



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

Análise de proteínas nucleares reguladas na
amastigogênese e de complexos proteicos de
Trypanosoma cruzi

Samuel Coelho Mandacaru

Brasília, 2013

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

Análise de proteínas nucleares reguladas na
amastigogênese e de complexos proteicos de

Trypanosoma cruzi

Samuel Coelho Mandacaru

Orientador: Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Coorientadora: Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de
Pós – Graduação em Biologia
Molecular da Universidade de
Brasília.

Brasília, 2013

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas em parceria com o Laboratório de Biologia do Gene do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, com apoio financeiro da CAPES.

Orientador: Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Coorientadora: Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Aos meus pais por sempre me incentivarem em qualquer que sejam minhas decisões e sempre me alertarem nos momentos de cabeça vazia.

À minha noiva Maira que sempre está ao meu lado. Grande amiga e companheira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Beatriz por ter me dado a oportunidade de iniciar minha carreira acadêmica, dando oportunidade de estagiar e desenvolver parte do mestrado em seu laboratório.

Ao Prof. e orientador Carlos André por ser tão amigo das pessoas, sabendo sempre conversar e orientar seus alunos de uma maneira que você aprende de forma fácil e agradável, um grande exemplo.

Agradeço também aos amigos Ricardo, Rayner, Agenor e Adelson pelas boas conversas e por sempre estarem por ali analisando e discutindo meus experimentos.

Agradeço a Marinez, técnica do Laboratório de Biologia do Gene, sem ela não há experimentos.

Agradeço a todos os membros dos laboratórios de Biologia do Gene e do LBQP.

A você Maira, meus profundos agradecimentos, por sempre estar do meu lado, independente de qualquer coisa.

Agradeço aos meus pais, maiores exemplos da minha vida. Amo vocês.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular e à CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
SIGLAS E ABREVIATURAS	11
INTRODUÇÃO	
1. Epidemiologia e doença de Chagas	13
2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
4. Organização nuclear	21
5. Amastigogênese	26
6. Complexos proteicos	28
7. Complexo coesina	32
JUSTIFICATIVA	35
OBJETIVOS	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
FLUXOGRAMA DE TRABALHO I	53
FLUXOGRAMA DE TRABALHO II	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
1. Construção de plasmídeos para transfecção em <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
2. Análises de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
3. Análise da propriedade replicativa de amastigotas de meio axênico	64
4. Análise de proteínas reguladas de núcleo na amastigogênese	70
5. Análise das principais proteínas reguladas e envolvidas com complexos proteicos durante a amastigogênese	74
CONCLUSÃO	79
PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da epidemiologia da doença de chagas.....	13
Figura 2. Representação esquemática das formas de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 3. Moléculas de adesão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 4. Ciclo de vida do parasita no hospedeiro vertebrado.....	19
Figura 5. Ciclo de vida do parasita no hospedeiro invertebrado.....	20
Figura 6. Dinâmica dos cromossomos em epimastigotas.....	23
Figura 7. Estrutura química do Coomassie Blue G250.....	31
Figura 8. Modelos de atuação do complexo coesina.....	33
Figura 9. Visão geral do ciclo da coesina.....	34
Figura 10. Perfil de restrição dos fragmentos de clonagem.....	56
Figura 11A. Análise em gel de agarose dos possíveis clones de bactérias transformadas com pLRT + EGFP.....	57
Figura 11B. Análise em gel de agarose dos possíveis clones de bactérias transformadas com pLRT + Red2.....	57
Figura 11C. Confirmação da clonagem por PCR.....	57
Figura 12. Análise de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	61
Figura 13. Separação das subunidades dos complexos proteicos por SDS-PAGE.....	63
Figura 14. Amastigogênese <i>in vitro</i>	66
Figura 15. Análise de extratos proteicos.....	67
Figura 16. Espectrometria de massas do “spot” correspondente a 62 kDa.....	68

Figura 17. Detecção da proteína TcSCC1 nas diferentes formas de amastigotas utilizando o anticorpo anti-SCC1	69
Figura 18. Representação gráfica das proteínas analisadas	71
Figura 19. Representação gráfica da porcentagem dos principais grupos de proteínas nucleares reguladas durante a amastigogênese	72
Figura 20. Categorização dos principais processos biológicos envolvendo proteínas reguladas de complexos proteicos	75

RESUMO

Uma característica do *Trypanosoma cruzi* são as mudanças morfológicas que ocorrem durante seu ciclo de vida. A amastigogênese é um importante processo no ciclo de vida do parasita onde as formas tripomastigotas infectivas se diferenciam em amastigotas replicativas. A duplicação celular é um processo complexo, onde vários eventos estão envolvidos, dentre eles, a correta segregação das cromátides irmãs após a replicação do DNA, função exercida por um complexo denominado coesina. Neste trabalho, foi proposta caracterização de complexos proteicos de *T. cruzi* assim como a identificação de proteínas de complexos nucleares, cuja expressão se altera durante a amastigogênese. Por meio da técnica *Blue Native PAGE* (BN-PAGE) foi possível realizar a separação de complexos proteicos de lisado total das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os componentes individuais dos complexos puderam ser visualizados em segunda dimensão após o gel ter sido corado com nitrato de prata. Experimentos de detecção imunológica por *western blotting* demonstraram a ausência da subunidade SCC1 do complexo coesina em amastigotas gerados por diferenciação *in vitro* de formas tripomastigotas em cultura axênica em pH 5. Porém, a subunidade SCC1 pode ser detectada em extratos proteicos de formas amastigotas que foram reincubadas por 10 h em meio de cultura com pH ajustado para 7,5, sugerindo que essas formas são capazes de manter suas propriedades replicativas. Por espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS, 1.339 proteínas de *T. cruzi* foram identificadas de amostras provenientes dos ensaios de amastigogênese. Destas, 560 proteínas foram anotadas em bancos de dados como proteínas reguladas, 65 possuíam localização nuclear e 66 foram preditas como pertencentes a complexos proteicos. Na classificação das proteínas identificadas os grupos que correspondem àqueles envolvidos em metabolismo de ácidos nucleicos aparecem como predominantes. Proteínas que se ligam a DNA (9,23%), proteínas de ligação a RNA (13,85%) e proteínas que se ligam a nucleotídeos (18,46%) correspondem juntas a 41,54% do total de proteínas nucleares reguladas, corroborando o fato de que intensa atividade de transcrição e processamento de DNA e RNA ocorre em todas as etapas de diferenciação, além de outros principais grupos como as peptidases (15,38%), proteínas estruturais (13,85%) e atividade de hidrolases (12,31%). Para proteínas reguladas e envolvidas com complexos proteicos durante a amastigogênese os maiores grupos estão envolvidos em processos de transporte (25,58%), processos metabólicos (19,77%), processos metabólicos de compostos contendo nucleotídeos (16,28%), geração de precursores metabólicos e de energia (8,14%).

Palavras chaves: *Blue Native PAGE*, LC-MS/MS, coesina, amastigogênese, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

A feature of *Trypanosoma cruzi* is the morphological changes that occur during their life cycle. The amastigogenesis is an important process in the life cycle of the parasite where the infective trypomastigotes differentiate into replicative amastigotes. A cell replication is a complex process, where several events are involved, among them the correct segregation of sister chromatids after DNA replication, function performed by a complex called cohesin. In this work we proposed the characterization of *T. cruzi* protein complexes and the identification of proteins from nuclear complexes, whose expression is altered during amastigogenesis. Through the technique of *Blue Native* PAGE (BN-PAGE) it was possible the separation of protein complexes from total lysate of *T. cruzi* epimastigotes. The individual components of the complexes could be visualized after the second dimensional gel after staining with silver nitrate. Immunological detection experiments by western blotting demonstrated the absence of SCC1 subunit of cohesin complex in amastigotes generated by *in vitro* differentiation of trypomastigotes in axenic culture at pH 5.0. However, the subunit SCC1 was detected in protein extracts of amastigotes that were reincubated for 10 hours in a culture medium adjusted at pH 7.5, suggesting that these forms are able to maintain their replicative properties. By LC-MS/MS mass spectrometry, 1,339 proteins of *T. cruzi* were identified in samples from amastigogenesis. Of these, 560 proteins were annotated in databases as regulated proteins, 65 have presented nuclear localization and 66 were predicted as belonging to protein complexes. In the classification of proteins involved in nucleic acid metabolism, this group appears to be predominant. Proteins which bind to DNA (9.23%), RNA-binding proteins (13.85%) and proteins that bind nucleotides (18.46%) correspond together to 41.54% of the total regulated nuclear proteins, confirming that strong transcription activity and DNA and RNA processing occur in all stages of differentiation, and other major groups such as peptidases (15.38%), structural proteins (13.85%) and activity of hydrolases (12.31%). For regulated proteins and protein complexes involved in amastigogenesis the largest groups are involved in transport processes (25.58%), metabolic processes (19.77%), metabolic processes of compounds containing nucleotides (16.28%), generation of metabolic precursors and energy (8.14%).

Key Words: *Blue Native* PAGE, LC-MS/MS, cohesin, amastigogenesis, *Trypanosoma cruzi*.

SIGLAS E ABREVIATURAS

APS – Persulfato de amônio

ATP – Adenosina Trifosfato

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetra-acético

GO – The Gene Ontology

kDNA –DNA mitochondrial dos Cinetoplastos

kDa – kilodaltons

LC – Cromatografia líquida

LC-MS/MS – Cromatografia líquida combinada à espectrometria de massa em Tandem

LIT – Meio de cultura com infuso de fígado e triptose para crescimento de *T. cruzi*

MALDI – Desorção e ionização a laser assistida por matriz

MCPs – Multi complexos proteicos

MMM– Marcador de Massa Molecular

mRNA– Ácido Ribonucleico mensageiro

MS – Espectrometria de Massas

NPC – Complexo do poro nuclear

pb – Pares de Bases

PBS – Tampão Salina Fosfato

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia

pH – Potencial Hidrogeniônico

pI – Ponto Isoelétrico

RNA – Ácido Ribonucleico

SCC – Proteínas de Coesão das Cromátides-irmãs

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida

SMC – Proteínas de Manutenção Estrutural dos Cromossomos

TEMED – N, N, N',N'-Tetrametiletilenodiamina

WHO – Organização Mundial da Saúde

2DE – Eletroforese bidimensional

INTRODUÇÃO

1. *Epidemiologia e doença de Chagas*

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário que pertence à ordem Kinetoplastida. Ela se tornou endêmica devido às precárias condições de habitação que eram expostas a população, além da migração de pessoas infectadas para áreas onde existia o vetor (COURA, 2003).

Alguns anos atrás a doença de Chagas era restrita somente à América, especialmente à América Latina, mas se disseminou para outros continentes. Estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo mundo (Figura 1). Destas, até 30% dos infectados desenvolvem cronicidade e alterações cardíacas, 10% alterações digestivas, além de possíveis alterações neurológicas (WHO, 2012).

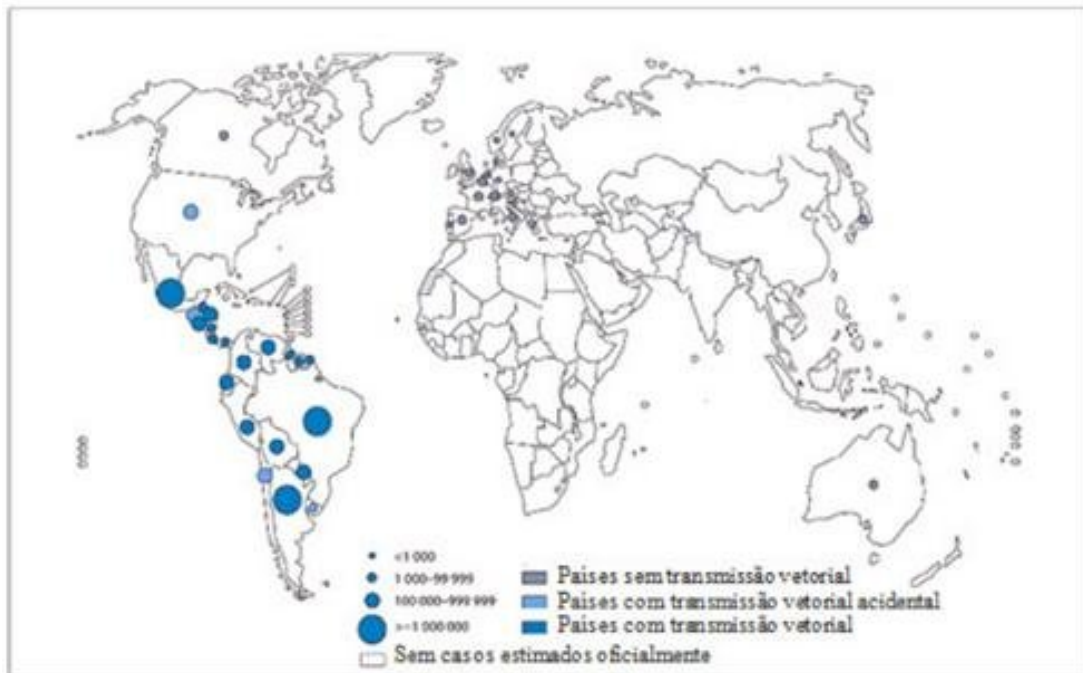


Figura 1: Mapa mundial da distribuição atual da doença de Chagas e o vetor transmissor (WHO, 2012).

A doença de Chagas é transmitida basicamente através das fezes contaminadas do inseto infectado com o parasita. Das 112 espécies de insetos encontradas no continente americano, 12 possuem maior capacidade de se procriar e invadir domicílios.

Essas têm recebido maior atenção por estarem envolvidas em um maior número de transmissão da doença (SILVEIRA, 2000).

Alguns mecanismos alternativos de transmissão foram observados, como a transfusão sanguínea que se tornou uma importante via de transmissão da doença e a transmissão vertical na qual mães com sorologia positiva para o *T. cruzi* transmitem a doença ao feto durante a gestação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Por se concentrar em grande parte na América Latina, a doença de Chagas tem sido alvo de intensas pesquisas na busca de melhoramento de tecnologias e medicamentos de combate à doença nos centros latino-americanos (STEINDEL et al. 2005).

Após a invasão do parasita, a doença de Chagas pode ser classificada em fase aguda ou crônica, de acordo com o tempo de infecção e resposta do hospedeiro. Na fase aguda, a doença apresenta características clínicas variáveis e de gravidade variável onde o diagnóstico é feito pela presença de sinais da doença como sinal de Romaña e chagoma cutâneo, sendo comprovado pela presença do parasita no sangue periférico. Já a fase crônica é caracterizada pela baixa parasitemia e alta quantidade de anticorpos circulantes, onde as manifestações clínicas são consequências do parasitismo intracelular. Sua classificação é dividida em cardíaca, digestiva ou mista (FIOCRUZ, 2012).

2. *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário parasita digenético pertencente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastidae, sub-ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*, espécie *Trypanosoma cruzi* (LEVINE et al, 1980).

Esse parasita apresenta características de eucariotos onde estão presentes organelas delimitados por membranas como o complexo de Golgi, retículo endoplasmático, membrana nuclear, além de vesículas compartimentalizadas denominadas glicosomos que são responsáveis pelo metabolismo de glicose. Possui uma única mitocôndria grande responsável pela produção energética da célula e cujo DNA está contido em uma estrutura denominado cinetoplasto (kDNA) (SILVEIRA,

2000). Outra característica desse parasita são as mudanças morfológicas que ocorrem durante seu ciclo de vida, a fim de se adaptar aos diferentes ambientes e maior eficiência no seu estabelecimento no hospedeiro.

Uma forma de classificar esse parasita é de acordo com essas mudanças morfológicas (Figura 2), especificamente com a posição do seu cinetoplasto. Os tripomastigotas possuem seu cinetoplasto posterior ao núcleo, são alongados e possuem uma membrana que emerge de sua extremidade posterior. As formas amastigotas são arredondadas ou ovóides e apresenta flagelo bem curto que praticamente não se exterioriza para fora da bolsa flagelar, o cinetoplasto se apresenta em forma de bastão anterior ao núcleo e é a forma replicativa no hospedeiro vertebrado. Os epimastigotas possuem seu cinetoplasto posicionado anterior ao núcleo e é a forma replicativa no hospedeiro invertebrado (SOUZA, 1999).

