no meio externo do parasito (Saxena *et al.*, 2003).

Em 2003, Minning e *cols*, utilizando a técnica de microarranjo de DNA caracterizaram alguns genes expressos especificamente durante a diferenciação de tripomastigotas para amastigotas. Das 4.400 seqüências estudadas observaram 14 genes previamente identificados e 25 novos genes associados especificamente a forma amastigota. Muitos desses genes estão envolvidos na produção e *turnover* de proteínas, incluindo seis genes das etapas da síntese de proteínas, sete do endereçamento de proteínas, doze relacionados ao metabolismo, três do transporte, crescimento, divisão celular, um da síntese de DNA, um de RNA estrutural, além de oito genes identificados sem processo biológico estabelecido e dois genes não significantes na análise de seqüências traduzidas.

Outras abordagens relacionadas com a expressão diferencial de genes em *T. cruzi* têm sido feitas estudando níveis do RNAm através de técnicas moleculares. Entretanto, o controle da expressão gênica utilizando eventos pós-transcricionais em *T. cruzi* resulta em uma fraca correlação entre o níveis de RNAm e as respectivas proteínas codificadas, como também tem sido descrito para outros tipos celulares (Tomas & Kelly, 1996; Rodriguez *et al*, 1993; Gygi *et al*, 1999; Humphery-Smith *et al*, 1997). Conseqüentemente, ferramentas que utilizem técnicas proteômicas tornaram-se fundamentais para estudos de padrões globais de expressão gênica (Hancock *et al.*, 1999; Tyers & Mann, 2003), uma vez que os mapas proteômicos obtidos representam as proteínas expressas na situação fisiológica em questão, suplantando as limitações encontradas nas técnicas de microarranjos, principalmente nos tripanossomatédeos onde a regulação ocorre após a transcrição.

1.8. Análise proteômica

Em 1995, Wasinger e *cols* descreveram proteoma como o complemento total de proteínas de um determinado genoma. Proteoma foi, então, um termo cunhado para fazer analogia com o termo genoma (Wasinger *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1996). Hoje sabe-se que a análise proteômica consiste no estudo das proteínas expressas a partir de um genoma. A evolução desta abordagem experimental é resultado de uma variedade de técnicas que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, bem como relacionar essa informação com a obtida por outras abordagens através da bioinformática. A obtenção da seqüência de nucleotídeos do genoma de um organismo, por si só, constitui apenas um primeiro passo que abre caminho à realização de estudos sobre o nível de expressão dos

genes e proteínas ou sobre características das proteínas expressas. A análise proteômica permite apreciar o efeito da regulação da expressão gênica que ocorre pós-transcrição e pós-tradução e fornece numerosas pistas quanto à sua função e envolvimento nos processos biológicos (Santos *et al.*, 2004). Tais informações não podem ser previstas com precisão a partir das seqüências dos ácidos nucleicos (Banks *et al.*, 2000). Assim, os diversos mapas de proteoma refletem a dinâmica dos sistemas biológicos e possibilitam analisar diferenças na expressão gênica frente, por exemplo, a uma dada situação fisiológica ou em um mecanismo de resposta a drogas (Kopec *et al.*, 2005).

Para se estudar o proteoma, a estratégia de escolha mais utilizada atualmente e que tem demonstrado ser eficiente é a combinação de eletroforese bidimensional com espectrometria de massa. A eletroforese permite a separação de proteínas de um dado sistema biológico com alta resolução e reprodutibilidade, enquanto que a espectrometria de massa permite, através de alta demanda e sensibilidade, a identificação de proteínas presente em um *spot* (ponto) do gel. Além da espectrometria de massa há outras técnicas para se identificar uma proteína, como por exemplo, o seqüenciamento através da degradação de Edman. Essa consiste na obtenção de seqüências dos aminoácidos de uma proteína a partir da sua extremidade N-terminal. O seqüenciamento automático de proteínas por degradação de Edman juntamente com a identificação por cromatografia líquida, tem sido aperfeiçoado desde a sua disponibilização no início da década de 80. A introdução do método de digestão parcial das proteínas (seqüenciamento dos peptídeos internos) e a utilização da técnica de eletrodisposição em membranas de polivinil (*eletroblotting* em PVDF) tornaram esta técnica altamente confiável na descoberta de novas seqüências de aminoácidos (Bisch, 2004).

A eletroforese bidimensional, comumente aplicada em análises proteômicas, consiste em separar as proteínas combinando-se duas técnicas: a focalização isoeletrica (IEF), seguida da separação segundo a massa molecular da proteína. Ao final, obtém-se um gel de poliacrilamida contendo numerosos pontos (*spots*), cada um teoricamente correspondendo a uma proteína (Santos *et al.*, 2004).

Desde o final da década de 1980, a espectrometria de massa (MS) começou a ser considerada uma das mais importantes ferramentas utilizadas para identificação de proteínas com alta sensibilidade e precisão. A MS permite determinar a massa molecular de uma biomolécula, tais como carboidrato, lipídeo e no caso em questão, a proteína. Além disso, é possível obter informações sobre a estrutura primária dessas biomoléculas, bem como determinar modificações pós-traducionais de aminoácidos.

1.8.1. Eletroforese bi-dimensional (2D)

Os fundamentos desta técnica foram primeiramente apresentados por O'Farrell e Klose em 1975 (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Desde então, inúmeras modificações e melhorias foram adicionadas a então eletroforese bidimensional original, que incluem o uso de múltiplas faixas de pH (Wildgruber *et al.*, 2000), uso de anfólitos nas faixas de pH entre 9-12 ou 10-12 (Görg *et al.*, 1997) e a escolha de detergentes adequados, preferencialmente os não-iônicos. Um dos maiores avanços desta técnica se deve à possibilidade de se criar um gradiente de pH imobilizado (IPG) no gel utilizado para a focalização isoeletrica (Görg *et al.*, 2000). Portanto, na primeira dimensão uma fita de IPG (gel de pH imobilizado) é embebida em solução contendo a mistura protéica e agentes desnaturantes não-carregados. As fitas são submetidas a uma corrente elétrica, onde as proteínas são separadas através de focalização isoeletrica, ou seja, segundo seu ponto isoeletrico (pI). Na segunda dimensão, as proteínas são resolvidas em um gel de poliacrilamida que atua como uma peneira molecular onde as proteínas maiores - ou com alta massa molecular - migram mais lentamente do que as proteínas menores - ou de baixa massa molecular (Bisch, 2004). Para se minimizar a influência que a carga elétrica líquida das proteínas (pI) possa causar no processo de filtração molecular, adiciona-se tanto ao gel como às soluções-tampões detergente aniônico, geralmente sulfato de dodecil de sódio (SDS), anulando-se possíveis cargas positivas na superfície das proteínas. Assim, a separação por massa molecular torna-se mais eficiente.

A dificuldade em detectar complexos protéicos, proteínas hidrofóbicas, proteínas muito básica ou muito ácidas, proteínas pouco abundantes e a possibilidade de analisar somente uma única amostra por gel, são algumas das limitações encontradas na eletroforese 2D. Em contra partida, a fácil manipulação, a reprodutibilidade e a alta resolução alcançada por esta metodologia são pontos fundamentais quando se pretende estudar, de forma sistemática e em larga escala, uma mistura complexa de proteínas (Bisch, 2004).

1.8.2. Análise computacional dos mapas proteômicos

As proteínas separadas pela eletroforese 2D são submetidas a métodos de coloração de modo a visualizar-se o mapa protéico gerado e assim facilitar a análise de comparação de proteomas. A existência de diferentes métodos de revelação de proteínas em géis de poliacrilamida é vastamente descrito na literatura, tais como: colorações por coomassie blue, impregnação por prata, coloração fluorescente e a utilização de isótopos radioativos (Corthals

et al., 2000; Wilkins *et al.*, 1998). Vale ressaltar que esses métodos de revelação apresentam limitações e, portanto, podem ser usados em combinação fornecendo, então, mais informações na análise comparativa de diferença de expressão protéica (Rabilloud, 2000; White *et al.*, 2004; Patton, 2002; Richert *et al.*, 2004). A busca pelo método de visualização ideal procura características como alta sensibilidade, representada pela detecção de baixas concentrações de proteínas além de reprodutibilidade dos mapas e compatibilidade com os procedimentos de identificação de proteínas, tais como espectrometria de massa e degradação de Edman.

A identificação de expressão diferencial entre duas ou mais situações de uma mesma amostra para se determinar proteínas com expressão *downstream* ou *upstream* é facilitada graças a existência de programas computacionais que basicamente detectam a intensidade e volume dos *spots*. Esses programas atualmente estão disponíveis nos mais diferentes formatos como o *Phoretix 2D* (Nonlinear Dynamics), *Melanie* (GeneBio), *Image Master* (Amersham BioSciences) e *PDQuest* (BioRad) (Dowsey *et al.*, 2003). Tais programas permitem padronizar as diferenças existentes de gel para gel, através da: (a) normalização das imagens, excluindo *background*; (b) detecção e quantificação dos *spots*; (c) escolha de *spots landmarks*, isto é, *spots* de referência que estejam presentes em todos os géis a serem analisados; (d) alinhamento dos *spots landmarks* entre os diferentes géis 2D; (e) comparação (*matching*), ou seja, pareamento automático entre os *spots* dos diferentes géis 2D submetidos à análise; (f) identificação de *spots* “expressos” diferencialmente; (g) resultados finais da interpretação das análises e (h) compilação dos resultados e criação de um banco de dados de géis 2D (Dowsey *et al.*, 2003; Garrels, 1989; Dunn *et al.*, 1992).

Os diversos programas disponíveis não promovem análises totalmente automáticas das imagens, em certas situações dúbias, se faz necessário a edição manual dos *spots* além de uma revisão criteriosa em todas as etapas da análise (Dowsey *et al.*, 2003; Dunn *et al.*, 1992; Fievet *et al.*, 2004).

1.8.3. Análise das amostras por espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica usada para medir a massa molecular de compostos químicos e biomoléculas, cujo processo consiste em converter moléculas intactas em íons moleculares. Os equipamentos, espectrômetros de massa, consistem basicamente de três partes: a) a fonte de íons, onde as moléculas a serem analisadas são transferidas para uma

fase de gás e, simultaneamente ionizadas; b) o analisador de massa, onde os íons moleculares são analisados segundo a razão massa-carga; e finalmente c) o detector, onde a abundância de íons (mostrada na forma de picos) é registrada. A massa molecular de um composto é determinada em Daltons, a partir da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas.

A descoberta de processos de ionização “mais brandos”, onde a conversão de moléculas grandes e frágeis, tais como proteínas, em íons moleculares evitando-se a sua fragmentação possibilitaram o desenvolvimento de estratégias no estudo de biomoléculas. Dessas técnicas de ionização, as duas que mais apresentaram sucesso foram a electrospray ionization (ESI) e a *matrix assisted laser desorption/ionization* (MALDI). Deve-se ressaltar que outros fatores como melhoramento na resolução de massa, aumento da acurácia e sensibilidade do aparelho, assim como rapidez de análises juntamente com o progresso recente nas ciências de computação, contribuíram para os avanços recentes observados na espectrometria de massa.

Na ionização do tipo MALDI, a amostra é misturada a uma matriz, normalmente constituída por pequenos compostos orgânicos, como ácido alfa-ciano-4-hidroxiâmico (HCCA) e o ácido diidroxibenzóico (DHB), previamente solubilizada em um solvente orgânico, como acetona, acetonitrila, etc. A mistura é aplicada em uma placa de metal e, a medida que o solvente se evapora, as moléculas da amostra cristalizam-se junto com a matriz. Esses cristais são então bombardeados por um feixe de raio *laser* que absorvem a sua energia e a transmite a amostra. Isso, então, promove a disorção e ionização das moléculas (Karas *et al.*, 1998).

Diferentemente da técnica MALDI, o procedimento de ionização da metodologia ESI envolve a geração de íons a partir de soluções aquosas (Fenn *et al.*, 1989). Neste tipo de ionização, a amostra líquida migra de um tubo microcapilar para o orifício de entrada do espectrômetro de massa, onde é gerada uma diferença de potencial entre o capilar e o espectrômetro de massa, resultando, assim, em uma fina névoa de gotículas eletricamente carregadas (Fenn *et al.*, 1989; Yates, 1998). Assim que o solvente se evapora, o tamanho das gotículas diminui resultando na formação de íons desolvatados e com uma alta densidade elétrica. Uma melhoria da técnica se deve ao desenvolvimento da ionização por nanodispersão (Wilm & Mann, 1996), que possibilitou a redução na quantidade de amostra consumida além do aumento no tempo disponível para análise (Shevchenko *et al.*, 1996; Shevchenko *et al.*, 1997).

Nessa tese, tanto ESI-MS como MALDI foram usados para a análise de proteínas. Em ambos os casos a preparação da amostra envolveu uma etapa de dessalinização, pois

contaminantes, tais como detergentes e soluções-tampões podem levar a supressão de sinal correspondente ao íon da amostra. Apesar de ionização de amostras por MALDI serem descritos na literatura como mais tolerante à presença de contaminantes na amostra, isso é crucial no mecanismo de formação de íons por *electrospray* (McCormack *et al.*, 1997; Davis & Lee, 1998 ; Gygi *et al.*, 2000).

As fontes de íon descritas acima são comumente combinadas com dois tipos de analisadores de massa: o tempo-de-vôo (TOF ou *time of flight*) e o *íon trap*.

Nos analisadores do tipo TOF, um dos mais simples analisadores de massa, os íons são acelerados linearmente dentro de um tubo mantido sob baixíssima pressão, ou alto vácuo. As partículas carregadas são então detectadas por um detector. Os íons mais leves percorrem ou voam no tubo mais rapidamente sendo detectadas antes dos íons mais pesadas (Lim & Elenitoba-Johnson, 2004).

Os analisadores do tipo *íon trap* (armadilha de íons) têm a capacidade de capturar íons em um campo elétrico tri-dimensional. Neste caso, os íons produzidos por eletrodispersão são conduzidos a uma câmara, onde são aprisionados sob o efeito de um campo elétrico produzido por um anel condutor e posteriormente liberados por um pequeno campo elétrico axial de forma seqüencial de acordo com a relação m/z (Jonscher & Yates III, 1997). Este equipamento exibe certa versatilidade uma vez que pode ser utilizado como simples analisador de massas acoplado a uma fonte de eletrodispersão ou como um dos módulos de seleção ou fragmentação em equipamentos compostos. Contudo, sua resolução não atinge os níveis conseguidos com os analisadores do tipo TOF (Bisch, 2004).

Ambos analisadores de massa são capazes de determinar a estrutura primária de peptídeos.

A busca por características como acurácia, resolução e limite da massa tem sido mandatória na escolha de um analisador de massas. De forma sumarizada, a acurácia é medida pela informação mais precisa da razão massa-carga que o instrumento é capaz de gerar, podendo ser medida por unidades de massa atômica (uma), partes por milhão (ppm) ou percentagem de acurácia. Já a resolução é avaliada pela habilidade do instrumento em discriminar íons com diferentes razões massa-carga. A resolução e a acurácia do instrumento geralmente são características correlacionadas. Por fim, o limite de massa é medido pela razão massa-carga ótima em que o instrumento opera, podendo variar entre os tipos de analisadores disponíveis (Lim & Elenitoba-Johnson, 2004).

Atualmente, em estudos proteômicos, a estratégia de escolha utilizada na identificação de proteínas tem sido a espectrometria de massa principalmente devido a

sensibilidade (attomoles) (Görg *et al.*, 2004). Esta técnica baseia-se na análise dos peptídeos oriundos da digestão das proteínas por proteases, resultando em um *fingerprint* (Rappsilber & Mann, 2002). Basicamente, o procedimento de preparação da amostra requer etapas de descoloração dos *spots*, tripsinização das proteínas no gel de poliacrilamida (*in-gel digestion*) e concentração dos peptídeos. Todas estas etapas requerem um manuseio cuidadoso das amostras, pois qualquer tipo de contaminação, principalmente por queratina, pode inviabilizar o material.

Métodos de digestão de proteínas *in-gel* foram desenvolvidos e desde então são comumente aplicados a proteínas observadas em géis uni ou bidimensionais (Shevchenko *et al.*, 1996; Rosenfeld *et al.*, 1992). A tripsina é, usualmente, a protease utilizada para digestão das proteínas, por ser uma enzima estável e que se mostra altamente específica: o sítio de clivagem é a porção carboxi-terminal de resíduos de arginina e lisina. Na etapa final de preparação da amostra, os peptídeos extraídos requerem um procedimento de purificação a fim de remover contaminantes provenientes do SDS-PAGE, como, por exemplo, sais, tampões e detergentes. As amostras ainda necessitam de uma etapa de concentração dos peptídeos antes da análise por espectrometria de massa. Esta etapa geralmente é feita por cromatografia de fase reversa (Graves & Haystead, 2002).

1.9. Projeto Proteoma de *T. cruzi* desenvolvido na Fiocruz

O projeto intitulado “Proteoma de *Trypanosoma cruzi*: Análise de diferenças fenotípicas entre cepas com distintos perfis patogênicos” está inserido na “Rede Proteoma” do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde – PDTIS e vem sendo realizado no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas no Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz com o objetivo geral de caracterizar diferenças entre isolados de distintos padrões patogênicos, definir marcadores protéicos em diferentes estágios evolutivos e em condições metabólicas de crescimento específicas. A proposta se volta para a identificação de fatores do parasito que sejam secretados e/ou que estejam envolvidos na virulência e na relação hospedeiro humano- *T. cruzi*.

Baseado na complexidade estrutural da população de *T. cruzi* está em andamento a construção de um banco de dados dos perfis proteômicos para *T. cause*, caracterizando diferenças entre os isolados pertencentes aos grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II e ZIII. A análise proteômica se faz necessária para a elucidação de proteínas linhagens-específicas, suas

associações com distintos hospedeiros e por ser uma abordagem que não havia sido utilizada até o momento para contribuir com a elucidação da questão filogenética do ZIII.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Através da análise proteômica de cepas de *T.cruzi* pertencentes ao zimodema III pretende-se caracterizar diferenças na expressão de proteínas entre os subgrupos ZIII-A e ZIII-B. A proposta se torna mais robusta com a possível comparação dos mapas obtidos de ZIII com os mapas das cepas dos grupos *T.cruzi* I e II, buscando possíveis diferenças de expressão proteica que poderiam contribuir na elucidação da posição filogenética de ZIII.

2.1.1. Objetivos específicos

- Análise protéica utilizando a técnica de eletroforese bidimensional e definição de proteínas diferenciais entre as cepas 3663 e 4167 pertencentes ao zimodema III.
- Definir o mapa protéico da forma epimastigota pertencente ao zimodema III.
- Comparar o perfil protéico do zimodema III com perfil protéico dos grupos *T.cruzi* I e *T.cruzi* II, que estão sendo descritos no Projeto “Proteoma de *Trypanosoma cruzi*” desenvolvido no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo e proliferação dos parasitos

Foram utilizadas 2 cepas de *T.cruzi*: 3663 e 4167 pertencentes ao zimodema III. Ambas as cepas foram isoladas na região da Amazônia brasileira. A cepa 3663 foi isolada a partir de *Panstrongylus geniculatus* do distrito de Manaus e a 4167 de *Rhodnius brethesi* do Município de Barcelos, localizado na margem do Rio Negro (Tabela 3.1, Mendonça *et al.*, 2002). As cepas 3663 e 4167 foram gentilmente cedidas pela Dra Angela Junqueira do Departamento de Medicina tropical do Instituto Oswaldo Cruz.

Isolados	Hospedeiro de origem	Mini-exon	Origem geográfica
3663	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Zimodema III (Z3A 110pb 24S α rDNA)	Manaus
4167	<i>Rhodnius brethesi</i>	Zimodema III (Z3B 117pb 24S α rDNA)	Barcelos

Tabela 3.1: Informações sobre os isolados utilizados neste estudo (Mendonça *et al.*, 2002).

Os parasitos foram mantidos em cultura axênica em meio de cultura LIT - *Liver Infusion Tryptose* (Camargo, 1964; Camargo, 1979; Chiari, 1984 – Anexo 1), incubados a 28°C, com passagens a cada 4 (cepa 4167) e 10 dias (cepa 3663) na fase exponencial de crescimento mantendo a densidade de 1×10^9 células/mL. Para obtenção de massas de parasitos para posterior extração de proteínas, as formas epimastigotas foram centrifugadas a 4.000 g e as células foram lavadas três vezes com tampão salina fosfato (PBS) e estocados a -20°C.

O cultivo de formas amastigotas e tripomastigotas “*in vitro*” foram realizados no Departamento de Ultra Estrutura celular e Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz.

3.1.1. Obtenção de tripomatigotas e amastigotas em células VERO

A obtenção de parasitos, nas formas tripomastigotas, foi realizada através do cultivo e infecção de células VERO. As células foram plaqueadas em garrafas de 150cm³ (3×10^6

células) após serem tripsinizadas em solução de Dissociação (Anexo 2). Após 24hs de plaqueamento, as células já em semi- confluência foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* (cepas CL Brener, Dm28c, 3663 e 4167) em uma relação de 10:1 parasito/célula, ou seja, infectar cada garrafa com 30×10^6 parasitos. Após 24hs de infecção, as células foram lavadas 2 a 3 vezes em PBS e foi adicionado 30ml de RPMI 1640 (Sigma®) (Moore *et al.*, 1969) suplementados com 5% de soro bovino fetal fazendo trocas a cada 48hs.

Foi coletada a primeira grande liberação de tripomastigotas em 96hs e a partir deste momento foram coletados e trocados o meio a cada 24hs. A partir do 9º dia as culturas começam a liberar principalmente amastigota, e a partir do 9º dia o meio deve ser deixado na garrafa por três dias, ou seja, até o 11º dia para que haja *stress* celular e conseqüentemente liberação de maior quantidade de amastigota.

Para as liberações ricas em formas tripomastigotas, o sobrenadante foi centrifugado em tubos de 50ml a uma velocidade de 50 a 80 g por 10 min para precipitação das células. Para obtenção de massas de parasitas, formas tripomastigotas foram transferidas para outro tubo e centrifugadas a uma velocidade de 700 a 1300 g por 15 min e as células foram lavadas três vezes com tampão salina fosfato (PBS) e estocadas no nitrôgenio líquido.

Para a obtenção formas amastigotas, o sobrenadante foi centrifugado em tubos de 50ml a uma velocidade de 50 a 80 g para a precipitação das células. O sobrenadante obtido foi transferido para outro tubo e centrifugado por mais 15 min a 500 g para sedimentar as formas amastigotas, que foram lavadas três vezes com tampão salina fosfato (PBS) e estocados no nitrôgenio líquido.

Para contagem dos parasitos utilizou –se a câmara de Newbauer.

3.1.2. Curva de crescimento

Após duas passagens semanais dos parasitos em meio MacNeal, Novy e Nicole – NNN (MacNeal & Novy, 1904; Nicolle, 1909)(Anexo 3), e uma em meio LIT suplementados com 10% soro bovino fetal (SBF), 2×10^6 formas epimastigotas foram inoculadas em 4ml de LIT 10% SBF e mantidas a 28°C. Nos 4º, 7º, 10º, 13º, 17º e 20º dias após a inoculação, foram retiradas alíquotas para contagem dos parasitos em câmara de Newbauer. Foram realizadas 3 contagens para cada cepa em experimentos diferentes

utilizando o mesmo lote de meio e de SBF. Concomitante à curva de crescimento, foram montadas lâminas que foram coradas por Giemsa (Anexo 4).

3.1.3. Tipagem molecular

As cepas 3663 e 4167 anteriormente tipadas como ZIII através da análise de isoenzimas e por PCR multiplex da região intergênica do gene mini-exon (Fernandes *et al.* 2001). Apresentaram polimorfismos na região 24SαrDNA fazendo com que fossem sub-agrupadas com outros isolados em grupos ZIII A (3663) e ZIII B (4167).

Cerca de 50ng de DNA genômico das cepas 3663 e 4167, recém cultivadas a partir de inoculo de criopreservado, foram submetidas à amplificação de parte da região intergênica do gene de mini-exon segundo protocolo de Souto *et al.* (1996) para confirmar sua classificação anteriormente realizada (Fernandes *et al.* 2001). Foram utilizados DNA genômico das cepas Dm 28c (*T.cruzi* I), CL Brener (*T.cruzi* II), JJ (ZIII), 4182 (ZIII) e *Trypanossoma rangeli* como controles. A visualização do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%, submetido à coloração por brometo de etídeo. Para cada cepa foram realizadas 3 tipagens em experimentos diferentes.

3.1.4. Cinética de Infecção das cepas de *T.cruzi* pertencentes ao ZIII, *T.cruzi* I e II em células VERO.

Para este experimento utilizou-se as cepas CL Brener representante do grupo *T.cruzi* II e Dm82c do *T.cruzi* I como controles.

As células VERO foram plaqueadas em placas de 24 poços com 10^5 células por poço. Após 24hs do plaqueamento, os poços foram lavados com PBS e adicionado o meio RPMI com SBF e as mesmas foram infectadas com as devidas cepas numa proporção de 10:1 parasito/célula (10^6 parasitos por poço). Após 24hs, a cultura foi lavada com PBS e adicionado mais meio RPMI retirando o primeiro ponto a ser fixado (24hs). Posteriormente, cada poço foi lavado a cada 24hs, 48hs, 72hs e 96hs. Para a fixação de cada ponto foi utilizado o Bouin (Anexo 5) por 5min em temperatura ambiente e foram lavados 3 vezes com álcool 70%. Após a fixação, as lâminulas foram coradas por giemsa e os percentuais de

infecção e número de parasitos por células determinados com a utilização microscópio óptico.

3.2. Preparação do extrato protéico total solúvel

3.2.1. Extração das proteínas solúveis

Formas epimastigotas (1×10^9) das cepas 3663 e 4167 cultivadas em meio LIT foram lavadas com PBS e lisadas através de 4 ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (37°C) na presença de coquetel de inibidor de proteases (inibidores de serina, cisteína metaloproteases e calpaína proteases), Ao final, as amostras foram centrifugadas por 10 min a $16.000g$ para obtenção das proteínas solúveis, presentes no sobrenadante.

As proteínas foram precipitadas com 20% de ácido tricloroacético (TCA) e após 10 min no gelo, foram centrifugadas por 15 min a $16.000g$.

Os precipitados resultantes foram lavados 3 vezes com acetona gelada acrescida de 20% trietanolamina (TEA) e centrifugados como descrito anteriormente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em tampão contendo 8M uréia; 2% CHAPS; 20 mM DTT (Tampão para focalização isoeletrica– IEF) e armazenados a -20°C .

3.2.2. Dosagem da concentração de proteínas no sobrenadante – Método RCDC (BIO RAD)

As proteínas foram quantificadas através do método RCDC da Bio-Rad conforme as instruções do fabricante utilizando como padrão albumina de soro bovino (BSA). Este método é adaptado do protocolo de Lowry (1951), sendo compatível tanto para reagentes redutores (RC) quanto detergentes (DC). A linearidade do método é de 0,2-1,5mg/ml e sua leitura foi efetuada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750nm com estabilidade de 1 hora.

Inicialmente partiu-se de um volume de $25\mu\text{l}$ tanto para o padrão quanto para as amostras, ambos em tampão para focalização isoeletrica (IEF). Para a etapa de precipitação foi adicionado $125\mu\text{l}$ do reagente RC I em todas amostras e as mesmas foram mantidas em

incubação a temperatura ambiente por 1 min. Em seguida, foi adicionado 125 µl do reagente DC II e todas as amostras foram centrifugadas por 16.000 g durante 5 minutos, e o sobrenadante resultante foi descartado. Foi adicionado 127 µl do reagente A' (preparado no momento do ensaio :para cada 250 µl do reagente A DC foi adicionado 5 µl do reagente S DC) e as amostras foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 1ml do reagente B DC e as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750nm. A concentração foi obtida utilizando a curva padrão de albumina bovina (BSA).

3.3 – SDS – PAGE (1D)

As proteínas solúveis totais foram submetidas à corrida eletroforética em gel SDS – PAGE (12%) a 200V. Depois de fixado com etanol 30% e ácido acético 10%, o gel foi impregnado por prata como descrito no Anexo 6.