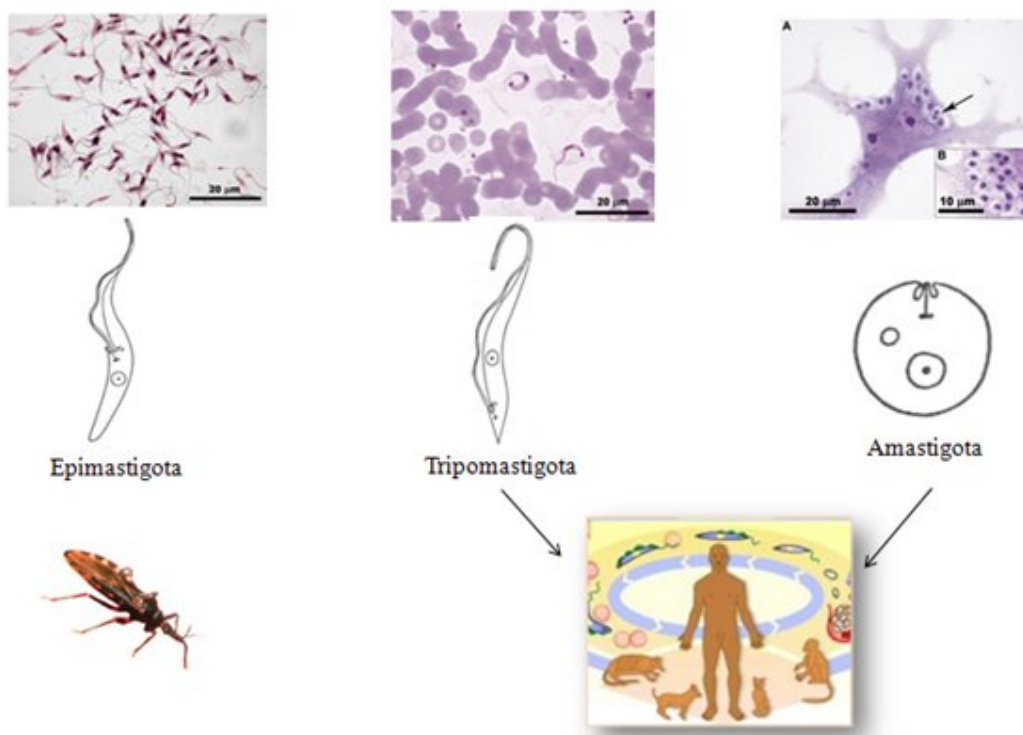


Figura 2: Representação esquemática das formas de vida do *Trypanosoma cruzi*. Formas epimastigotas alongadas encontradas no hospedeiro invertebrado e também forma replicativa nesse hospedeiro. Formas tripomastigotas infectivas que são inoculadas na corrente sanguínea e infectam células do hospedeiro vertebrado. Formas amastigotas intracelulares e também replicativa no hospedeiro vertebrado.

O kDNA é composto por algumas dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que estão concatenados formando uma rede que é estabilizada por pelo menos quatro tipos de proteínas semelhantes às histonas denominadas de KAP

(*Kinetoplast Associated Protein*). Essas compactam os mini e maxi círculos conferindo a forma de disco ao cinetoplasto (LIU et al., 2005).

A perda de um minicírculo essencial pode ser letal para a célula filha, assim a fidelidade na replicação e a sua segregação correta devem acontecer. Durante a fase S do núcleo os minicírculos são liberados da rede do kDNA por meio de uma topoisomerase II e alcançam a região entre o cinetoplasto e o corpo basal, chamada de zona cinetoflagelar, desta forma cada minicírculo será replicado individualmente. Primeiramente a proteína UMSBP (*Universal Minicircle Sequence Binding Protein*) se liga à origem de replicação denominada CSB3 e inicia o processo de replicação. As DNA polimerases mitocondriais IB e IC são as responsáveis pelo alongamento das fitas de DNA que, juntamente com UMSBP, estão localizadas em uma sub-região da zona denominada centro cinetoflagelar. Há, portanto, a formação da forquilha de replicação, surgindo formas intermediárias de minicírculos. A fita contínua é sintetizada a partir de um iniciador de RNA produzido pela RNA polimerase mitocondrial (mtRNA polimerase), enquanto que a fita descontínua formada por vários fragmentos de Okasaki é sintetizada a partir de vários iniciadores de RNA produzidos pela DNA primase (LIU et al., 2005; LUKES et al., 2005).

Após a duplicação de todos os minicírculos, esses migram da zona cinetoflagelar para os sítios antipodais que se encontram ao lado do cinetoplasto, a 180° um do outro. Nesse sítio estão presentes as proteínas envolvidas no processo de união dos fragmentos da fita descontínua e a topoisomerase II. Assim as proteínas SSE1 (*Structure Specific Endonuclease 1*), ribonuclease H, DNA polimerase β e DNA polimerase β -PAK irão remover os iniciadores e preencher os espaços entre os fragmentos, enquanto as DNA ligases mitocondriais β irão realizar a ligação desses fragmentos. Os minicírculos recém sintetizados devem apresentar pelo menos um *gap*, assim são recolocados na rede de kDNA pela topoisomerase II concatenado com cerca de três minicírculos (LIU et al., 2005).

A replicação dos maxicírculos ainda é pouco conhecida. Assim como os minicírculos parecem ter apenas uma origem de replicação e formam estruturas intermediárias θ , mas ao contrário de minicírculos permanecem ligados à rede de kDNA (LIU et al., 2005)

3. O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo que varia entre um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado. Para tal plasticidade, o parasita apresenta-se em quatro formas morfológicamente e bioquimicamente distintas de vida, a fim de se adaptar aos diferentes ambientes ao qual é submetido durante seu ciclo. São elas as formas replicativas epimastigotas e amastigotas e as formas não replicativas tripomastigota sanguíneas e metacíclicas. As formas tripomastigotas metacíclicas são inoculadas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado após a picada do vetor infectado. A infecção por esses parasitos pode também ocorrer através de membranas mucosas alcançando células subjacentes (DVORAK; HYDE, 1973).

Uma vez que as formas tripomastigotas alcancem a corrente sanguínea, ocorrerá a adesão do parasita sobre a superfície celular da célula hospedeira. Essa primeira etapa ocorre em três diferentes passos: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. O processo de adesão ocorre com o envolvimento de inúmeras moléculas de superfície do parasita e receptores da célula do hospedeiro, além da possibilidade de excreção de moléculas pelo parasita para facilitar o processo (Figura 3) (SOUZA et al., 2010).

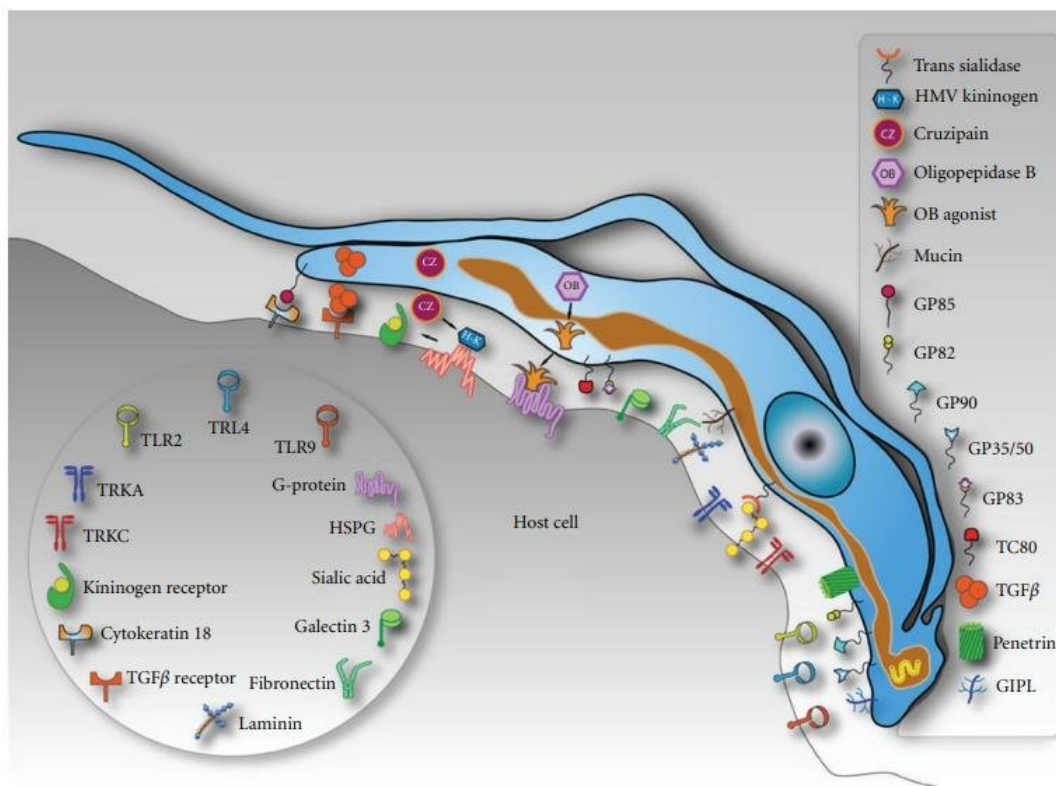


Figura 3: Modelo esquemático resumindo as moléculas envolvidas no processo de interação entre o parasita e a célula do hospedeiro (SOUZA, 2010).

As rotas e mecanismos de infecção variam de acordo com o tipo celular, já que ao contrário de outros organismos, o *T. cruzi* não precisa necessariamente da atuação de células fagocitárias para sua internalização (MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992). Entretanto, três fases básicas são descritas durante o processo de infecção em macrófagos: 1) Adesão caracterizada pela atração, contato e reconhecimento do macrófago; 2) Internalização seguida de um complexo mecanismo de sinalização, intensa atividade da maquinaria endocítica, formação de pseudópodes e vacúolo endocítico; 3) Destino intracelular onde ocorre fusão fago-lisossomal, rompimento da membrana vacuolar e consequente proliferação do parasita no citoplasma dos macrófagos (ARAÚJO-JORGE, 1989). Em células fagocíticas não profissionais, uma série de moléculas do parasita dispara sinalização intracelular (CALER et al., 1998; SCHARFSTEIN et al., 2000). Essa sinalização resultará no rearranjo do citoesqueleto de actina e consequente recrutamento de lisossomos para fundir com a membrana plasmática onde ocorrerá o início da invasão do parasita na membrana ou alternativamente no sítio de invaginação da membrana plasmática (TARDIEUX et al., 1992; WOOLSEY et al., 2003).

O vacúolo parasitóforo torna-se ácido após a fusão com o lisossomo e ocorre o início da diferenciação da forma tripomastigota em amastigota. Várias enzimas e outras moléculas, tanto da forma tripomastigota quanto do vacúolo parasitóforo do hospedeiro estão envolvidas na dissolução da membrana e liberação do parasita para o citoplasma (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). No citoplasma, as formas amastigotas replicativas se dividem por fissão binária até começarem a se diferenciar novamente em tripomastigotas sanguíneos, ocorrendo rompimento da membrana plasmática celular e consequente liberação dos parasitas (Figura 4) (FERNANDES; ANDREWS, 2012).

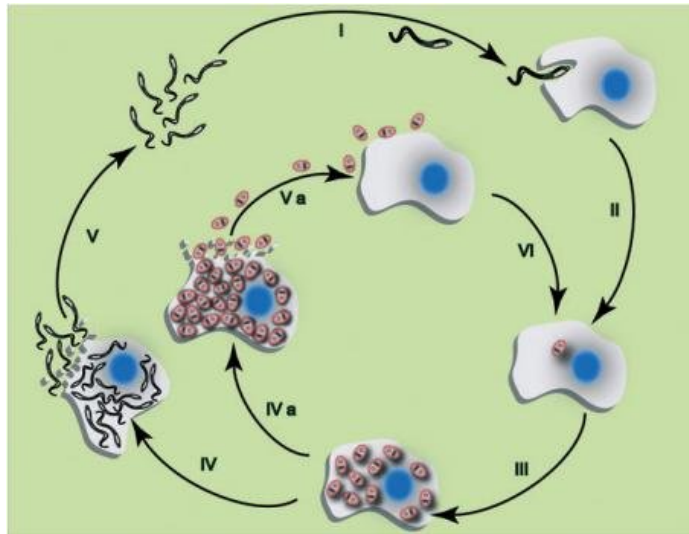


Figura 4: Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro mamífero. I) Formas tripomastigotas metacíclicas penetram ou são fagocitadas pela célula hospedeira. (II) O parasita alcança o citoplasma. III) Uma grande replicação das formas amastigotas intracelulares. IV) As formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e rompem a membrana celular. V) As formas tripomastigotas estão livres na corrente sanguínea para infectarem novas células. Alternativamente, IVa) as formas amastigotas replicativas intracelulares podem lisar a membrana celular e ficarem livres na corrente sanguínea. Va) Formas amastigotas livres podem ser internalizadas em novas células.

O hospedeiro invertebrado, ao se alimentar do sangue infectado com as formas tripomastigotas sanguíneas, adquire o parasita o qual se diferenciará em epimastigotas iniciais, denominadas esferomastigotas e, ao migrar pelo intestino do inseto se transformarão em epimastigotas com muita motilidade e por fim em tripomastigotas metacíclicas. O inseto ao picar o hospedeiro não infectado transmitirá tal forma dando sequência ao ciclo (Figura 5) (VERONESI, 2005).

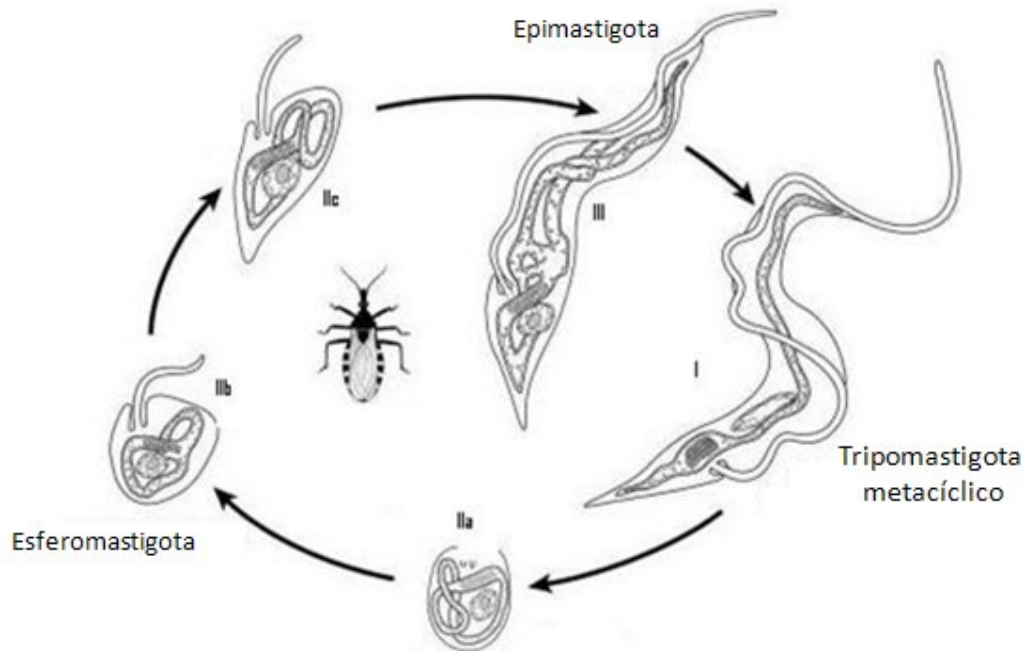


Figura 5: Ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. I) Durante a picada do inseto as formas tripomastigotas metacíclicas chegam ao estômago do inseto. II) À medida que passam pelo intestino vão se modificando em formas de transição até se transformarem em epimastigotas (IIa, IIb, IIc). III) Formas epimastigotas replicativas no hospedeiro invertebrado.

Em resumo, o ciclo acontece quando o inseto não infectado ingere as formas tripomastigotas sanguíneas de um hospedeiro vertebrado portador do parasita. No interior do hospedeiro invertebrado, o parasita adquire nova forma chamada epimastigota replicativa que, à medida que migra pelo intestino do inseto se transforma na forma tripomastigota metacíclica. Em um novo repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas penetram na pele do hospedeiro vertebrado na corrente sanguínea transformando-se em tripomastigotas sanguíneas. Essas são capazes de infectar células fagocíticas profissionais e também células fagocíticas não profissionais, como fibroblastos, mioblastos. Ao chegar ao meio intracelular, se diferenciam em amastigotas replicativas que irão se multiplicar até a lise celular e sua liberação novamente na corrente sanguínea. Um novo repasto sanguíneo por um inseto saudável em um sangue contaminado com o parasita é o suficiente para dar sequência no ciclo (DE SOUZA, 2002; TYLER; ENGMAN, 2001).

4. *Organização nuclear*

O núcleo de eucariotos é extremamente organizado e possuem compartimentos para os mais diferentes tipos de processos principalmente aqueles envolvendo DNA. Esses compartimentos não são envoltos por membrana, mas sua organização é capaz de determinar regiões específicas onde ocorrerão cada um dos mecanismos durante o ciclo celular (LAMOND; SPECTOR, 2003; MISTELI, 2005). Além disso, o DNA também se organiza em níveis estruturais e espaciais, primeiramente na formação de cromatina e também pela distribuição não aleatória dos cromossomos (CREMER et al., 1982). A existência dos compartimentos assegura a concentração e os fatores necessários para os mais diversos processos nucleares, dentre eles a replicação do DNA, onde a eficiência da interação entre tais fatores em um dado momento garante a síntese completa da nova molécula de DNA (CHAKALOVA et al., 2005).

Durante a transcrição em *T. cruzi* seus mRNAs são produzidos de forma policistrônica, que quer dizer que uma única molécula de RNA é traduzida e depois processada. Isso se dá da seguinte forma: o mRNA policistrônico sofre um processo de *trans-splicing* qual uma sequência líder é adicionada em sua porção 5' e uma poliadenilação na extremidade 3'. Ao final desse processo são gerados RNAs monocistrônicos maduros (PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006). As três RNAPolimerases, I, II e III, descritas em outros eucariotos, foram encontradas em *T. brucei* (KOCK et al., 1998; JESS et al., 1989; EVERS et al., 1989), no entanto elas apresentam algumas diferenças estruturais comparadas às RNA polimerases de outros eucariotos. A RNA polimerase II apresenta um comportamento diferencial na presença de inibidores específicos como a α -amanitina (CLAYTON et al., 1990). As RNA polimerases dos tripanossomatídeos também apresentam diferenças na dependência de Mn^{+2} , na utilização de fita simples e no reconhecimento de promotores específicos. Em *T. cruzi*, apenas promotores associados a genes ribossomais e ao miniexon foram caracterizados (DIETRICH et al., 1993; PULIDO et al., 1996; NUNES et al., 1997). A atividade desses promotores de *T. cruzi* parece ser controlada por fatores de transcrição que são linhagem-específica (TYLER-CROSS et al., 1995; NUNES et al., 1997). Nos sítios onde se inicia a transcrição, ou seja, no promotor do gene para o miniexon ou Sequência Líder (SL), a proteína de ligação ao TATA box (TBP) bem como outros fatores foram encontrados. Ensaio de SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) mostraram que a TBP do *T. cruzi* tem afinidade por regiões

ricas em G, que também estão presentes em *Switch Regions* (CRIBB; SERRA, 2009). O recrutamento da TBP ao promotor do gene SL também foi demonstrado em *Leishmania tarentolae* (THOMAS et al., 2006). Diferentemente dos eucariotos superiores, não existe uma sequência consenso na região onde são adicionados os resíduos de adenina. A região espaçadora entre os genes é pequena, cerca de 100-300 pb e são regiões ricas em pirimidinas as quais tem influência no controle da transcrição (SILVEIRA, 2000).

Durante a síntese de DNA e formação da forquilha de replicação é necessária a total integridade do núcleo, pois o rompimento da lâmina nuclear impede a fase de alongação e replicação do DNA (MOIR et al., 2000). A localização dos cromossomos em células de mamíferos é determinada pelo estado de ativação dos seus genes. Genes mais transcritos estão localizados no centro do núcleo, assim como os eventos que antecedem a replicação na fase S do ciclo celular. Os genes pouco expressos ou que estão em forma de heterocromatina se localizam na região periférica nuclear e ao redor do nucléolo (FERREIRA et al., 1997; MA et al., 1999; SADONI et al., 1999).

Em *T. cruzi* não se sabe ao certo a distribuição dos cromossomos no espaço tridimensional uma vez que esses não se condensam completamente durante o ciclo celular (SOLARI, 1980). A formação da cromatina ocorre em um processo semelhante aos demais eucariotos, onde a compactação do DNA se dá no entorno de um octâmero de histonas. A histona H1 difere das demais por não possuir um domínio globular em sua porção N-terminal (ALSFORD; HORN, 2004). Dessa forma, alteração na interação de cargas entre a proteína e a molécula de DNA impede a formação da compactação observada em outros eucariotos onde ocorre a formação das fitas de 30nm (HECKER et al., 1995).

A organização cromossômica entre as diferentes cepas de *T. cruzi* é conservada. O sequenciamento do genoma revelou que o *T. cruzi* é um organismo diploide, cujo genoma está organizado em 41 cromossomos com tamanho estimado entre 106,4 a 110,7 Mb. O tamanho de cada cromossomo não é conservado entre as diferentes linhagens, algumas vezes variando até mesmo entre cromossomos homólogos da mesma estirpe, o que pode ser explicado pelo fato de que aparentemente a quantidade de DNA repetitivo seja maior em algumas cepas desse parasita (HENRIKSSON, 1996). Embora seja estabelecida a diploidia, alguns dados sugerem também a ocorrência de poliploidia e aneuploidia, como observado em isolados do *T. cruzi* derivados de um mesmo clone que apresentam polimorfismo no conteúdo de DNA (HENRIKSSON, 1996).

Elias et al. (2002) demonstraram que os cromossomos se movimentam no espaço nuclear durante todo o ciclo celular de epimastigotas. Seus cromossomos podem ser vistos de forma dispersa durante a fase G1 e concentrados na periferia nuclear durante as fases S, G2 e mitose (Figura 6).

A disposição da heterocromatina durante o ciclo de vida do *T. cruzi* também possui uma dinâmica nas formas replicativas do parasita, com intensa atividade transcricional e apresentando heterocromatina na periferia nuclear, diferindo da forma tripomastigota infectiva que possui menos atividade transcricional e heterocromatina distribuída por todo o núcleo (ELIAS et al., 2001).

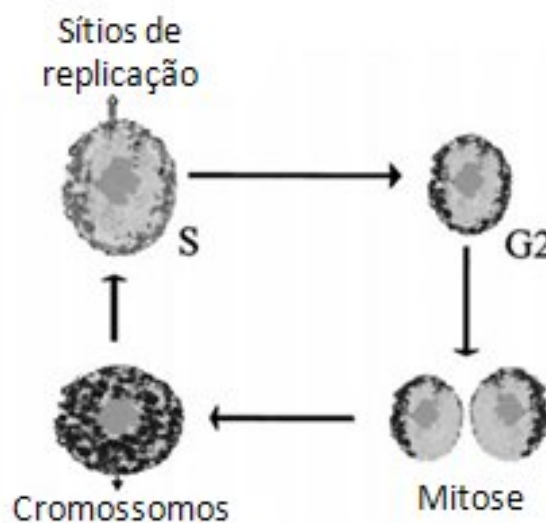


Figura 6: Modelo da dinâmica dos cromossomos durante o ciclo celular do *T. cruzi*. Em G1, os cromossomos se encontram dispersos no núcleo. Durante a fase S, os cromossomos são mantidos na periferia nuclear, permanecendo nos pólos da célula durante a mitose e se dispersando ao seu final. Os nucléolos podem ser vistos no centro das estruturas (ELIAS et al., 2002).

O nucléolo é um compartimento nuclear distinto, extremamente essencial, no qual ocorre a biogênese de ribossomos (LUSTIG et al., 2005). Os pré-rRNAs que darão origem aos complexos 40S e 60S são sintetizados, processados e associados dentro do nucléolo (RASKA, 2004). Um centro fibrilar armazena genes rRNAs inativos e é uma região altamente elétrion-densa devido as altas concentrações de RNPs. Isso demonstra o nível de organização nucleolar no qual mantém sua integridade estrutural dependente da transcrição de genes ribossomais pela RNA polimerase I e sua interatividade com os componentes ribossomais (RASKA, 2006). O tamanho do nucléolo é maior na fase exponencial do crescimento de epimastigotas quando comparado aos de células em estado estacionário (NEPOMUCENO-MEJIA et al., 2010), além de possuírem uma

grande quantidade de histona H1 não fosforilada (GUTTIYAMA et al., 2008). Essas se tornam fosforiladas durante a progressão do ciclo celular até a mitose, dispersando assim pelo nucleoplasma inteiro na citocinese.

O nucléolo desaparece quando as epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas (RAMIREZ et al., 2000) e reaparece logo que as formas metacíclicas invadem as células de mamíferos (GLUENZ et al., 2007), compatível com as taxas de transcrição e tradução das formas tripomastigotas. No entanto, não é conhecido como as células controlam os níveis de transcrição durante a diferenciação. Várias proteínas nucleolares foram identificadas nos bancos de dados de *T. cruzi* como similares e conservadas em outros eucariotos. Uma proteína denominada TcSoft1 que está envolvida no processamento de RNAs ribossomais apresentou localização nuclear e alta expressão durante a metaciclogênese (NARDELLI et al., 2007). Por outro lado, uma proteína homóloga a TcSoft1 não foi encontrada no genoma da cepa Esmeraldo, sugerindo que os mecanismos de expressão de RNAs nucleolares podem ser específicos para cada cepa (NARDELLI et al., 2007).

Os poros nucleares do *T. cruzi* apresentam bastante similaridade aos de demais eucariotos (SPADILIERO et al., 2002). No entanto, como em eucariotos inferiores, o *T. cruzi* apresenta poucas proteínas da lâmina nuclear conservadas. Ao invés disto, esses parasitas possuem uma proteína chamada TcNup que se assemelha a uma proteína similar em *T. brucei*. Foi demonstrado que TcNup tem um comportamento interessante na lâmina nuclear o qual interage com regiões específicas do genoma do *T. cruzi*, provavelmente ancorando os cromossomos no envelope nuclear (PICCHI et al., 2011).

A exportação de mRNA comumente auxilia no direcionamento para regiões de tradução, sendo um ponto de controle que garante o transporte dos transcritos corretamente processados e a síntese proteica em determinado local ou tempo dentro de uma célula ou organismo (DU et al., 2007). O modelo geral de transporte núcleo-citoplasma de RNA tem a participação de proteínas da família das β -carioferinas (importinas e exportinas, responsáveis pela importação e exportação, respectivamente) que utilizam energia fornecida por Ran-GTP para o transporte de cargas (STRÖM; WEIS, 2001). Componentes envolvidos no processo de exportação de RNAs e importação de proteínas têm sido pouco caracterizadas em *T. cruzi*, no entanto, sinais de localização nuclear nesses parasitas são muito complexos, provavelmente únicos e são direcionados principalmente a partir de sequências de aminoácidos básicos (WESTERGAARD et al., 2010).

Muitas alterações nucleares ocorrem no *T. cruzi* durante os processos de transformação das formas infectivas para replicativas e vice-versa. É concebível que essas alterações decorrem das várias alterações no DNA durante os processos de replicação e transcrição. Após alterações e danos no DNA provocados por radiações gama, foi demonstrado que o núcleo de epimastigotas apresenta uma densa cromatina dispersa pela periferia nuclear e o nucléolo amplamente aumentado (NARDELLI et al., 2009).

O *T. cruzi* apresenta um robusto sistema de reparo no DNA. Esse ocorre por recombinação homóloga com a participação de uma proteína denominada TcRAD51, envolvida no reconhecimento de regiões de quebra para promover o reparo, consequentemente permitindo a sobrevivência do parasita mesmo sob fortes radiações (SILVA et al., 2006). Reorganização nuclear semelhante a essa foi observada em células tratadas com hidroxíureia que interrompe a replicação celular e também provoca danos na dupla fita de DNA (ELIAS et al., 2002). Essas modificações na cromatina correlacionam-se com um aumento observado na acetilação da lisina 10 e 14 da histona H4, localizadas em regiões menos densas na cromatina de células normais, sugerindo que as modificações na cromatina e remodelagem nuclear estão envolvidas no reparo de DNA. Os tripanossomas são desprovidos de histonas H2AX, uma variante que é fosforilada diante de danos no DNA, sinalizando para o seu reparo em muitos eucariotos. No entanto, outros mecanismos de sinalização e modificação de cromatina podem ocorrer após o dano no DNA do *T. cruzi*. Por exemplo, a radiação ultravioleta que induz aumento na expressão da proteína TcBRD2 que se liga a histonas acetiladas, sugerindo que a reorganização da cromatina ocorre após a formação de dímero de pirimidina (VILLAMIL et al., 2008).

A estrutura nuclear tem se tornado uma nova área que contribui para o entendimento de vários eventos moleculares e celulares em eucariotos. A transferência da informação do DNA para o nível proteômico permite uma maior compreensão do funcionamento das células eucarióticas. A extensão desse conhecimento para uma única célula como o *T. cruzi* poderá facilitar no entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos de infecção e de adaptação do parasita nas células hospedeiras.

5. Amastigogênese

Ao longo do seu ciclo de vida, o *T. cruzi* sobrevive a uma ampla gama de condições que induzem modificações morfológicas complexas em sua estrutura. Além das suas principais fases de desenvolvimento, o parasita ainda assume formas intermediárias que parecem seguir uma mesma via, independente do hospedeiro (FARIA et al., 1999; TYLER; ENGMAN, 2001). Formas intermediárias aparecem transientemente durante a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese) no triatomíneo, na diferenciação de tripomastigotas metacíclicas em amastigotas (amastigogênese primária) e na transformação de tripomastigotas derivadas de tecido em amastigotas (amastigogênese secundária) (TYLER; ENGMAN, 2001; NAVARRO et al., 2003).

A adaptação do parasita aos diversos ambientes, aos quais é exposto nos diferentes hospedeiros, induz a uma complexa regulação na expressão de seus genes, que em nível proteico precede as alterações morfológicas observadas durante a transição de formas. Vários pesquisadores têm estudado alguns fatores que induzem o estresse fisiológico no parasita como a temperatura, condições nutricionais e mudanças no pH para estimular a diferenciação morfológica durante a amastigogênese (NAVARRO et al., 2003; TOMLINSON et al., 1995).

A grande maioria das informações relativas à amastigogênese *in vivo* e *in vitro* é proveniente de tripomastigotas derivados de tecidos pela facilidade de obtenção de um número maior de parasitas (NAVARRO et al., 2003; TOMLINSON et al., 1995; ZWEYGARTH et al., 1989). Análises ultra-estruturais e moleculares durante a transformação de tripomastigotas em amastigotas mostraram um rearranjo complexo e uma alteração progressiva morfológica do parasita e do flagelo os quais têm sido associados com a expressão diferencial de antígenos específicos em cada fase (ANDREWS et al., 1987; NAVARRO et al., 2003; TOMLINSON et al., 1995). Estudos de morfologia comparativa também mostraram que, apesar dos tripomastigotas sanguíneos e metacíclicos apresentarem propriedades morfológicas e biológicas similares, a amastigogênese primária e a secundária aparentemente se desenvolvem em diferentes processos, sugerindo que seus mecanismos moleculares são diferentes (NAVARRO et al., 2003).

Processos de diferenciação nas diversas etapas do desenvolvimento de uma forma para outra têm sido associados com alterações nas propriedades biológicas e na

expressão de moléculas específicas na superfície do parasita em cada estágio. Além disso, a transformação morfológica durante a amastigogênese primária relaciona-se a alterações no perfil de glicoproteínas transialidases e mucinas (BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

Nos tripomastigotas, durante a amastigogênese, ocorrem rearranjos celulares formando dobras em torno de si mesmo de uma forma helicoidal. Este padrão de torção é, provavelmente, influenciado pelos microtúbulos peculiares que se formam no córtex do cinetoplasto (ANGELOPOULOS, 1970). A transição dessa forma dobrada para a forma totalmente arredondada dos amastigotas envolve fusão de membranas e provavelmente a perda de membrana nos pontos de contato. Possivelmente, produtos são liberados desses parasitas durante as suas mudanças drásticas já que alguns antígenos foram detectados na circulação de animais infectados e podem estar envolvidos na patogênese da doença (GOTTLIEB, 1977).

O *T. cruzi* emprega diferentes estratégias para se adaptar aos diferentes ambientes a que é exposto. Conseqüentemente, o estudo da diferenciação celular desse organismo é sinônimo do estudo do seu ciclo de vida. Sua diferenciação é altamente controlada, afetando principalmente processos intracelulares, ocorrendo profundas mudanças na morfologia, motilidade e metabolismo, tipicamente em resposta a estímulos externos. Além disso, durante essas transições são conhecidas alguns pontos relevantes: 1) Superfície celular – permite que o parasita interaja com diferentes ambientes; 2) Citoesqueleto – afeta principalmente sua morfologia e motilidade; 3) Ciclo de vida – manutenção das formas invasivas não replicativas até atingir novamente um ambiente estável para voltar a multiplicar-se; 4) Defesa – uma vez que as respostas imunes dos hospedeiros vertebrados e invertebrados são imensamente diferentes, onde diferentes moléculas são necessárias para o parasita sobreviver (TYLER et al., 2001).