3.4- Eletroforese Bidimensional (2D)

3.4.1 – Focalização isoeletrica (1ª dimensão)

A amostra foi descongelada e foi acrescida à mesma anfólitos, azul de bromofenol na concentração final de 1% de cada um e tampão IEF, quando necessário, para atingir um volume total de 300µl para géis de 17cm e 125µl para géis de 7cm . A mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente durante 1 h, período suficiente para a interação entre amostra e reagentes. Posteriormente, todo o conteúdo foi aplicado na cuba de focalização isoeletrica (BIO RAD *Protein IEF Cell*). Sobre a amostra colocou-se a fita contendo um gel com gradiente de pH imobilizado (*ReadyStrip IPG Strip* -BIO RAD) . Após 1h de re-hidratação da fita de IPG a temperatura ambiente esta foi coberta com óleo mineral e procedeu-se a rehidratação de forma ativa na cuba de focalização isoeletrica , com uma voltagem de 50 Volts durante 11 horas a 20°C. A focalização isoeletrica foi iniciada imediatamente depois de terminada a rehidratação ativa, segundo programa descrito na tabela 3.2 . Para este protocolo, foram aplicadas amostras de uma única cepa na cuba de

focalização isoeletrica, uma vez que já havia sido observado pelo nosso grupo, que a utilização de amostras de espécies ou cepas diferentes na mesma cuba não propiciava mapas proteicos com boa resolução.

Géis de 7 cm			
	Vtagem	Gradiente	Tempo
Rehidratação	50 V		11h
Passo 1	250 V	Linear	15 min
Passo 2	4000 V	Linear	2 h
Passo 3	4000 V	Rápido	15.000 V/h (Impregnação por Prata)
Passo 4	500 V	Rápido	<i>Hold</i>

Géis de 17 cm			
	Vtagem	Gradiente	Tempo
Rehidratação	50 V		11h
Passo 1	250 V	Linear	20 min
Passo 2	10000 V	Linear	2:30 h
Passo 3	10000 V	Rápido	60000 V/h (Impregnação por Prata) 90000 V/h (coloração por Coomassie Coloidal – G250)
Passo 4	500 V	Rápido	<i>Hold</i>

Tabela 3.2: Programa utilizado para a Focalização isoeletrica e strips de 7 e 17 cm

Ao final da primeira dimensão, as fitas podem ser armazenadas a -20°C por tempo indeterminado.

3.4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (2^a dimensão)

As fitas de IPG foram equilibradas com tampão contendo Uréia 6 M, SDS 20%, Tampão Tris/HCl 1,5 M pH 8, 8, Glicerol 50% e q.s.p 100 ml mais 130mM DTT por 10 minutos para reduzir as pontes dissulfetos. Cada fita foi posicionada no suporte específico com o gel voltado para cima. Posteriormente, eliminou-se o tampão anterior e foi adicionado o mesmo tampão contendo 125 mM iodoacetamina para alquilar os grupos sulfidril. As fitas

foram mantidas nesta solução por 10 min à temperatura ambiente, sob leve agitação e depois lavada em tampão Laemli (Tris base 24,6 mM, Glicina 192 mM e SDS 3,48 mM, concentração de 1X). A fita uma vez equilibrada foi encaixada cuidadosamente no gel preparativo SDS-PAGE 12% (Tris – HCl 0,375 M pH 8,8 , 30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida 12%, SDS 0,1%, APS 0,1% e TEMED 0,01%). Os géis foram submetidos à corrida eletroforética por aproximadamente 1 h a 200mA (géis 7cm) ou 1 h a 40 mA e posteriormente a 100 mA (géis 17cm). Os géis foram revelados por impregnação por prata ou por coomassie coloidal.

3.5. Métodos de detecção das proteínas no gel

3.5.1. Coomassie Coloidal (G-250)

Neste método de revelação, o coomassie coloidal forma microprecipitados em meio ácido contendo sulfato de amônio. É um método bastante sensível, sendo capaz de revelar até 0,2 µg de proteína (em cada *spot*). A coloração compreende três etapas : fixação das proteínas, a lavagem para retiradas dos interferentes e a revelação das proteínas por Coomassie Coloidal (adaptado de Nehoff *et al.*, 1988)(anexo 7).

3.5.2. Impregnação por nitrato de prata

A impregnação por prata foi feita baseado no método de Ansorge (1985)(anexo 4).

3.6. Análise e identificação das proteínas

3.6.1. Captura dos géis em um formato digital e análise das imagens obtidas

Para captura dos géis, foi utilizado o densitômetro *GS-800 Calibrated Densitometer* (BIO-RAD), onde obteve-se as imagens em formato digital para as análises pelo programa PDQuest™ (BIO-RAD). Para as análises comparativas entre as imagens obtidas, foram realizadas as seguintes etapas:

- (i) escolha de um gel *master* (imagem virtual que irá conter todos os *spots* de todos os géis utilizados na análise);
- (ii) escolha de *spots* de referência (*spots* que estejam presentes em todos os géis a serem analisados),
- (iii) alinhamento dos mesmos entre os diferentes géis 2D;
- (iv) detecção dos *spots*;
- (v) pareamento automático entre os *spots* dos diferentes géis 2D;
- (vi) normalização das imagens
- (vii) e identificação de *spots* expressos diferencialmente.

Neste trabalho, foram realizadas análises provenientes de comparações de três experimentos independentes, realizados com as cepas 3663 e 4167. Foram realizadas análises de reprodutibilidade utilizando parâmetros do programa que sobreponham às imagens obtidas de diferentes experimentos provenientes da mesma amostra. Além disso, também foram realizadas análises observando expressão qualitativa e/ou quantitativamente diferentes entre as cepas em estudo. Posteriormente, foram realizadas análises comparativas entre o mapa protéico obtido para ZIII com imagens de géis pertencentes aos grupos *T.cruzi* I e II, realizados no Projeto Proteoma de *T.cruzi* desenvolvido no Laboratório de Epidemiologia Molecular de Doenças Infecciosas.

3.6.2. Retirada e processamento dos *spots*

Após as análises dos géis os *spots* de interesse foram retirados do gel e processados para serem analisados pelo espectrômetro de massa. Os *spots* foram transferidos para tubos novos previamente lavados em água milliQ/ metanol/ água milliQ. Todos os *spots* eram provenientes de géis 2D revelados por coloração de coomassie coloidal, devido à compatibilidade deste método com a espectrometria de massa. O material foi armazenado a -20°C até o seu processamento.

Inicialmente foi realizada a descoloração dos *spots*, adicionando a cada tubo contendo um *spot* coletado, 400µL de uma solução de acetonitrila (ACN) 50% (p/v) / bicarbonato de amônio 25mM, pH 8,0. Foram feitas 3 lavagens de 15 min cada, em agitação contínua até a descoloração total do *spot*.

O descorante foi removido e então, adicionado a cada tubo 200 μ L de ACN 100% (solução de desidratação), permanecendo por 5 min sob agitação. O procedimento foi repetido até que o *spot* (gel) estivesse opaco. A etapa seguinte promovia a secagem do *spot* no *SpeedVac* durante 15 min. Posteriormente foi realizada a etapa de tripsinização, adicionando-se 10 μ L da solução de tripsina 20ng/ μ L, de forma a cobrir completamente o *spot* (gel). Os tubos foram mantidos no gelo por 10 min, para que a tripsina penetrasse no gel. Após o término deste tempo, todo o excesso de tripsina foi removido e adicionado 20 μ L de solução de bicarbonato de amônio 50mM, disparando a digestão. Os tubos foram incubados por uma noite, à 37°C (16-24 h).

A etapa seguinte consistiu na extração e concentração dos peptídeos gerados pela tripsinização. Para isso, transferiu-se os 20 μ L de solução de bicarbonato de amônio 50mM do tubo contendo o *spot* para um tubo limpo. Adicionou-se ao tubo com o *spot* 30 μ L de ácido fórmico 5% (v/v) / ACN 50% (v/v), de modo a extrair os peptídeos. Esta solução permaneceu no tubo durante 30 min, sob agitação constante, sendo transferida posteriormente para o tubo contendo os 20 μ L previamente coletados. A extração foi repetida mais uma vez e todos os extratos foram combinados em um mesmo tubo, com um volume final de aproximadamente 60 μ L. A amostra foi então concentrada até 20 μ L por cerca de 1 h no *Speed Vac*. Os peptídeos foram armazenados à -20°C para posterior análise por espectrometria de massa.

3.6.3. Análise dos *spots* por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos

Após o processamento dos *spots*, as amostras foram aplicadas uma resina de fase reversa empacotada em uma ponteira de micropipeta (ZipTip™ C18), com o objetivo de retirar sais e outros interferentes, visando a análise por espectrometria de massa. Previamente a aplicação da amostra, o ZipTip foi umidecido em ACN 100 % e equilibrado com uma solução de 0,1 %TFA (ácido trifluoracético) . A adsorção dos peptídeos a resina foi feita com sucessivas aspirações da amostra. Uma vez adsorvidos, os peptídeos foram lavados com 0,1% TFA em água milliQ e finalmente eluídos em um novo tubo utilizando uma solução de 0,1 % TFA / ACN 50 %.

Depois de concentradas, as amostras foram co-cristalizadas com uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxâmico em uma placa de aço inox especialmente utilizada para a análise no

espectrômetro de massa. Foram misturadas quantidades iguais de amostra e matriz (0,5µL: 0,5 µL) estando a matriz a uma concentração de 5,0 mg/ mL diluída em solução de 50% ACN / 0,3% TFA em água milliQ.

Uma vez preparada a placa, contendo de 1 a 100 amostras, esta foi colocada no espectrômetro de massa MALDI TOF TOF 4700 *Proteomics Analyser*. A determinação da massa dos diferentes peptídeos, obtidos pela proteólise de cada um dos *spots* coletados nos diferentes géis 2D, foi feita automaticamente pelo equipamento e após a conclusão, os resultados foram capturados através do programa integrado ao equipamento (4000 *Explorer Remote Client*), sendo retirados os picos de contaminantes, se existirem. Os mesmos foram transferidos para um programa de busca, visando à identificação. Foram utilizados dois programas de busca, *Mascot* e *MS-Fit*, ambos disponíveis *on-line* nos endereços http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS e <http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0/msfit.htm>, respectivamente. Cada espectro obtido foi avaliado pelos dois programas paralelamente.

Para o programa *Mascot* foram utilizados parâmetros de busca descritos previamente no programa (*default*), onde foram efetuadas as seguintes modificações (Tabela 3.3)

Taxonomy: All entries
Type of search: MS/MS Ion search
Enzyme: Trypsin
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M), Phospho (ST), Pyro_glu (N-term E)
Peptide tol. ± 0.5 Da MS/MS tol. ± 0.5 Da
Peptide charge +1 Da
Mass values: Monoisotopic
Instrument : Maldi TOF-TOF
Overview: Report top 50 hits

Tabela 3.3: Parâmetros utilizados no programa de busca *Mascot* visando à identificação da seqüência de peptídeos.

Nestas análises foram considerados como confiáveis os resultados que apresentaram um espectro onde foram observadas boas identificações de íons y. Neste caso, foi feita uma comparação entre massas relativas de fragmentos peptídicos teóricas (banco de dados) e experimentalmente observadas (espectro obtido), onde verificou-se correlação entre pelo menos uma seqüência de 4 peptídeos consecutivos. Além disso, quando o programa encontrava mais de uma identificação para um mesmo *spot*, a proteína que tinha maior área de cobertura, isto é, o maior valor referente à porcentagem de cobertura de seqüências peptídicas foi a escolhida. Para estes casos, o próprio programa posicionava esta proteína em destaque.

Para o programa *MS-Fit* foram utilizados parâmetros de busca descritos previamente no programa (*default*), onde foram efetuadas as seguintes modificações:

Database: NCBI nr 2006.02.16

Sort type: Score Sort

Digest used; Trypsin

Cysteine modification: Carbamidomethylation

Species: TRYPANOSOMA

Possible Modifications: Peptide N-terminal Gln to PyroGlu, Oxidation of M, Phosphorylation of S and T.

Instrument: TOF-TOF

Tabela 3.4: Parâmetros utilizados no programa de busca *MS-Fit* visando à identificação da seqüência de peptídeos.

Neste caso, foram consideradas, a princípio, as duas proteínas que tinham os maiores valores de *score*, independentes de sua taxonomia. Como critério de desempate, foi utilizada a comparação manual no gel bidimensional, onde foi verificado o pI (ponto isoelétrico) e a MM (massa molecular) manualmente procedendo-se desta forma a comparação com os dados teóricos das respectivas proteínas.

3.7. Mapas metabólicos

As enzimas foram classificadas de acordo com a reação por elas catalisadas (*The Enzyme Commission - EC numbers*). Estes *EC number* são disponibilizados no site <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> , e foram utilizados para a localização de seus respectivos mapas metabólicos.

Os mapas metabólicos foram reconstruídos pelo KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) com as enzimas classificadas, utilizando como referência os mapas encontrados no banco de dados do KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>). A ferramenta utilizada para colorir os mapas foi a disponibilizada por este mesmo banco de dados (http://www.genome.jp/kegg/tool/color_pathway.html).

4. RESULTADOS

4.1. Curvas de crescimento *in vitro*

As curvas de crescimento das cepas 3663 e 4167 foram realizadas em meio LIT em triplicata para cada cepa. As médias e os desvios padrão correspondentes encontram-se descritos na Tabela 4.1. A Figura 4.1 representa a média do número de parasitas por mililitro de cultura. As curvas de crescimento das cepas 4167 e 3663 apresentaram a fase exponencial entre o 4° e 10° dia, respectivamente. Neste período, os parasitos foram coletados para o procedimento de extração de proteínas solúveis.

Cepas	Dias de contagem						
	0	4	7	10	13	17	20
3663	0,5	5,25±0,25	10,75±0,66	57,58±8,65	36,33±3,21	13,08±2,00	15,25±0,66
4167	0,5	17,5±1,32	12,5±0,5	9,08±1,01	10,83±1,01	8,83±0,52	9,33±2,27

*média do número de parasitas em milhões/mL de cultura e (\pm) desvio padrão.

Tabela 4.1. Médias e desvios padrão dos resultados obtidos em três curvas de crescimento das cepas 3663 e 4167.

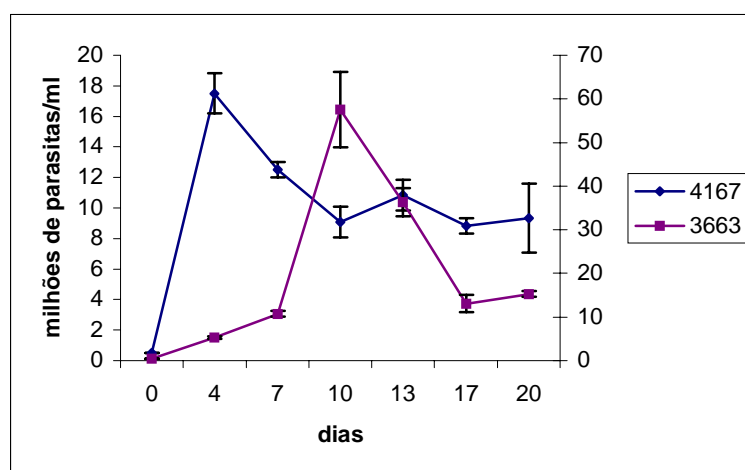


Figura 4.1: Curvas de crescimento das cepas 3663 e 4167. O resultado representa a média aritmética de três experimentos.

Em cada dia de contagem dos parasitos para obtenção da curva de crescimento, lâminas foram montadas, coradas por Giemsa e posteriormente fotografadas, como mostra a figura 4.2.

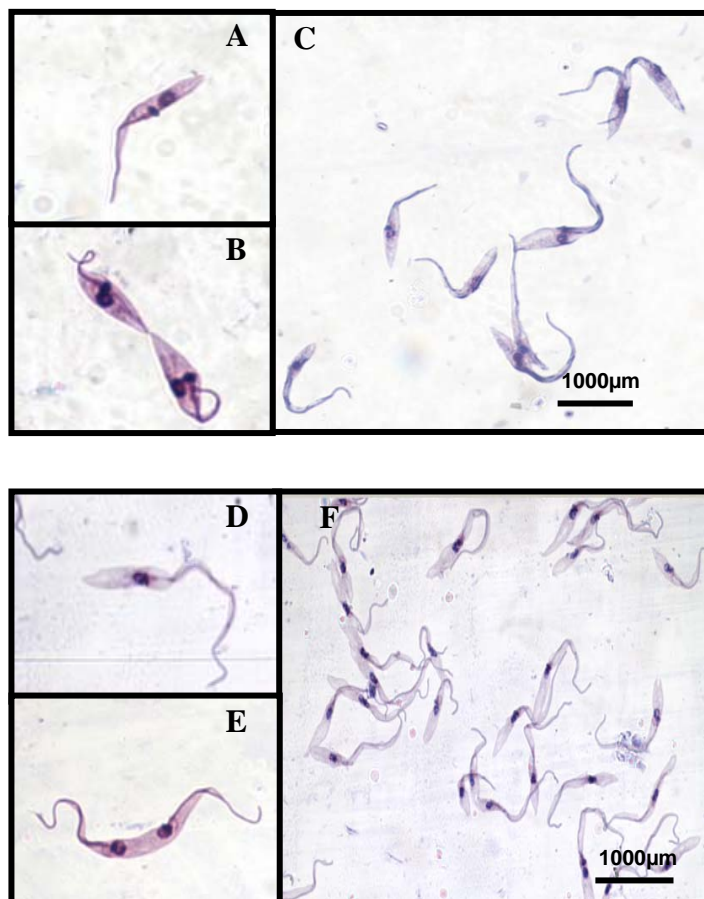


Figura 4.2: Lâminas coradas por Giemsa referente aos dias de contagem dos parasitos para obtenção da curva de crescimento das cepas 3663 e 4167. Cepa 3663: (A) Lâmina referente ao ponto zero da curva de crescimento, (B) Lâmina referente ao 4^o dia da curva de crescimento e (C) ao 7^o dia da curva de crescimento. Cepa 4167: (D) Lâmina referente ao ponto zero da curva de crescimento, (E) Lâmina referente ao 4^o dia da curva de crescimento e (F) ao 7^o dia da curva de crescimento.

4.2. Caracterização molecular das cepas 3663 e 4167

Aproximadamente 50ng de DNA genômico obtidos das cepas 3663 e 4167 foram submetidos à amplificação do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon de *T.cruzi* (Figura 4.3). Foram utilizados como controles o DNA genômico das cepas Dm

28c (caracterizada como *T. cruzi* I), CL Brener (caracterizada como *T. cruzi* II), JJ (pertencente ao ZIII), 4182 (pertencente ao ZIII) e *Trypanossoma rangeli*. Esta tipagem foi realizada em três momentos diferentes do desenvolvimento desta tese e todos os resultados obtidos confirmaram a classificação original dos isolados utilizados.

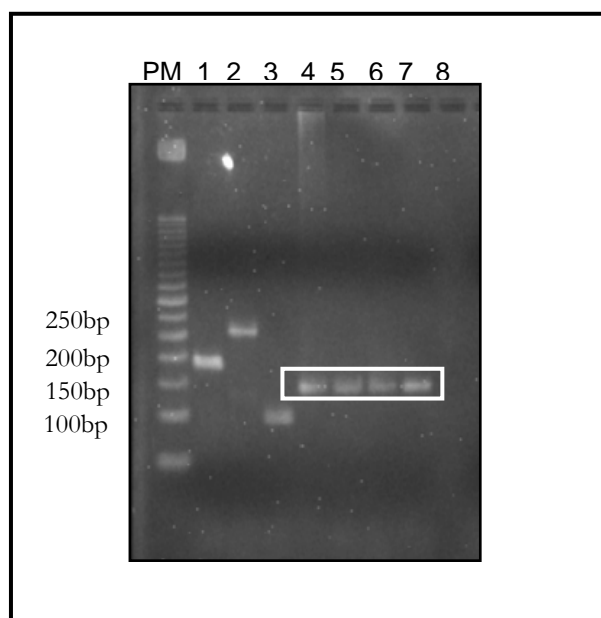


Figura 4.3: Caracterização molecular das cepas 3663 e 4167 através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídeo. PM – Peso molecular (50pb), 1 – amostra controle de *T. cruzi* I (Dm28c), 2 – amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), 3 – amostra controle de *T. rangeli*, 4 – amostra controle de ZIII (JJ), 5 – amostra controle de ZIII (4182), 6 – 3663, 7 – 4167, 8 – controle negativo.

4.3. Cinética de infecção por cepas de *T. cruzi* pertencentes ao ZIII e *T. cruzi* I e II em células VERO

Para este experimento foram utilizadas as cepas 3663 e 4167 pertencentes ao ZIII e as cepas CL Brener (*T. cruzi* II) e Dm82c (*T. cruzi* I) como controles.

A cinética temporal de infecção de células VERO pelos parasitos foi realizada em meio RPIM'S com 5% de SBF e para cada dia de observação foram montadas lâminas (Anexo 8 ao 16). Através a observação das lâminas ao microscópico óptico foi possível visualizar diferentes momentos da infecção das células VERO com as duas cepas *T. cruzi* estudadas.

As cepas analisadas apresentaram perfis distintos de infecção nos diferentes tempos determinados (figuras 4.4 e 4.5). A cepa Dm28c mostrou-se mais infectiva em relação às demais (70% de infecção), sendo a cepa 3663 aquela que apresentou menor grau de infectividade (3% de infecção). As cepas 4167 e CL Brener apresentaram o mesmo perfil de infecção (Figura 4.4).

A figura 4.5 mostra a quantidade de parasitas por células VERO, em diferentes tempos de infecção: 24 h, 48 h e 72 h. Os parasitos da cepa Dm28c apresentaram maior potencial de infecção que os pertencentes as cepas CL Brener, 3663 e 4167.

As células infectadas pelos parasitos pertencentes à cepa 3663 apresentaram a menor relação parasitas/células infectadas (menor quantidade de parasitas no interior das células). As células infectadas pelos parasitos das cepas CL Brener e 4167 apresentaram relação parasita/célula infectada semelhante.

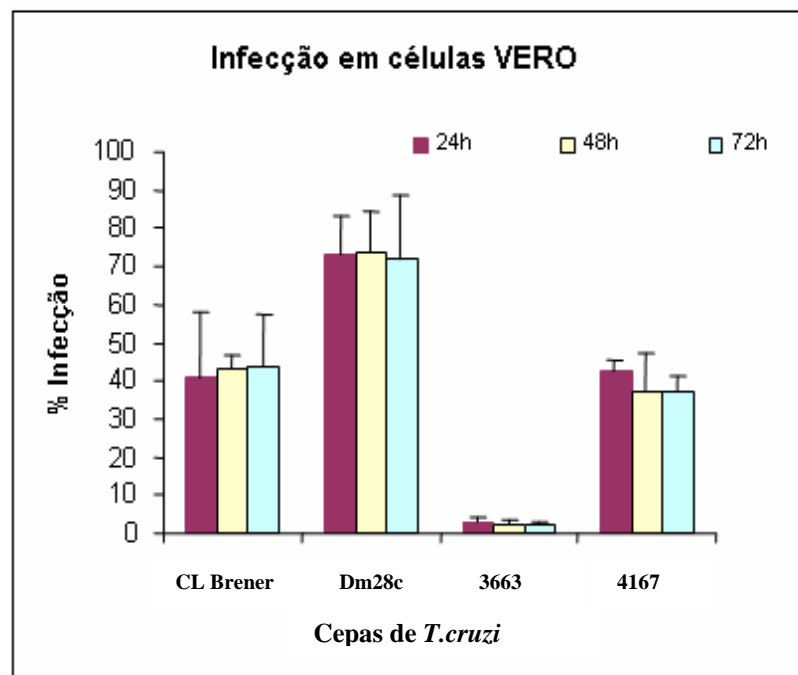


Figura 4.4: Cinética de infecção de células VERO pelas cepas Dm 28c (*T. cruzi* I), CL Brener (*T. cruzi* II), 3663 (ZIII) e 4167 (ZIII) nos períodos de 24h, 48h e 72h. O resultado representa a média aritmética de três experimentos.

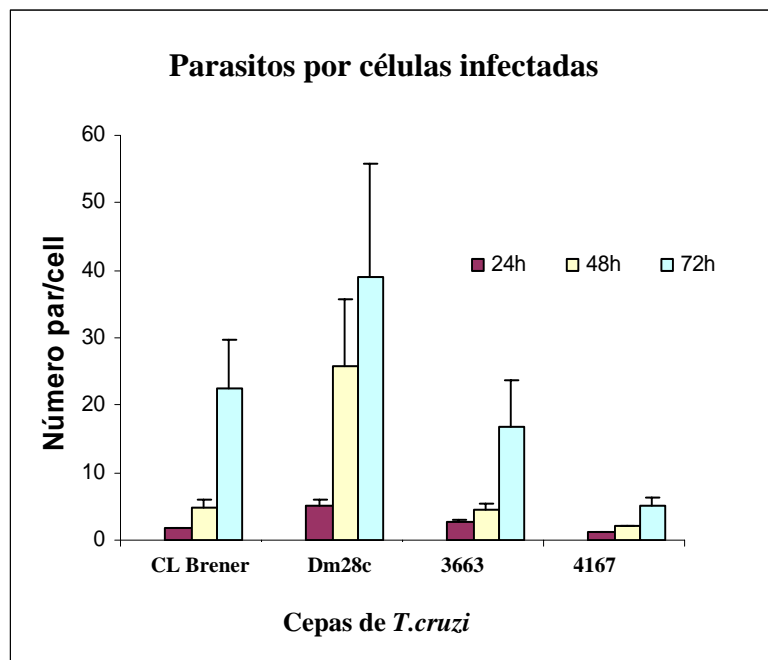


Figura 4.5: Relação do número de parasitos por célula VERO infectada nos períodos de 24h, 48h e 72h. O resultado representa a média aritmética de três experimentos.

4.4. Eletroforese Uni-dimensional (1D)

Na fase exponencial dos cultivos em meio LIT das cepas 3663 e 4167, 1×10^9 células foram utilizadas para se obter os extratos protéicos totais solúveis de epimastigotas que foram submetidos à separação eletroforética em gel SDS-PAGE a 12% (Figura 4.6). Algumas diferenças nos perfis protéicos foram observados entre as cepas 3663 e 4167.

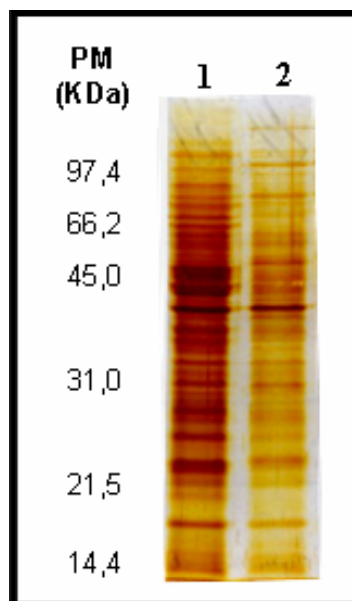


Figura 4.6: Gel SDS-PAGE de extratos protéicos totais solúveis da forma epimastigota das cepas 3663 e 4167: 5 μ g foram aplicados em gel de poliacrilamida-SDS 12% e submetidos a uma separação eletroforética. Posteriormente, o gel foi impregnado pela prata para visualização das proteínas. Formas epimastigotas (1) da cepa 3663 e (2) 4167.

4.5. Eletroforese Bidimensional (2D)

Os ensaios de eletroforese bidimensional utilizando extrato protéico solúvel de formas epimastigotas em uma faixa de pH 3-10 (Figura 4.7) mostraram que uma quantidade significativa de proteínas focalizou em uma faixa estreita de pH. Quando foi utilizada uma faixa de pH 4-7, observou-se uma resolução melhor destas proteínas e uma considerável diversidade na expressão protéica das cepas 3663 e 4167 (Figura 4.8 e 4.9, respectivamente). Estes experimentos foram feitos em triplicata que mostrando-se reproduzíveis (Figuras 4.10 e 4.11). A análise computacional dos géis bidimensionais (programa PDQuest – Bio-Rad) realizados na faixa de pH 4-7 (Figura 4.12), detectou 300 *spots* na cepa 3663 e 325 *spots* na cepa 4167. Dentre eles, 181 *spots* eram comuns a ambas (3663 e 4167), 119 eram exclusivos da cepa 3663 e 144 da cepa 4167 (Tabela 4.2).