Cascatas de sinalização são alvos de intensas pesquisas tanto em *T. cruzi* quanto nas células hospedeiras. As funções dos metabólitos cAMP e inositol são antagonicas e está claro que a regulação dos níveis de cAMP e inositol são críticos no controle da diferenciação do parasita. Um papel para o cAMP na diferenciação de epimastigotas replicativos em tripomastigotas metacíclicos não replicativos tem sido demonstrado utilizando análogos lipofílicos de cAMP, o qual induz a metaciclogênese. Em contraste, metabólitos de inositol demonstraram não ter efeitos na metaciclogênese, mas promovem a proliferação do tripanossoma e estão criticamente (através da fosfolipase C) envolvidos na reentrada no ciclo proliferativo, sendo acelerado pela inibição de

algumas fosfatases específicas. Proteínas de sinalização estão cada vez mais sendo localizadas nos ambientes ricos em colesterol na membrana flagelar e citoesqueleto flagelar. Provavelmente, essas proteínas incluem proteínas que se ligam ao cálcio e adenilato ciclase, o que sugere que o flagelo possa ter funções não apenas de motilidade e adesão, mas também pode funcionar como um centro sensorial que regula os batimentos do flagelo e a diferenciação nas balsas lipídicas (TYLER et al., 2001).

Tripomastigotas da cepa Y possuem os antígenos Ssp-1, Ssp-2 e Ssp-3 em suas membranas de superfície. Poucas horas após os tripomastigotas serem liberados do interior da célula hospedeira, Ssp-1 e Ssp-2 são perdidos e Ssp-1 é encontrado livre no meio de cultura. Em contraste, Ssp-3 teve seus níveis aumentados durante as horas iniciais da incubação extracelular. Durante as 24 horas subsequentes, o parasita também perdeu o antígeno Ssp-3 e adquiriu o Ssp-4. Depois de 48 horas de incubação em meio específico, todos os parasitas adquiriram o antígeno Ssp-4 em suas membranas e assumiram a forma arredondada característica de amastigotas (ANDREWS et al., 1987).

Mudanças similares às descritas acima (perda de Ssp-1, Ssp-2 e Ssp-3 e aquisição de Ssp-4) também ocorrem quando tripomastigotas sanguíneos infectam células *in vivo* ou *in vitro* se transformam em amastigotas (ANDREWS, et al., 1987).

Algumas características fundamentais do processo da amastigogênese são conhecidas, mas os mecanismos moleculares envolvidos no processo ainda não foram totalmente elucidados. A análise das proteínas envolvidas no processo de transformação irá aumentar nosso conhecimento sobre a morfogênese e a expressão gênica envolvida não somente na diferenciação entre as formas de desenvolvimento, mas também durante as transições da forma não replicativa para a fase replicativa.

6. Complexos proteicos

Os processos que ocorrem no interior das células são em grande parte guiados por interações entre macromoléculas que desempenham papel biológico (ALBERTS, 1998) e são regulados através de uma complexa rede de interações transientes entre proteínas. Nos últimos anos, trabalhos em proteômica têm buscado as inter-relações entre moléculas a fim de compreender o comportamento global de sistemas biológicos (UETZ et al., 2000; ITO et al., 2001; RAIN et al., 2001), uma vez que muitas proteínas homólogas podem interagir entre si (ALOY et Al., 2005).

Recentes avanços tecnológicos possibilitaram a caracterização de redes de interações entre proteínas. Entre os métodos mais diretos e sistemáticos para esse tipo de análise podemos citar a co-imunoprecipitação (MANN et al., 2001), purificação por afinidade (GAVIN et al., 2002), ensaios de duplo híbrido (ITO et al., 2001) que tem sido amplamente usado para definir redes de interação de vários organismos como *S. cerevisiae* (HO et al., 2002), *Helicobacter pylori* (RAIN et al., 2001), *Caenorhabditis elegans* (BOULTON et al., 2001; LI et al., 2004) e *Drosophila melanogaster* (GIOT et al., 2003).

Os crescentes dados de redes de proteínas para diferentes organismos naturalmente levam a análise comparativa, as quais tentam determinar o quanto uma determinada rede de proteínas é conservada entre as espécies e o quanto podem ser utilizadas para explorar novas redes ou partes de outras redes. Evidências sugerem que algumas vias de interação de proteínas podem ser amplamente conservadas, como, por exemplo, várias interações proteína-proteína descritas em leveduras tem sido identificadas em suas proteínas ortólogas em vermes (LI et al., 2004; MATTHEWS et al., 2001).

Na era pós-genômica, existe um grande desafio para entender os milhares de genes e seus produtos e como eles interagem entre si para gerar um organismo. Por isso, estudos e desenvolvimento de métodos capazes de analisarem a função e padrões de interações de proteínas e atividades de Multi-Complexos Proteicos (MCP) são fundamentais (GALVIN et al., 2002).

Técnicas de eletroforese em gel são muito importantes em abordagens proteômicas (SCHRATTENHOLZ, 2004). É possível separar as proteínas de uma determinada amostra, fracioná-las e caracterizá-las por espectrometria de massas. Outra grande vantagem é que, dependendo do sistema da eletroforese, proteínas hidrofílicas ou mesmo proteínas solubilizadas por detergentes podem ser diretamente aplicadas no gel e separadas em um único passo, assim pode ser representado um proteoma compreensível de uma determinada amostra (MONTI et al., 2005; DZIEMBOWSKI; SÉRAPHIN, 2005).

Geralmente complexos de proteínas são mantidos por interações eletrostáticas entre seus componentes. Assim, qualquer que seja a abordagem utilizada, é fundamental manter as condições nativas a fim de prevenir a dissociação entre subunidades dos complexos (LASSERRE et al., 2010).

A eletroforese bidimensional tem sido amplamente utilizada para a separação prévia de proteínas e análise por espectrometria de massas. A focalização isoeletrica pode ser uma alternativa para separar MCPs em suas condições nativas baseado nos seus pontos isoeletricos. Porém, o método é limitado pelo fato de que muitas proteínas tendem a ser insolúveis perto do seu ponto isoeletrico, proteínas hidrofóbicas tendem a se precipitar e as matrizes adequadas e que estão disponíveis (acrilamida ou agarose) tem o tamanho do poro discreto que limita seu uso para determinados complexos (<1 MDa) (CAMACHO-CARVAJAL et al., 2004).

Blue Native (BN)-PAGE é um método baseado na mudança de carga no qual a mobilidade eletroforética dos MCPs é determinada pela carga negativa introduzida pela ligação de um corante chamado Coomassie que circunda todo o complexo. As subunidades dos complexos podem então ser separadas em uma segunda dimensão desnaturante e digeridas por uma enzima específica, geralmente tripsina, e identificadas por espectrometria de massa (SCHAGGER; JAGOW, 1991; SCHAGGER et al., 1994).

A versatilidade do BN-PAGE se dá por duas características peculiares que são críticas para separar os complexos com diferentes propriedades fisico-químicas que ocorrem em várias amostras biológicas como mitocôndrias, cloroplastos, outras organelas, frações citosólicas e membrana de bactérias. Primeiro, a corrida do BN-PAGE ocorre com um pH fixo de 7,5 que é o fisiológico na maioria dos compartimentos intracelulares. Isso permite a migração de complexos de proteínas que são susceptíveis à dissociação em diferentes pHs. Segundo, o corante Coomassie Blue (CBB G-250) (FIGURA 7) é adicionado no tampão catódico e frequentemente adicionado também à amostra antes da corrida. Isso confere uma carga negativa global na rede de proteínas e diminui de forma artificial a agregação de proteínas hidrofóbicas que foram solubilizadas pelo detergente não-iônico (HEUBERGER et al., 2002).

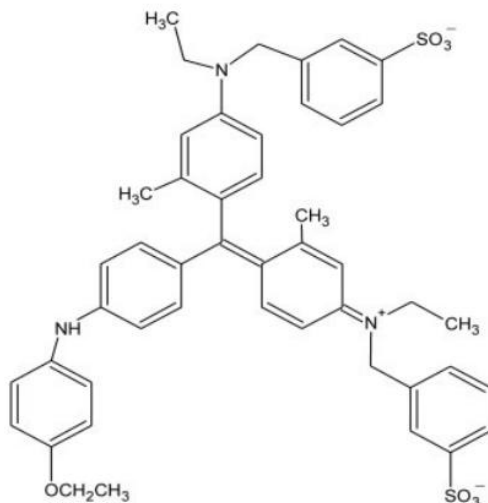


Figura 7. Coomassie Blue G250. Molécula responsável por solvatar complexos de proteínas a fim de que essas adquirem cargas negativas e migrem de acordo com sua massa, mantendo sua estrutura nativa.

A escolha do detergente não-iônico depende da estabilidade do complexo proteico de interesse. A digitonina é um detergente não-iônico que tem sido usado para isolar associações supramoleculares de múltiplos complexos proteicos, sendo possível a identificação de interações proteína-proteína sem o uso de *crosslinking* químico. O dodecilmaltosídeo tem uma maior propriedade de substituição de lipídeos quando comparado com a digitonina. Ele é um detergente neutro adequado para isolar proteínas de membrana e complexos individuais, mas não é rara ocorrência de dissociação entre interações hidrofóbicas. Triton X-100 apresenta um comportamento intermediário em complexos de proteínas mitocondriais. Sob altas concentrações desses detergentes complexos de proteínas de membranas são solubilizadas de maneira similar ao dodecilmaltosídeo (SCHAGGER; PFEIFFER, 2000).

Após a solubilização de proteínas de membranas biológicas e centrifugação, o corante CBB-250 pode ser adicionado diretamente à amostra. Esse corante é muito solúvel em água e pode se ligar até mesmo em proteínas de membrana que apresentam propriedades hidrofóbicas e também em proteínas básicas, induzindo a mudança de carga global e induzindo a migração para o tampão anodo em pH 7,5 durante a corrida do BN-PAGE (SCHAGGER et al., 1994). No entanto, as proteínas não são separadas de acordo com sua razão massa/carga e sim de acordo com o seu tamanho em um gradiente de acrilamida. A migração das proteínas desacelera à medida que correm pelo gel e também com a diminuição do poro de sua malha. As proteínas param de migrar assim que encontram o tamanho do poro que ocupa sua massa (WITTIG et al., 2006).

As cargas adicionadas às proteínas se repelem mutuamente, o que diminui consideravelmente a possibilidade de agregação entre elas. Além disso, proteínas hidrofóbicas de membrana associadas ao corante tornam-se hidrossolúveis, o que significa que não é necessária a utilização de detergentes para solubilização dessas proteínas, diminuindo consideravelmente a sua desnaturação (WITTIG et al., 2006).

Associações supramoleculares que foram detectadas pela primeira dimensão do BN-PAGE podem então ser separadas em seus componentes individuais em uma segunda dimensão identificando assim os parceiros de interação e sua razão estequiométrica (WITTIG et al., 2006).

7. Complexo coesina

Em eucariotos, as cromátides irmãs devem permanecer juntas após a replicação do DNA até mitose para que ocorra a segregação do material genético. Um grande complexo de proteínas em forma de anel chamado coesina serve para unir as duas cromátides irmãs. A coesão tem a função de orientar a correta adesão dos microtúbulos ao fuso mitótico, garantindo assim a exata segregação (NASMYTH; HAERING, 2005). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o complexo é composto de quatro subunidades principais: Smc1 (Psm1 em *Schizosaccharomyces pombe*), Smc3 (PSM3 em *S. pombe*), Scc1 (Rad21 em *S. pombe* e vertebrados, substituído por Rec8 na meiose), e Scc3 (Psc3 em *S. pombe*) que é parcialmente substituído por Rec11 na meiose (HIRANO, 2000, 2002; XIONG; GERTON, 2010). A coesina é montada antes da replicação do DNA e está presente no centrômero e nos braços dos cromossomos onde depende de outras proteínas como as Scc2 e Scc4 que parecem auxiliar na montagem do complexo.

A subunidade Scc1/Mcd1/Rad21 é conhecida como uma subunidade *kleisin*, que é membro de uma superfamília de proteínas evolutivamente conservada de procariontes aos seres humanos (SCHLEIFFER et al., 2003). A subunidade Scc1 tem papel importante na montagem do complexo coesina, pois ela se liga diretamente em ambas as cabeças das SMC, sendo que sua região C-terminal se liga na região N-terminal da Smc1 e sua região N-terminal se liga na C-terminal da Smc3. A Rec8 é uma homóloga da Scc1 na meiose, ambas compartilham homologia apenas nas regiões N e C-terminal (SCHLEIFFER et al., 2003). A Scc1 é clivada pela Separase/Esp1/Cut1 no início da

anáfase ocorrendo então a abertura do anel levando a coesina a se dissociar dos cromossomos (UHLMANN et al., 2001).

A subunidade Scc3 se associa a região C-terminal da Scc1 e parece exercer função de ativação da transcrição em células humanas (LARA-PEZZI et al., 2004). Outro fator o Swi6 mostrou ser capaz de interagir com Scc3 e recrutar o complexo coesina para outras regiões do DNA (NONAKA et al., 2002).

Análises da arquitetura molecular do complexo mostram em sua estrutura que as subunidades Smc possuem um motivo conhecido como motivo *Walker A*, dois motivos centrais conhecidos como *coiled-coil* que assumem a forma de uma estrutura em dobradiça, e uma região conservada carboxi-terminal, motivo *Walker B*. A região *coiled-coil* ou de dobradiça como é mais conhecida se organiza em forma antiparalela de forma que a SMC se dobre sobre ela mesma e a sua região N-terminal se junta ao C-terminal formando uma “cabeça” com atividade ATPase semelhante à observada na família ABC, que são proteínas de membrana que transportam ativamente moléculas (HIGGINS, 1992) (Figura 10). Embora Smc1 e Smc3 possam ligar ATP e hidrolisá-lo, ainda não se sabe ao certo como isso acontece, mas supõe-se que a hidrólise do ATP esteja relacionada ao transporte de DNA para dentro do anel formado pelo complexo (HAERING et al., 2002; WEITZER et al., 2003).

Desse modo, o complexo coesina montado assume uma estrutura em forma de anel em volta do DNA. Essa conexão é topológica, bem forte e não é eluída mesmo em altas concentrações salinas (CIOSK et al., 2000; SUMARA et al., 2000). O diâmetro do anel formado pelo complexo é estimado em 45 nm, que parece impedir a compactação da cromatina na fibra de 30 nm embora a fibra de 10 nm possa ser acomodada. Em um segundo modelo aceito, dois anéis da coesina circundam uma fibra de cromatina única (Figura 8) (GRUBER et al., 2003).

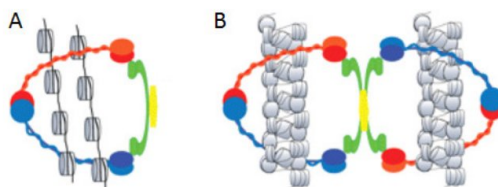


Figura 8. Modelos de atuação do complexo coesina para a manutenção da união das cromátides irmãs. (A) O modelo de anel (à esquerda) propõe a passagem das duas cromátides irmãs (cilindros cinza) através da estrutura de anel e da interação topológica entre DNA e coesina. (B) Um modelo alternativo propõe que um domínio “cabeça” da Smc1 se liga a uma cromátide enquanto o outro domínio “cabeça” da Smc3 se liga a outra cromátide irmã, possivelmente em conjunto com Scc1. A interação coesina DNA é apenas física (BOSE; GERTON, 2010).

No momento em que a correta bi-orientação é alcançada, a destruição da coesão entre as cromátides irmãs deve ocorrer, de modo que a separação das cromátides aconteça na transição da metáfase para a anáfase (Figura 9). O fim da coesão acontece de maneira regulada e pode ser inibido por cromossomos retardatários, que ainda não se encontram corretamente bi-orientados em um dos pontos de checagem que ocorre durante todo o processo conhecido como SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) (NASMYTH et al., 2004). O fim da coesão entre as cromátides irmãs durante a transição da metáfase para a anáfase é regulado pelo complexo proteico tipo ubiquitina ligase conhecido como complexo promotor da anáfase (APC) (IRNINGER, et al., 1995).

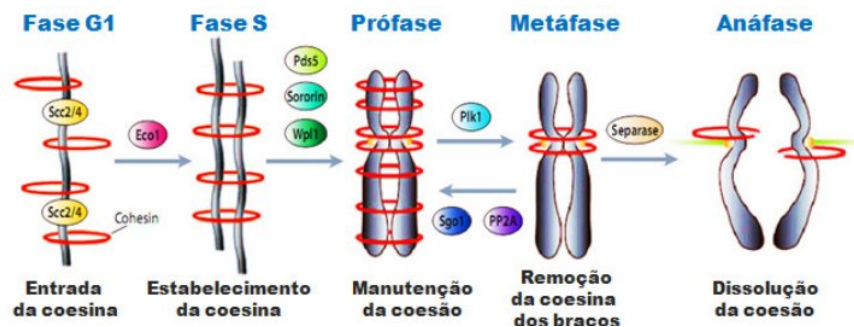


Figura 9. Visão geral do ciclo da coesina. O complexo coesina se associa inicialmente na cromatina na fase G1 do ciclo celular, dependente da atividade do complexo Scc2 e Scc4. Concomitantemente com a replicação do DNA, a coesina estabilizada entre as cromátides irmãs na presença da acetiltransferase Eco1. Após a entrada na fase G2/M, a coesão é mantida pela proteína Pds5, sororin e Wp11. Em mamíferos, a coesão ao longo dos braços do cromossomo é removida durante a prófase via fosforilação da Rad21 pela Polo-like quinase 1. Na metáfase, a coesão é protegida pela shugoshin e PP2A. No início da anáfase, a protease Separase cliva Scc1/Mcd1/Rad21, levando à abertura do anel da coesina e a separação das cromátides irmãs (XIONG; GERTON, 2010).

JUSTIFICATIVA

Apesar da Doença de Chagas ter sido descrita há 90 anos, ela ainda continua a ser um desafio em termos de saúde pública na América Latina, muito embora os programas de controle da transmissão tenham reduzido consideravelmente o risco de infecção (WHO, 2005). Atualmente, os tratamentos disponíveis para as infecções agudas são de alta toxicidade e de variável eficácia sendo que nas formas crônicas da doença poucas opções terapêuticas podem ser oferecidas aos pacientes.

O *Trypanosoma cruzi*, causador da doença, possui ciclo de vida complexo, caracterizado por mudanças morfológicas e metabólicas sensíveis a estímulos originados no ambiente em que o parasita se encontra. Em resposta a esses fatores, o parasita modifica a expressão de certos genes de forma a se adaptar ao novo habitat. O conhecimento da expressão diferencial de genes e das diferentes propriedades bioquímicas entre as formas do parasita pode levar à identificação de marcadores moleculares responsáveis por suas características biológicas assim como novos alvos de drogas, além de ser um modelo interessante para o estudo do controle da diferenciação celular em eucariotos.

Além da importância de dados genômicos e transcriptômicos, é também em nível proteico que se torna possível vislumbrar a diversidade e funcionalidade bioquímica dos produtos de expressão gênica (proteínas). A função biológica de uma proteína é fortemente sugerida quando é feita a identificação das proteínas às quais se associa, ou seja, quando são conhecidos os componentes desse complexo. É desta forma que as funções celulares são controladas por complexos proteicos cujas proteínas interagem de forma dinâmica e cooperativa no tempo e espaço. Assim, a análise de interações e localizações de proteínas pode trazer informações sobre suas funções no ambiente celular. O aprofundamento nos estudos bioquímicos e moleculares do *Trypanosoma cruzi* contribuirá para o aumento do conhecimento da biologia do parasita, incluindo os mecanismos de controle do seu ciclo celular, a caracterização de proteínas responsáveis pela sua virulência, assim como da descoberta de possíveis alvos de terapia que possam oferecer à população infectada novas alternativas de tratamento da doença de Chagas.

OBJETIVOS

Assumindo a complexidade, diversidade morfológica e bioquímica do *Trypanosoma cruzi*, o presente trabalho propõe contribuir para a caracterização bioquímica e molecular desse parasita seguindo as seguintes etapas:

- Construção de plasmídeo para transfecção do complexo coesina em *T. cruzi*;
- Análise do perfil geral de complexos proteicos solúveis da forma epimastigota do *T. cruzi* por Blue Native PAGE (BN-PAGE);
- Análise da presença do complexo coesina nas formas amastigotas geradas em meio axênico;
- Análise de proteínas relacionadas a complexos proteicos que são reguladas durante a amastigogênese;
- Análise de proteínas preditas como nucleares que são reguladas na amastigogênese.

MATERIALE MÉTODOS

1. Material

1.1. Organismos e linhagens celulares utilizadas

1.2. Linhagens Bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas para procedimentos de clonagem são descritas a seguir junto ao seu genótipo:

DH5 α (Invitrogen): F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1.

1.3. Células L6

As células L6 são derivadas de mioblasto originalmente isolado por YAFFE (1968) de culturas primárias de músculo de rato (*Rattus norvegicus*).

1.4. *Trypanosoma cruzi*

Em todo o desenvolvimento do trabalho, a cepa de *T. cruzi* utilizada foi a Y para as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

2. Meios de cultura

2.1. Meios de cultura para bacterias

Meio LB (Luria-Broth)

Peptona de caseína 1% (p/v); Extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v). Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 minutos a 121°C.

LB ágar

Adicionar ágar bacteriológico ao LB a uma concentração final de 1,5% (p/v). Esterilizar em autoclave por 20 minutos a 121°C.

Meio 2YT

Peptona de caseína 1,6% (p/v); Extrato de levedura 1% (p/v); NaCl 0,5% (p/v). Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 minutos a 121°C.

SOB

Peptona de caseína 2% (p/v); Extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 0,05%; KCL 2,5mM; MgCl₂ 10mM. Ajustar o pH para 7,2 com NaOH e esterilizar em autoclave por 20 minutos a 121°C. Deixar esfriar, e em seguida adicionar ao meio o MgCl₂ (já em solução esterilizada por filtração).

SOC

Adicionar glicose (já em solução esterilizada por filtração) ao meio SOB a uma concentração final de 20mM.

2.2 Meios de cultura para *T. cruzi*

2.1. Meio de cultura LIT

NaCl 0,4 %; KCL 0,4 %; Na₂HPO₄ 0,8 %; Glicose 0,2 %; Triptose 0,5 %; Infuso de fígado 0,5 %; Hemina 0,0025 %; Soro Fetal Bovino 10 %.

O extrato de fígado foi previamente dissolvido em água destilada, aquecido a 60°C em placa aquecedora sob agitação durante 1 hora e filtrado em papel Whatman número 1. O pH foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e o meio filtrado utilizando filtro Millipore 0,22µm. Após esterilização, o meio foi suplementado para uso com soro fetal bovino 10% (Gibco – BRL), hemina a uma concentração final de 2mg/mL e ampicilina (100µg/mL)/estreptomicina (30µg/mL) esterilizados por filtração em filtro Millipore 0,22µm.

2.3. Meio de cultura e soluções para cultura de células L6

2.3.1. Meio DMEM (Gibco BRL #12100-046) 13,4g; Piruvato de sódio 0,11 g; Bicarbonato de Sódio 3,7 g; Água destilada q.s.p. 900 mL; pH 7,2. O meio foi esterilizado por filtração e distribuído assepticamente em garrafas previamente autoclavadas. Para uso o meio DMEM foi suplementado com soro fetal bovino (GIBCO – BRL) e coquetel de antibióticos (item 2.3.2).

2.3.2. Solução de antibióticos

A solução de antibióticos continha uma solução de ampicilina (100µg/mL) e estreptomicina (30µg/mL). A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22µm, distribuída asépticamente em alíquotas de 0,5 mL e armazenadas a -20°C.

2.3.3. Verseno (EDTA)

EDTA (pH 7,0) 2mM; PBS 1X. A esterilização foi realizada em autoclave por 20 minutos a 121°C.

2.3.4. Tripsina

Tripsina 5%; PBS 1X. O pH foi ajustado para 7,8. A solução foi armazenada a 4°C overnight para decantação. NO dia seguinte, o pH foi checado novamente. A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22µm e armazenado a -20°C.

3. Soluções e tampões

PBS (5X)

NaCl 685,0mM; Na₂HPO₄ 35,0mM; KCL 13,5mM; KH₂PO₄ 7,5mM

Tampão TB para células competentes

Pipes 10mM; MnCl₂ 55mM; CaCl₂ 15mM; KCL 250mM. Dissolver todos os sais exceto o MnCl₂; ajustar o pH 6,7 com KOH. E seguida, adicionar o MnCl₂ e esterilizar por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm; armazenar a 4°C.

Tampão de Lise (1X)

Tris HCL (pH 6,8) 80mM; Sacarose 12%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 2%; Azul de Bromofenol 0,01%. O tampão foi alíquotado em microtubos de 1,5ml e armazenados a -20°C.

3.1. Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris HCL 25mM pH 8,0; EDTA 10 mM.

Esterilizar em autoclave por 20 min a 121°C.

Solução II

NaOH 0,2M; SDS 1%.

Solução III

Acetato de Sódio 3M; Ácido acético 2M; pH 4,8-5,0

3.2. Soluções para géis SDS-PAGE

Gel Separador 13%

Tris HCl (pH 8,8) 0,375M; SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida (39:1 p/p) 13%; APS 1,0%; TEMED 0,1%.

Gel Concentrador 4%

Tris HCl (pH 6,8) 0,125M; SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida (39:1 p/p) 4%; APS 1,0%; TEMED 0,1%.

Tampão de Corrida Tris-Glicina (5X)

Tris Base 0,125M; Glicina 1,25M; SDS 0,5%.

Tampão de Amostra (2X)

Tris HCl (pH 6,8) 0,16M; Sacarose 24%; SDS 4%; β-Mercaptoetanol 4%; Azul de Bromofenol 0,05%.

Solução Corante – Coomassie blue

Coomassie Blue R250 0,25%; Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%.

Solução Descorante/Fixadora

Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%

Tampão de transferência para Western Blot

Trisma base 48mM; Glicina 39mM; SDS 0,0375%; Metanol 20%

3.3. Soluções para géis nativos (BN-PAGE)

Tampão catódico

Tricina 50mM; Bistris 15mM/HCl, pH 7,0; Commassie blue G-250 0,02%

Tampão anódico

Bistris/HCl 50mM; pH 7,0

BN-Lise Buffer (5X)

Bis-Tris 20mM; Ác. Aminocapróico 500mM; NaCl 20mM; EDTA 2mM, Glicerol 10%, Triton x-100 0,1%

BN-Diálise Buffer

Bis-Tris 20mM; Ác. Aminocapróico 500mM; NaCl 20mM; EDTA 2mM, Glicerol 10%, Triton x-100 0,1%

Gel concentrador 4%

Acrilamida/Bisacrilamida (48:1,5 p/p); Gel Buffer; APS 1,0%; TEMED 0,1%

Gel Buffer 3X

Bistris/HCl 150mM; ácido aminocapróico 1.5M; pH 7,0

Gel separador 5%

Acrilamida/Bisacrilamida (48:1,5 p/p); Gel Buffer; APS 1,0%; TEMED 0,1%

Gel separador 18%

Acrilamida/Bisacrilamida (48:1,5 p/p); Gel Buffer; APS 1,0%; TEMED 0,1%

Solução fixadora II

3.4. Soluções para eletroforese em géis de agarose

Tampão TBE (10X)

Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89M; EDTA 0,02M

Tampão de amostra (5X)

TBE 5X; Glicerol 25 %; Azul de Bromofenol; 0,01 % Xileno Cianol; 0,01 %

Brometo de Etídeo

Solução estoque: 10 mg/mL em água destilada. Concentração final de uso: 0,5 µg/mL.

4. Métodos

4.1. Manutenção das culturas

4.1.1. Cultura de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As células epimastigotas cepa Y foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) a uma temperatura de 28°C. Os repiques foram realizados semanalmente com inóculo de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/mL e cultivados durante 48 e 72 horas. As células foram cultivadas de acordo com o experimento, centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos. O sedimento contendo as formas epimastigotas foi utilizado para realização dos experimentos.

4.1.2. Cultura de tripomastigotas sanguíneas

Tripomastigotas metacíclicos purificados e mantidos em estoque foram descongelados para infectar células L6. A infecção foi mantida durante 72 horas com aproximadamente 10 parasitas por célula (8×10^4 células/cm²). Após esse período, sucessivas eclosões liberavam as formas tripomastigotas sanguíneas. Em seguida os parasitas eram coletados e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado por mais duas vezes com PBS 1X estéril. Este processo foi realizado até a obtenção do número total de parasitas necessários para a execução dos experimentos.

4.1.3. Cultura de amastigotas diferenciados por exposição a pH ácido

O ensaio de amastigogênese e a produção de amastigotas axênicos foram realizados por incubação de tripomastigotas em meio DMEM sem SFB, pH 5.0, durante 9 horas a 37 °C e 5% CO₂ conforme a literatura (TOMLINSON et al., 1995; HERNANDEZ-OSORIO et al., 2010). Para os experimentos quantitativos do proteoma

durante a diferenciação, foram coletados parasitos também em estágios intermediários da amastigogênese após 30 e 120 min de incubação.

4.1.4. Cultivo de células L6

As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, a 37°C, com 5% de CO₂. O meio DMEM foi retirado e descartado. Em seguida 2,0 mL de solução de verseno contendo 2 % de tripsina eram adicionados às garrafas e as células foram mantidas nessa solução à temperatura ambiente por aproximadamente 30 s. Após este período, a solução de verseno era retirada e descartada e as células incubadas a 37°C por 10 min para que descolassem das garrafas. Em seguida, 2,0 mL de meio DMEM suplementado eram adicionados em cada cultura para homogeneização das células e 500 µL de suspensão de células eram inoculadas em garrafas de 150 cm² (marca TPP) contendo 10 mL de meio DMEM suplementado.

4.1.5 Cultivo de células L6 para infecção

As monocamadas de células L6 foram obtidas por meio do plaqueamento de $4,0 \times 10^4$ células/ cm² em garrafas de 150 cm² contendo 20 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Após 48 h de incubação em estufa a 37°C foram obtidos aproximadamente $8,0 \times 10^4$ células/ cm².

4.2. Construção de vetores para transfecção transiente em *Trypanosoma cruzi*

4.2.1. Digestão com enzimas de restrição

O plasmídeo pLRT (gentilmente cedido pela Profª. Dra. Santuza Teixeira, UFMG) é um vetor específico para a transfecção transiente em *Trypanosoma cruzi*. Para a digestão do pLRT, misturas de reação foram feitas com volumes totais de 40µl no caso de preparação de vetores e insertos para os experimentos de clonagem. Para a retirada do gene da luciferase do seu vetor, foram usadas as enzimas BamH1 e XhoI, respeitando as recomendações do fabricante. 5µg de DNA foram digeridos e o fragmento correspondendo ao gene da luciferase liberado. Os fragmentos do eGFP e

Red2 que funcionariam como repórteres foram retirados dos vetores pEGFP-N3 e pDsRed2-N1, respectivamente. Para isso 5µg de DNA de cada plasmídeo foram digeridos com as enzimas de restrição BglII e NotI por 4 horas a 37°C. Após a obtenção do vetor pLRT sem o fragmento correspondente à luciferase e os fragmentos GFP e Red, um novo sistema foi montado.

4.2.2. Purificação dos fragmentos de DNA de gel de agarose

Para a clonagem, tanto o fragmento quanto o vetor foram fracionados em gel de agarose preparados segundo o item 3.4. As bandas de interesse foram excisadas do gel, colocadas em tubos de 1,5mL e o DNA purificado utilizando-se o kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (GE healthcare), seguindo protocolo do fabricante.

4.2.3. Ligação de fragmentos de DNA

Todas as reações de ligação foram feitas em um volume final de 10µl com adição de uma unidade da enzima T4 DNA Ligase (Gibco) e incubadas a 16°C por 18 horas. A metade desse sistema foi usada para a transformação de células competentes DH5α. A proporção vetor/inserto foi calculada de acordo com a fórmula descrita em *Promega Protocols & Applications Guide* (1991), tendo como base a adição de 100ng do vetor ao sistema de reação

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{kb do inserto} \times \text{relação molar inserto/vetor}}{\text{kb do Inserto}} = \text{ng de inserto}$$

A relação vetor/inserto foi sempre 1:2.

4.2.4. Cultivo de células competentes de *Escherichia coli* (Inoue et. al. 1990)

Células DH5α estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e estriadas em meio de cultura LB Agar e incubados por 18 horas a 37°C. Após crescimento, foram coletadas quatro colônias de 2-3 mm de diâmetro e inoculadas em 100 ml de meio SOB sob agitação de 22 rpm, a 30°C, até atingir 0,6 de OD₆₀₀/mL. Em seguida, a cultura foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2500 x g, a 4°C, durante 10 minutos. O sedimento de células foi ressuscitado em 32 ml de TB gelado e incubado no gelo por 10 min. Foi realizada uma nova centrifugação a 2500 g, por 10 min. a 4°C e o sedimento obtido foi ressuscitado em 8 ml de tampão TB. Finalmente, adicionou-se lentamente DMSO, homogeneizando e diluindo para uma concentração final de

7%, incubou-se no gelo por 10 minutos, distribuiu-se 200 µL da suspensão de células em tubos de 1,5 mL, os quais foram resfriados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a – 80°C.

4.2.5. Transformação de bactérias por choque térmico

Tubos contendo 200 µl de células competentes foram descongelados em banho de gelo e a eles adicionados 50-100 µg do plasmídeo desejado. As células foram incubadas em gelo por uma hora, depois submetidas ao choque térmico por 30s à 42°C e rapidamente transferidas para o banho de gelo por 10 minutos. Em cada tubo adicionou-se 0,8 mL de SOC, deixando-os à 37°C por 1 hora. Após este período, as células foram semeadas em placas de LB ágar contendo o antibiótico de seleção adequada (ampicilina) e cultivada à 37°C por 14-18 horas.