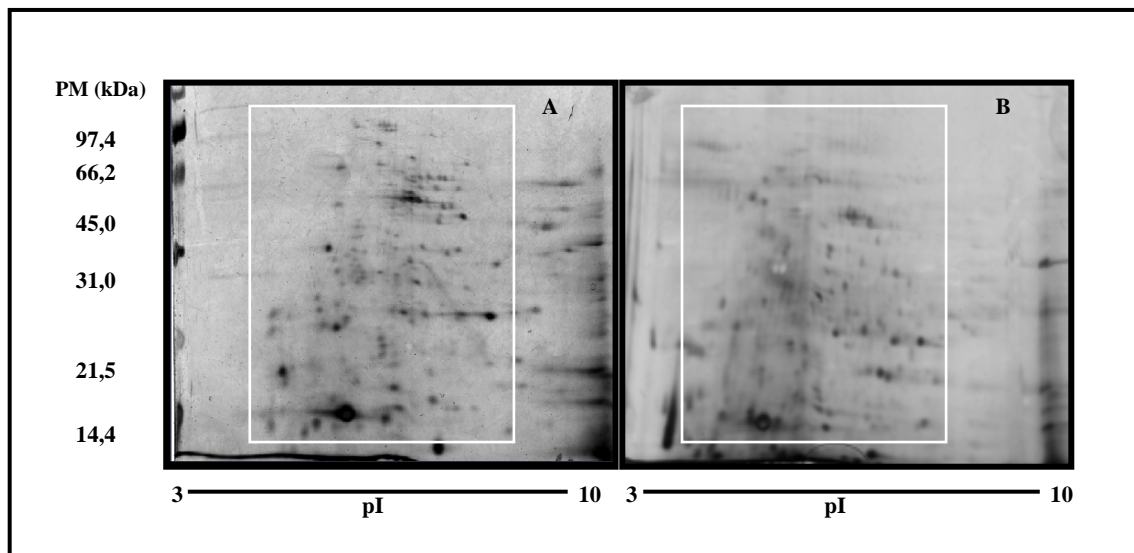


Figura 4.7: (A) Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 3663. Proteínas solúveis (40 μ g) foram aplicadas em fitas de IPG – 7 cm (Bio-Rad) com faixa de pH 3-10 e separadas por focalização isoelétrica (primeira dimensão). Após a primeira dimensão, as fitas de IPG foram submetidas aos tratamentos de redução (DTT) e alquilação (iodoacetamida). A segunda dimensão foi feita em SDS-PAGE (12% poliacrilamida). As proteínas foram visualizadas utilizando impregnação pela prata. A área selecionada no gel demonstra a região onde a maioria das proteínas focalizou. (B) Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 4167. O procedimento foi feito como descrito na Figura A.

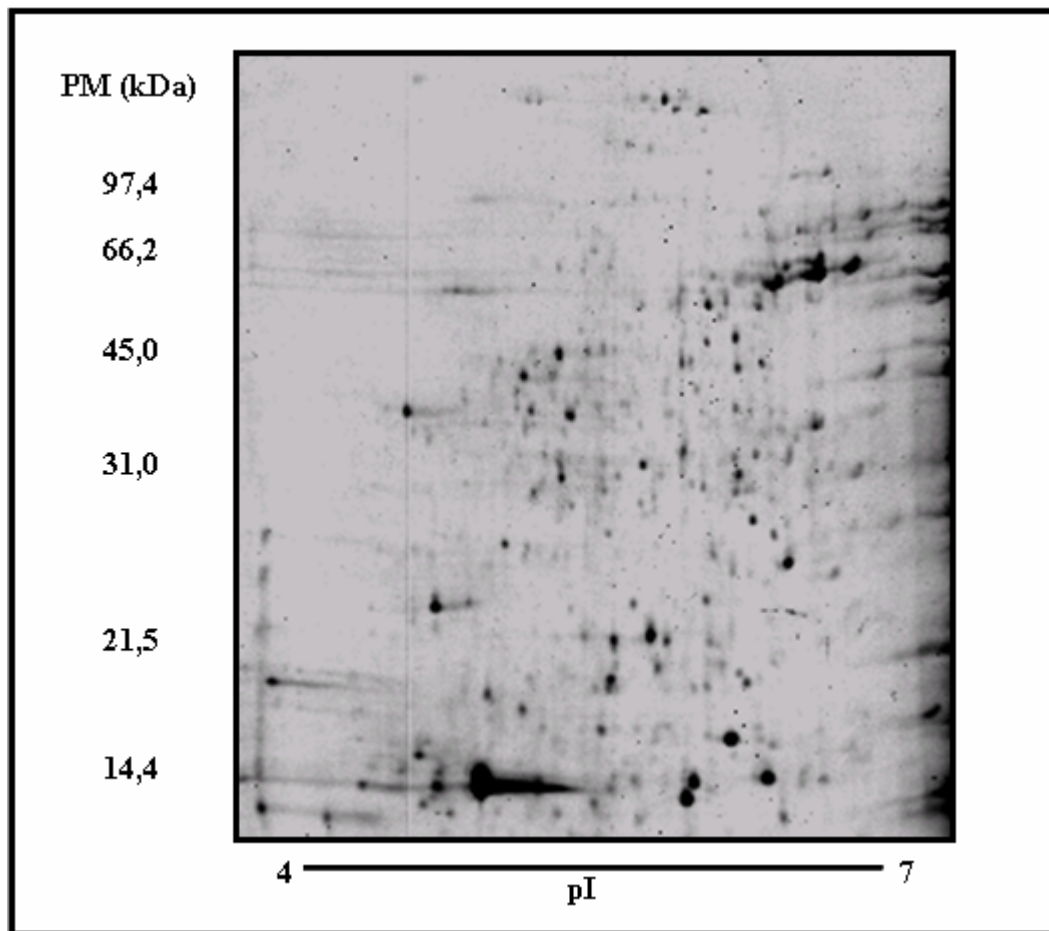


Figura 4.8: Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 3663. Proteínas solúveis (700 μ g) foram aplicadas em fitas de IPG – 17 cm (Bio-Rad) com faixa de pH 4-7 e separadas por focalização isoeletrica (primeira dimensão). Após a primeira dimensão, as fitas de IPG foram submetidas aos tratamentos de redução (DTT) e alquilação (iodoacetamida). A segunda dimensão foi feita em SDS-PAGE (12% poliacrilamida). As proteínas foram visualizadas utilizando a técnica de coloração por saturação com o Coomassie G-250.

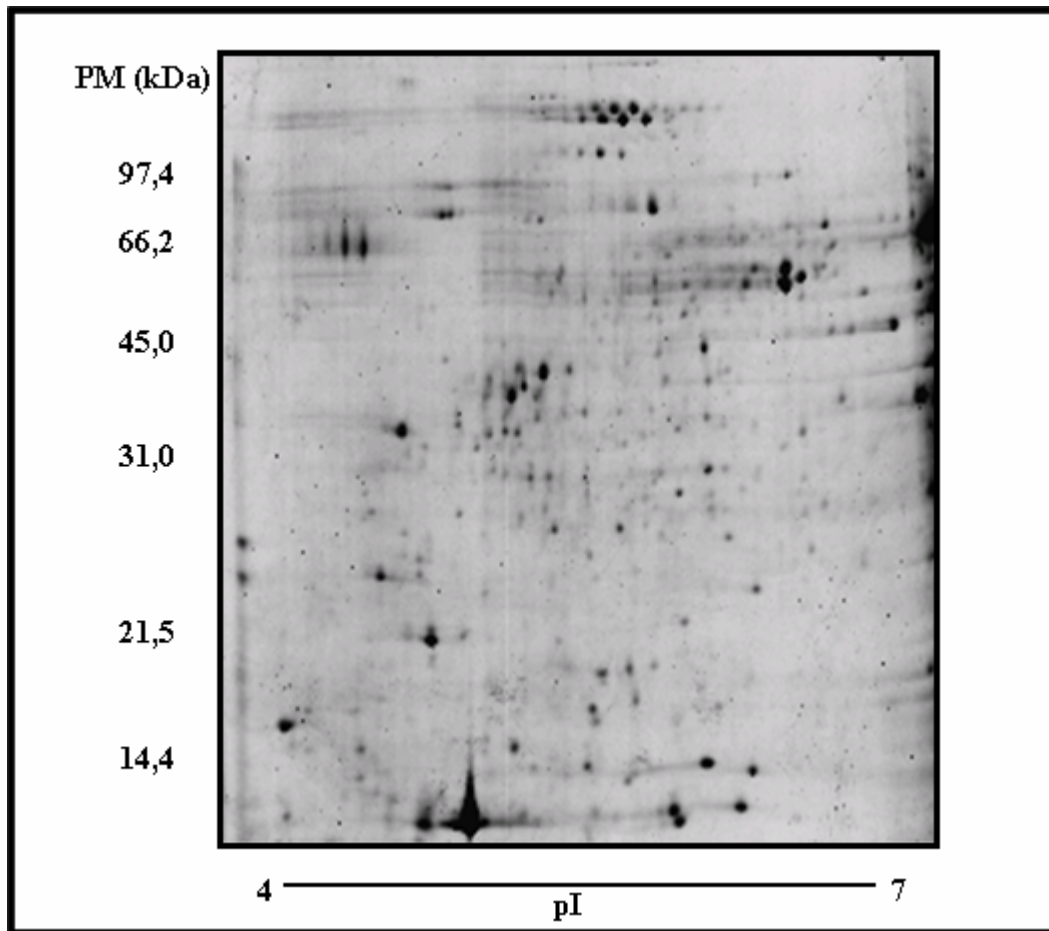


Figura 4.9: Eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 4167. O procedimento foi feito como descrito na Figura 4.8.

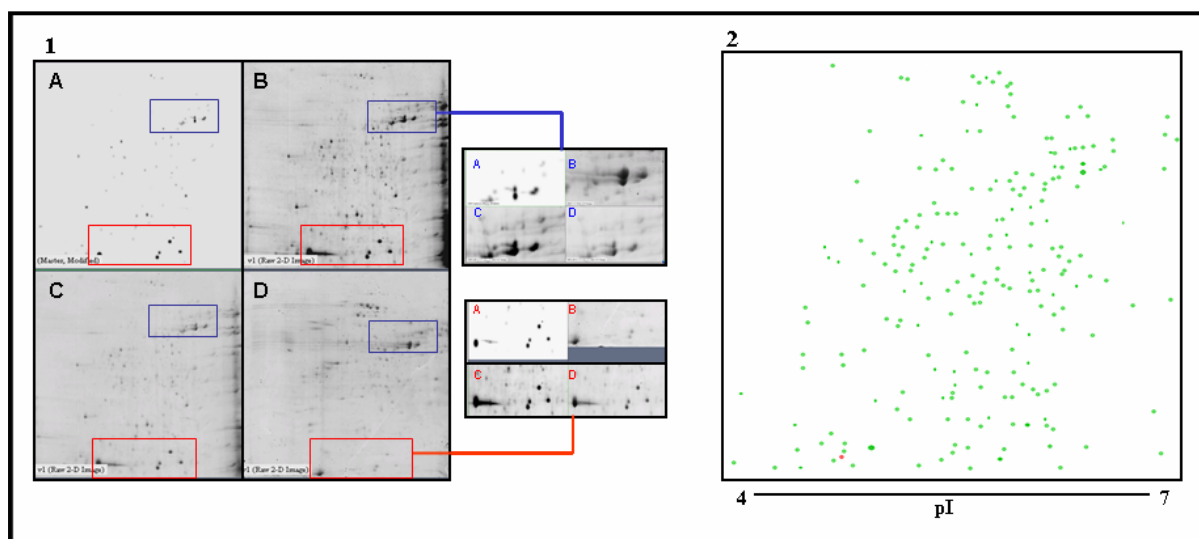


Figura 4.10: (1) Análise da reprodutibilidade da eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 3663. O procedimento foi feito como descrito na Figura 4.8 e a análise foi feita utilizando o programa PDQuest (Bio-Rad). (A) Imagem virtual criada para a análise comparativa entre as triplicatas (B, C e D). Os retângulos representam áreas ampliadas dos géis (B, C e D) que encontram-se delineadas pelos retângulos azul e vermelho; (2) Imagem virtual resultante da comparação entre os géis bidimensionais da cepa 3663 como descrito na Figura E 1. Verde – *spots* comuns entre as triplicatas das cepas 3663; vermelho – gel C. Os géis (B, C e D) foram apresentados na Figura 4.10(1).

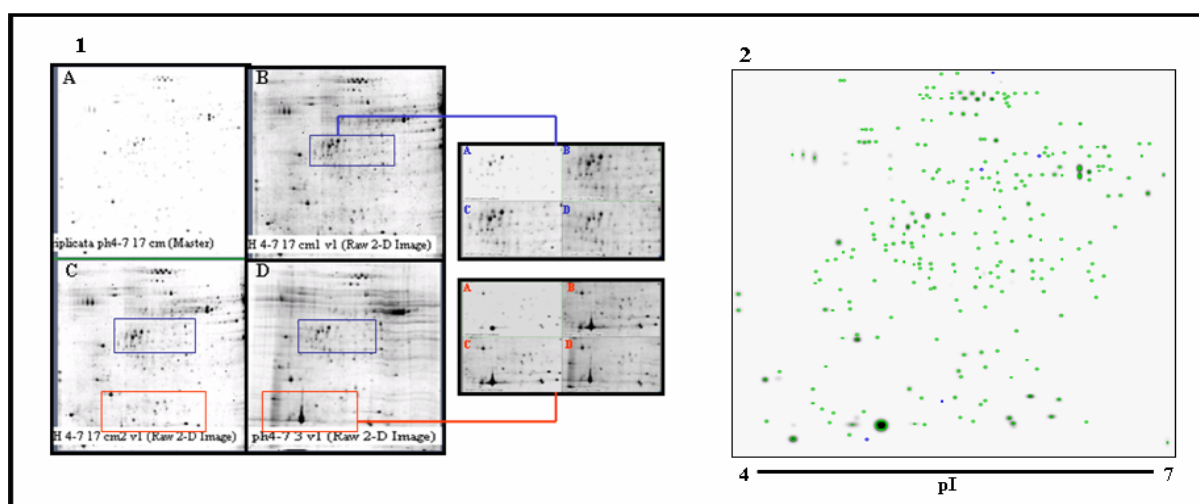


Figura 4.11: (1) Análise da reprodutibilidade da eletroforese bidimensional de proteínas solúveis de formas epimastigotas da cepa 4167. O procedimento foi feito como descrito na Figura 4.8 e a análise foi feita utilizando o programa PDQuest (Bio-Rad). (A) Imagem

virtual criada para a análise comparativa entre as triplicatas (B, C e D). Os retângulos representam áreas ampliadas dos géis (B, C e D) que encontram-se delimitadas pelas cores azul e vermelho; (2) Imagem virtual resultante da comparação entre os géis bidimensionais da cepa 4167 como descrito na Figura F 1. Verde – *spots* comuns entre as triplicatas das cepas 4167; azul – gel B; vermelho – gel C; preto – gel D. Os géis (B, C e D) foram apresentados na Figura 4.11(1).

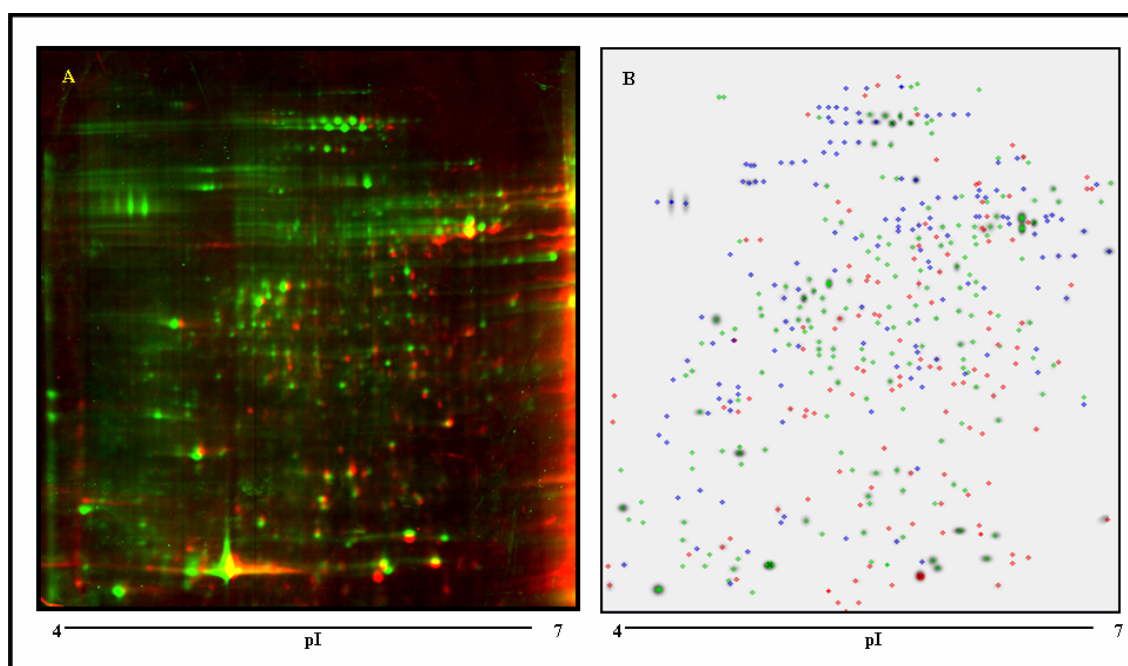


Figura 4.12: (A) Imagem virtual gerada pelo programa PDQuest obtida através da sobreposição de imagens dos géis das cepas 3663 e 4167 na faixa de pH 4-7. Vermelho (3663), verde (4167) (B) Imagem virtual obtida pela comparação entre os géis bidimensionais entre as cepas 3663 e 4167: *spots* vermelho únicos da cepa 3663, *spots* azul únicos da cepa 4167 e *spots* verde comuns entre as cepas 3663 e 4167.

Cepas	<i>Spots</i> totais	<i>Spots</i> diferenciais	<i>Spots</i> comuns
3663	300	119	181
4167	325	144	181

Tabela 4.2: quantitativo da análise realizada pelo programa PDQuest.

Para identificar a proteína correspondente aos *spots* presentes nos mapas protéicos das cepas estudadas foi utilizada a técnica de espectrometria de massa. Foram retirados e processados 80 *spots* do gel bidimensional referente ao pH 4-7 da cepa 3663, mas somente 25 foram caracterizados (Figura 4.13). Em relação à cepa 4167, foram retirados e processados 91 *spots* sendo 30 caracterizados (Figura 4.14). Um provável motivo para a não identificação de vários *spots* em ambas as cepas foi o fato deles serem muitos pequenos e/ou de fraca intensidade, que poderia representar pequena quantidade de proteína.

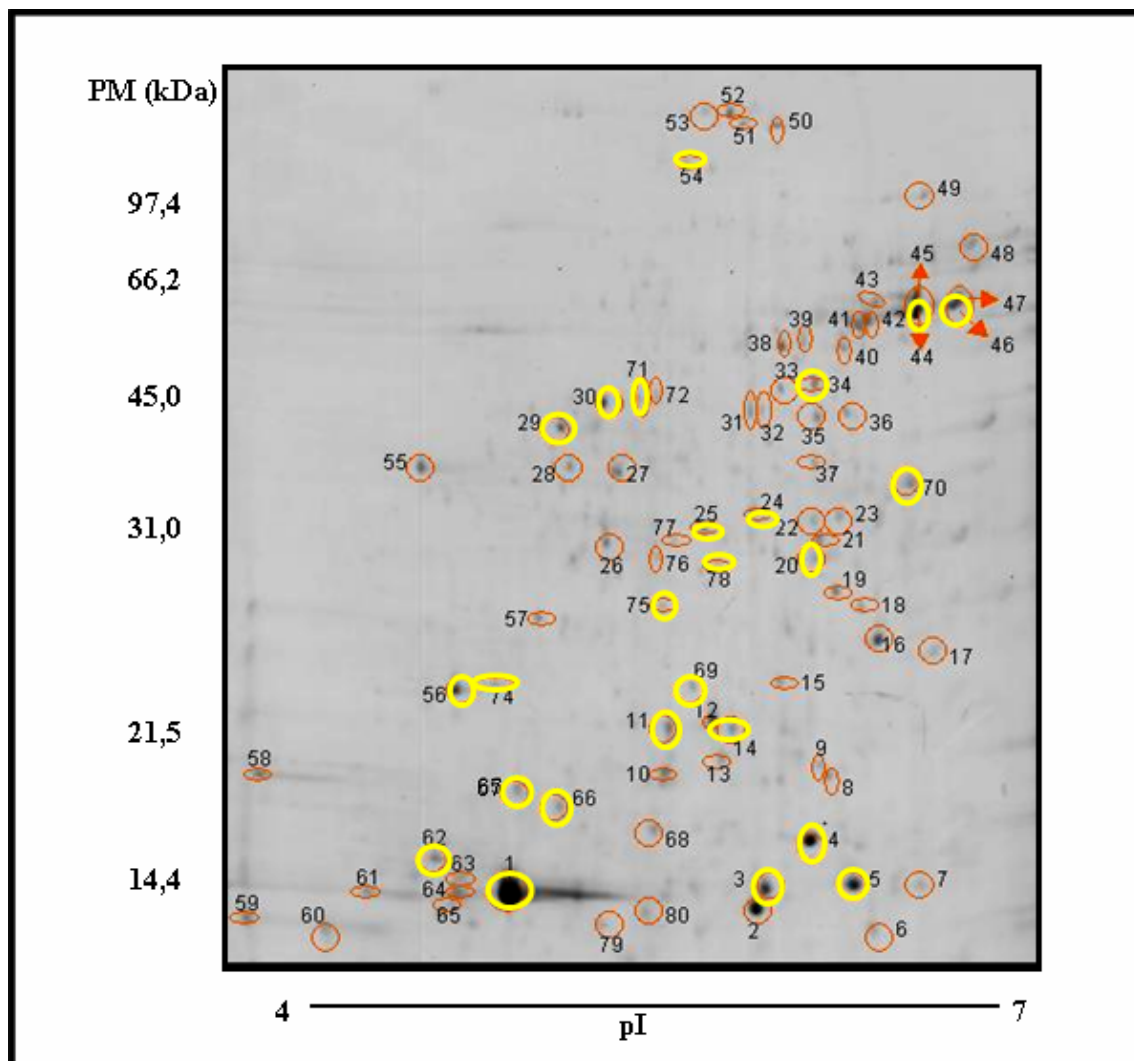


Figura 4.13: Foram retirados spots dos géis de 17 cm na faixa de pH 4-7 estes foram processados e analisados na espectrometria de massa. Em amarelo, *spots* identificadas na Cepa 3663 das formas epimastigotas

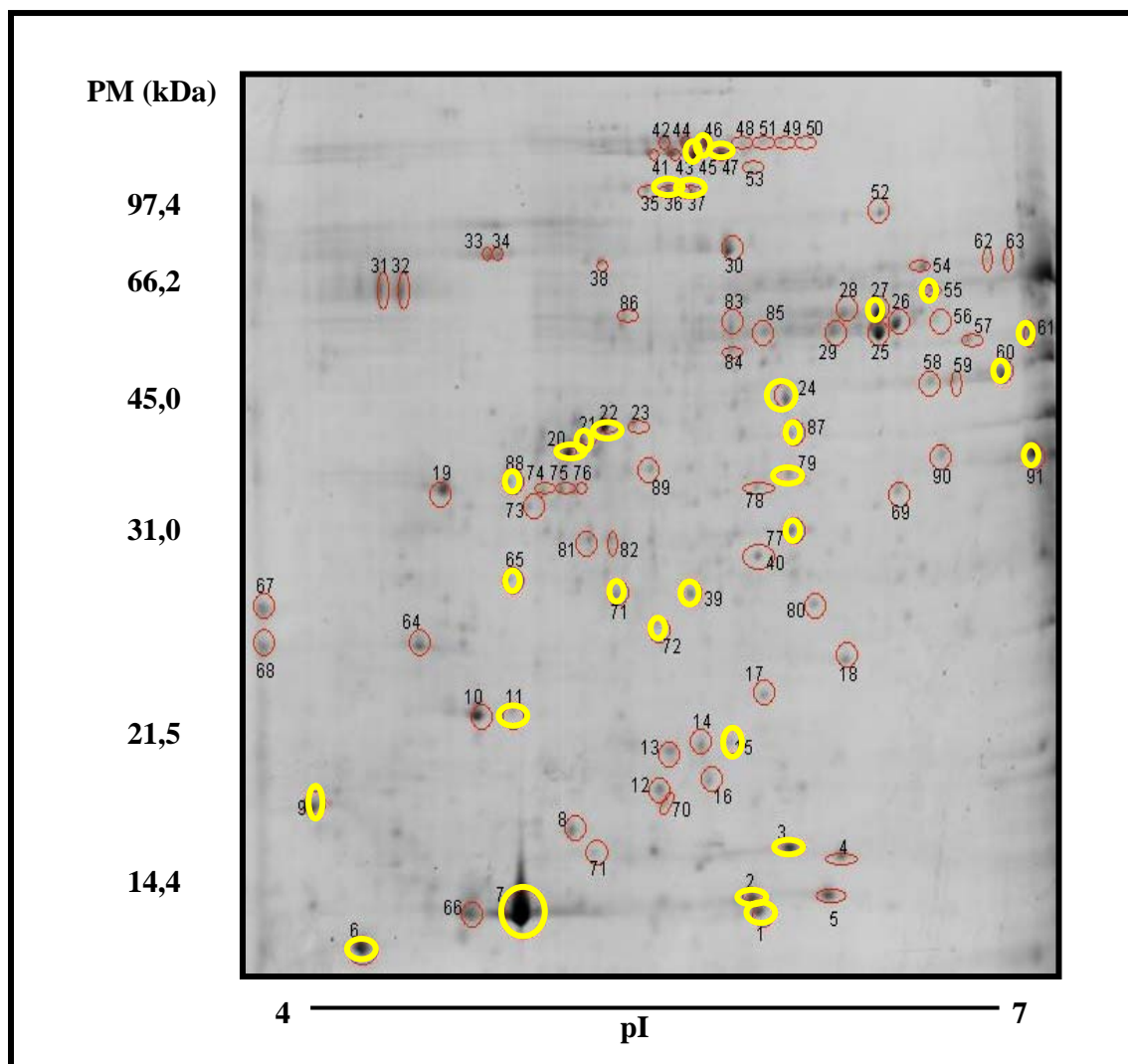


Figura 4.14:Foram retirados spots dos géis de 17 cm na faixa de pH 4-7 estes foram processados e analisados na espectrometria de massa.Em amarelo, *spots* identificadas na Cepa 4167 das formas epimastigotas

4.6. Análise dos *spots* por espectrometria de massa e identificação dos peptídeos

Os *spots* identificados (Figura 4.13 e 4.14) encontram-se discriminados nas Tabelas 4.3 (cepa 3663) e 4.4 (cepa 4167). As proteínas identificadas apresentam funções celulares distintas. Sendo assim, foram agrupadas em categorias funcionais (Tabela 4.5 e 4.6).

Cepa 3663					
Spot	Identificação de proteínas em <i>T. cruzi</i>	pI/MW teórico	pI/MW encontrado	Sequência de peptídeos	Nº de acesso
1	Calpain-like cysteine peptidase	5.08/12839	4.58/14200	QWAFYNDTK (1172.5) KQWAFYNDTK (1300.6)	XP_807299
3	Putative cofilin	5.69/15736	6.09/14500	YVMLHIIDQK (1259.7) DATFQQFVDSIDK(1513.7) LILVSWNPDSGLPR(1566.9) DKLILVSWNPDSGLPR (1810.0) SSPCYAAAYDFEYETNDGKR(2273.0)	ABF13410
4	Ubiquitin-conjugating enzyme like	5.81/15755	6.24/16600	YTMENCLAELR(1399.7) YTMENCLAELR (1415.7) ILSLEIFCDEDEYPNRPPHIK(2456.3)	XP_809137
5	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	6.08/16756	6.35/14600	DQWSPALTISK (1245.6) DPPANTSGGPISESDFNWK(2132.0)	XP_812602
11	Alfa Tubulina	5.49/46927	5.36/21400	AVFLDLEPTVVDEIR(1715.9)	XP_802499
14	Ran binding protein 1	5.46/18078	5.82/21400	LAAQHYLLK (1056.6)	XP_817320
24	Nitrilase	5.58/30840	5.96/37800	ENNIWVAVAGSIPER(1583.9) EVLSPGSTAFPVSINEK (1775.1) AMDNQYVLLCSPAR (1781.9) YFDEYAEIIRPGCPTYDSISK(2540.2)	XP_811054
25 46	Desidrogenase	6.03/42196	5.59/36600 6.57/60700	FIANPDLVER(1173.7) GGLIFLQLIHAGR (1394.8) YDFEEDAQIR (1413.6) ETYGVPEELTDDEV(1751.9)	AAJ54855
20 29 30 71	Beta tubulina	4.69/49410	6.15/35700 4.64/46800 4.69/50100 4.99/50100	LAVNLVPPFR (1125.7) FPQQLNSDLR (1146.6) KLAVNLVPPFR (1253.8) INVYFDEATGGR (1341.7) AVLIDLEPMTDMSVR (1631.9)	AAA91958
34	Activated protein kinase C	5.73/35009	6.23/52800	DVLSVTFSPDNR (1349.7)	XP_817733
44	Alcool desidrogenase	6.07/41732	6.5/59700	AEKDQYPLVCINTTSGTASEITR(2554.2)	XP_821876
54	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	5.4/59166	5.11/78200	NVHIEQSYGAPK(1318.7) AVGVILQSVAEQSR(1456.8) AAVQEGIVPGGGVALLR(1606.9)	EAN97657
56 74	Eukaryotic initiation factor 5a	4.82/18004	4.52/24100 4.57/23800	VSIVATDIFTGNK(1364.8) TSTYSVLDIQEDR(1526.8) DNLDMPNNAELAAQIK(1756.0)	XP_821554
62 67	Proteína hipotética	8.59/45869	4.49/15400 4.60/18300	FEEFANR(912.5) LEELQAELLSR(1300.8) HHSDDVEAAAYIK(1384.7)	gi/71667953
66	40S ribosomal protein S12	5.07/15887	4.64/17400	EELAEWAGLQK(1273.6) ALASQANIDFVEVESR(1748.9)	XP_804361
69	Glutathione peroxidase-like protein	5.62/19584	5.49/24000	EFACTQFK(1030.5) AHPLYSYLK(1091.6) GGYETATTLYNK(1317.7)	XP_812807
70	29kDa proteosome subunit	5.45/29347	6.54/42000	SPVAQFAAYQEK(1370.7) LDDHVGMAIAGLVADGR(1725.9) NQYDTNTTWSPTGR(1741.9)	AAB48403
75	Peroxi-redoxin	7.62/25506	5.22/29900	GLFIHDDK(920.5) VVQAFQYVVK(1196.6) IQDISLNDYK(1208.6) HITVNDLPVGR(1220.7) DYGVLIEEQGISLR(1591.8) GGLGEMSIPLVSLDLTK(1632.8)	CAA06923
78	Hlsu complex proteolytic subunit like	6.77/22867	5.56/32300	<i>Peptideo Massa Fingerprint</i> 4 peptídeos 21% Cobertura Erro: 42 ppm	XP_810173

Tabela 4.3: Proteínas identificadas por espectrometria de massa da forma epimastigota da cepa 3663

Cepa 4167					
Spot	Identificação de proteínas de <i>T. cruzi</i>	pI/MW teórico	pI/MW encontrado	Sequência de peptídeos	Nº de acesso
1	Hypothetical protein	6.15/14027	6.15/14000	TYAVSKPLQDDTLVMYCK.K+Carbamidomethyl(C) Oxidation (M)(2148.2) QCGYNTAVYPGSWDDWSK.N + Carbamidomethyl(C) Pyro-Glu (N-Terminal Q)(2218.0) QCGYNTAVYPGSWDDWSK + Carbamidomethyl(2235.0)	XP_815378
2	Cofilin/actin depolymerizing factor	5.69/15736	6.09/14500	YVMLHIDQK*(1259.7) DATFQQFVDSIDK(1513.8) SSPCYAAAYDFEYETNDGKR + Carbamidomethyl(C)(2273.1)	XP_810628
3	Hypothetical protein conserved	9.0/60733	6.24/16600	QVDQLFLNAK + pyroGlu(1285.67) GGSVLTQLQQR(1185.64) ELQSFMDSPFAK(1398.65) ELQSFMDSPFAK + 1Met-ox(1414.64)	EAN90633
6	Ribosomal protein P-JL5	4.37/10472	4.37/10500	VDALFAEFAGK(1277.63) YLAAAYALVGLSGGTPSK(1666.89)	CAA49261
7	Hypothetical protein conserved	5.3/92789	4.58/14200	MMSPPETLMVANSR + 1Met-ox(1693.75) CGDSNGLLLLYSCVGDMEAIK(2285.04) CGDSNGLLLLYSCVGDMEAIK + 1Met-ox(2301.03) MNAFAAAVVEGSTIKFENDLAATK(2447.24)	EAN85301
9 11	Putative heat shock 70kDa protein, mitochondrial precursor	5.8/70992	4.15/18400 4.57/23800	<i>Peptideo Massa Fingerprint</i> 14 peptídeos 27% Cobertura Erro: 4.23 ppm	EAN84370
15 20 22 88	Beta tubulin	4.69/50094	5.90/21900 4.64/46800 4.69/50100 4.56/43300	LAVNLVPPFR(1124.67) FPGQLNSDLR(1145.58) KLAVNLVPPFR(1252.77) INVYFDEATGGR(1340.64) GHYTEGAELIDSVLDVCR(1974.92)	AAA91958
21 39	Mitochondrial elongation factor G putative	6.4/83984	4.66/48480 5.56/32300	QFYTLSPFR + pyroGlu(1369.67) MTAPPPECMEK(1288.54) CGNGLTFSFGMHTSPR(1896.82) SPSVIMAYYMQKCCR + Met-ox(1908.84)	EAN77920
24	Prefolín subunit 2	5.38/16191	6.23/52800	GIQEALQLNK(1242.7) ISELENELHEHK(1477.7) TVAEILPELDDNVK(1555.8)	XP_809508
27	Tyrosine aminotransferase (L-tyrosine 2-oxoglutarate aminotransferase)	5.8/46167	6.5/61700	NLVVPGWR(939.53) EAVATWWR(1017.50) LTTTRPVEVYR(1333.74) LPLFSDIYAGMVFK + 1Met-ox(1744.87) LLIVTNPSNPGSNFSR(1874.93) GKDPNATFTSVADFETTVPR(2152.04) LLEENVQVLPGTIFHAPGFR(2466.29) LGWLLYVDPHNGSPFLEGLKR(2467.30)	P33447
36	Heat shock 60 kDa protein	5.4/59412	5.34/78100	<i>Peptideo Massa Fingerprint</i> 18 peptídeos 49% Cobertura Erro: 46 ppm	
37	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	5.4/56166	5.58/77900	TAMMQDIAIFAGAR + 2Met-ox(1526.72) AAVQEGIVPGGVALLR(1605.92) YVNMFEAGHDPAR + 1Met-ox(1610.78) ALDSLLEDSSLTADQQR(1660.83) VSSHTLTPALNHVVR(1755.02) TNDLAGDGTTSAVLVA SVFSESLR(2510.25)	EAN97657
45	Putative structural maintenance of chromosome 3 protein	5.6/83258	5.6/83300	FYGLRSLWSSR(1370.71) TVHNFGEAVMER + 1Met-ox(1404.65) ELCNFNVALPVDVVSFR(1878.93) NPMLFGLLNLLRGYK(1879.02) YAVVVEGPFCLPCSGR(1906.91)	AAO85524
46	Peroxisredoxin ou Trypanredoxin peroxidase	7.62/25506	5.70/85400	VVQAFQYVVK(1196.7) DYGVLIEEQISLR(1591.1) GGLGEMSIPLVLDLTK.E + Oxidation (M)(1632.9) INTQVVAVSCDSQYSHLAWINTPR.N + Carbamidomethyl(C)(2759.5)	XP_806739 CAA06923
47	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	5.8/70991	5.82/83400	DSEMHAEDRVK(1386.62) EISEVVLVGGMTR(1388.73) EISEVVLVGGMTR + 1Met-ox(1404.73) GVNPDAAVALGAATLGGVLR(1879.07) VSNVAVTCAYPNDAQR(1910.89)	EAN84370
55	S-adenosylmethionine synthetase, putative	6.0/43495	6.71/65000	YHLNPSGR(942.46) LRPYDIK(1016.60) FVIQPHGDAGLTGR(1452.75) IIVDTYGGFAGHGGAFSGK(1948.94)	EAN97128
60	Aromatic L-alpha-hydroxyacid dehydrogenase	6.8/33793	6.80/54700	SLALVAER(857.50) NAAIFSEHGR(1100.53) AELMDCAFLLDR1491.69 AELMDCAFLLDR + 1Met-ox(1507.69) VVVGAAGQVGYALLPLIAGGR(2067.18) EAIKDDAYLDGEFMTTVQQR(2329.09) EAIKDDAYLDGEFMTTVQQR + 1Met-ox(2345.08) NCHWGNHSGTQVDPVNSATVR(2366.13)	AAF36774
61	Arginine kinase, putative	6.3/40198	6.86/59100	SLEGYFPNCLK(1423.68) TFLVWVNEEDHLR(1656.83) FLQAAHACEFWPTGR(1789.84) LGFLTFCPTNLGTTIR(1809.94)	EAN84558
65	Proteasome alpha 5 subunit	4.96/27092	4.56/33600	IFQIEYAIEAIK(1437.8) LGSTSLGIQTPDAVIAAEK(1970.1)	XP_808230
71 72	Peroxisredoxin	7.62/25506	4.82/32200 5.22/29900	VVQAFQYVVK(1196.6) DYGVLIEEQISLR(1591.1)	CAA06923
77	Nitrilase	5.58/30840	6.24/38100	ENNIWVVAAGSIPER(1583.8) EVLSPGSTAFPVSINEK(1774.9)	gi71419064
79	Putative proteasome alpha 3 subunit	5.7/31929	6.24/44300	<i>Peptideo Massa Fingerprint</i> 7 peptídeos 35% Cobertura Erro: 4.63 ppm	EAN86245
87	Activated protein kinase C receptor	5.73/35009	6.24/49100	GAHTDWWSCVR + Carbamidomethyl(1287.7) DVLSTVTFSPDNR(1349.7) NSECEYGFPER.R + Carbamidomethyl(1516.7) GWVTALACPCIFETTYIK.A + Carbamidomethyl(1951.1) GEALSEMAAGAPINQICFSPNR.Y + Carbamidomethyl(2333.3)	XP_817733
91	Prostaglandin F synthase	7.71/32490	6.76/46700	EEVWVTIK(991.5) VWNSDQGYEK(1225.6) WDIQHGIVTIPK(1406.8) IQENFNWDFK(1439.8) AIGVSNFEPHHLTELFK(1939.1)	XP_814362

Tabela 4.4: Proteínas identificadas por espectrometria de massa da forma epimastigota da cepa 4167.

Cepa 3663	
Caracterização funcional	Proteína
Síntese de proteínas	<i>40S ribosomal protein S12 (T.cruzi)</i>
Sinalização / Diferenciação Celular	<i>Activated protein kinase C (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Alcohol dehydrogenase (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Dehydrogenase (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Nitrilase (T.cruzi)</i>
Metabolismo, resposta ao stress oxidativo	<i>Glutathione peroxidase-like protein (T.cruzi)</i>
Metabolismo de aminoácidos	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 (T.cruzi)</i>
Metabolismo de aminoácidos	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme like (T.cruzi)</i>
Organização celular	<i>Alpha tubulin (T.cruzi)</i>
Organização celular	<i>Beta tubulin (T.cruzi)</i>
Resposta ao Stress/ Proteína de matriz mitocondrial	<i>Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (T.cruzi)</i>
Fator de iniciação de Tradução	<i>Eukaryotic initiation factor 5a (T.cruzi)</i> <i>Hlsvu complex proteolytic subunit like (T.cruzi)</i>
Catabolismo de proteínas	
Transporte nuclear	<i>Ran binding protein 1 (T.cruzi)</i>
Outras	<i>Calpain-like cysteine peptidase (T.cruzi)</i>
Transporte de elétrons	<i>Peroxiredoxin (T.cruzi)</i>
Outras	<i>Putative cofilin (T.cruzi)</i>
Degradação de proteínas	<i>29kDa proteosome subunit (T.cruzi)</i>
Outras	<i>Hypothetical protein (T.cruzi)</i>

Tabela 4.5: Proteínas identificadas na cepa 3663 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.

Cepa 4167	
Caracterização funcional	Proteína
Comunicação Celular	<i>Activated protein kinase C receptor (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Arginine kinase, putative (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Aromatic L-alpha-hydroxyacid dehydrogenase (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Tyrosine aminotransferase (L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase (TAT) (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Nitrilase (T.cruzi)</i>
Metabolismo	<i>Putative proteasome alpha 3 subunit (T.cruzi)</i>
Transporte de elétrons	<i>Peroxiredoxin ou Tryparedoxin peroxidase (T.cruzi)</i>
Processo de formação de proteínas	<i>Prefolin subunit 2 (T.cruzi)</i>
Processo biológico	<i>Prostaglandin F synthase (T.cruzi)</i>
Atividade trypanothiona-dissulfide redutase	<i>Proteosome alpha 5 subunit (T.cruzi)</i>
Resposta ao Stress/Proteína de destino	<i>Putative heat shock 70kDa protein, mitochondrial precursor (T.cruzi)</i>
Codifica epítomos reativos	<i>Ribosomal potein P-JL5 (T.cruzi)</i>
Processo celular	<i>S-adenosylmethionine synthetase, putative (T.cruzi)</i>
Organização celular	<i>Beta tubulin (T.cruzi)</i>
Resposta ao Stress / Proteína mitocondrial	<i>Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (T.cruzi)</i>
Organização dos filamentos de actina	<i>Cofilin/actin depolymerizing factor (T.cruzi)</i>
Outras	<i>Hypothetical protein (T.cruzi)</i>
	<i>Hypothetical protein conserved (T.cruzi)</i>
Proteína mitocondrial	<i>Mitochondrial elongation factor G putative (T.cruzi)</i>
Separação da cromátide irmã, reparo de DNA , recombinação e transporte intracelular	<i>Putative structural maintenance of chromosome 3 protein (T.cruzi)</i>
Resposta ao Stress	<i>Heat shock 60 kDa protein (T.cruzi)</i>

Tabela 4.6: Proteínas identificadas na cepa 4167 por espectrometria de massa com função conhecida e agrupada em categorias funcionais.

Os *spots* identificados nas cepas 3663 e 4167 foram selecionados utilizando o programa PDQuest que gerou gráficos de intensidade dos *spots* comuns e diferenciais entre as duas cepas estudadas (Figura 4.15 e 4.16).

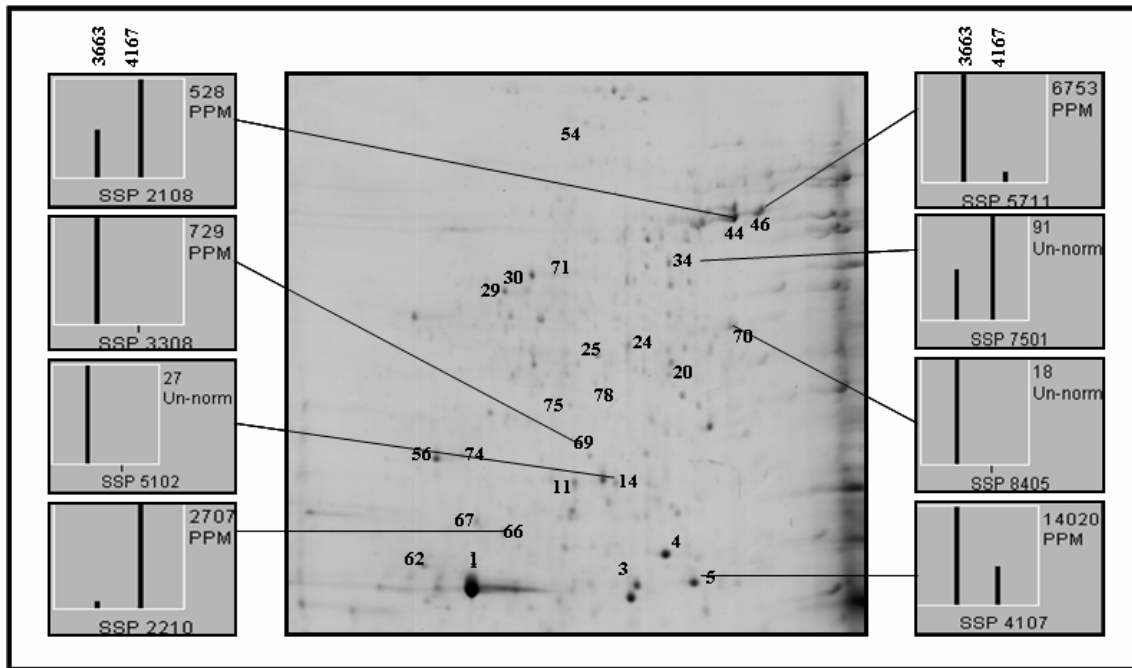


Figura 4.15: Imagem gerada pelo PDQuest onde é possível observar a diferença de expressão dos *spots* selecionados na cepa 3663: *spot* 66 identificado por espectrometria de massa como *40S ribosomal protein S12* ; *spot* 44 identificado como *Alcohol dehydrogenase* ; *spot* 46 identificado como *Dehydrogenase (T.cruzi)* ; *spot* 69 identificado como *Glutathione peroxidase-like protein (T.cruzi)*; *spot* 5 identificado como *Ubiquitin-conjugating enzyme E2*; *spot* 14 identificado como *Ran binding protein 1 (T.cruzi)*; *spot* 70 identificado como *29kDa proteosome subunit (T.cruzi)* e *spot* 34 identificado como *Activated protein kinase C (T.cruzi)* .

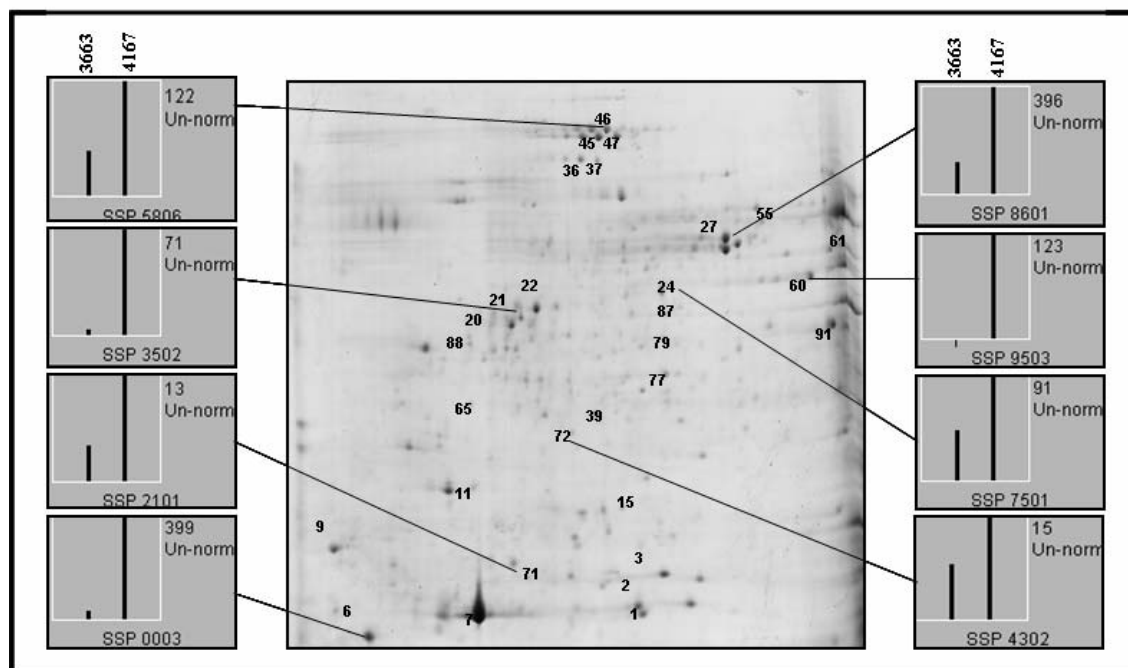


Figura 4.16: Imagem gerada pelo PDQuest onde é possível observar a diferença de expressão dos *spots* selecionados na cepa 4167: *spot* 6 identificado por espectrometria de massa como *Ribosomal protein P-JL5 (T.cruzi)*; *spot* 71 identificado como *Peroxiredoxin (T.cruzi)*; *spot* 46 identificado como *Tryparedoxin peroxidase*; *spot* 21 identificado como *Mitochondrial elongation factor G putative (T.cruzi)*; *spot* 27 identificado como *Tyrosine aminotransferase (L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase (TAT) (T.cruzi)*; *spot* 60 identificado como *Aromatic L-alpha-hydroxyacid dehydrogenase (T.cruzi)*; *spot* 24 identificado como *Prefolin subunit 2* e *spot* 72 identificado como *Peroxiredoxin (T.cruzi)*.

4.7. Vias metabólicas

As enzimas foram classificadas de acordo com a reação por elas catalisadas (Enzyme Commission number - *EC numbers*), e foram utilizados pelo banco de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) para a localização de seus respectivos mapas metabólicos.

Os mapas metabólicos (Anexos 17 a 28) foram reconstruídos com as enzimas classificadas, utilizando como referência os mapas encontrados no banco de dados do KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>). Foram utilizadas sete enzimas para a busca no KEGG, somente duas não estavam disponíveis no banco, onde cinco destas enzimas estão envolvidas em 13 vias metabólicas (Tabela 4.7).

<i>Enzima</i>	<i>EC number</i>	Cor da enzima	Via metabólica
Nitrilase	3.5.5.1	Cinza	Metabolismo do triptofano Metabolismo do ácido cianoamino Via da degradação do benzoato; via da ligação de CoA Metabolismo do nitrogênio
Tirosina aminotransferase	2.6.1.5	Azul	Metabolismo da metionina Metabolismo da tirosina Metabolismo da fenilalanina Biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano <i>Novobiocin biosynthesis</i> Biossíntese de alcalóides I
S-adenosilmetionina sintetase, putativa	2.5.1.6	Verde	Metabolismo da metionina Metabolismo do ácido selenoamino
Prostaglandina F sintase	1.1.1.188	Amarelo	Metabolismo do ácido aracdônico
Proteína glutathiona peroxidase-like	1.11.1.9	Vermelho	Metabolismo da glutathiona Metabolismo do ácido aracdônico
Peroxirredoxina	1.11.1.15	Rosa	Não estava disponível no KEGG
Triparedoxina peroxidase	1.11.1.15	Rosa	Não estava disponível no KEGG

Tabela 4.7 : Enzimas envolvidas nas vias metabólicas disponibilizadas pelo banco de dados do KEGG.

4.8. Comparação do mapa de proteínas solúveis obtidas para ZIII com o mapa obtido para cepas do grupo *T.cruzi* I e *T. cruzi* II.

As análises comparativas entre o mapa protéico de ZIII com os obtidos para cepas pertencentes aos grupos *T. cruzi* I e II foram feitas utilizando o programa PDQuest (Figura 4.17 e 4.18). As imagens utilizadas para as análises comparativas foram virtuais. As mesmas foram geradas através da comparação de géis bidimensionais, realizados na faixa de pH 4-7, de cepas pertencentes ao mesmo grupo filogenético: ZIII (cepas 3663 e 4167), *T.cruzi* I (cepas D7 e Dm28c) e *T.cruzi* II (cepas GLT e CL Brener). Quando comparados os grupos

ZIII e *T.cruzi* I (Figura 4.17) foram detectados 441 *spots* no ZIII e 280 *spots* no grupo *T.cruzi* I, onde 155 *spots* eram comuns a ambos, 286 eram exclusivos de ZIII e 125 de *T.cruzi* I (Tabela 4.8).

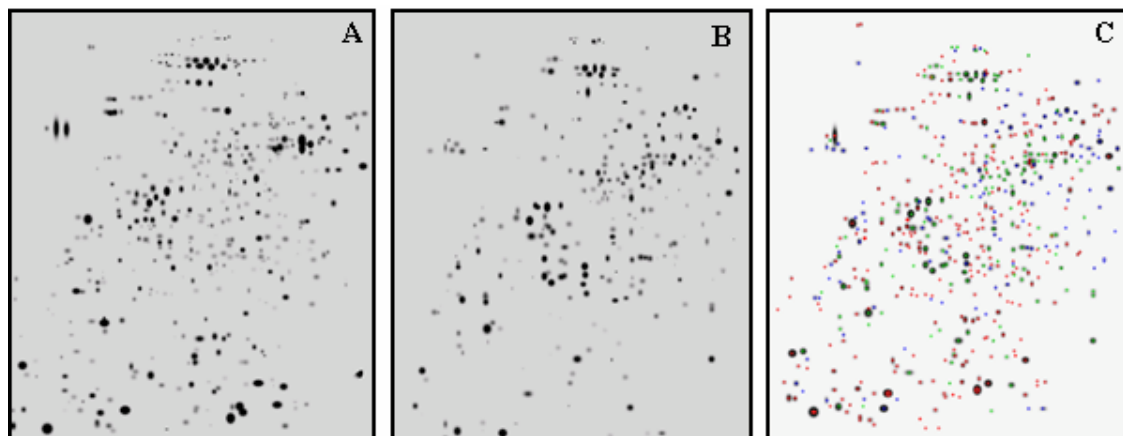


Figura 4.17: A e B- Imagens virtuais resultante da comparação entre cepas pertencentes a cada grupo:ZIII (cepas 3663 e 4167) e *T.cruzi* I (cepas D7 e Dm28c); C- imagem virtual obtida pela comparação de A com B: *spots* vermelho únicos em ZIII; *spots* azul - únicos em *T.cruzi* I e *spots* verde - *spots* comuns a A e B.

Grupo	Spots totais	Spots diferenciais	Spots comuns
Z III (3663 e 4167)	441	286	155
<i>T.cruzi</i> I (Dm28c e D7)	280	125	155

Tabela 4.8: Quantitativo da análise realizada no programa PDQuest entre ZIII e *T.cruzi* I.

Através da análise comparativa entre ZIII e *T. cruzi* II (figura 4.18) foram detectados 441 *spots* no ZIII (cepas 3663 e 4167) e 279 em *T. cruzi* II (cepas GLT e CL Brener), onde 137 *spots* eram comuns a ambos, 304 únicos de ZIII e 142 *spots* únicos de *T. cruzi* II (Tabela 4.9).

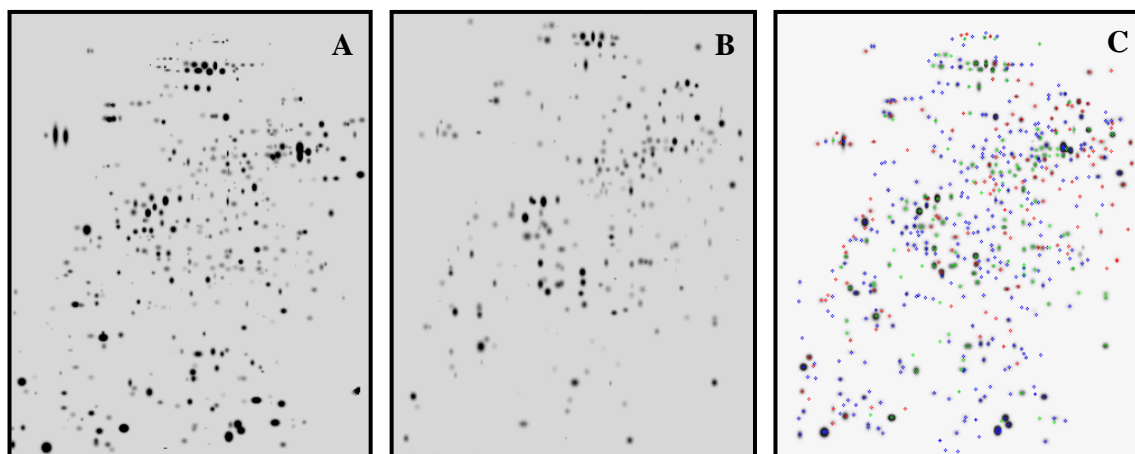


Figura 4.18: A e B- Imagens virtuais resultante da comparação entre cepas pertencentes a cada grupo: ZIII (cepas 3663 e 4167) e *T.cruzi* II (cepas GLT e CL Brener); C- imagem virtual obtida pela comparação de A com B: *spots* vermelho únicos em *T. cruzi* II; *spots* azul - únicos em ZIII e *spots* verde - *spots* comuns a A e B.

Grupo	Spots totais	Spots diferenciais	Spots comuns
Z III (3663 e 4167)	441	304	137
<i>T.cruzi</i> II (CL Brener e GLT)	279	142	137

Tabela 4.9: Quantitativo da análise realizada pelo programa PDQuest entre ZIII e *T.cruzi* II.