4.2.6. Extração de DNA plasmidial de *E. coli* (Birnboim; Doly, 1979)

Para extração de DNA plasmidial, clones foram selecionados e inoculados em 3 mL de meio LB ou 2YT contendo o antibiótico de seleção e incubados sob agitação a 220 rpm a 37°C por 18 horas. Para a extração de DNA plasmidial (Miniprep) foram utilizados 2 mL da cultura por meio do método de lise alcalina (BIMBOIM; DOLY, 1979; SAMBROOK et. al. 1989).

4.2.7. Reação em cadeia da polimerase

Para confirmação da clonagem, oligonucleotídeos específicos foram desenhados e sintetizados para avaliar a inserção do fragmento clonado no vetor pLRT. Com a utilização desses oligonucleotídeos, foram realizados experimentos de PCR com os vetores clonados. Na região 5' foi sintetizado um oligonucleotídeo com o tamanho de 20 nucleotídeos e com a temperatura de anelamento no vetor de 62° C, enquanto o primer anti-senso também foi sintetizado com o tamanho de 20 nucleotídeos e temperatura de anelamento 60° C Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos sintetizados para avaliar a inserção do fragmento clonado.

Primer	Características	Sequência (5' - 3')	Tamanho	Tm
PR358	5' UTR amastina - primer sense	5' TCCCCTGCTTTCAACCCTAG 3'	20	62
PR359	3' UTR da TcR27 - primer antisense	5' GTCCGTTACAAAGGTCGCCA 3'	20	62

Para a amplificação o sistema de PCR foi realizado com o volume final de 25 μ l constituído por 50 ng de vetor pLRT clonado, 1,5mM de MgCl₂, 0,1 μ M de dNTPs, 20 picomoles de cada primer e 2,5 U da enzima *Taq* polimerase (invitrogen).

As amostras foram amplificadas em um termociclador (BioRad). A temperatura de anelamento foi calculada 2° C abaixo do Tm correspondente dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação.

Os parâmetros de amplificação adotados foram:

1. Desnaturação inicial: 94° C/1 min.
2. Desnaturação: 94° C/ 30 s.
3. Anelamento: 60° C/ 30 s.
4. Extensão: 72° C/ 45 s.
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 35 vezes.
6. Extensão final: 72° C/ 1 min.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% e visualizados após o tratamento com brometo de etídeo 0,22 μ g/mL, em sistema de fotodocumentação BioRad Universal Hood II (BioRad).

4.3. Géis para proteína e *western blot* para detecção da subunidade SCC1 do complexo coesina

4.3.1. Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O gel desnaturante de poliacrilamida segue o protocolo original de Laemmli (1970). Para a confecção dos géis, foram utilizadas placas de vidro de 16,5cm x 15.5cm, espaçadores de 0,75mm e pentes com 10 poços. O gel foi polimerizado pela adição de 100 μ l de persulfato de amônio 10% e 10 μ l de TEMED a cada 10 mL de solução de gel separador (13%). O gel separador foi aplicado às placas e coberta com 500 μ l de butanol

para evitar contato com ar e conseqüente oxidação. Após polimerização o butanol foi retirado, a superfície do gel lavado com água destilada e secado com papel filtro para retirar o excesso de água. Em seguida foi adicionado o gel concentrador com 50µl de persulfato de amônio 10% e 5µl de TEMED. Então, foi adicionado tampão de amostra às amostras de proteínas e incubadas a 100°C por 5 minutos para garantir a desnaturação completa das proteínas. As eletroforeses foram realizadas com uma corrente constante de 25 mA à temperatura ambiente. Após o término da corrida, a coloração do gel foi realizada com a solução de Coomassie Blue R-250, incubando-o sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas e descorado em seguida para visualização das bandas. O processo de coloração do gel não era realizado se o mesmo fosse utilizado para análise *western blotting*.

4.3.2. Western blotting para detecção da subunidade SCC1 do complexo coesina

A técnica de transferência semi-seca foi realizada utilizando o sistema *Semi – Dry Transfer Cell* (BIO-RAD), com membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra membrane 0,45µm – Amersham). Após a corrida da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana. Para isso foi colocada sobre o anodo do sistema de transferência uma pilha de seis pedaços de papéis de filtro, previamente saturados com tampão de transferência. Sobre esta primeira pilha de papel de filtro, foi colocado o gel, e sobre o gel, a membrana de nitrocelulose seguida de outras seis folhas de papel de filtro. O eletrodo aniônico foi acoplado ao sistema e a transferência realizada com uma amperagem constante de 0,8 mA/cm² de membrana por aproximadamente 1 hora.

4.3.2.1. Incubação com anticorpos

Imediatamente após a transferência, a membrana foi saturada com leite desnatado 5% durante a noite. Após a saturação, a membrana foi lavada com PBS1X durante 5 minutos. Em seguida, o anticorpo anti-SCC1 foi diluído numa razão de 1:250 em leite desnatado 1% diluído em PBS. A incubação com o anticorpo primário ocorreu durante 4 horas. Logo após, a membrana foi lavada com PBS 1X por três vezes com duração de 10 minutos cada e incubada com o anticorpo secundário (anti-rabbit acoplado a fosfatase alcalina) na diluição de 1:1000 em PBS 1X contendo leite desnatado a 1%. A incubação ocorreu durante 2 horas seguida de nova lavagem com PBS 1X por três vezes de 10 minutos.

4.3.2.2. Revelação

A revelação foi feita adicionando o tampão APB por um período de um minuto, incubando a membrana com a solução de revelação BCIP/NBT (invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A membrana permaneceu sob agitação com a solução de revelação até o aparecimento das bandas correspondentes à proteína SCC1.

4.4. Blue Native Page (BN-PAGE) para purificação de complexos proteicos solúveis de epimastigotas

4.4.1. Preparo das amostras para BN-PAGE

As amostras das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram obtidas a partir de cultura axênica. Para a purificação de seus complexos solúveis, 1×10^8 células do parasita foram lisadas com solução BN-Lise buffer e o material insolúvel separado por centrifugação a 10.000g por 30 minutos. Todas as amostras tiveram suas concentrações de proteínas determinadas pelo método de Bradford.

4.4.2. Primeira dimensão do BN-PAGE

O BN-PAGE foi confeccionado contendo um gel separador com gradiente de 5 – 18% e o gel concentrador 4%. Após montagem do sistema e aplicação das amostras a corrida foi realizada a uma corrente constante de 15mA. Ao final da corrida o gel foi submetido a fixação utilizando a solução fixadora II descrito no item 3.3 de materiais e métodos. As amostras submetidas a *western blotting* não foram fixadas.

4.4.3. Segunda dimensão do BN-PAGE

Uma linha de complexos foi recortada da primeira dimensão do BN-PAGE e submetida a uma segunda dimensão. Nesta etapa, a amostra foi incubada por 2 horas em tampão desnaturante (1% β -mercaptoetanol e 1% SDS 10%) e lavada várias vezes com água uma vez que o β -mercaptoetanol inibe a polimerização. O gel correu por 10 horas a uma corrente de 25 mA constante e corado com nitrato de prata.

4.5. Coloração com nitrato de prata

Após a corrida da segunda dimensão do BN-PAGE, o gel foi submetido a coloração com nitrato de prata. O gel foi incubado durante a noite com solução fixadora III. Na sequência, o gel foi submetido a duas lavagens de 20 minutos com uma solução contendo 50% de etanol. Em seguida, o gel foi incubado com 0,02% de tiosulfato de sódio (p/v) depois lavado três vezes com água Milli-Q. A impregnação foi feita com uma solução contendo 0,2% AgNO₃ e 0,075% de formaldeído por 20 minutos e lavado novamente por três vezes com água Milli-Q. As proteínas foram reveladas com uma solução reveladora contendo 6% Na₂CO₃ (w/v), 0,05% de formaldeído e 0,4mg de tiosulfato de sódio (w/v). A reação foi parada com solução 50% metanol e 12% ácido acético.

4.6. Preparo de amostras da amastigogênese e digestão de proteínas para análises por espectrometria de massas

As proteínas do extrato total do parasito durante a amastigogênese (tempos 0 min, 30 min, 2h e 9h de indução da diferenciação) foram precipitadas com etanol/acetona. Resumidamente, cada amostra foi diluída quatro vezes etanol gelado. Então foi adicionado o mesmo volume de acetona gelada, agitados vigorosamente e incubados durante a noite a -20 °C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g a 4 °C por 15 min e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado outras três vezes com solução gelada de 40% etanol/ 40% acetona.

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

4.6.1. Marcação com iTRAQ™

A marcação com iTRAQ™ seguiu as instruções do fabricante com pequenas modificações. Brevemente, 100 µg do digesto dessalinizado e seco de cada amostra de

cada tempo de diferenciação foram ressuspensos em 30 µL de 300 mM TEAB e adicionadas a um *vial* do reagente iTRAQ™ já ressuspensado em 70 µL de etanol. Os *vials* já com as amostras foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 1-2 horas e em seguida foram misturados na proporção de 1:1:1:1 (tempos 0min marcado com iTRAQ 114, 30 min com iTRAQ115, 2h com iTRAQ116 e 9h com iTRAQ117). O equivalente a 20 µg da amostra marcada e misturada foi encaminhado para o fracionamento automático com coluna TSKGel Amide 80 HILIC HPLC (comprimento: 15 cm, diâmetro: 2 mm, tamanho de partícula: 3 µm) em um equipamento Agilent com coletor automático de frações. As amostras da amastigogênese foram analisadas em triplicata biológica com duas repetições técnicas (dois fracionamentos por HILIC) de cada replicata biológica.

4.6.2. LC-MS/MS

As amostras foram analisadas utilizando um sistema EASY-nano LC (Proxeon Biosystems) acoplado *online* com um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). 20 µg das amostras da amastigogênese de cada uma das três replicatas biológicas foram separadas em 10 frações em um HPLC com coletor automático de amostras e com uma coluna TSK Gel Amide 80 HILIC (comprimento: 15 cm, diâmetro: 2 mm, partícula: 3 µm) essencialmente como descrito em (MCNULTY; ANNAN, 2008). A aplicação e análise no espectrômetro de massas foi feita basicamente como descrito acima, exceto que o gradiente de 26% até 100% fase B durou 77 min (total de 90 min), a fragmentação se deu por HCD dos sete picos mais intensos. O processamento dos dados foi feito com *Proteome Discoverer* v.1.3 beta (Thermo Scientific). A busca e identificação das proteínas também foram realizadas usando o programa *Proteome Discoverer* com algoritmo Mascot v.2.3 contra um banco de dados de *Trypanosoma cruzi* instalado no servidor do laboratório, gerados usando a ferramenta *Database on Demand* (REISINGER; MARTENS, 2009) contendo as proteínas encontradas no UniProt/SWISS-PROT e UniProt/TrEMBL. Proteínas contaminantes (diversos tipos de queratinas humanas, BSA e tripsina porcina) foram adicionadas ao banco de dados e removidas manualmente das listas de identificação. As buscas foram feitas com os seguintes parâmetros: precisão no MS de 10 ppm, no MS/MS de 0.5 Da para espectros de fragmentação por CID e 10 MS de ppm e MS/MS de 0,05 ppm para espectros de fragmentação por HCD, até 2 sítios de clivagem perdidos, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação da

metionina, acetilação N-terminal da proteína como modificações variáveis. Nas amostras da amastigogênese, as modificações variáveis N-terminal iTRAQ *tagging* e fosforilação de S, T e Y também foram aceitas e para as amostras biotiniladas, NHS-LC biotinilação do N-terminal da proteína e NHS-LC biotinilação de resíduos de lisinas (incremento de 339.16 Da). O número de proteínas, grupo de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com uma taxa de detecção de falsos positivos (FDR) menor que 1% e peptídeos com *rank1* e mínimo de 2 peptídeos por proteínas foram aceitos para identificação com *Proteome Discoverer*.

4.6.3. Análise de dados, bioinformática e estatística

O software *Protein Center* (Thermo Scientific) foi usado para interpretar os resultados em nível de proteínas (Gene Ontology, peptídeo sinal e domínio transmembranar). Anotação de proteínas de *T. cruzi* foi adquirida usando o software *Blast2GO* (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) (CONESA et al., 2005) com os parâmetros básicos.

A análise estatística da expressão relativa quantificada com iTRAQTM foi feita com o software R onde os dados consistiam de três replicatas biológicas contendo as frações de peptídeos e fosfopeptídeos marcados com iTRAQ. Os valores da intensidade do íon *reporter* de cada amostra e de cada fração foram transformados em log₂ e normalizados pela mediana. Medidas múltiplas do mesmo peptídeos foram mescladas usando-se a função *RRollup* do pacote DanteR(TAVERNER et al., 2012), onde foi permitido somente um peptídeo por medida e foi escolhido o parâmetro médio ao invés de mediana.

Regulações estatisticamente significantes requerem ferramentas mais sofisticadas que apenas o teste-t padrão. Os teste Limma (SMYTH, 2005) *erank products* (BREITLING et al., 2004; KOZIOL, 2010) oferecem poder suficiente para lidar com baixo número de replicatas e adicionais *missing-values*. Desta forma realizamos ambos os testes estatísticos em todos os fosfopeptídeos e proteínas contra a amostra marcada com iTRAQ 114 Da. e corrigimos para teste múltiplo (Storey, 2002). Todas as proteínas com valor-q (em ambos os testes) abaixo de 0,05 (5% *false discovery rate*) foram consideradas como reguladas.

Para a análise de *clusters*, foi calculada a média sobre todas as três replicatas para cada condição. Fosfopeptídeos e proteínas foram agrupadas em um único conjunto de dados. *Fuzzy c-means clustering* foi aplicado após determinar-se o valor do

parâmetro *fuzzifier* e o número de *clusters* de acordo com Schwämmle e colaborador (SCHWAMMLE; JENSEN, 2010).

4.6.4. Digestão *in situ*

Bandas de SDS-PAGE de interesse foram cortadas e descoradas. As proteínas presentes na banda de SDS-PAGE, foram reduzidas as pontes dissulfeto por incubação das fatias de gel em NH_4HCO_3 100 mM contendo DTT 10 mM por 1 h a 56°C. Depois de retirada esta solução, os resíduos de cisteína foram alquilados em solução de NH_4HCO_3 100 mM contendo iodoacetamida 55 mM por 45 min em temperatura ambiente, no escuro. Realizou-se um novo ciclo de lavagem água/acetonitrile antes de uma nova secagem em *Speed Vac*. Os géis foram hidratados novamente em NH_4HCO_3 50 mM, CaCl_2 5 mM contendo 12,5 ng/ μL de tripsina de grau de sequenciamento (Promega, Madison, WI, EUA) e incubados a 37°C por 16–18 h. Os peptídeos trípticos foram extraídos duas vezes com 40 μL de solução acetonitrila/água/TFA (66:33:0,1) em sonicador por 10 min. Os digestos foram dessalinizados e concentrados usando ZipTips[®] C₁₈ (Millipore, Billerica, MA, EUA).

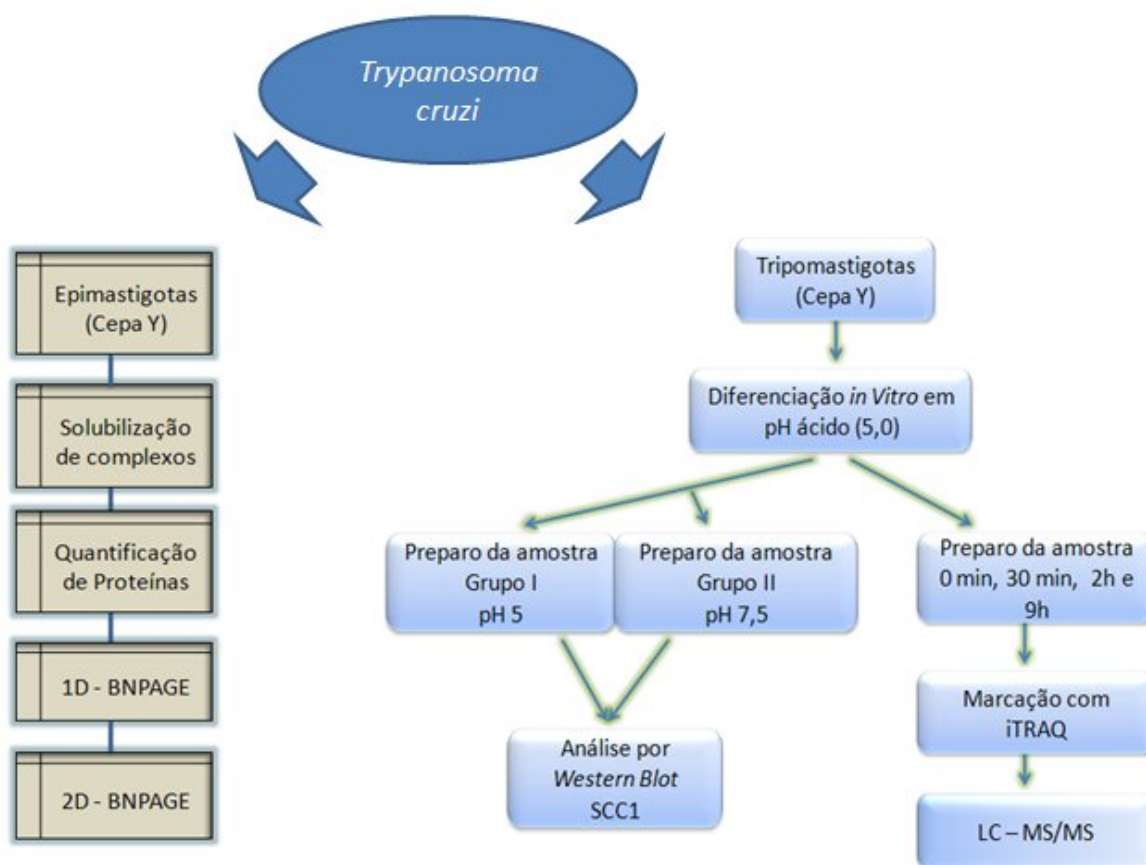
4.6.5. Espectrometria de massa (MS) e identificação de proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). A calibração externa foi realizada utilizando um “kit” de peptídeos padrão fornecido por Bruker Daltonics (Peptide calibration standard (1000–3200 Da): angiotensina II, angiotensina I, substância P, bombesina, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39, somatostatina 28).