Utilizando outra ferramenta disponível no PDQuest, foi possível observar a disposição dos *spots* presentes em cada grupo e os *spots* comuns entre *T.cruzi* I e ZIII e *T.cruzi* II e ZIII (Figura 4.19, Figura 4.20)

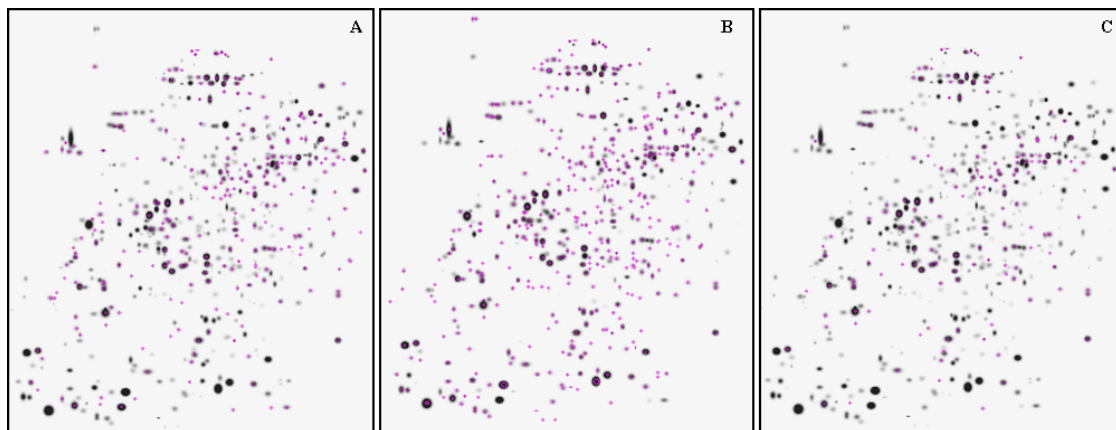


Figura 4.19: Imagens virtuais geradas a partir da comparação dos géis dos grupos ZIII e *T. cruzi* I. Em roxo estão marcados os *spots* (A) presentes somente no grupo *T. cruzi* I, (B) somente em ZIII e (C) *spots* comuns entre *T. cruzi* I e ZIII

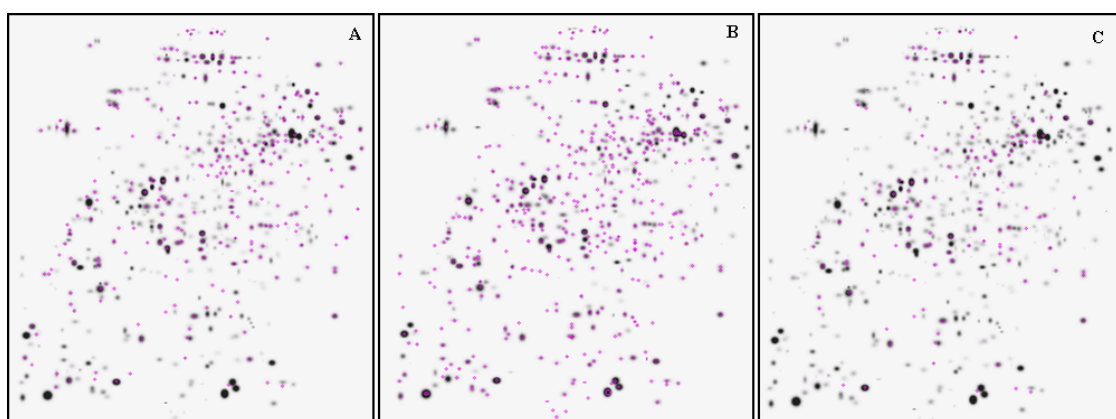


Figura 4.20 : Imagens virtuais geradas a partir da comparação dos géis dos grupos ZIII e *T. cruzi* II. Em roxo estão marcados os *spots* (A) presentes somente no grupo *T. cruzi* II, (B) somente em ZIII e (C) *spots* comuns entre *T. cruzi* II e ZIII

Os *spots* compartilhados entre os grupos entre ZIII e *T. cruzi* I (Figura 4.21 A) e ZIII e *T. cruzi* II (Figura 4.21 B) numa faixa de pH de 4-7, se encontram na mesma região do gel como mostra a Figura 4.21.

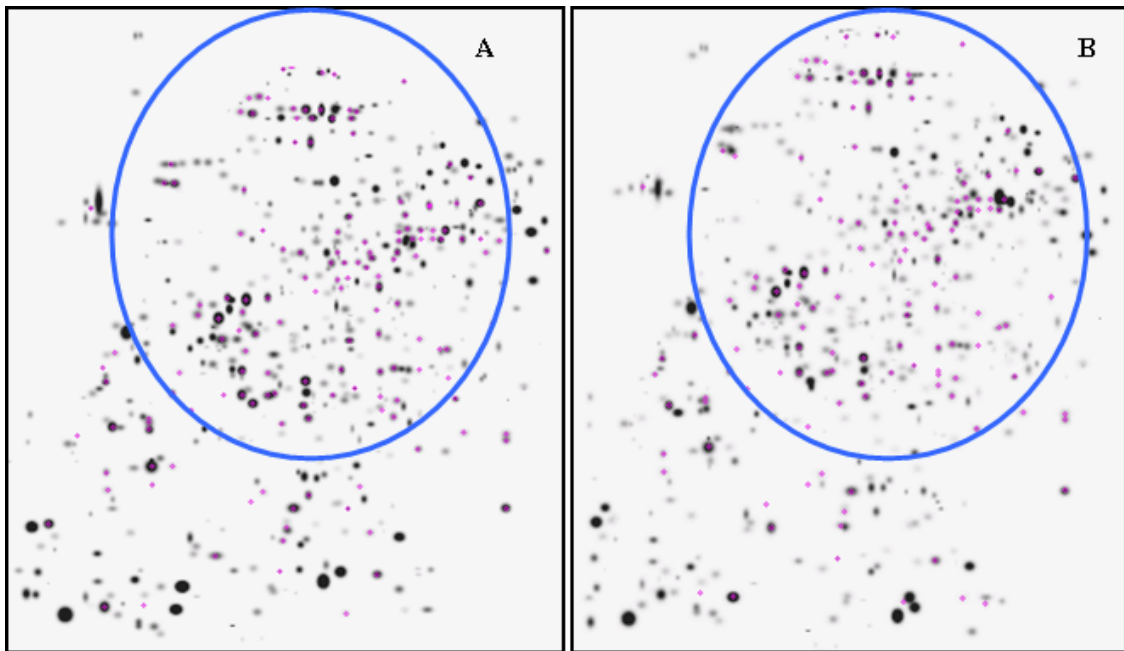


Figura 4.21: Géis virtuais faixa de pH 4-7 onde em roxo se encontram-se os *spots* comuns a ZIII e *T.cruzi* I (A) e a ZIII e *T.cruzi* II (B). A região do gel onde esta localizada a maior concentração de *spots* esta marcada em azul.

5. DISCUSSÃO

A heterogeneidade do *Trypanosoma cruzi* vem sendo descrita desde a sua descoberta. Chagas (1909) no primeiro trabalho sobre a nova etiologia, descreveu a diversidade morfológica do parasito e levantou a hipótese de que a dualidade morfológica poderia estar relacionada à diferenciação sexual.

Miles e cols (1978, 1980, 1981a) utilizando análises de isoenzimas agruparam as cepas em zimodemas e relacionavam os três diferentes grupos isoenzimáticos encontrados com o perfil epidemiológico dos isolados. Os zimodemas ZI e ZIII estariam relacionados ao ciclo silvestre do parasito e o ZII ao ciclo doméstico. Posteriormente, através de diversas técnicas de biologia molecular (Morel *et al.*, 1986; Ávila *et al.*, 1990; Mimori *et al.*, 1992; Tibayrenc *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1993; Macedo *et al.*, 1993; Vago *et al.*, 1996; Souto *et al.*, 1996; Zingales *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1998a), observou-se um claro dimorfismo entre os isolados, levando ao agrupamento das cepas em duas grandes linhagens filogenéticas: *T. cruzi* I (que se correlaciona ao ZI) e *T. cruzi* II (que se correlaciona ao ZII). Os dois grupos filogenéticos apresentam características biológicas, genéticas e epidemiológicas distintas. A posição de ZIII em relação aos grupos *T. cruzi* I e II continua controversa. Alguns autores consideram que ZIII está mais perto filogeneticamente do *T. cruzi* I do que do *T. cruzi* II (Miles *et al.*, 1981; Fernandes *et al.*, 1998b; Brandão & Fernandes, 2006), enquanto outros consideram o contrário (Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000; Machado & Ayala, 2001; Toma, 2005).

Através de estudos filogenéticos baseados no perfil de RFLP-ITS-rDNA (*Restriction Fragment Length Polymorphis do Internal Transcribed Spacer do rDNA*) com isolados de ZIII da Amazônia Brasileira, demonstrou-se uma clara dicotomia entre isolados deste grupo que permitiu dividi-lo em dois subgrupos denominados ZIII-A (cepa 3663) e ZIII-B (cepa 4167), em que a distância genética mostrou um baixo nível de heterogeneidade (Mendonça *et al.*, 2002).

Os diversos estudos desenvolvidos até o momento para caracterizar a posição filogenética de ZIII utilizam técnicas moleculares. Deste modo, a análise proteômica de cepas pertencentes ao ZIII em comparação com *T. cruzi* I e II pode contribuir para o melhor entendimento desta questão.

Este trabalho tem como objetivo principal definir o mapa de proteínas solúveis das cepas pertencentes ao zimodema III (3663 – ZIII-A e 4167 – ZIII-B), ressaltando as diferenças existentes entre os subgrupos ZIII-A e ZII-B. Para isto foram utilizadas as técnicas

de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. Pretendemos contribuir para o estudo maior que busca uma abordagem proteômica mais global para o táxon *T. cruzi* (Projeto PDTIS intitulado: Proteoma de *Trypanosoma cruzi*: Análise de diferenças fenotípicas entre cepas com distintos perfis patogênicos).

As cepas utilizadas neste estudo são orindas da região Amazônica brasileira. A cepa 3663 foi isolada a partir de *Panstrongylus geniculatus* do distrito de Manaus e a 4167 de *Rhodnius brethesi* do Município de Barcelos, localizado na margem do Rio Negro (Mendonça *et al.*, 2002). As cepas escolhidas (3663 e 4167), já foram bem caracterizadas como ZIII por diversos marcados moleculares (Fernandes *et al.*, 1998; Mendonça *et al.*, 2002; Brandão *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2006).

O estudo da doença de Chagas na região da Amazônica tem demonstrado que diversos isolados de *T. cruzi* têm sido caracterizados recentemente como ZIII, baseado em testes padrões de isoenzimas e em uma inserção no espaçador não transcrito do gene mini-exon (Fernandes *et al.*, 1998b; 2001). Embora este marcador genético distinga ZIII do grupo *T. cruzi* I e II, não permite a caracterização de polimorfismos do intra-grupo desde que o gene mini-exon provou ser um gene de evolução lenta. Através da análise da região intergênica de cepas representantes dos grupos filogenéticos principais de *T. cruzi*, juntamente com as cepas utilizadas neste estudo, confirmou-se ZIII como um terceiro grupo (Figura 4.3). Este grupo de parasitos, tanto pela proximidade isoenzimática quanto pelas características epidemiológicas, estaria mais relacionado ao ciclo silvestre da doença de Chagas e, portanto mais próximo do ZI (*T. cruzi* I) do que ZII. Entretanto, Brisse e cols (2000a) demonstraram que ZIII estaria mais relacionado a *T. cruzi* II. De forma antagônica, Fernandes e cols (1998b) utilizando o gene de mini-exon e Santos e cols (2002) utilizando a região espaçadora interna não-transcrita do gene ribossômico definiram que ZIII estaria mais próximo de *T. cruzi* I validado pelas características isoenzimática e epidemiológicas.

A maioria das trabalhos de interação do *T. cruzi* – célula hospedeira tem sido realizados com as cepas Y e CL Brener que apresentam alto nível de parasitemia em camundongo e bom desenvolvimento em cultura de tecido. Entretanto, não há relatos de ensaios com cepas pertencentes ao grupo ZIII. Visando buscar um entendimento do comportamento destas cepas de ZIII em relação às cepas de referências dos grupos *T. cruzi* I e II, foram realizados experimentos de infectividade *in vitro* utilizando células VERO. As cepas 3663, 4167, Dm28c e CL Brener foram infectantes para as células VERO (Gráfico 4.4 e Anexos 8 ao 15), que proporcionou além da infecção, o desenvolvimento intracelular do parasito. Nos experimentos em que se manteve-se as células por 96 hs de incubação, o

número de parasitos intracelulares foi maior do que o encontrado 24 hs após a infecção. O período de 96hs de incubação permitiu-nos quantificar com segurança os parasitos em cada célula VERO infectada (Gráfico 4.5).

Tripomastigotas sanguíneos e tripomastigotas de cultura são muito similares em vários aspectos (da Silva *et al.*, 1988), porém, diversos trabalhos têm indicado diferenças na infectividade *in vitro*. Isto também foi observado em nossos experimentos (Gráfico 4.4), pois obteve-se um perfil de infecção maior quando utilizado a cepa Dm28c (*T. cruzi* I) do que para CL Brener (*T. cruzi* II). As cepas de *T. cruzi* I (Dm28c) são pouco infectantes para as células hospedeiras e induzem baixa parasitemia *in vivo*, pois expressam a glicoproteína gp90 que está relacionada com a inibição da mobilização do cálcio requerido para a invasão celular (Ruiz *et al.*, 1998). As pertencentes ao grupo *T. cruzi* II (CL Brener) são altamente infectivas para o hospedeiro vertebrado e não expressam a gp90 (Ruiz *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1999). Quando comparamos o perfil de infecção das cepas de ZIII (3663 e 4167) vimos que mesmo estando alocadas dentro do mesmo grupo, as cepas possuem comportamentos diferentes, pois 4167 apresentou um perfil de infecção como CL Brener (*T. cruzi* II), já a 3663 obteve uma baixa infectividade quando comparada com os resultados obtidos com as cepas de referência (Gráfico 4.4). Os experimentos descritos anteriormente foram realizados utilizando tripomastigotas de cultura e uma correlação segura não deve ser feita, pois como já foi relatado por Kloetzel (1984) e Toma (2000), diferenças significativas existem entre tripomastigota de cultura e tripomastigota sanguíneos. As diferenças entre as cepas, assim como as observadas nos experimentos de infecção e curva de crescimento, podem refletir distintos estados fisiológicos de subpopulações do parasito, além das diferenças fenotípicas e genotípicas. Outro ponto importante refere-se ao fato das formas de cultura não apresentarem algumas características biológicas relevantes observadas em tripomastigotas sanguíneos, tais como componentes de membrana que podem influenciar a endocitose, interferindo no perfil diferenciado da infecção (Nogueira *et al.*, 1980; Toma *et al.*, 2000).

Para a determinação da fase em que os parasitos seriam coletos para obtenção da preparação de proteínas utilizada nos experimentos de eletroforese bidimensional, realizamos experimentos de curvas de crescimento das cepas 3663 e 4167 em meio LIT, onde foram determinados os picos de crescimento no 10º e 4º dias, respectivamente (Gráfico 4.1), momentos estes em que os parasitos foram coletados para a extração de proteínas solúveis.

A utilização da análise proteômica nos possibilita o estudo do nível de expressão gênica em condições específicas e a identificação de proteínas que sofrem modificações pós-

traducionais comumente encontradas no *T. cruzi*, e que não são detectadas por análise do genoma.

A análise protéica utilizando eletroforese bidimensional de proteínas totais solúveis de formas epimastigotas das cepas 3663 e 4167 mostrou-se reproduzível (Figuras 4.10 e 4.11), demonstrando que a padronização da preparação de proteínas e das condições de focalização isoeétrica foram satisfatórias. Os ensaios realizados na faixa de pH 3-10 revelaram uma grande diversidade de *spots* entre as cepas 3663 e 4167. Entretanto, quando a faixa de pH foi diminuída (4-7) houve um aumento no número de *spots* revelados. A análise computacional das imagens dos géis (proteínas solúveis na faixa de pH 4-7) das cepas 3663 e 4167 mostraram a presença de 300 e 325 *spots* respectivamente, sendo 181 comuns a ambas (Figura 4.12). Uma diversidade considerável na expressão de proteína, bem como na intensidade de vários *spots* também foi observada entre as cepas estudadas (Figuras 4.15 e 4.16). Algumas das limitações encontradas na eletroforese 2D, foi a dificuldade de detecção de proteínas pouco abundantes e a possibilidade de analisar somente uma única amostra por gel. Em contra partida, a fácil manipulação, a reprodutibilidade e a alta resolução alcançada por esta metodologia foram pontos fundamentais para a sua escolha.

Atualmente, em estudos proteômicos, a estratégia de escolha utilizada na identificação de proteínas tem sido a espectrometria de massa, principalmente devido a sensibilidade (Görg *et al.*, 2004). A maioria das proteínas identificadas neste trabalho por espectrometria de massa foi classificada em três grupos funcionais: metabolismo, organização celular e proteína de destino (Tabelas 4.3; 4.4; 4.5 e 4.6). Dos *spots* identificados, somente 5 foram exclusivos da cepa 3663 (*spots* 70, 14, 62, 69 e 11) e 4 exclusivos da cepa 4167 (*spots* 1, 45, 60 e 15). Dos 55 *spots* identificados (25 da cepa 3663 e 30 da cepa 4167) sete foram identificadas como enzimas. As enzimas identificadas no ZIII foram agrupadas em 3 grandes grupos: hidrolases (Nitralase), transferases (Tirosina aminotransferase, cinases e S-adenosilmetionina sintetase) e oxidorredutases (Prostaglandina F, glutathiona peroxidase e triparedoxina peroxidase) estando envolvidas em vias metabólicas diversas.

Algumas reações bioquímicas ocorrem somente no *T. cruzi* e não no hospedeiro mamífero (Pereira *et al.*, 2002; Yarlett *et al.*, 1993). As enzimas envolvidas em tais reações podem ser objetos de futuros estudos para a determinação de alvos droga-específicos para a doença de Chagas. Novas e efetivas drogas no combate as doenças tropicais, como a doença de Chagas, poderiam reduzir dramaticamente a morbidade dessas entidades em regiões em desenvolvimento como o Brasil e o restante da América Latina.

Todas as células recebem e respondem a sinais vindos do ambiente ao seu redor. A ligação da maioria das moléculas sinalizadoras com seus receptores inicia uma série de reações intracelulares, através de vias de sinalização, que regulam todos os aspectos do comportamento celular, incluindo metabolismo, movimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação (Cuatrecasa, 1985). A sinalização celular é feita por sistemas de regulação, envolvendo proteínas cinases, fosfatases, proteína G e mensageiros secundários, entre outros (Neer, 1995).

O *spot 34* foi identificado como proteína cinase C na cepa 3663 (Tabela 4.3). A Proteína cinase C é uma enzima amplamente distribuída em tecidos e órgãos de mamíferos e outros organismos (Inoue *et al.*, 1977; Kikkawa *et al.*, 1982). Esta proteína é dependente de Ca^{+2} e fosfolípídeo e é ativada por diacilglicerol (DAG) (Michell, 1975). As PKC α – proteínas cinases C convencionais ou dependentes de Ca^{+2} são ativados por Ca^{+2} , DAG e fosfatidilserina (um fosfolípídeo de membrana) (Liu & Heckman, 1998). Na maioria dos tecidos, em condições de repouso, a PKC apresenta-se sob uma forma solúvel inativa. Porém, quando ativada, é encontrada sob uma forma fortemente associada à membrana da célula, participando de muitos eventos celulares (Nishizuka, 1984). Uma vez ativada, promove a fosforilação (dependente de ATP) de diversas proteínas, desencadeando várias reações celulares, como proliferação e diferenciação celular, alterações na expressão de receptores de superfície e comunicação intercelular (Ashendel, 1985).

Recentemente, foram descritas caracterizações moleculares e bioquímicas da arginina cinase em *T.cruzi* (Pereira *et al.*, 1999; 2000), identificada na cepa 4167 (Tabela 4.4). Desde então, arginina cinase foi considerada uma enzima importante na produção de energia do parasito, permitindo que a molécula de ATP seja produzida rapidamente quando necessária e regulando o crescimento celular. Esta forma é ausente em tecidos de mamíferos (Pereira *et al.*, 2002), podendo ser, no futuro, um alvo para desenvolvimento de agentes quimoterapicos contra a doença Chagas e outras doenças parasitárias. Silber e cols (2005), sugeriram que a arginina cinase estaria envolvida na adaptação do parasito a modificações ambientais e condições de *stress*.

A S-adenosilmetionina sintetase, identificada na cepa 4167 (Tabela 4.4), catalisa a produção de S-adenosilmetionina, importante em vários processos celulares, como síntese de poliamina essencial para o crescimento do parasito e instalação da infecção no hospedeiro (Jiang *et al.*, 1999; Reguera *et al.*, 2002). Duas isoformas desta proteína foram anteriormente identificados e o mecanismo da ação é suficientemente diferente da encontrada em mamíferos podendo ser um alvo de droga (Yarlett *et al.*, 1993).

Dois *spots* identificados na cepa 3663 (*spots* 25 e 71) correspondem a desidrogenase *old yellow enzyme* (TcOYE) e uma prostaglandina F2 α sintase identificada na cepa 4167 (*spot* 91) pertencem à família das oxidorreduções flavina-dependente (Kubata *et al.*, 2002; Tabelas 4.3 e 4.4). TcOYE é uma NADPH oxidorredução que contém flavina mononucleotídeo (FMN) como grupo prostético que catalisa a síntese de prostaglandina F2 α . Esta enzima pode reduzir também agentes tripanocidas (nifurtimox e outros) ou hidroperóxido (Williams *et al.*, 2002). Foi sugerido que esta enzima seria responsável pela maior parte da atividade antioxidante em *T. cruzi* (Kubata *et al.*, 2002). Murta e cols (2005) classificaram previamente os zimodemas (ZI, ZII e ZB-CL Brener) para analisar os polimorfismos em TcOYE, e mostraram que alguns polimorfismos descobertos em TcOYE e na sequência dos aminoácidos das cepas de *T. cruzi* se associam com zimodema. A presença desta proteína com diferentes pesos moleculares nos grupos *T. cruzi* I e II, como observado pelo nosso grupo, sugere uma necessidade de estudar esta proteína mais detalhadamente.

A enzima triparedoxina peroxidase (TXNPx) está relacionada à família peroxirredoxinas. A TXNPx faz parte do sistema antioxidante dos kinetoplastídeos e é essencial para a sobrevivência do parasito em ambientes altamente oxidantes no intestino do inseto vetor e nos macrófagos humanos (Levick *et al.*, 1998; Flohé *et al.*, 2002). Esta enzima pode estar relacionada com a virulência do parasito como demonstrado em *Leishmania* (Clemens *et al.*, 1999; Ejiri *et al.*, 2002;). O *spot* 46 (Figura 4.16) identificado na cepa 4167 como triparedoxina peroxidase parece estar mais expresso nesta cepa do que na cepa 3663 (Figura 4.15), corroborando com o resultado encontrado nos experimentos de infecção em células VERO (Gráfico 4.4), sugerindo que esta cepa seja mais virulenta.

O *spot* relativo à proteína ribossomal P-JL5 presente em ambas as cepas apresentou uma expressão diferenciada (figura 4.16). As proteínas P ribossomais são componentes da subunidade maior dos ribossomos que estão envolvidas na etapa de translocação na síntese de proteínas. As proteínas P não são uma necessidade absoluta para síntese de proteína, mas regulam a atividade da subunidade 60S, afetando diferencialmente a tradução de certos RNAm. A eficiência reduzida dos ribossomos deficientes em proteína P pode afetar a taxa de tradução, dependendo da estrutura secundária do RNAm (Remacha *et al.*, 1995). As proteínas P de *T. cruzi* apresentam uma sequência que difere da sequência consenso P de outros eucariotos. Esse motivo conservado apresentou reatividade cruzada entre o parasito e seu hospedeiro mamífero e tem sido apontado como um dos epítomos que induzem a autoimunidade na doença de Chagas (Motrán *et al.*, 1998; 1999). Levin e cols (1993) demonstraram que pacientes com cardiopatia chagásica crônica apresentam uma forte

resposta humoral contra a porção C-terminal clonada da proteína P ribossomal de *T. cruzi*. O peptídeo clonado compartilhava mais de 90% de homologia com a região C-terminal da proteína P ribossomal humana, que é alvo de auto anticorpos anti-P em lupus eritematoso sistêmico (Levin *et al.*, 1989). O fato dos dados terem mostrado que esta proteína é mais expressa na cepa 4167 (Figura 4.16) e a região desta proteína ser altamente imunogênica em pacientes chagásicos crônicos com cardiopatia, poderia corroborar o achado mais prevalente de cardiopatia chagásica nas regiões onde predominam o *T. cruzi II* (CL Brener) (Luquetti *et al.*, 1986; Fernandes *et al.*, 1998a) sendo este resultado compatível com o perfil de infecção encontrado neste estudo, onde 4167 teve um comportamento *in vitro* semelhante a CL Brener. De forma oposta a este raciocínio, poderíamos argumentar que qualquer manifestação patogênica oriunda de autoimunidade deveria ser fruto de uma interação *in vivo* e crônica.

Foram identificadas também *heat shock proteins* (HSP) em ambas as cepas estudadas (Tabela 4.3 e 4.4). Estas proteínas estão envolvidas na resposta ao *stress* (Hartl e Hayer-Hartl, 2002). Existem várias isoformas de HSP70 e proteína HSP60 em *T. cruzi*. As diferentes isoformas de HSP70 e HSP60 têm a mesma massa molecular (70 e 60 kDa, respectivamente), mas pontos isoelétricos diferentes. O HSP60 é uma proteína mitocondrial que é expressa constitutivamente e induzida por calor (Giambiagi-Demarval *et al.*, 1996).

Quatro *spots* diferentes foram identificados como a beta tubulina na cepa 3663 e na 4167. Alguns deles foram retirados do gel na região de aproximadamente de 50KDa lugar correspondente a peso molecular esperado de tubulinas (por exemplo os *spots* 29,31 e 71 da cepa 3663), ao passo que os *spots* 20 (cepa 3663) e 15,20,22 e 88 (cepa 4167) tiveram pesos moleculares menores (Figura 4.13 e 4.14). O mesmo aconteceu com a alfa tubulina identificada na cepa 3663 (*spot* 11) que também apresentou um peso molecular inferior a 50KDa. Resultados similares foram descritos em *Leishmania*, no mapeamento do proteoma deste parasito vários fragmentos de tubulina de tamanhos diferentes foram identificados, e a presença de mais fragmentos menores foi associada ao envelhecimento das culturas do parasito (Drummelsmith *et al.*, 2003). Contudo, nosso estudo foi sempre realizado na fase exponencial de crescimento do parasito para a obtenção dos mapas 2D como descrito por Parodi-Talice e cols em 2004, onde observaram o mesmo perfil encontrado em nosso trabalho. Embora não possamos excluir a possibilidade de que alguns *spots* podem resultar da degradação da proteína durante os procedimentos analíticos; é notável que esses fragmentos menores de tubulinas estiveram presentes em todos os experimentos. É possível que esses

fragmentos sejam os produtos resultantes de proteólises e/ou modificações extensas de produtos primários (Serrano *et al.*, 1986).

A grande variabilidade biológica e genética encontrada nessa espécie pode ser explicada pelos múltiplos contatos entre os vetores e reservatórios nas áreas endêmicas, os quais proporcionaram infecções com mais de uma população de *T. cruzi*, que coexistiram dentro de um mesmo hospedeiro, sem recombinação entre eles, constituindo as cepas monoclonais e policlonais (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc & Ayala, 1991).

Inúmeros estudos de biologia molecular já foram realizados com o objetivo de classificar os grupos de *T. cruzi* e com isso posicionar filogeneticamente o ZIII. Através da abordagem proteômica, mais um passo foi dado para uma compreensão da posição de ZIII. Os resultados preliminares podem ser o ponto de partida para um melhor entendimento da biologia do parasito e para a elucidação da posição de ZIII. Foi possível observar uma diversidade considerável na expressão de proteínas, assim como na intensidade de diversos *spots*. Fatos estes também observados quando ZIII foi comparado com os grupos *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, onde ZIII compartilhou 155 *spots* com *T. cruzi* I e 137 *spots* com *T. cruzi* II (Figura 4.19 e 4.20). Porém, uma avaliação da posição de ZIII em relação aos grupos *T. cruzi* I ou II ainda é muito precoce, pois seria necessária a utilização de um número amostral mais significativo.

Este foi o primeiro passo nos estudos da obtenção do mapa protéico e expressão de proteínas para ZIII. Comparações entre os mapas protéicos, assim como na expressão diferencial de proteínas de cada forma evolutiva do parasito nos permitirão identificar possíveis alvos candidatos a ação de drogas. Dados proteômicos em conjunto com os dados do genoma de *T. cruzi* fornecerão avanços na compreensão da biologia deste parasito e na identificação de fatores-chave da virulência, de resistência e/ou infectividade.

Na realidade esta tese é um subprojeto de um programa institucional de pesquisa induzida e estratégica. A determinação de *spots* protéicos próprios de parasitos e não compartilhados por humanos pode levar ao desenvolvimento de insumos como kits diagnósticos e drogas.

Estima-se que para cada mil componentes descritos de um determinado patógeno, apenas um torna-se produto farmacêutico de relativa eficácia. Para que tal evolução seja alcançada mais rapidamente, atualmente diversas parceiras pública-privadas, principalmente entre a indústria farmacêutica e renomados centros de pesquisa aplicados ao controle de doenças tropicais, vêm agindo em conjunto. Parcerias como essa atualmente possibilitam que

cientistas de países em desenvolvimento tenham acesso a equipamentos e metodologias de ponta no âmbito mundial (Nwaka & Hudson, 2006).

Esta é uma prioridade estratégica para a Fiocruz, revelada pelo lançamento do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), que tem como objetivo estimular a pesquisa aplicada e o desenvolvimento tecnológico de produtos e processos com impacto na saúde pública e no controle de doenças infecto-parasitárias, como vacinas, kits diagnósticos, fármacos, medicamentos e produtos para o controle de vetores. O programa busca o aprimoramento de produtos em potencial, estudando aspectos de aplicabilidade, de produção e de comercialização, partindo do trabalho laboratorial e da pesquisa clínica até a produção piloto e escalonamento. Inclui também a implantação/adaptação de novas tecnologias que possam levar a novas abordagens para a identificação de produtos e processos. Uma das estratégias do programa é fomentar a formação de redes cooperativas para a interação entre pesquisadores, além de promover o compartilhamento de equipes e de equipamentos (<http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>).

6. CONCLUSÕES

- A caracterização molecular utilizando como marcador molecular o gene de mini-exon, confirmou que a identidade das cepas utilizadas neste estudo como pertencentes ao ZIII (cepas 3663 e 4167).
- A caracterização biológica das cepas mostrou que: (i) as cepas 3663 e 4167 foram infectantes para as células VERO, onde houve desenvolvimento intracelular dos parasitos. As taxas de infecção das células VERO pelo clone CL Brener (*T.cruzi* II) e pela cepa 4167 (ZIII) se mostraram com o mesmo perfil. A cepa 3663 (ZIII) se caracterizou como a menos infectiva, (ii) as cepas 3663 e 4167 apresentaram picos de crescimentos diferenciados nos 10^o e 4^o dias, respectivamente.
- A caracterização proteômica utilizando a eletroforese bidimensional possibilitou a obtenção do mapa protéico das proteínas solúveis de formas epimastigotas das cepas 3663 e 4167 na faixa de pH 3-10 e 4-7. A análise computacional dos géis obtidos com as cepas 3663 e 4167 mostraram a presença de 300 e 325 *spots* respectivamente, sendo 181 comuns a ambas. Uma diversidade considerável na expressão de proteínas foi observada entre as cepas estudadas.
- Das 55 proteínas identificadas (25 da cepa 3663 e 30 da cepa 4167) sete foram identificadas como enzimas. A maioria das proteínas identificadas por espectrometria de massa foi classificada em três grandes grupos funcionais: metabolismo, organização celular e proteína de destino.
- ZIII compartilha 155 *spots* com *T.cruzi* I e 137 *spots* com *T.cruzi* II não contribuindo para a melhor definição da posição filogenética deste grupo através desta análise.

ANEXO 1

- **Meio *Liver Infusion* Tryptose - LIT**

Modo de Preparo*** LIT – A 2X**

1 LITRO 2 LITROS

NaCl	8.0 g	16 g
KCL	0.8 g	1.6 g
Na ₂ HPO ₄	16 g	32 g

*** LIT – B 2X**

1 LITRO 2 LITROS

Tryptose (Difco ou Oxiid)	10 g	20 g
Infusão de Caldo de Fígado (Difco)	10 g	20 g

Autoclavar as duas soluções 20 min à 120°C.

*** LIT completo**

1 LITRO 2 LITROS

LIT – A 2X	500mL	1L
LIT – B 2X	500mL	1L
Glicose 0.2g/mL (2g/1 Final)	10mL	20mL
Hemina 50mg/mL (25µg/1 Final)	500µL	1mL
SBF (estéril, 10% final)	100mL	200mL

- Filtrar com filtro com poros de 0.45µm de diâmetro. Manter a 4°C.
- Adicionar 10% Soro Bovino Fetal (SBF) no momento da utilização.
- Filtrar com filtro de poros de 0.2µm de diâmetro.

Ajustar o pH para 7,4

Soro Bovino Fetal – 45 min a 56°C

ANEXO 2

- **Solução de Dissociação (Solução utilizada para a tripsinização das células)**

25% EDTA

25% Tripsina

50% PBS

ANEXO 3

- **Meio N.N.N (Novy, Macneal & Nicolle)**

Preparo de base da Agar

Agar (Bactor Agar, Difco 0140).....3g
NaCl.....1,5g
H₂O.....200ml

Colocar Agar, o sal e a água diretamente em um balão volumétrico de 500cm³ ,
fechando-o com rolha protegida por papel de alumínio. Autoclavar a 120°C por 20min.

Preparo do Agar/sangue

- Desfibrinar o sangue de coelho através de movimentos rotatórios com frasco contendo pérolas de vidro,
- Estando a base de agar com temperatura entre 40-60°C, acrescentar 10-15% do sangue de coelho desfibrinado, homogeneizar bem e distribuir alíquotas entre 3-5ml/tubo de ensaio. Os tubos devem ficar ligeiramente inclinados até endurecimento do agar. Colocar os tubos com meio já solidificado em prova de esterilidade (24h, 37°C).

ANEXO 4

- **Coloração por Giemsa**

- _ Fixar as lâminas com metanol durante 10 min no máximo
- _ Rejeitar o metanol e deixar secar
- _ Cobrir cada lâmina com uma solução de HCl 5N, deixar 10 min
- _ Após, lavar bem as lâminas sob um fluxo delicado de água corrente. Deixar secar.
- _ Cobrir cada lâmina com a solução corante com 3 gotas de giemsa paracada 2mL de Tampão*.Deixar durante 30-40min
- _ Lavar as lâminas rapidamente sob um fluxo delicado de água corrente.Deixar secar.

*Tampão

Fosfato de sódio dibásico.....3g

Fosfato de potássio monobásico.....6g

Água destilada.....100mL

pH entre 7,2 a 7,5

ANEXO 5

- **Fixação em Bouin**

- _ Lavar as lâminas 3 vezes em PBS
- _ Fixar em Bouin* por 5 min em temperatura ambiente
- _ Lavar 3 vezes em álcool 70% e armazenar em álcool 70% até a coloração por giemsa.

*Solução estoque 1:

- _ 75% de solução saturada de ácido picrico em H₂O

- _ 25% de formol

Bouin: Solução estoque + 5% de ácido acético

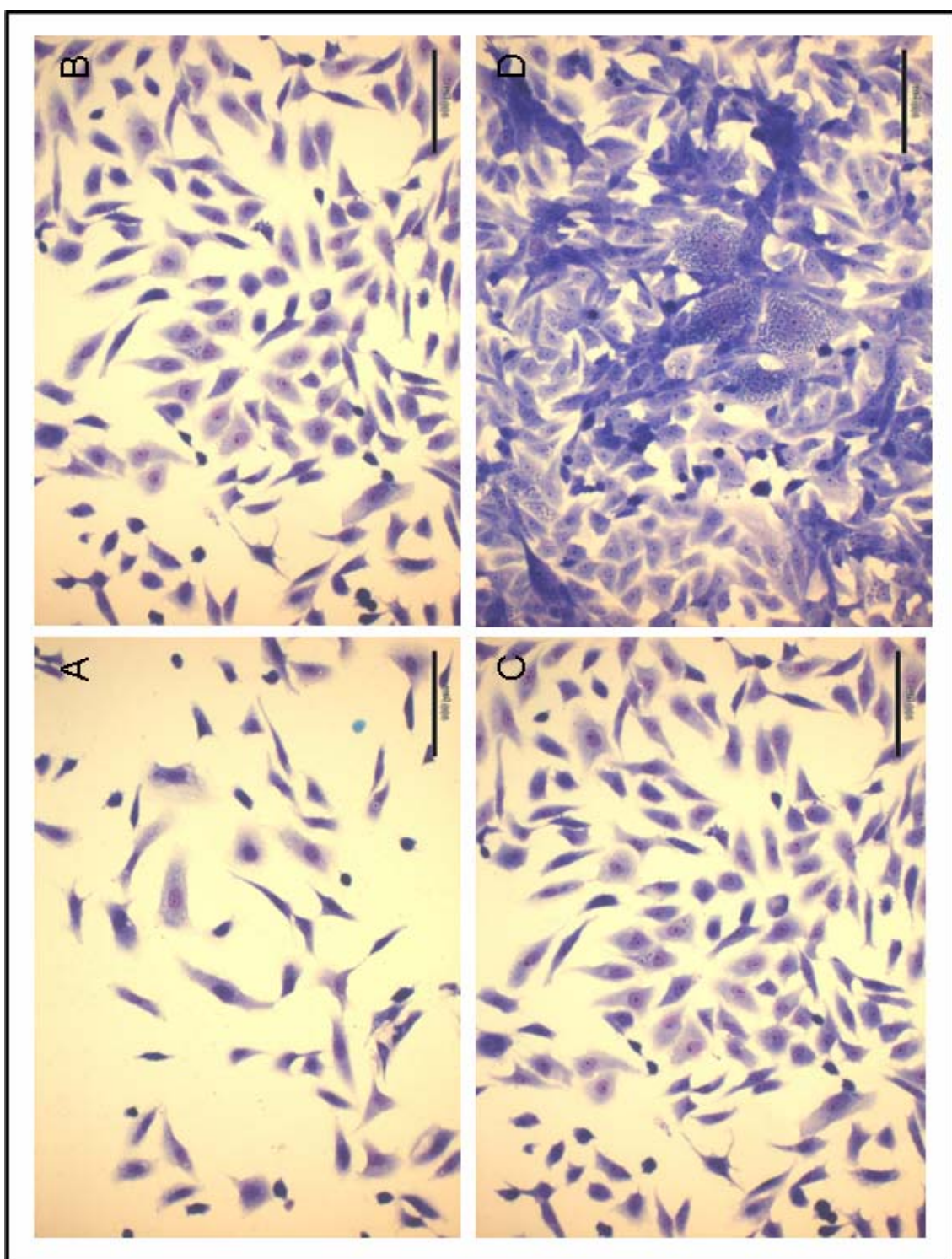
ANEXO 6**• Impregnação por prata**

- _ 10% etanol + 5% de ácido acético - 15 min
- _ 50% metanol + 12% TCA (100%) + 2% de cloreto de cobre - 20min
- _ Etanol 10% + 5% ácido acético - 10min.
- _ 0,01% Permanganato de potássio - 10min.
- _ Etanol 10% + 5% ácido acético - 10min
- _ Etanol 10% - 10min
- _ H₂O milliQ - 10 min
- _ 0,1% nitrato de prata - 10min.
- _ Lavar 1X com H₂O milliQ (rapidamente)
- _ 10% carbonato de potássio - 1 a 2 min
- _ 0,01% Formaldeído + 2% carbonato de potássio – 4 X.5 min
- _ Etanol 10% + 5% de ácido acético - 5min
- _ Água ou Solução de secagem (Etanol 20% + 2% glicerol).

ANEXO 7**• Coloração por Coomassie Coloidal (G-250)**

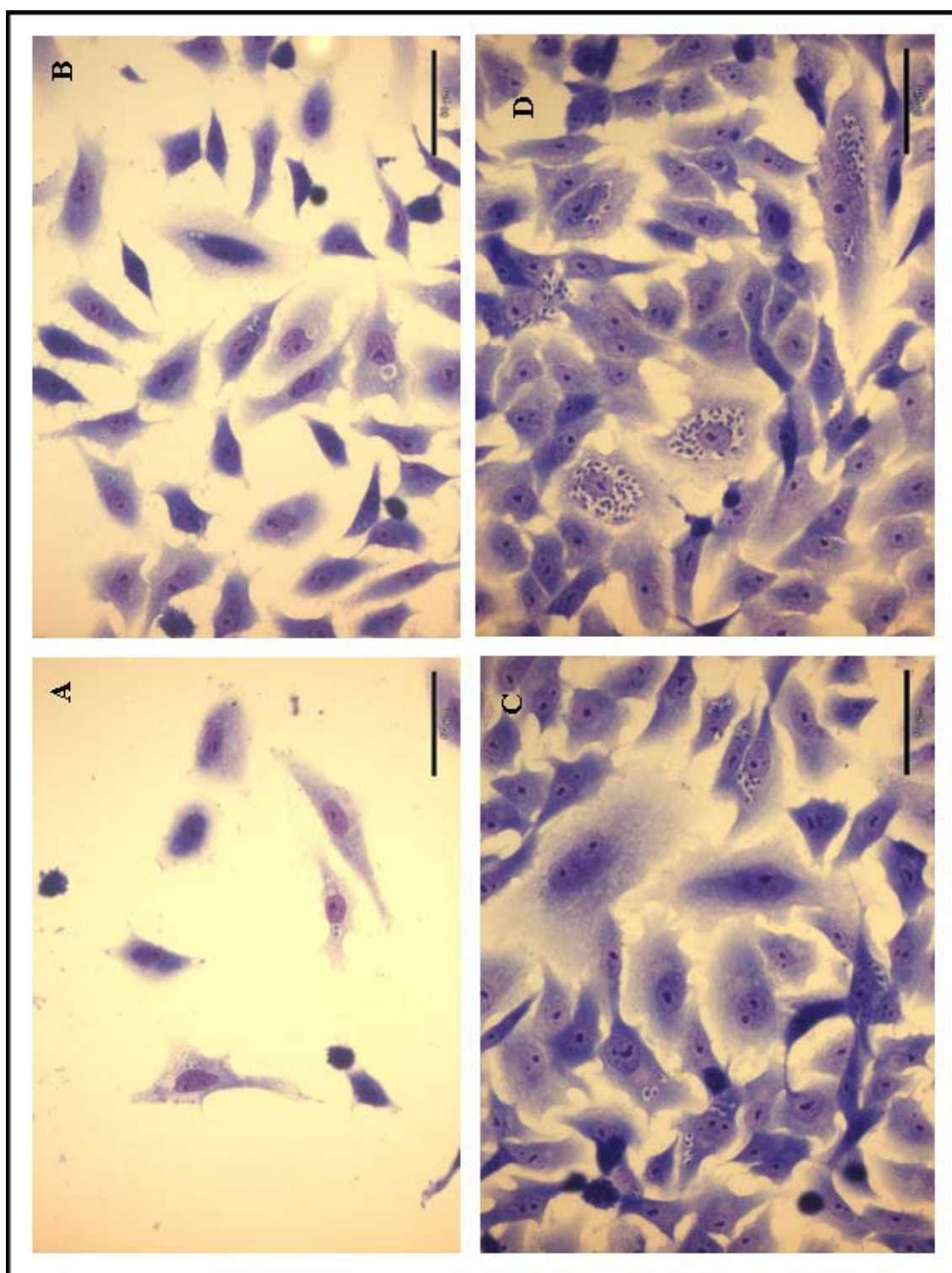
- _ 30% etanol + 2% de ácido ortofosforico (v/v) em água – 3 X 30 min
- _ 2% de ácido ortofosforico (v/v) em água – 3 X 20 min
- _ 18% etanol + 2% de ácido ortofosforico (v/v) e 15% sulfato de amônio (p/v) em água – 30 min
- _ Adicionar 1% do volume da solução utilizada anteriormente uma solução contendo Coomassie Blue G-250 a 0,02 g/mL – 24 a 72 horas

ANEXO 8



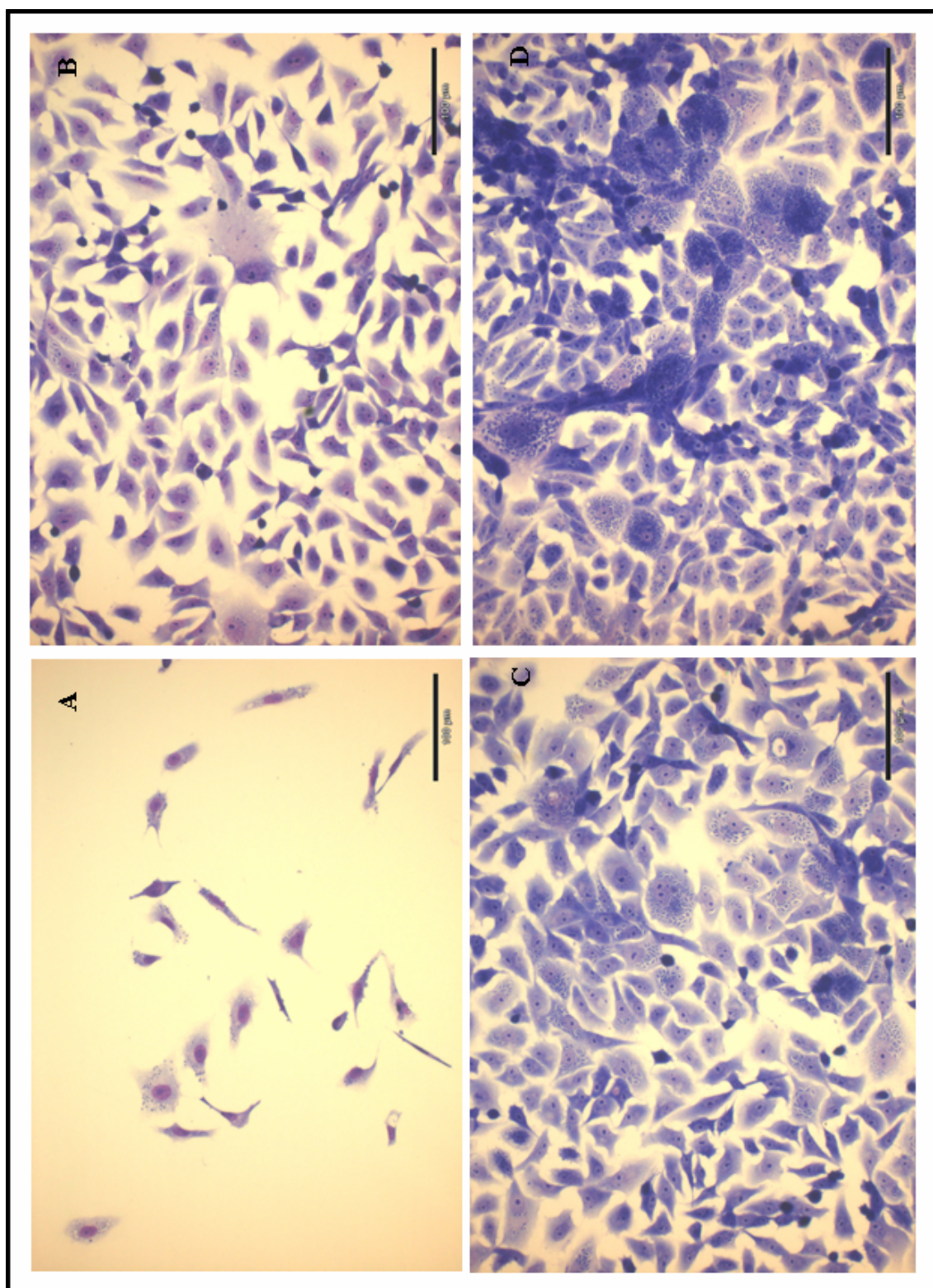
ANEXO 8: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 3663 (A) com 24hs, (B) 48hs, (C) 72hs e (D) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 20 vezes.

ANEXO 9



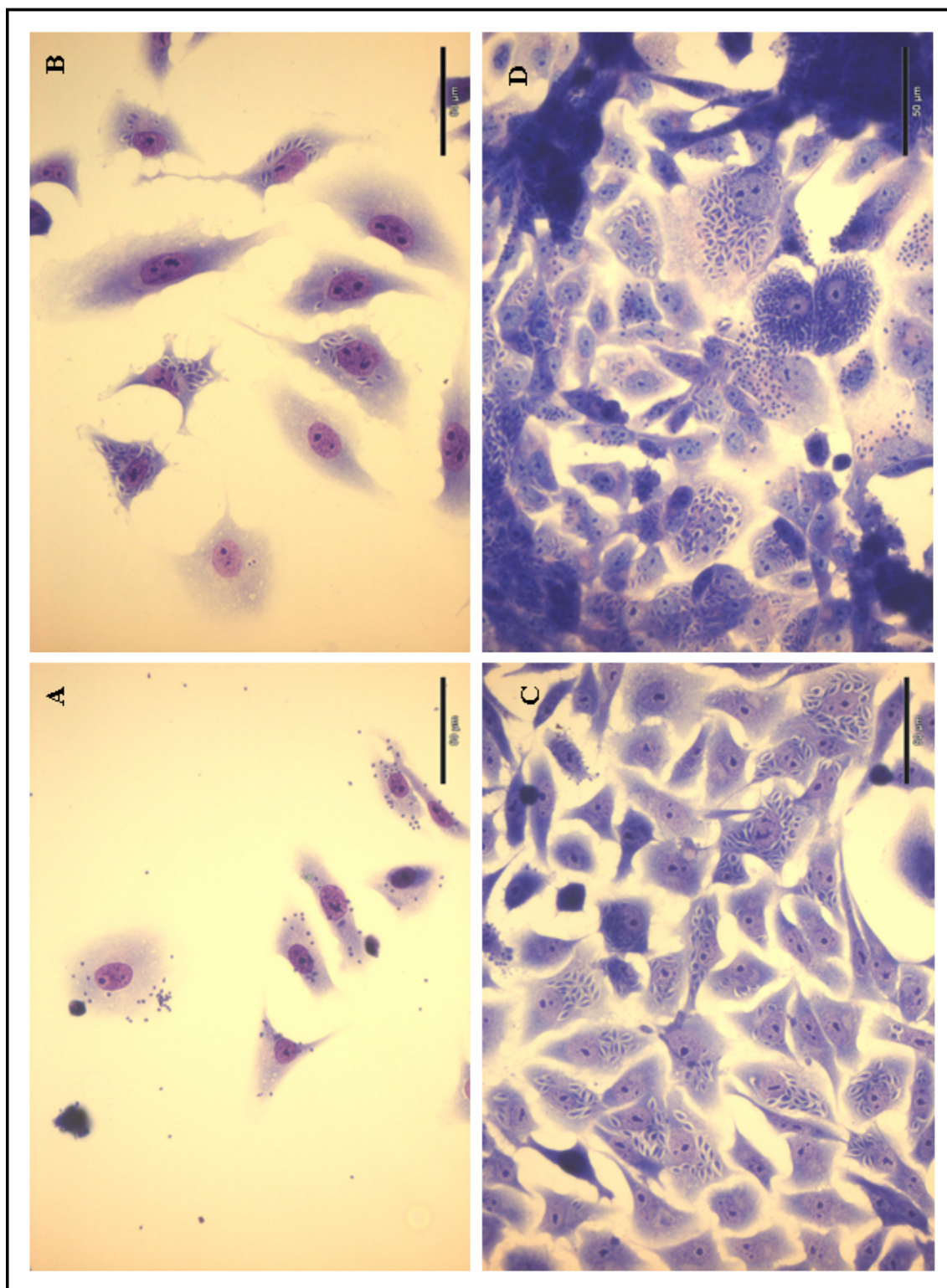
ANEXO 9: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 3663 (A) com 24hs, (B) 48hs, (C) 72hs e (D) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 40 vezes.

ANEXO 10



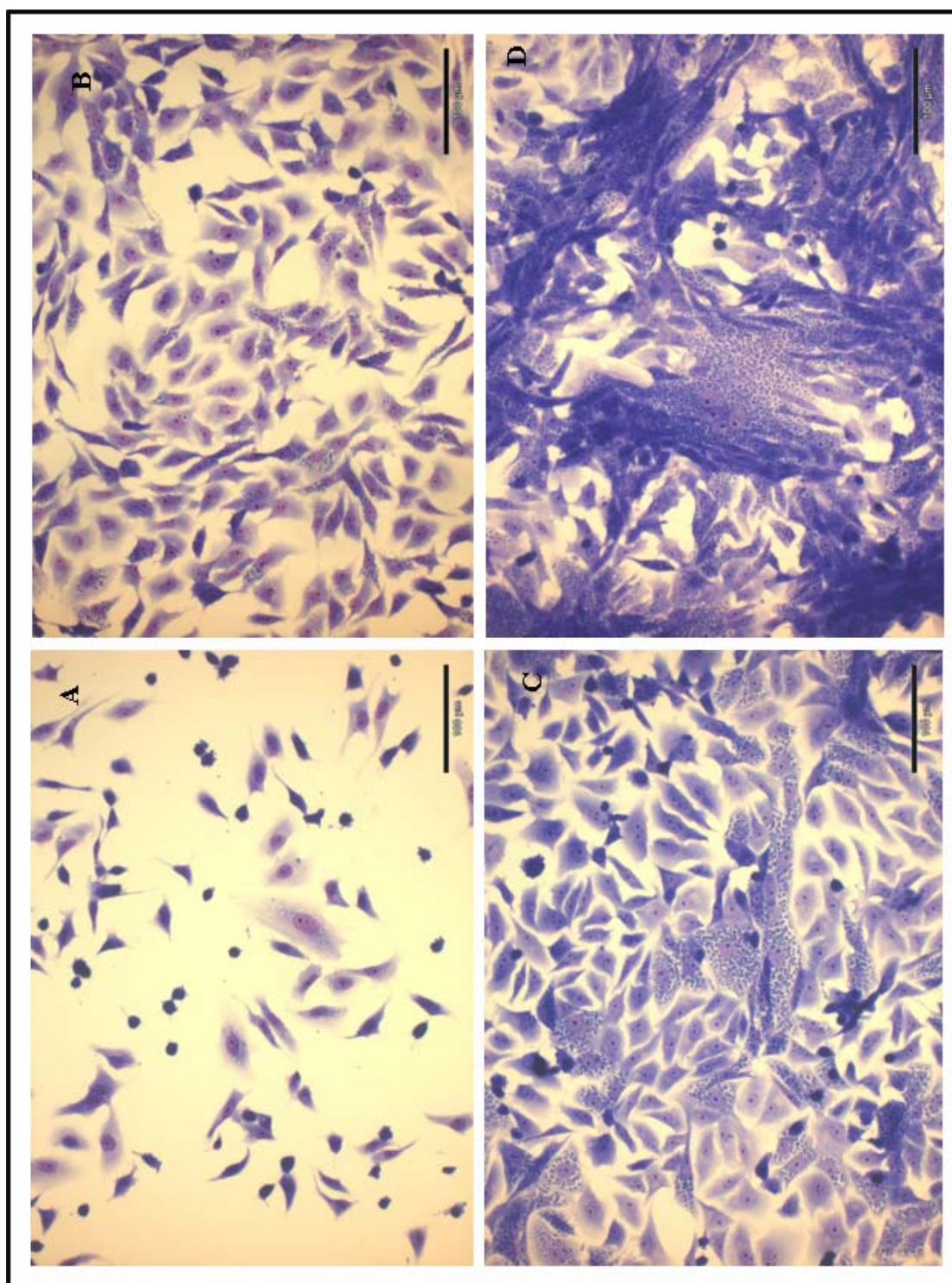
ANEXO 10: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 4167 (A) com 24hs, (B) 48hs, (C) 72hs e (D) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 20 vezes.