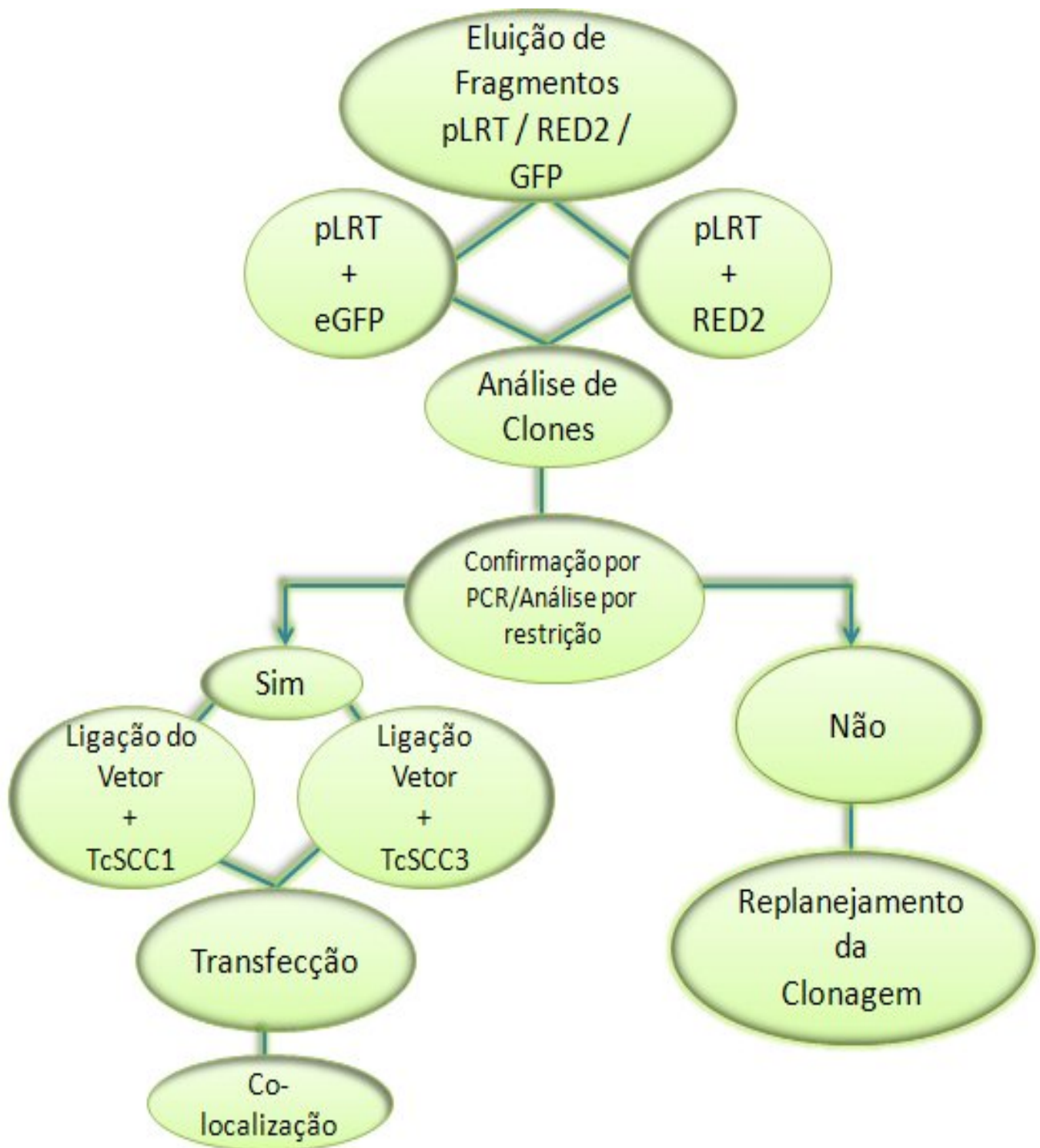
Espectros de massas foram obtidos em modo refletido positivo para os peptídeos, utilizando o programa Flex Control v. 2.4 (Bruker Daltonics). O programa Flex Analysis v. 2.4 (Bruker Daltonics) foi utilizado para adquirir e editar as listas de picos. Tais listas foram utilizadas para buscas contra o banco de dados de proteínas do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) usando Bio Tools v. 2.0 (Bruker Daltonics) acoplado ao programa Mascot v. 2.1 ou 2.2 (<http://www.matrixscience.com/>). As massas monoisotópicas dos peptídeos trípticos foram utilizadas para identificar as proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) apenas em modo MS.

A tolerância de erro de massa molecular estabelecida para os peptídeos foi menor que 100 ppm e nenhuma restrição foi imposta para massa molecular de proteína ou para qualquer linhagem filogenética. Estabeleceu-se oxidação de metionina como modificação variável e propionamidação de cisteína (alquilação com acrilamida) como modificação fixa. Os possíveis sítios de clivagem perdidos foram estabelecidos como zero ou, no máximo, um. Identidades foram consideradas significativas se o escore de identificação de proteína ultrapassasse o limiar variável calculado pelo programa Mascot, assumindo valor de $p < 0,05$.

5. Fluxograma experimental I



5.1. Fluxograma experimental II (Estratégia para clonagem)



RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Construção de plasmídeos para transfecção em *Trypanosoma cruzi*

Para entender melhor as características e funções do complexo coesina em *Trypanosoma cruzi* plasmídeos foram construídos para determinar a co-localização de duas subunidades que pertencem ao complexo, SCC1 e SCC3.

Para cada uma das subunidades (SCC1 e SCC3) do complexo foi montado um plasmídeo correspondente. A primeira etapa consistiu na retirada dos genes repórteres de diferentes plasmídeos para serem inseridos no nosso vetor de interesse. Para a retirada do gene da luciferase do vetor de transfecção em *T. cruzi* utilizamos as enzimas NotI e XhoI que reconhecem sítios específicos na dupla fita de DNA do plasmídeo, liberando dois fragmentos, um correspondendo ao plasmídeo vazio sem o gene da luciferase e um outro fragmento menor correspondendo ao gene da luciferase (Figura 10A). Utilizando o próprio plasmídeo intacto como controle (Linhas 1 e 2 - Figura 10A) pode ser observado que a retirada do gene foi realizada com êxito. Após a separação desses fragmentos, o plasmídeo vazio foi eluído do gel e armazenado a -20° até o momento de ser utilizado.

De posse do plasmídeo pLRT vazio, experimentos equivalentes foram realizados com os plasmídeos pEGFP-N3 e pDsRed2-N1 para a retirada dos genes do EGFP e RED2 que servirão como os genes repórteres nos experimentos de transfecção. Tanto para o pEGFP-N3 quanto para pDsRed2-N1 foram utilizados as enzimas BglII e NotI. Os tamanhos dos fragmentos esperados dos genes do EGFP e RED2 correspondem a 720 bp. Como pôde ser observado nas Figuras 10B e 10C, os fragmentos foram separados dos seus vetores da maneira esperada.

Após a eluição de todos os fragmentos, esses foram submetidos a análises por eletroforese em gel de agarose (Figura 10D). Ao montar o sistema de ligação de fragmentos, esses foram incubados com oligo linkers específicos descritos no material e métodos.

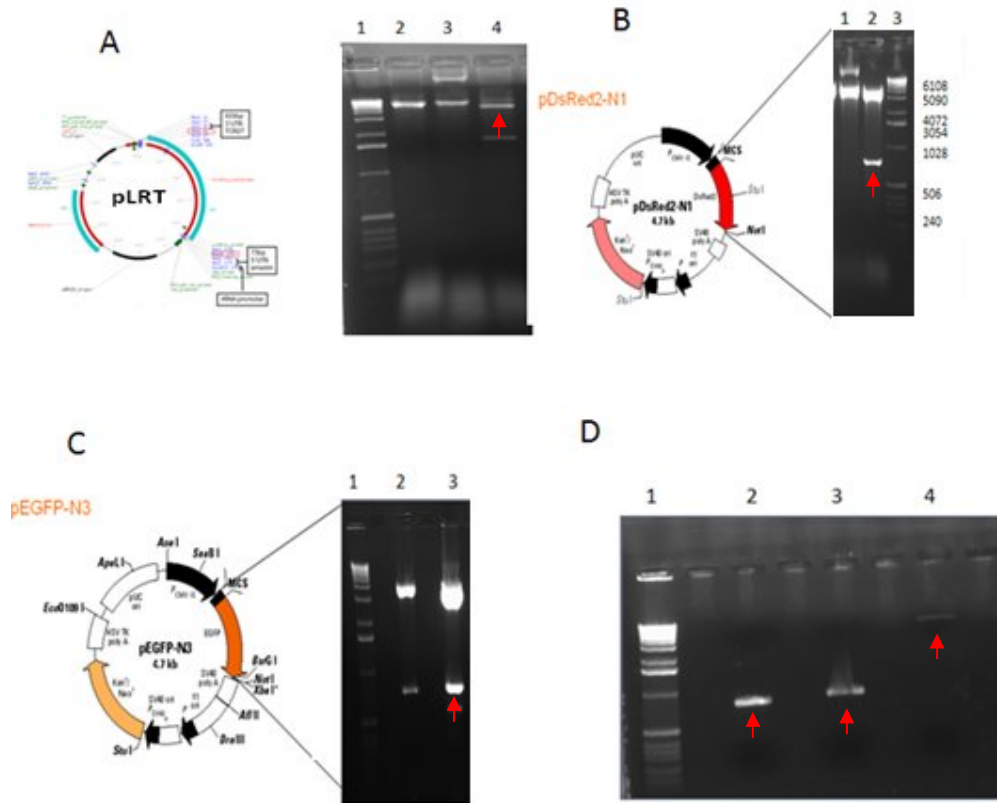


Figura 10. Perfil de restrição dos fragmentos de clonagem. As figuras acima representam o perfil de restrição dos fragmentos a serem empregados em experimentos de clonagem. Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1,5%. A – Retirada do gene luciferase do plasmídeos pLRT; B – Restrição do gene RED2 do pDsRed2-N1; C – Restrição do gene do EGFP do pEGFP-N3; D – Análise de todos os fragmentos para a clonagem. As setas em vermelho nas figuras A, B e C indicam quais foram os fragmentos eluídos do gel.

Para a reação de ligação utilizou-se 10 ng do vetor digerido, 20 ng de cada inserto em sistemas independentes. As ligações ocorreram por um período de 18 horas a 16°C e foram utilizadas para a transformação em bactérias *E. coli* DH5α competentes. As colônias crescidas foram selecionadas para a confirmação da clonagem. Essa confirmação se deu inicialmente pela extração dos plasmídeos de todas as colônias crescidas a partir do crescimento em cultura líquida objetivando obter maior número de bactérias recombinantes. Após a extração plasmidial, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% como mostrado nas Figuras 11A e B. Na linha 1 de cada imagem o marcador correspondente a 1kb ladder. Na segunda linha o controle que consiste no plasmídeo pLRT intacto, ou seja, o plasmídeo ainda contendo o gene da luciferase. As demais linhas correspondem aos plasmídeos extraídos das bactérias.

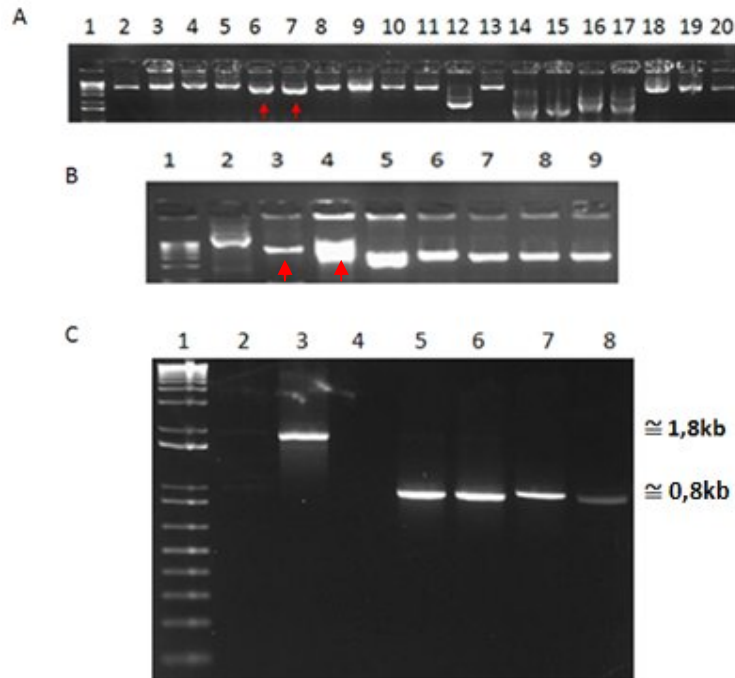


Figura 11. Análise em gel de agarose dos possíveis plasmídeos recombinantes pLRT + EGFP e pLRT + Red2. (A) Análise em gel de agarose a 1 % dos possíveis plasmídeos recombinantes pLRT+EGFP. Linha 1 - o marcador de 1kbladder; linha 2 - controle do plasmídeo intacto contendo o gene da luciferase. Linhas 3 a 20, possíveis plasmídeos recombinantes pLRT + EGFP. As setas em vermelho indicam os possíveis clones recombinantes corretos. (B) Análise em gel de agarose a 1 % dos possíveis plasmídeos recombinantes pLRT+Red2. Linha 1 - o marcador de 1kbladder; linha 2 - controle do plasmídeo intacto contendo o gene da luciferase. Linhas 3 a 9, possíveis plasmídeos recombinantes pLRT+Red2. As setas em vermelho indicam os possíveis clones recombinantes corretos. (C) Confirmação da clonagem dos genes EGFP e Red2 no pLRT. Linha 1 – marcador 1 kb plus ladder. Linha 2 e 4 – controles negativos pEGFP-N3 e sem DNA, respectivamente. Linha 3 – controle positivo pLRT com a amplificação do gene da luciferase (1,8 kb). Linhas 5 e 6 – plasmídeos recombinantes pLRT+EGFP e linhas 7 e 8 – plasmídeos recombinantes pLRT+Red2, todos amplificaram o fragmento correspondente esperado de 0,8 kb.

Nas linhas 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 18, 19 e 20 são observados plasmídeos do mesmo tamanho que o controle, o que quer dizer que esses não foram devidamente clonados, pois o gene da luciferase é maior que o gene do EGFP e desta forma o tamanho do plasmídeo clonado deve ser menor. Nas linhas 6 e 7 podem ser observados dois possíveis plasmídeos recombinantes com uma massa molecular um pouco menor que o plasmídeo pLRT. Isso quer dizer que os plasmídeos podem ter incorporado o oligo *linker* e o fragmento dos gene do EGFP. As linhas 12, 14, 15, 16 e 17 são provavelmente plasmídeos que não incorporaram os fragmentos, pois apresentam tamanho muito inferior ao pLRT (Figura 11A). O mesmo pode ser observado na Figura 11B, linha 3, para os transformantes do pLRT + RED2. Assim como na figura anterior, na primeira linha está o marcador de massa molecular 1 kb *ladder*, na segunda linha o

controle positivo que se refere ao pLRT intacto contendo o gene da luciferase. Na linha 3 aparece um possível clone já que esse parece ter o tamanho menor que o controle, assim como esperado quando se compara os tamanhos do gene da luciferase e do RED2. Já nas linhas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 não houve a inserção como esperado pois, os plasmídeos apresentam tamanhos menores do que o controle pLRT intacto, isto quer dizer que aqueles plasmídeos com tamanho inferior provavelmente correspondem ao pLRT vazio (sem luciferase e sem RED2) e religado.