ANEXO 11



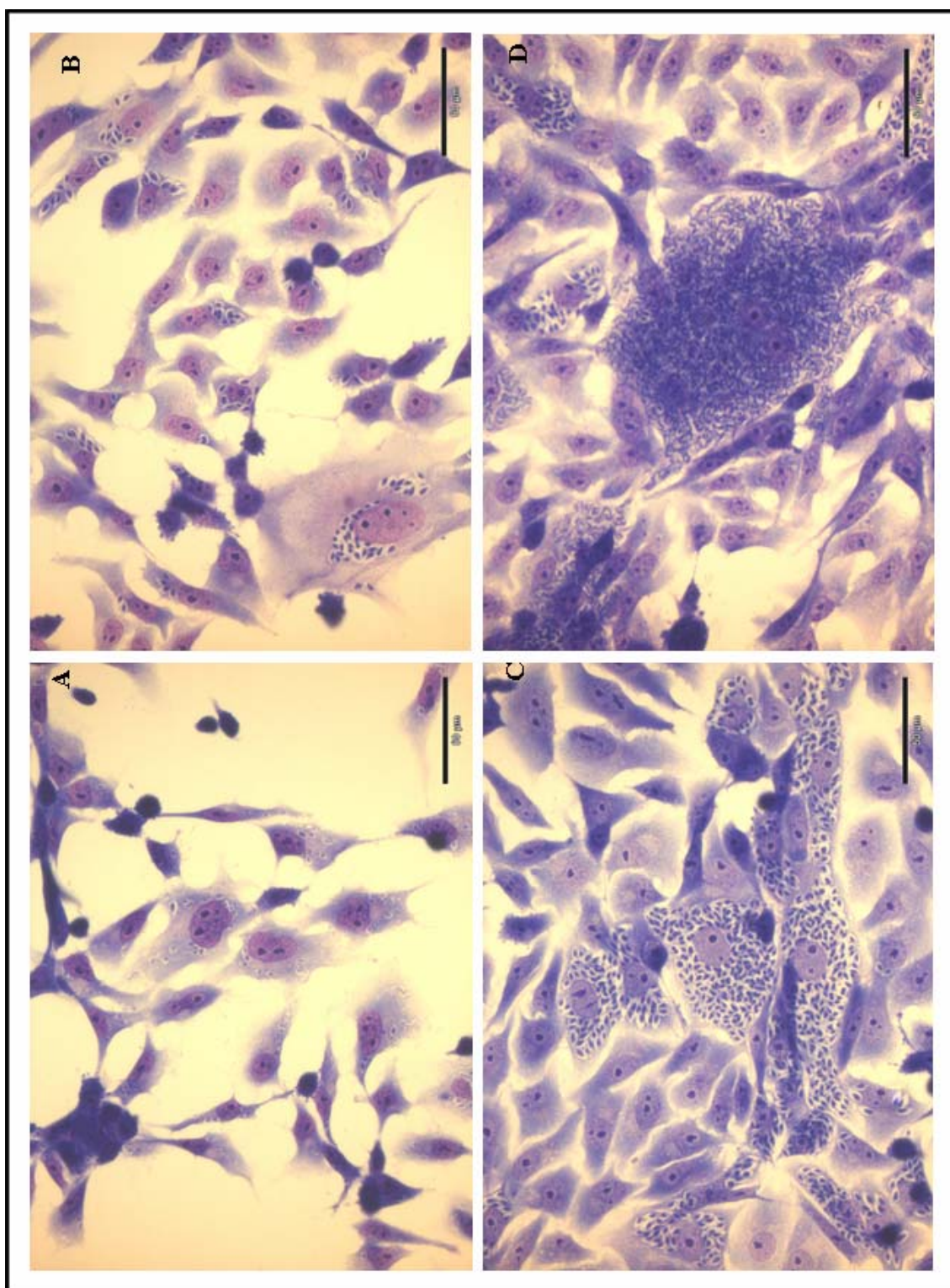
ANEXO 11: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa 4167 (A) com 24hs, (B) 48hs, (C) 72hs e (D) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 40 vezes.

ANEXO 12



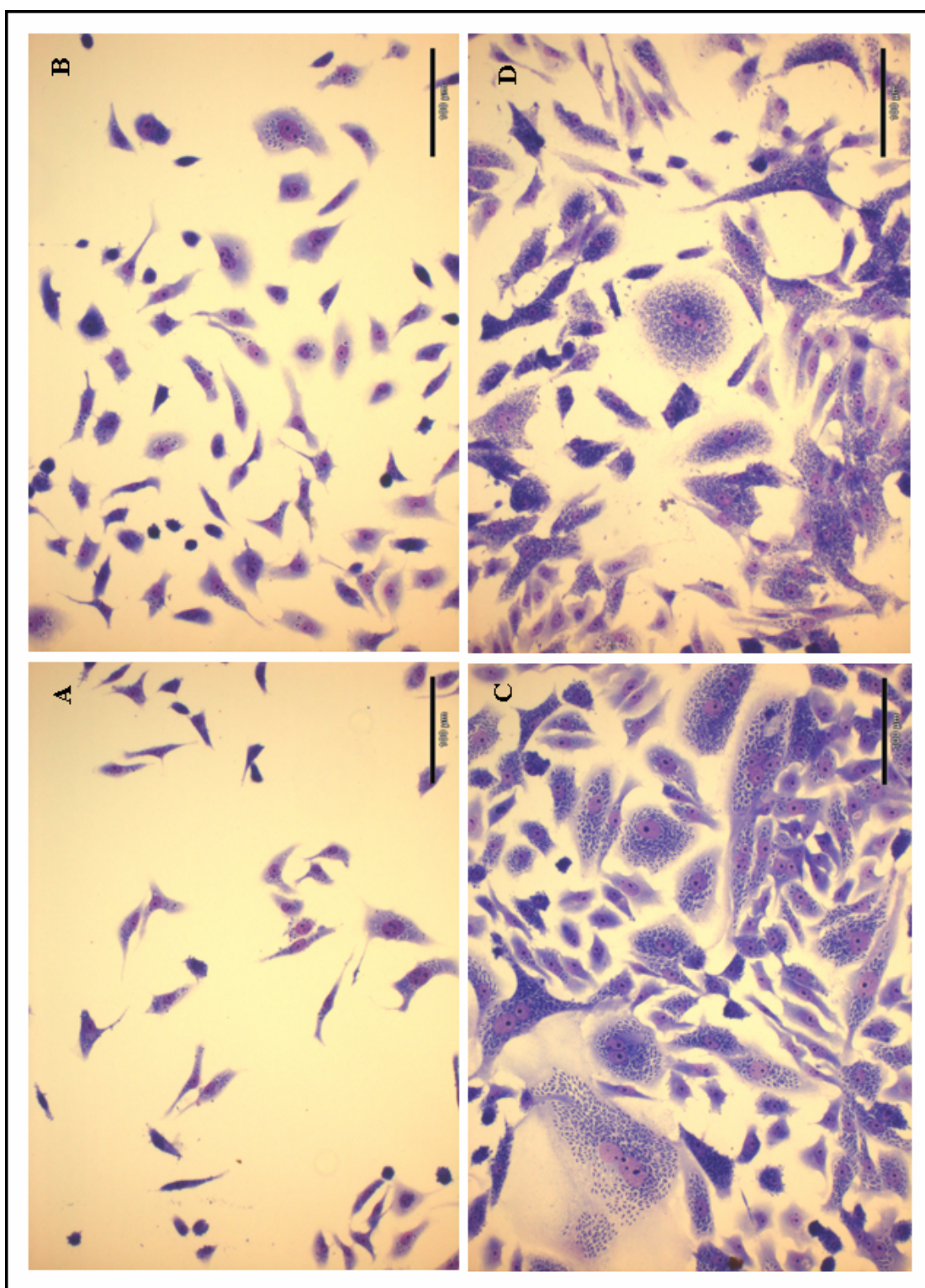
ANEXO 12: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa CL Brener (**A**) com 24hs, (**B**) 48hs, (**C**) 72hs e (**D**) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 20 vezes.

ANEXO 13



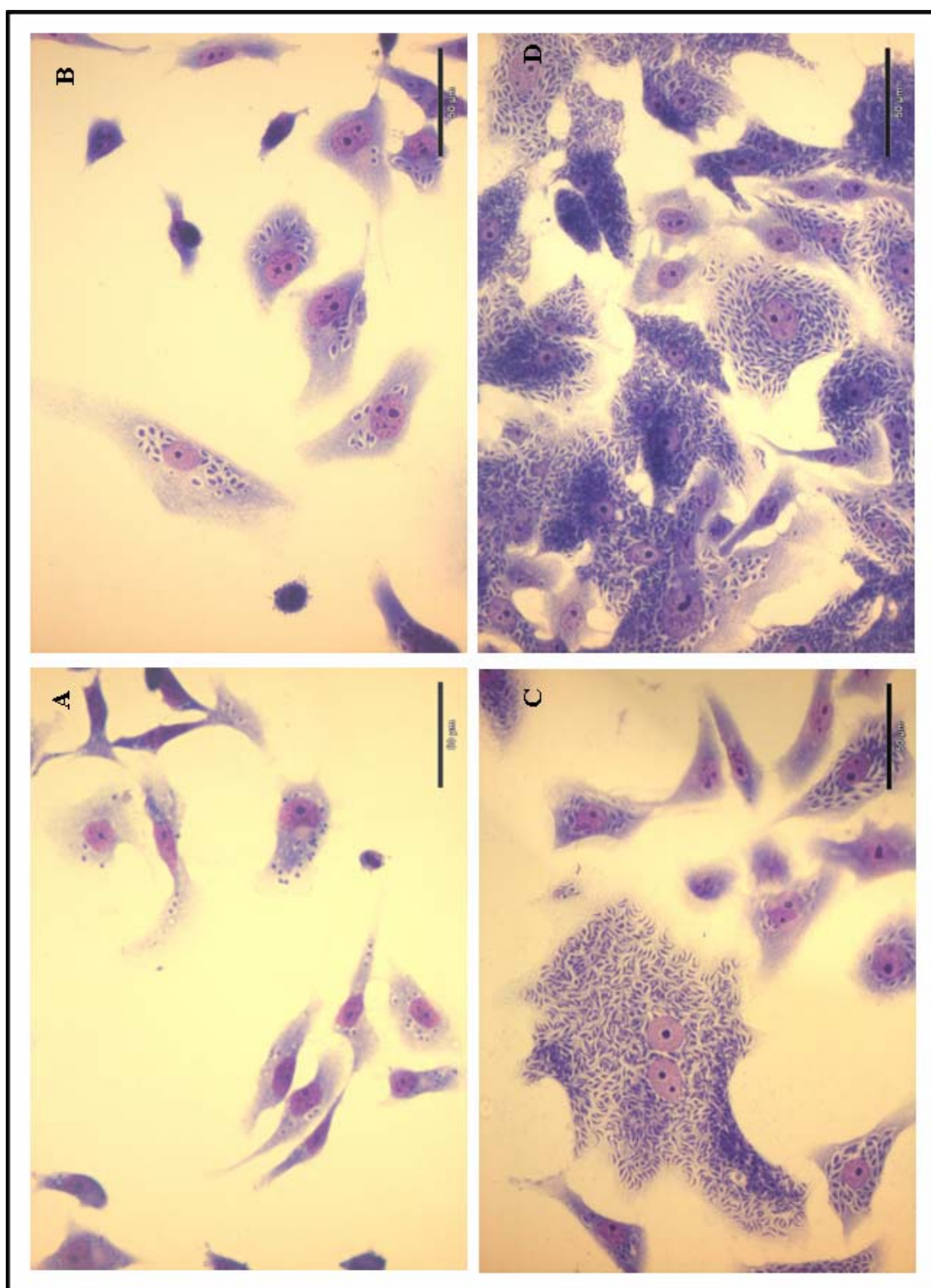
ANEXO 13: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa CL Brener (A) com 24hs, (B) 48hs, (C) 72hs e (D) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 40 vezes.

ANEXO 14



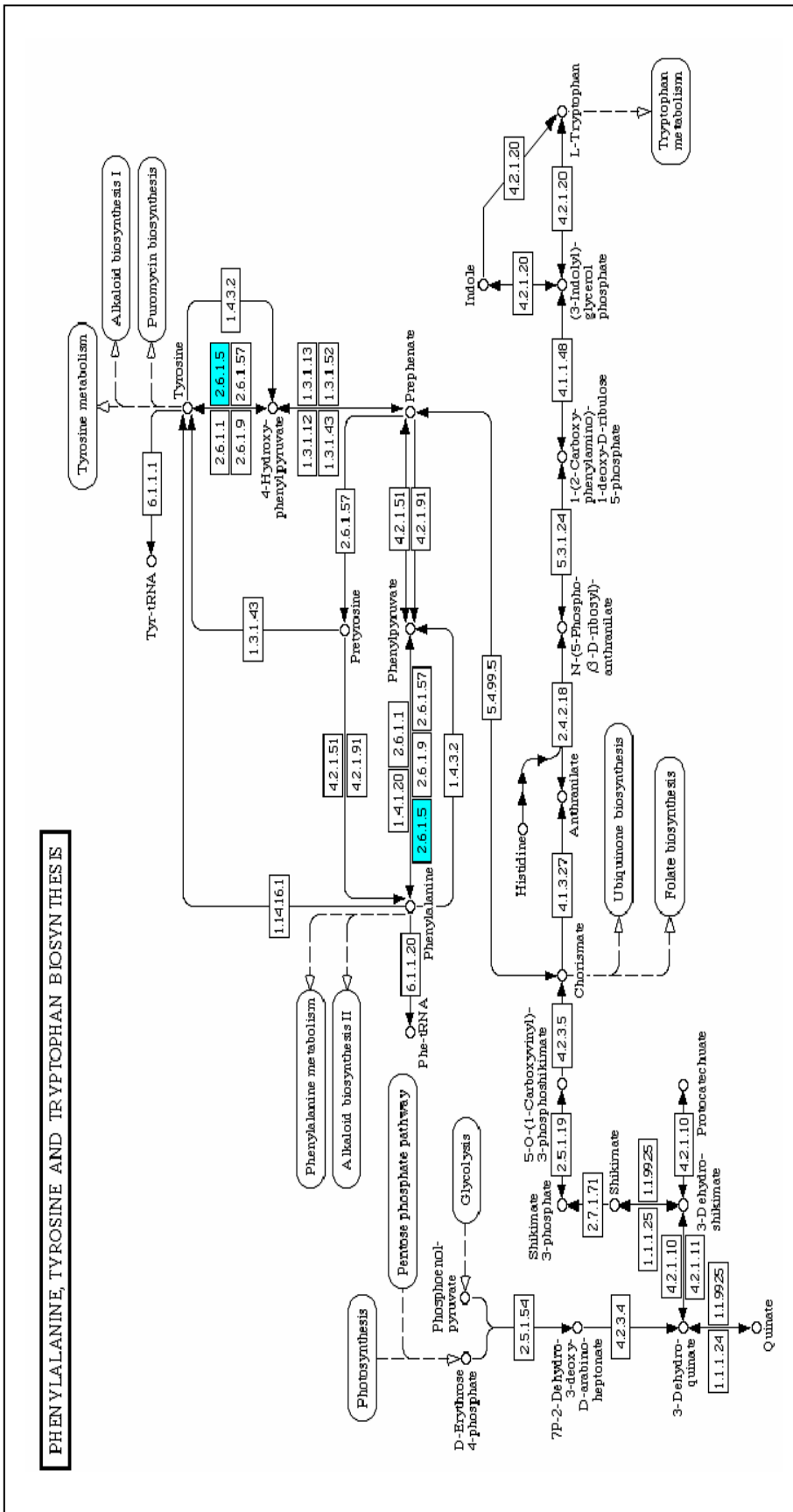
ANEXO 14: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa Dm28c (A) com 24hs, (B) 48hs, (C) 72hs e (D) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 20 vezes.

ANEXO 15



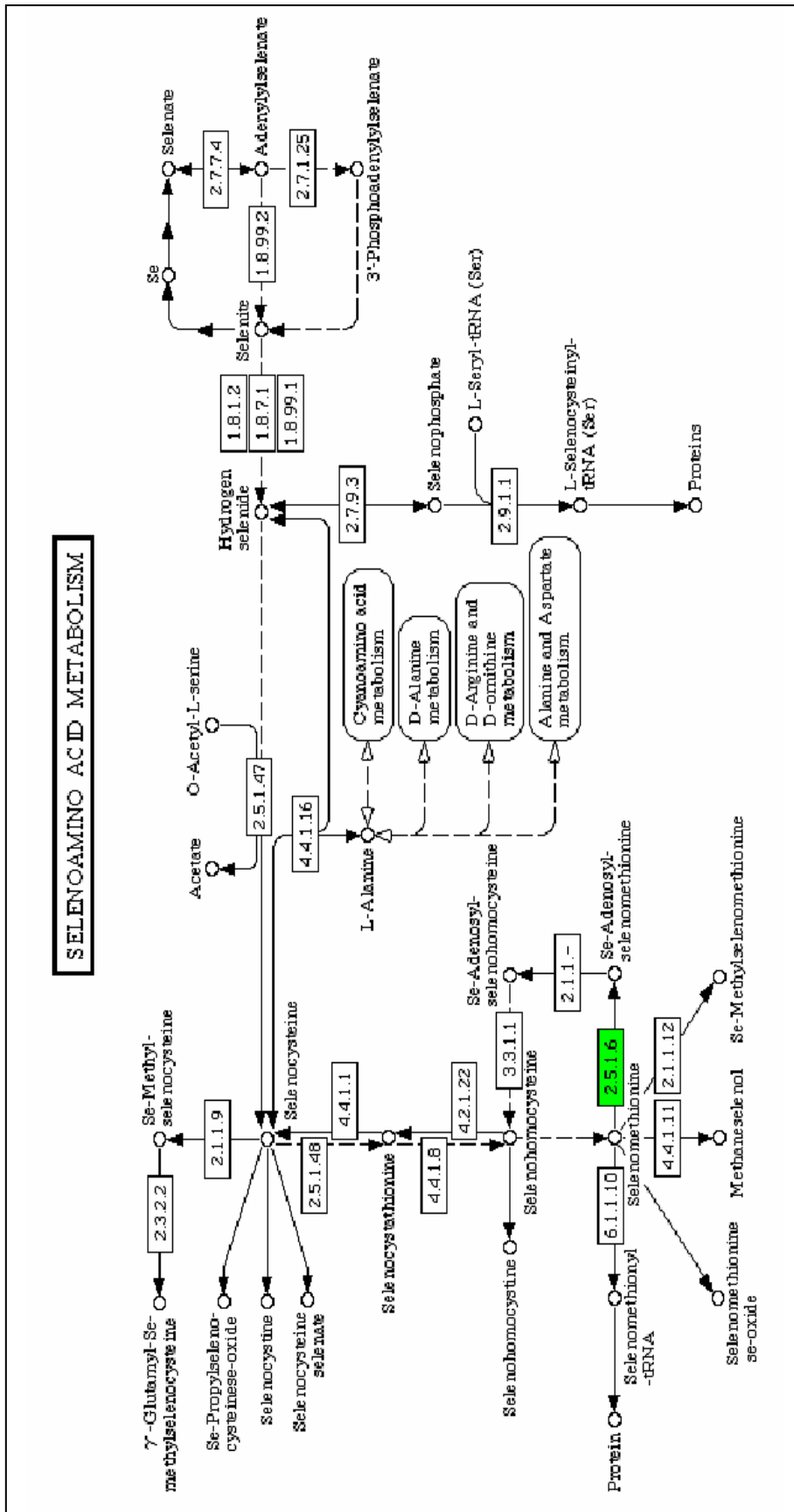
ANEXO 15: Prancha referente as lâminas da cinética de infecção em células VERO da cepa Dm28c (A) com 24hs, (B) 48hs, (C) 72hs e (D) 96hs de infecção. As lâminas foram coradas por giemsa, examinadas em microscópio óptico e fotografadas num aumento de 40 vezes.

ANEXO 21



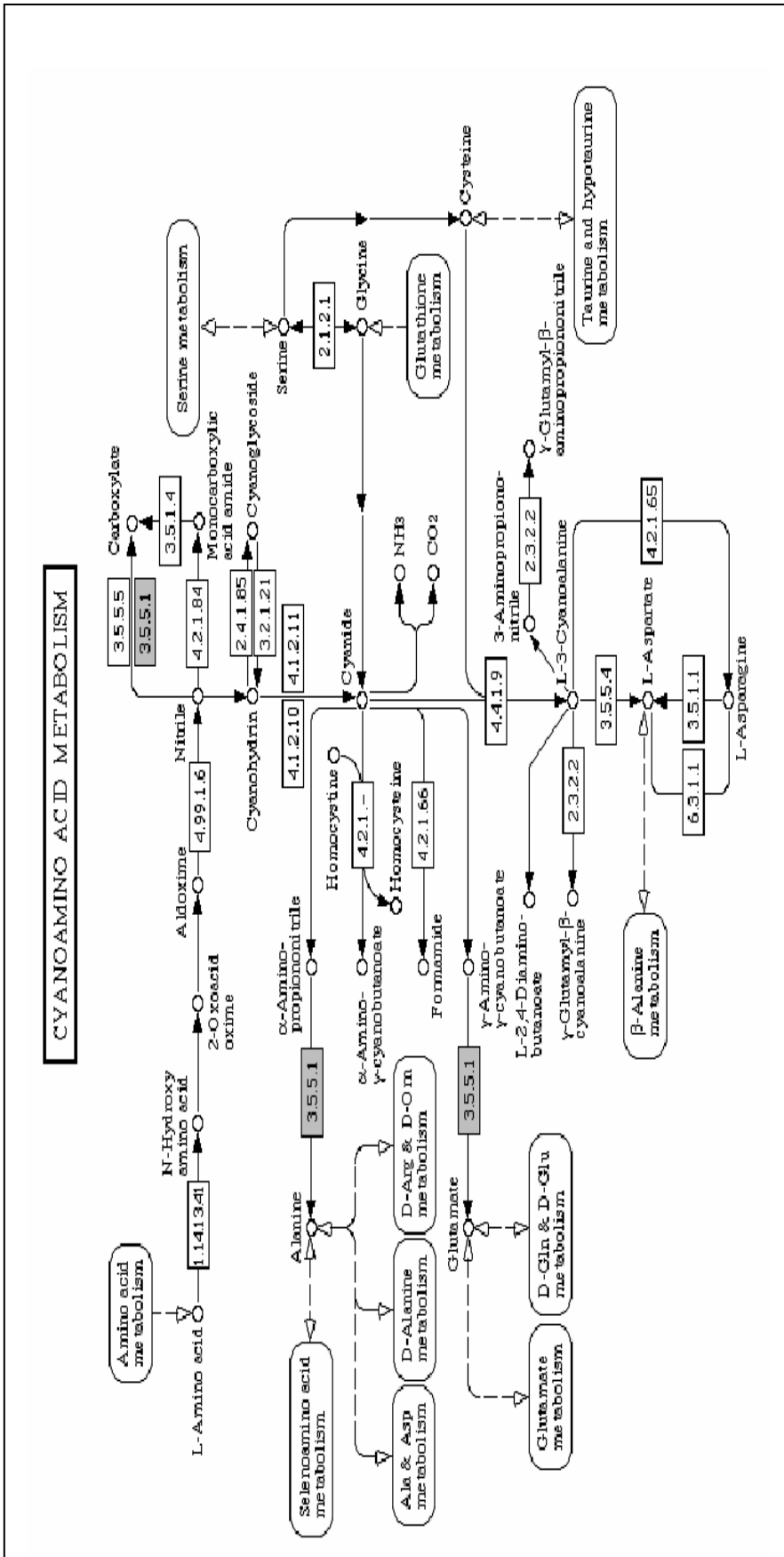
ANEXO 21: Via de Biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano gerada pelo banco de dados do KEGG, onde em azul se encontra localizada a enzima Tirosina aminotransferase (EC number 2.6.1.5) identificada na cepa 4167.

ANEXO 23



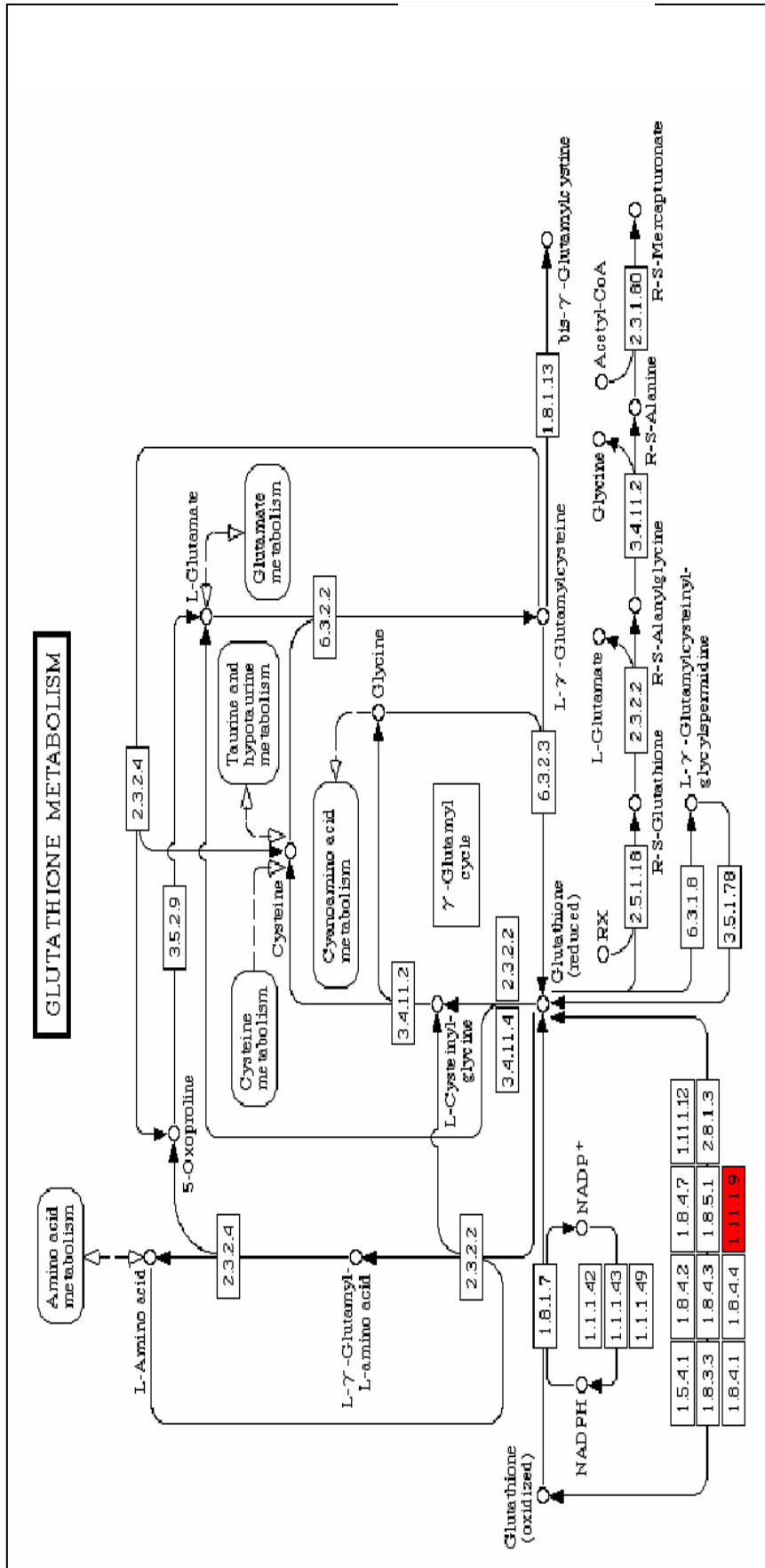
ANEXO 23: Via de Metabolismo do ácido selenoamino gerada pelo banco de dados do KEGG, onde em verde se encontra localizada a enzima S-adenosilmetionina sintetase, putativa (EC number 2.5.1.6) identificadas na cepa 4167 .

ANEXO 24



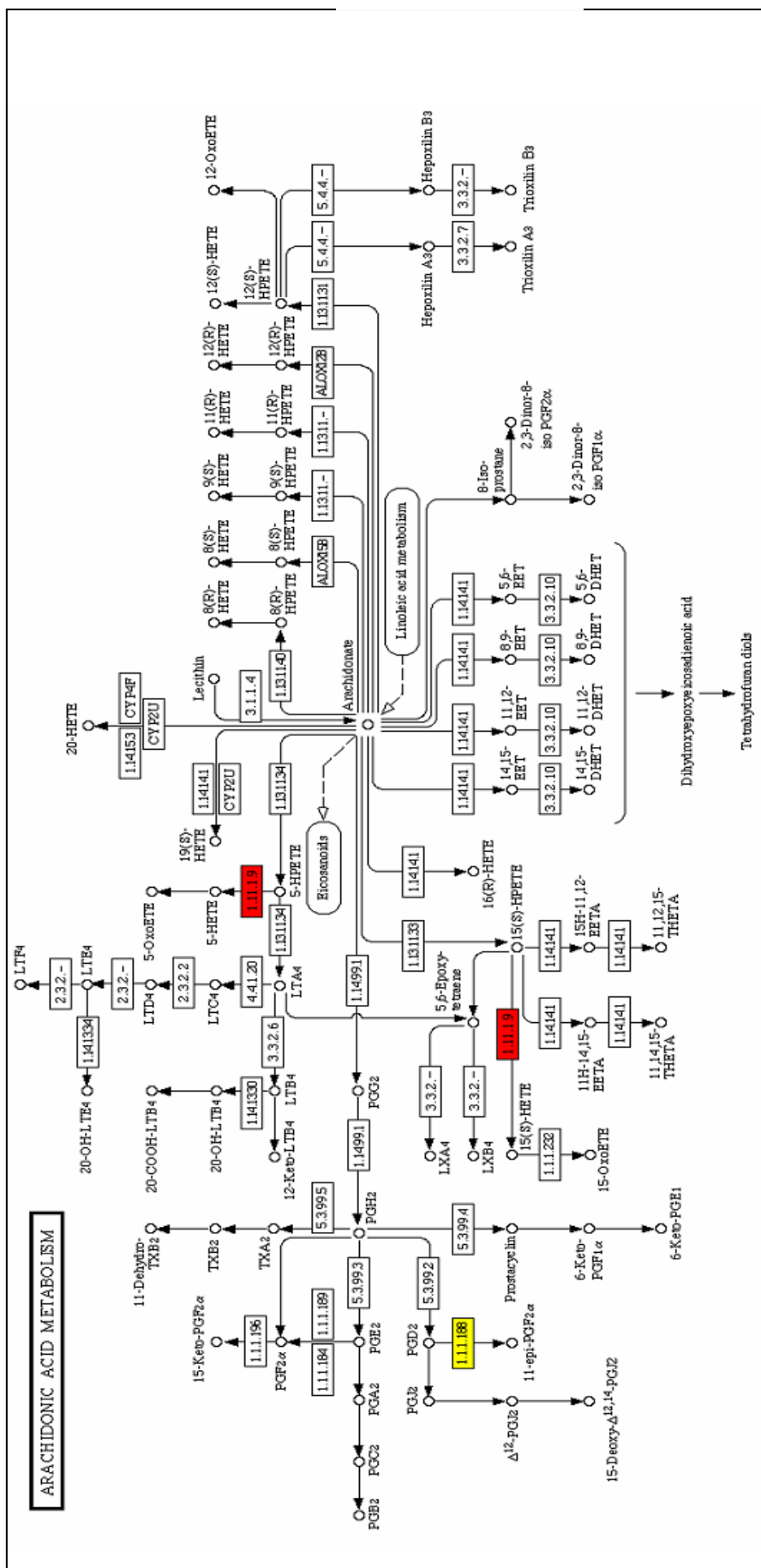
ANEXO 24: Via de Metabolismo do ácido cianoamino gerada pelo banco de dados do KEGG, onde em cinza se encontra localizada a enzima Nitrilase (EC number 3.5.5.1) identificada na cepa 4167.

ANEXO 25



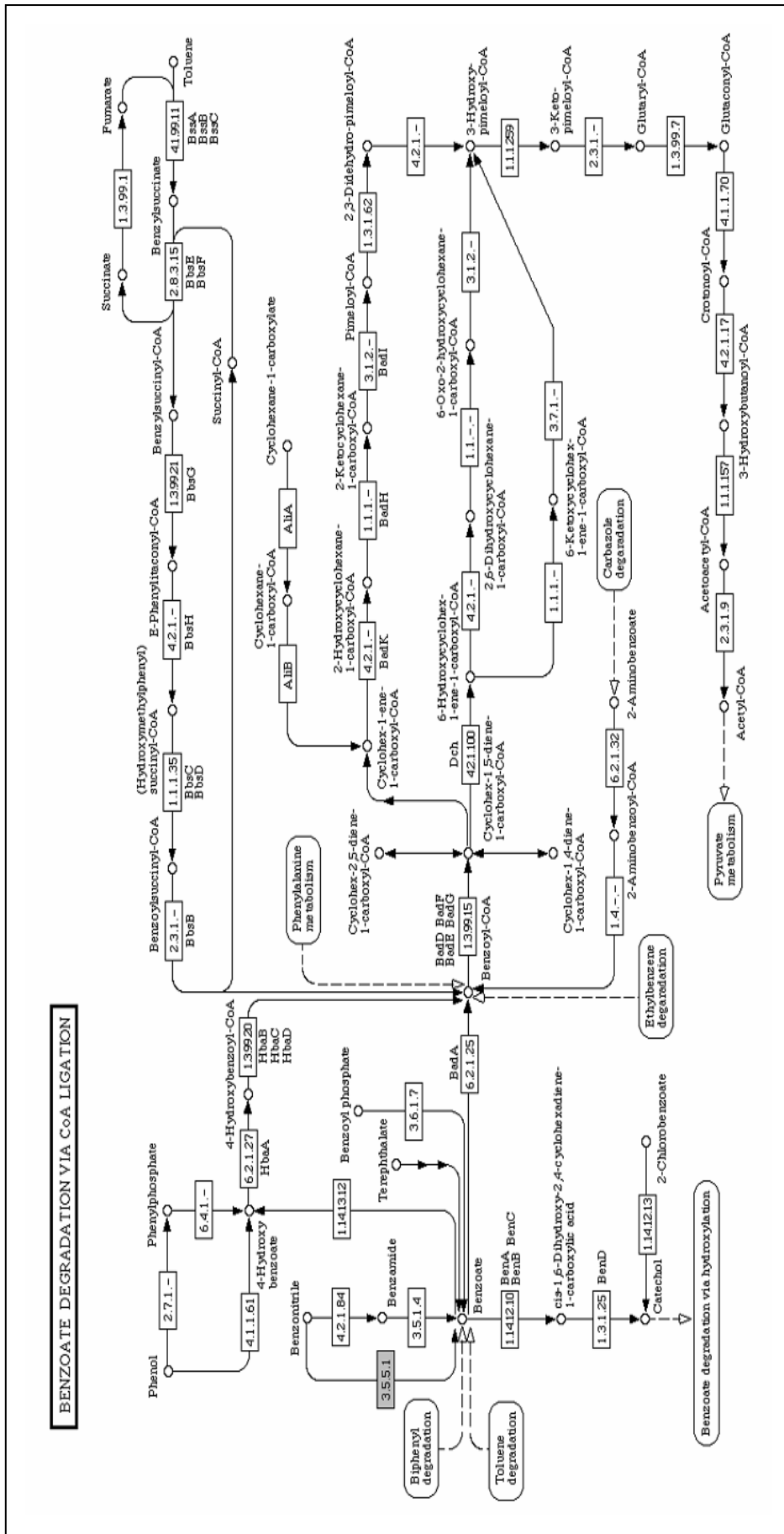
ANEXO 25: Via de Metabolismo da glutatona gerada pelo banco de dados do KEGG, onde em vermelho se encontra localizada a enzima Proteína glutatona peroxidase-like (EC number 1.11.1.9) identificada na cepa 3663.

ANEXO 26



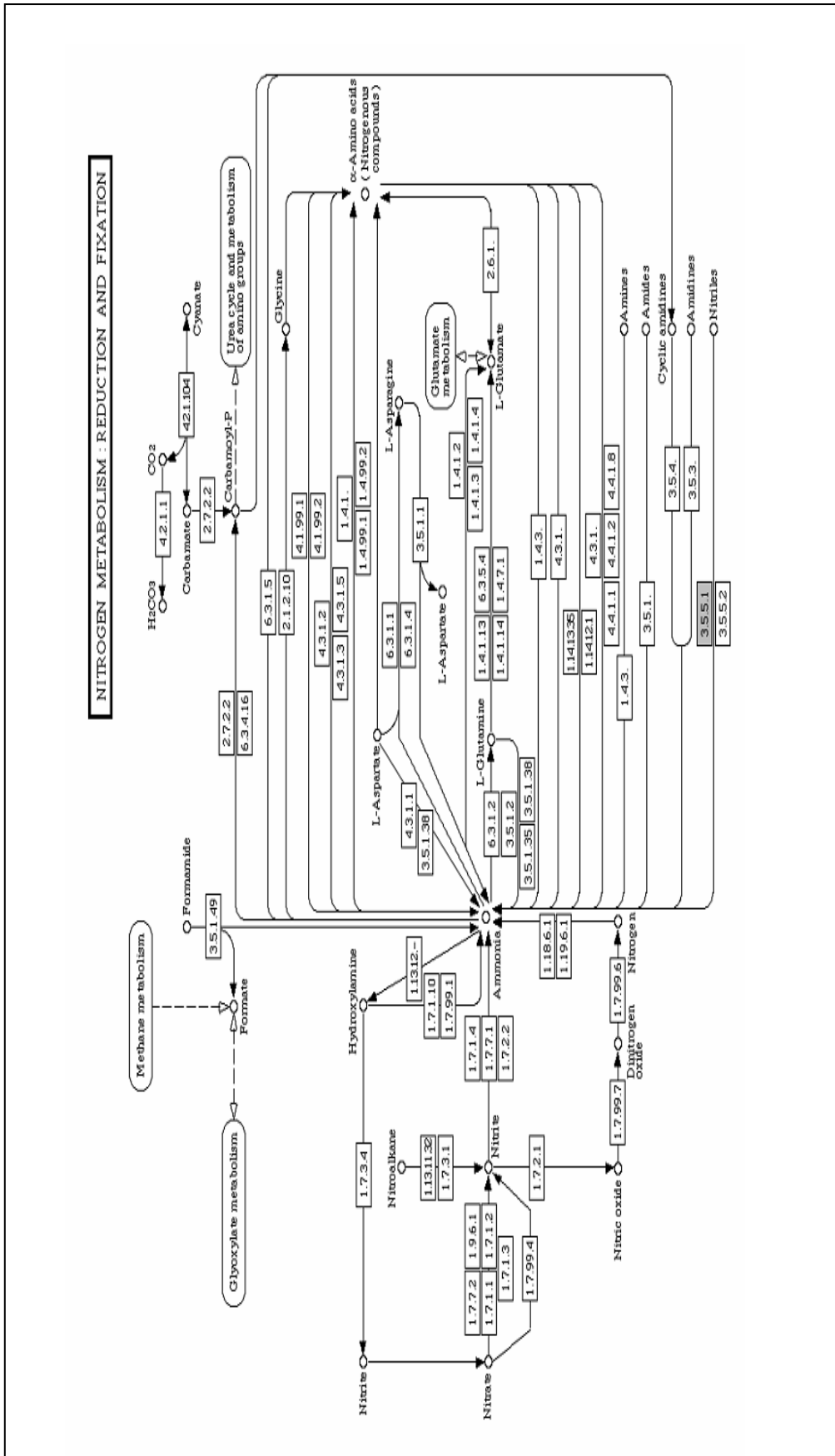
ANEXO 26: Via de Metabolismo do ácido aracídico gerada pelo banco de dados do KEGG, onde em vermelho se encontra localizada a enzima Proteína glutationa peroxidase-like (EC number 1.1.1.9) identificada na cepa 3663 e em amarelo a enzima Prostaglandina F sintase identificada na cepa 4167 (EC number 1.1.1.188).

ANEXO 27



ANEXO 27: Via de degradação do benzoato; via da ligação de CoA gerada pelo banco de dados do KEGG, onde em cinza se encontra localizada a enzima Nitrilase (EC number 3.5.5.1) identificada na cepa 3663 e 4167.

ANEXO 28



ANEXO 28: Via de Metabolismo do nitrogênio gerada pelo banco de dados do KEGG, onde em cinza se encontra localizada a enzima Nitrilase (EC number 3.5.5.1) identificada na cepa 3663 e 4167.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson NL, Matheson AD & Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. In Current Opinion in Biotechnology 2000;11(4):408.

Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *T. cruzi*: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop 1997;30:27-53.

Andrade V, Andrade SG, Barral Netto M, Pontes A, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de 6 linhagens isogênicas de camundongos. Rev Soc Bras Med Trop 1985;18:143-154.

Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG, Magalhaes JB. [Immunological aspects of infection of 6 inbred strains of mice by 3 different strains of *Trypanosoma cruzi*]. Mem Inst Oswaldo Cruz 1985;80(2):203-11.

Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *T. cruzi*. Trans R Soc Med Trop Hyg 1983;77, 796-799.

Aragão, M.B. "Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia". Rev Saúde Públ (S Paulo) 1983; 22: 401-410.

Araújo SM, Chiari E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988;83:175-181.

Ashraf M, Kuhn RE. Changes in fibroblast-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* during long-term culture. J Parasitol 1992;78(3):526-8.

Avila H, Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. Mol Biochem Parasitol 1990;42(2):175-87.

Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. Lancet 2000;356(9243):1749-56.

Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. Parasitology 2000;120 (Pt 5):513-26.

Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic epidemiology of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: a multilocus enzyme approach. Parasitology 2000;120:513-526.

Barret TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godofrey DG, Texeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock IA. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia

- States, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1980;74:84-90.
- Barreto MP. Epidemiologia. In: Brener Z & Andrade, ed, *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1979.p.89-151.
- Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock IA. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980;74(1):84-90.
- Bertelli MS, Brener Z. Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol 1980;66(6):992-7.
- Bertelli MS, Golgher RR, Brener Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. J Parasitol 1977;63(3):434-7.
- Bice DE, Zeledon R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). J Parasitol 1970;56:663-670.
- Bogliolo AR, Chiari E, Silva-Pereira RO *et al.* A comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South América. Brazilian J. Med. Biol. Res. 1986;19:673-683.
- Bongertz V, Hungerer KD, Galvao-Castro B. *Trypanosoma cruzi*: circulating antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz 1981;76(1):71-82.
- Braga EM, Galvao LM, Chiari E, Martins MS. Difference in susceptibility to lysis between clones of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993;88(4):529-34.
- Brandao A, Fernandes O. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages T. cruzi I, T. cruzi II, and the Zymodeme III isolates. Exp Parasitol 2006;112(4):247-52.
- Brener Z, Cancado JR, Galvao LM, da Luz ZM, Filardi Lde S, Pereira ME, Santos LM, Cancado CB. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993;88(1):149-53.
- Brener Z, Cardoso JE. Nonspecific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. J Parasitol 1976;62(4):645-6.
- Brener Z, Chiari E. [Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*.]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1963;19:220-4.
- Brener Z, Costa CA, Chiari C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1976;18(6):450-5.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int Arch Allergy Immunol 1997;114(2):103-10.

- Brener Z, Ramirez LE, Krettli AU, Cancado JR. EVI antibodies in patients with Chagas' disease: relationship with anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulins and effects of specific treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983;78(4):437-42.
- Brener Z. (Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*.). *Ann Trop Med Parasitol* 1965;59:19-26.
- Brener Z. [Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease]. *Ann Soc Belg Med Trop* 1985;65 Suppl 1:9-13.
- Brener Z. [Symposium on new approaches in research on American trypanosomiasis]. *Bol Oficina Sanit Panam* 1977;83(2):106-18.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 1973;27:347-82.
- Brener Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *Adv Pharmacol Chemother* 1975;13:1-81.
- Brener Z. Immune response and immunopathology in *T.cruzi* infection. In: Winal S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (eds), *Chagas Disease:It's impact on transfusion and clinical medicine*, ISBT Brazil'92, São Paulo, p.31-48.
- Brener Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 1980;18:247-92.
- Brener Z. Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bull World Health Organ* 1982;60(4):463-73.
- Brener Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann Trop Med Parasitol* 1969;63(2):215-20.
- Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1962;4:389-96.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 1999;104(2):219-32.
- Brisse S, Barnabé C & Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology* 2000; 30:35-44.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000;111(1):95-105.
- Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas AC, De Marchi CR, Ferguson MA, Frasc AC, Almeida IC. The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem* 2004;279(16):15860-9.

- Buscaglia CA, DI Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and epidemiology of Chagas' disease – Review. *Microbes and Infection* 2003;5:419-427.
- Ciência e cultura [on line].Rio de Janeiro, Brasil; 2002. [captura em 05 outubro 2006]. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v55n1/14851.pdf>
- Camargo EP. Enzimas do ciclo ornitina-arginina em trypanosomatídeos: significado fisiológico e valor taxonômico. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo 1979.p.158.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* 1 origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1964; 6:93-100.
- Carneiro M, Chiari E, Gonçalves AM, Silva Pereira AA, Morel CM, Romanha AJ. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *T.cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop* 1990;47:35-45.
- Carneiro M, Romanha AJ, Chiari E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86:387-393.
- Chagas, C. Nova tripanozomíase humana. “Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem”. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909;1: 159-218..
- Chiari E, Camargo EP. A laboratory manual. In: Morel CM. Genes and Antigens of parasites Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 2ed; 1984,p.23-26.
- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 2000;21(6):1104-15.
- Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Suppl 1:379-84.
- da Silva AM, Brodskyn CI, Takehara HA, Mota I. Comparison between the antigenic composition of bloodstream and cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Med Biol Res* 1988;21(5):991-3.
- De Araujo SM, Chiari E. [Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred C3H mice]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83(2):175-81.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2006;2(3):e24.

Deane MP, Jansen AM, Mangia RHR, Gonçalves AM, Morel C. Are our laboratory strains representative samples of *T. cruzi* populations that circulate in nature? Mem Inst Oswaldo Cruz 1984;79(suppl.):19-24.

Deane MP, Sousa MA, Pereira NM, Gonçalves AM, Momen H, Morel CM. Trypanosoma cruzi: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. J Protozool 1984;31(2):276-80.

Degrave WM, Melville S, Ivens A, Aslett M. Parasite genome initiatives. Int. J. Parasitol 2001;31,532-536.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should Trypanosoma cruzi be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting populations after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 (1): 1-12.

Dias JC, Machado EM, Fernandes AL, Vinhaes MC. [General situation and perspectives of chagas disease in Northeastern Region, Brazil]. Cad Saude Publica 2000;16 Suppl 2:13-34.

Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97(5):603-12.

Dias JC. [Cecilio Romana, Romana's sign and Chagas' disease]. Rev Soc Bras Med Trop 1997;30(5):407-13.

Dias JCP. Epidemiology of Chagas' disease. In: Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E., Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. São Paulo ISBT BRAZIL – SBHH, 1992. p.49-80.

Dias, J.C.P.; Coura, J.R. Epidemiologia. In *Clínica e Terapêutica da doença de Chagas*.

Dias, J.C.P.; Coura J.R. Ed Fiocruz 1997; p. 33-65.

Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics 2003;3(8):1567-96.

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

Dvorak JA, Howe CL. The attraction of Trypanosoma cruzi to vertebrate cells in vitro. J Protozool 1976;23(4):534-7.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S,

- Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005;309(5733):409-15.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246(4926):64-71.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. ***Parasitology*** 1999;118:161-166.
- Fernandes O, Santos S, Junqueira A, Jansen A, Cupolillo E, Campbell D, Zingales B, Coura JR. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Suppl 1:195-7.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derré R, Junqueira ACV, Santos LC, Strum NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA. & Coura JR. Trypanosomiasis in the Brazilian Amazon – mini-exon multiplex PCR to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2001; 95:1-3.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC., Junqueira ACV, Naiff RD., Barret TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA & Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using the mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998a; 58: 807-811.
- Fernandes O, Sturm NR, Derré R, & Campbell DA . The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1998b; 95:129-133.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araujo A. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop* 2000;75(1):79-84.
- Fievet J, Dillmann C, Lagniel G, Davanture M, Negroni L, Labarre J, de Vienne D. Assessing factors for reliable quantitative proteomics based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2004;4(7):1939-49.
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81(5):755-9.
- Forattini O. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. ***Revista de Saúde Pública de São Paulo*** 1980; 14:265-299.
- Garrels JI. The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *J Biol Chem* 1989;264(9):5269-82.

- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21(6):1037-53.
- Graham SV. Mechanisms of stages-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol Today* 1995;11:217-223.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1720-30.
- Haberkorn A, Gonnert R. Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittelforschung* 1972;22(9):1570-82.
- Hancock W, Apffel A, Chakel J, Hahnenberger K, Choudhary G, Traina JA, Pungor E. Integrated genomic/proteomic analysis. *Anal Chem* 1999;71(21):742A-48A.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002;295(5561):1852-8.
- Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1996;12(3):108-14.
- Henriquez D, Piras R, Piras MM. The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1981;2(5-6):359-66.
- Hoare CA . Morphological and taxonomic studies mammalian trypanosomes X. Revision of the systematics. *J Protozool* 1964;11:200.
- Hoare CA. The *Trypanosomes* of mammals. A zoological monograph. Oxford and Edinburgh, Blackwell Scientific publications, 1972;749.
- Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 1997;18(8):1217-42.
- Jonsson AP. Mass spectrometry for protein and peptide characterization. In *Cellular and Molecular Life Sciences* 2001;(58) :868.
- Johnson PJ, Kooter JM, 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(2):273-81.
- Kloetzel JK, Milder RV, Umezawa ES. *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1984;26(4):179-85.
- Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;26(3):231-43.

- Kopec KK, Bozyczko-Coyne D, Williams M. Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. *Biochem Pharmacol* 2005;69(8):1133-9.
- Lauria-Pires L, Santana JM, Tavares FS, Teixeira AR. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I--Behavioral characterization in vitro. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997;30(3):187-92.
- Levin MJ, Kaplan D, Ferrari I, Arteman P, Vazquez M, Panebra A. Humoral autoimmune response in Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigens as immunizing agents. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;7(3):205-10.
- Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MB, et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41(5):530-8.
- Lim MS & Elenitoba-Johnson. Proteomics in pathology research. *Laboratory Investigation* 2004;84:1227-1244.
- Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, de Rezende JM, de Souza AA, Povoá MM, Rodrigues I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80(3):462-70.
- Luquetti AO, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revollo S, Anez N, Zingales B, Ramgel-Aldao R, Gonzalez A, Levin MJ, Umezawa ES, Franco da Silveira J. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46(4):265-71.
- Macedo AM, Pena SD. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* 1998;14(3):119-24.
- Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SD. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Exs* 1993;67:321-9.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(13):7396-401.
- Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol* 1978;64(3):475-82.
- Mendonça MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, Naiff RD, Barrett TV, Coura JR, Zingales B, Fernandes O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 2002;124(Pt 2):177-84.
- Merrill CR, Dunau ML, Goldman D. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981;110(1):201-7.

- Miles MA, Pova MM, Sousa AA, Lainson R, Shaw JJ & Ketteridge DS. Chagas' disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in the Para state, North Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1981; 75: 667-674.
- Miles MA, Cedillos RA, Pova MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet 1981;1(8234):1338-40.
- Miles MA, de Souza AA, Pova M. Chagas' disease in the Amazon basin III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Para State, Brazil. J Med Entomol 1981;18(4):266-78.
- Miles MA, Lanhan SM, Souza AA, *et al.* Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1980;74:221-237.
- Miles MA, Sousa A, Pova ME *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature 1978;272:819-821.
- Miles MA, Toy PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1977;71(3):217-25.
- Mimori T. [Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolates, using restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA]. Nippon Rinsho 1992;50 Suppl:475-9.
- Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 2003;131(1):55-64.
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci U S A 1980;77(11):6810-4.
- Morel CM, Deane MP, Goncalves AM. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. Parasitol Today 1986;2(4):97-101.
- Morel CM. Reaching maturity - 25 years of the TDR. Parasitol Today 2000;16(12):522-8.
- Motran CC, Cerban FM, Rivarola HW, Vottero de Cima E. Characterization of autoantibodies generated in mice by immunization with the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P1 and P2 proteins. Clin Immunol 1999;91(1):17-24.
- Motran CC, Cerban FM, Rivarola W, Iosa D, Vottero de Cima E. *Trypanosoma cruzi*: immune response and functional heart damage induced in mice by the main linear B-cell epitope of parasite ribosomal P proteins. Exp Parasitol 1998;88(3):223-30.

- Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998;93(2):203-14.
- Nicolle, C. Culture de parasite du beuton d'Orient. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris.* 1908. 146: 842-843.
- Patton WF, Schulenberg B, Steinberg TH. Two-dimensional gel electrophoresis; better than a poke in the ICAT? *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(4):321-8.
- Petana WB, Coura JR . Experimental studies on *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* strains isolated from man, animals and from triatomines bugs in Brazil. *Soc Med Trop* 1974; 8:315-323.
- Piras MM, Henriquez D, Piras R. The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblasts. *Mol Biochem Parasitol* 1985;14(2):151-63.
- Povoa MM, de Souza AA, Naiff RD, Arias JR, Naiff MF, Biancardi CB, Miles MA. Chagas' disease in the Amazon basin IV. Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the states of Amazonas and Rondonia, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1984;78(5):479-87.
- Rabilloud T, Blisnick T, Heller M, Luche S, Aebersold R, Lunardi J, Braun-Breton C. Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: comparison of the proteins extracted from normal or *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis* 1999;20(18):3603-10.
- Rassi A. Clínica: Fase aguda, In: Brener,Z. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan, S.A., Rio de Janeiro; 1979.p. 251-264.
- Remacha M, Jimenez-Diaz A, Bermejo B, Rodriguez-Gabriel MA, Guarinos E, Ballesta JP. Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1995;15(9):4754-62.
- Remacha M, Jimenez-Diaz A, Santos C, Briones E, Zambrano R, Rodriguez Gabriel MA, Guarinos E, Ballesta JP. Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem Cell Biol* 1995;73(11-12):959-68.
- Richert S, Luche S, Chevallet M, Van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T. About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 2004;4(4):909-16.
- Rodriguez T. [Pathogenic features of the genus *Leishmania*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11(3):117-9.
- Romanha AJ.Heterogeneidade isoenzimatica em *T.cruzi* .BH.1982.Doutorado [Dissertação de doutorado] – Universidade Federal de Minas Gerais
- Ruiz RC, Favoreto S, Jr., Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J* 1998;330 (Pt 1):50

- Santos MR, Lorenzi H, Porcile P, Carmo MS, Schijman A, Brandao A, Araya JE, Gomes HB, Chiurillo MA, Ramirez JL, Degraive WM, Levin MJ, da Silveira JF. Physical mapping of a 670-kb region of chromosomes XVI and XVII from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* encompassing the genes for two immunodominant antigens. *Genome Res* 1999;9(12):1268-76.
- Santos PM, Texeira MC, Sá-Correia. Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de resposta a Stresse químico em microrganismos. *Métodos em Biotecnologia – Proteômica Quantitativa*. 2004; 7-17.
- Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, Campbell DA, Fernandes O. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasitol* 2002;96(8):755-64.
- Saraiva EM, Andrade AF, de Souza W. Involvement of the macrophage mannose-6-phosphate receptor in the recognition of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Parasitol Res* 1987;73(5):411-6.
- Saraiva NG, Holguin AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the Eastern plains, piedmont and highland of Colômbia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1987;36:59-69.
- 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(1):103-14.
- Schmunis GA, Zicker F, Segura EL, del Pozo AE. Transfusion-transmitted infectious diseases in Argentina, 1995 through 1997. *Transfusion* 2000;40(9):1048-53.
- Serrano L, Wandosell F, de la Torre J, Avila J. Proteolytic modification of tubulin. *Methods Enzymol* 1986;134:179-90.
- Silveira CA, Castillo E, Castro C. [Evaluation of an specific treatment for *Trypanosoma cruzi* in children, in the evolution of the indeterminate phase]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33(2):191-6.
- Souto R, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996; 83: 141-152.
- Souto RP & Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of ribosomal RNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 62: 45-52.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;83(2):141-52.

- Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol* 1999;91(4):306-14.
- Souza WF. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In Brener Z, Andrade Z, Barral – Netto (eds). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 2000. p. 88-126.
- Steindel M, Dias Neto E, de Menezes CL, Romanha AJ, Simpson AJ. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60(1):71-9.
- Stothard JR, Frame IA, Carrasco HJ, Miles MA. Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) analysis of riboprints from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1998;117 (Pt 3):249-53.
- Tekiel VS, Mirkin GA, Gonzalez Cappa SM. Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1997;115 (Pt 5):495-502.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. High correlation between isoenzyme classification na kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*. *C R Acad Sci USA* 1988;90: 1335-1339.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. *Parasitol Today* 1987;3(6):189-90.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Breniere SF, Darde ML, Ayala FJ. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(12):5129-33.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(4):1335-9.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A. & Ayala FJ . Natural populations of *Trypanosoma cruzi* the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:1335-1339.
- Toma HK. Seleção de transcritos diferenciais pertencentes às duas linhagens filogenéticas principais de *T. cruzi*, RJ. 2005. Doutorado [Dissertação em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz.
- Tomas AM, 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(1-2):91-103.
- Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. *Nature* 2003;422(6928):193-7.
- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvao LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SD. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 1996;149(6):2153-9.

Vanhamme L, Paas E. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 1995;59:223-240.

Vinhaes MC, Dias JC. [Chagas disease in Brazil]. *Cad Saude Publica* 2000;16 Suppl 2:7-12.

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16(7):1090-4.

White AP, Weinstein MA, Patel T, Horowitz MC, Friedlaender GE. The 2002 Marshall Urist Young Investigator Award Paper. Lumbar arthrodesis gene expression: a comparison of autograft with osteogenic protein-1. *Clin Orthop Relat Res* 2004(429):330-7.

Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W, Fey SJ, Larsen PM, Gorg A. Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21(13):2610-6.

Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, Bairoch A, Hochstrasser DF. Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 1998;19(8-9):1501-5.

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996;14(1):61-5.

World Health Organization. Control of Chagas Disease: Second report of the WHO Expert Committee. Geneva:WHO; 2002.

Zingales B, Abuin G, Romanha AJ, Chiari E, Colli W. Surface antigens of stocks and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. *Acta Trop* 1984;41(1):5-16.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 1998;28(1):105-12.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Suppl 1:159-64.

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](#)