Para confirmar a montagem do vetor para transfecção em *T. cruzi*, os plasmídeos indicados pelas setas vermelhas nas Figuras 11 A e B foram utilizados para experimentos de PCR a fim de observar a inserção dos genes do EGFP e RED2 no plasmídeo pLRT. Para isto, utilizamos iniciadores específicos para o vetor pLRT em experimento de PCR. Como controles negativos foram utilizados o vetor origem do gene EGFP (pEGFP-N3) e um sistema sem adição de DNA plasmidial com o propósito de observar alguma possível contaminação dos oligos utilizados. Como pode ser observado na Figura 11C nos poços 2 e 4 (pEGFP-N3 e sem DNA plasmidial, respectivamente), não houve amplificação, uma vez que os oligonucleotídeos amplificariam somente o fragmento que tenha sido inserido no vetor pLRT. Como controle positivo do experimento, utilizamos o pLRT intacto, ou seja, o vetor contendo o gene da luciferase. Como pode ser observado no poço 3, houve uma amplificação correspondendo a 1,8kb, tamanho esperado para a amplificação do gene da luciferase. Nos poços 5, 6, 7 e 8, no teste com os plasmídeos recombinantes, pode-se observar a amplificação de um fragmento correspondendo a aproximadamente 800 pb, tamanho esperado para a amplificação após a clonagem do gene do EGFP e RED2. Estes dados demonstram claramente que a clonagem ocorreu da forma esperada, uma vez que os genes correspondentes (EGFP e RED2) inseriram no vetor pLRT, produzindo assim dois vetores para transfecção transiente em *T. cruzi* do qual a proteína de interesse seja expressa como proteína de fusão com o gene EGFP ou Red2.

Estudos moleculares dos cinetoplastidas já revelaram muitos mecanismos únicos de regulação, expressão e processamento de genes nestes parasitas (BORST, 1986; VANHAMME; PAYS, 1995). O desenvolvimento de sistemas de transfecção tem sido utilizado como uma ferramenta para a análise genética de parasitas protozoários e permite introduzir e expressar diferentes genes nestes. Entre outras aplicações, estes sistemas de transfecção também podem ser usados para: 1) identificar e caracterizar promotores de transcrição, tais como os de rRNA e promotores de genes SL de *T. cruzi*

(TYLER-CROSS et al. 1995, NUNES et al. 1997); 2) complementar funcionalmente genes endógenos (KELLY et al. 1994, NOZAKI; CROSS, 1994) e 3) analisar o produto gênico em na sua localização celular (CHUNG et al. 1994).

O complexo coesina em tripanosomatídeos ainda é pouco conhecido, não se sabe ao certo qual a sua importância no ciclo celular desses organismos e de suas formas evolutivas. No estudo de GLUENZ et al. (2007) verificou-se que, em *T. brucei*, a depleção da subunidade SCC1 por RNAi ou a expressão de uma SCC1 não clivável leva a uma falha na citocinese. Sem a segregação cromossômica os tripanosomas procíclicos produzem uma célula nucleada e outra anucleada, enquanto em formas sanguíneas a citocinese é interrompida permanecendo incompleta, deste modo há uma falha completa na divisão da forma sanguínea, mas não da forma procíclica.

Estudos realizados com outras proteínas reguladoras do ciclo celular de *Trypanosoma cruzi* mostraram que existem diferenças na imunolocalização destas proteínas quando se comparam as formas amastigotas e tripomastigotas do parasita. Cunha et al. (2005) utilizou anticorpos contra a quinase TzCRK1, uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular através da fosforilação de histonas, e não detectou nenhum sinal para a mesma nas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, enquanto nas formas amastigotas este sinal foi detectado.

2. Análises de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas de *T.cruzi*.

A grande maioria das proteínas funciona como parte de conjuntos compostos por vários elementos, definindo assim os complexos de proteínas celulares como unidades funcionais. Para a solubilização de MCPs (Multi Complexos proteicos) é necessário escolher o detergente apropriado uma vez que ajuda a preservar a estrutura dos complexos proteicos. Por exemplo, foi previamente demonstrado que uso de baixas concentrações do detergente Triton X-100 permite determinar a forma dimérica do complexo F_1F_0 -ATPase, enquanto altas concentrações deste detergente leva a dissociação da forma dimérica do complexo correspondendo a um aumento proporcional da forma monomérica deste mesmo complexo (ARNOLD, PFEIFFER et al. 1998).

Em geral, os detergentes utilizados são o digitonina (0,5 a 1%), Triton X-100 (0,1 a 0,5%), Brij 96 (0,1 a 0,5%) ou o dodecilmaltosídeo (0,1 a 0,5%). Estes são detergentes não iônicos, os quais tendem a estabilizar melhor os MCPs (CAMACHO-CARVAJAL; WOLLSCHIED et al. 2004).

A partir da utilização da técnica de BN-PAGE foi possível realizar a separação de complexos proteicos de lisado total das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Essa ferramenta de eletroforese bidimensional separou em sua primeira dimensão Multi-Complexos Proteicos (MCP) em condições nativas (Figura 12).

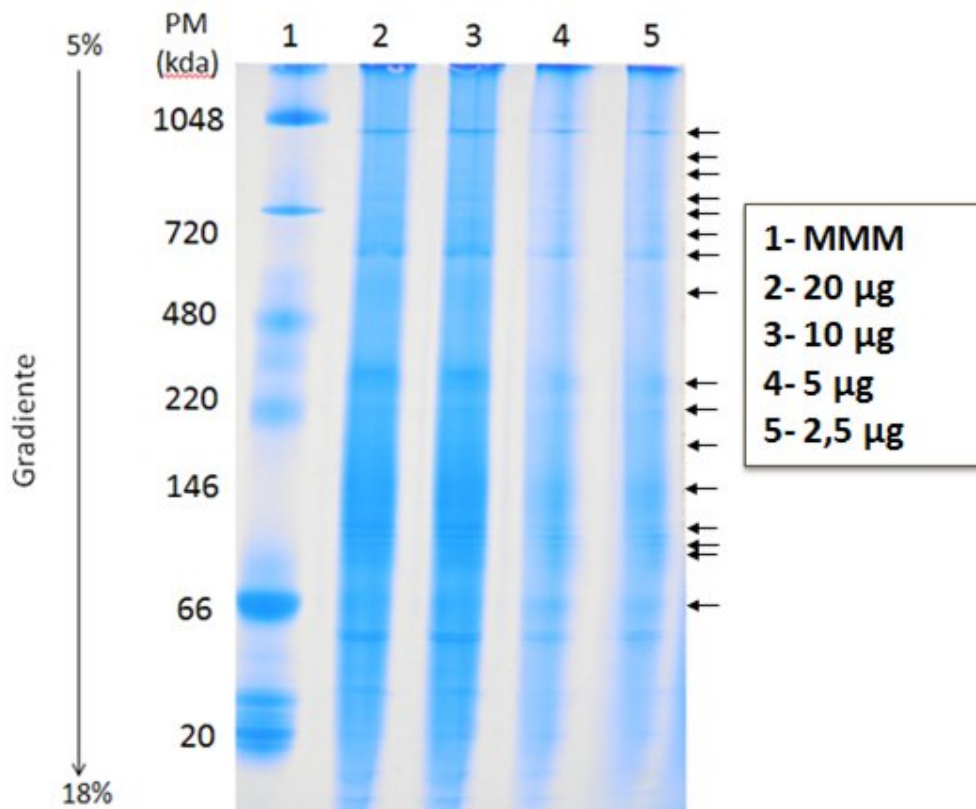


Figura 12. Análise de complexos proteicos solúveis das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os complexos foram separados em uma malha de 5 – 18%T e as amostras foram concentradas em um gel concentrador a 4% T. 1 – Marcador Massa Molecular (MMM). 2, 3, 4 e 5 foram aplicados diferentes concentrações de proteínas para análise de resolução (20, 10, 5 e 2,5 µg, respectivamente). As setas indicam as bandas correspondentes a complexos proteicos.

Para a separação de proteínas por BN-PAGE, o corante Coomassie Blue é necessário, uma vez que esse corante se liga de forma não específica às proteínas criando uma camada de solvatação nas mesmas impedindo a agregação e induzindo os complexos a se dirigirem em direção ao tampão catódico (SCHAGGER et al., 1994). Diferentes concentrações de proteínas (20, 10, 5 e 2,5 µg/µl, respectivamente) foram aplicadas nos poços do gel para observar em qual concentração haveria melhor resolução no gel ou até qual concentração poderia haver agregação. Como pode ser observada na Figura 12, nenhuma das concentrações formou agregados, tão pouco alterou a resolução do gel. As linhas 1 e 2 que contêm maior quantidade de proteínas apresentam um *background* de Coomassie maior do que as linhas 3 e 4 que possuem menor concentração de proteínas.

Antes de fazer um BN-PAGE é necessário assegurar que a porcentagem do gel ajusta-se ao tamanho necessário para detecção do complexo de interesse. Como nosso interesse era fazer uma análise do perfil geral de complexos proteicos solúveis do *T.*

cruzi, um gradiente de 5 a 18% nos garante uma ampla faixa de separação de complexos. As setas na Figura 12 indicam os possíveis complexos proteicos identificados.

Quando comparado com outros métodos para identificação e análise de MCPs, tais como aqueles que usam purificação por afinidade ou imunoprecipitação o BN-PAGE possuem algumas vantagens. Em primeiro lugar, não se baseia na inclusão de uma *tag* ou na ligação de um anticorpo, que pode potencialmente influenciar nas interações proteína-proteína e assim na recuperação e composição do complexo. Em segundo lugar, é possível obter rapidamente informações sobre o número, tamanho, composição e a abundância relativa dos complexos.

A tira quatro do gel nativo com os complexos proteicos solubilizados foi submetida a um processo de desnaturação em uma solução de 1% β -mercaptoetanol e 1% SDS por duas horas. Em seguida, uma segunda dimensão SDS-PAGE foi realizada evidenciando, assim, para cada complexo proteico seus diferentes componentes (Figura 13).

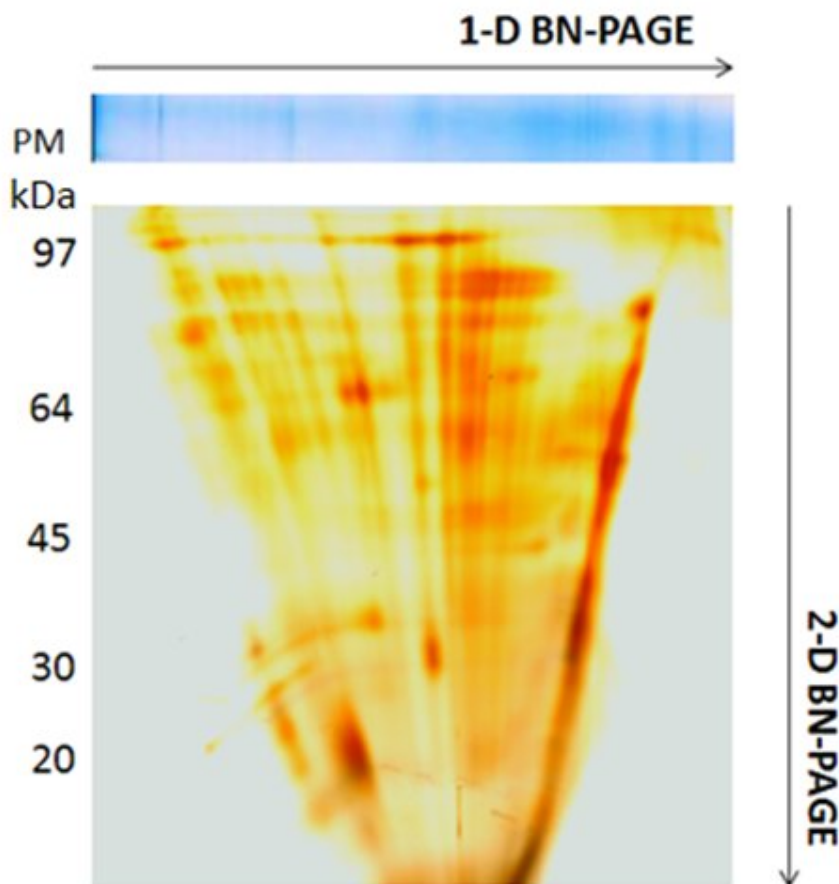


Figura 13. Separação das subunidades dos complexos proteicos de formas epimastigotas de *T. cruzi* por SDS-PAGE. Após a realização da primeira dimensão do BN-PAGE, a tira 4 foi submetida a análise de separação das subunidades de cada complexo. O gel da segunda dimensão do BN-PAGE foi feito em uma concentração de 12%.

Os componentes individuais de cada complexo separado na primeira dimensão foram observados. Seus componentes individuais podem ser visualizados após o gel ter sido corado com nitrato de prata. É importante considerar que os *spots* que aparecem em uma mesma linha vertical na segunda dimensão podem também pertencer a diferentes complexos que migram na mesma posição no BN-PAGE. Para isso pode ser necessário a utilização de anticorpos específicos para a identificação individual dos componentes.

Como pode ser observado, durante a corrida, o perfil de migração das proteínas tomou forma de funil e foi diminuindo sua largura à medida que ocorreu sua corrida. Algumas hipóteses podem ser consideradas a esse respeito, dentre elas, defeito durante a polimerização do gel, alteração na composição do tampão de corrida ou até mesmo alguma falha intrínseca do próprio sistema. Porém, apesar do afunilamento da corrida,

foi possível visualizar com clareza os *spots* correspondentes de cada complexo separado da primeira dimensão.

Uma alternativa sugerida é a excisão individual das bandas de interesse ao invés da corrida de uma linha inteira de complexos. Porém, um fator limitante neste caso é não ter um complexo específico a ser analisado e sim a visualização global dos complexos solúveis dessa forma do parasita. A excisão individual nos levaria a possivelmente desprezar complexos que não estão visíveis ou pela pouca intensidade no gel ou até mesmo pela dificuldade de observação devido ao grande *background* deixado pelo Coomassie durante a corrida.

Apesar de algumas limitações, o BN-PAGE é apropriado para a identificação de MCPs, bem como seu tamanho, composição e abundância relativa. Além disto, esta técnica de eletroforese bidimensional é promissora para avaliar complexos proteicos de extrato total de células, mesmo que a determinação das subunidades se faça necessário para idealizar certamente a magnitude da técnica para lisados totais.

3. Análise da propriedade replicativa de amastigotas de meio axênico

A amastigogênese é um processo natural que ocorre quando tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas no interior das células do hospedeiro vertebrado. Mas os detalhes dos mecanismos de invasão nas células dos vertebrados têm sido obtidos utilizando células de tripomastigotas derivados de cultura, que são equivalentes àqueles tripomastigotas sanguíneos (BURGLEIGH; ANDREWS, 1995). Esses estudos revelaram que a transformação de tripomastigota para amastigota é iniciada de 1-2 horas após a formação do vacúolo parasitóforo. Após este intervalo de tempo, proteínas ácidas componentes da membrana do parasita promovem a formação de poros na membrana do vacúolo parasitóforo e conseqüente liberação do parasita para o meio citoplasmático, onde a diferenciação em amastigotas será concluída.

Vários grupos de pesquisa têm utilizado condições axênicas para induzir a diferenciação dos tripomastigotas sanguíneos em amastigotas e vários fatores têm sido descritos como estimulantes nesse processo de transformação, sendo que esses fatores representam stress para o parasita (VILLALTA; KIERZENBAUM, 1982, ANDREWS et al., 1987; KAMBARA et al. 1990; TOMLINSON et al., 1995).

Um evento descrito na literatura como um dos responsáveis pelo disparo do início da amastigogênese é o pH ácido encontrado no interior dos lisossomos. Tomlinson (1995) observou que a mudança do pH em meio de cultura induziu diretamente a transformação de tripomastigotas em amastigotas e que esses também duplicavam seu DNA, sugerindo que possivelmente esses parasitas são capazes de se dividirem.

Reconhecendo a complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos no ciclo celular de cada célula e sabendo que a duplicação do DNA compreende apenas um passo diante de todo o processo, resolvemos investigar se fato esses amastigotas induzidos em cultura mantêm suas propriedades replicativas. Para isso, induzimos a amastigogênese *in vitro* de forma que os parasitas foram expostos ao meio de cultura pH 5,0 por um período de 9 horas. Até esse período está assegurado que todos os tripomastigotas se transformaram em amastigotas. Após o término desse período, o material biológico foi dividido em dois grupos: aqueles que seriam processados logo ao término da diferenciação e um segundo grupo que após o término da diferenciação seriam lavados, ressuspensos em meio DMEM pH 7,5 e incubados durante a noite. Isto simularia, o contexto do pH dentro dos lisossomos (pH 5) e quando os parasitas escapam para o citoplasma (pH 7,5) onde terminariam a diferenciação em amastigotas e iniciariam o processo de multiplicação celular (Figura 14).

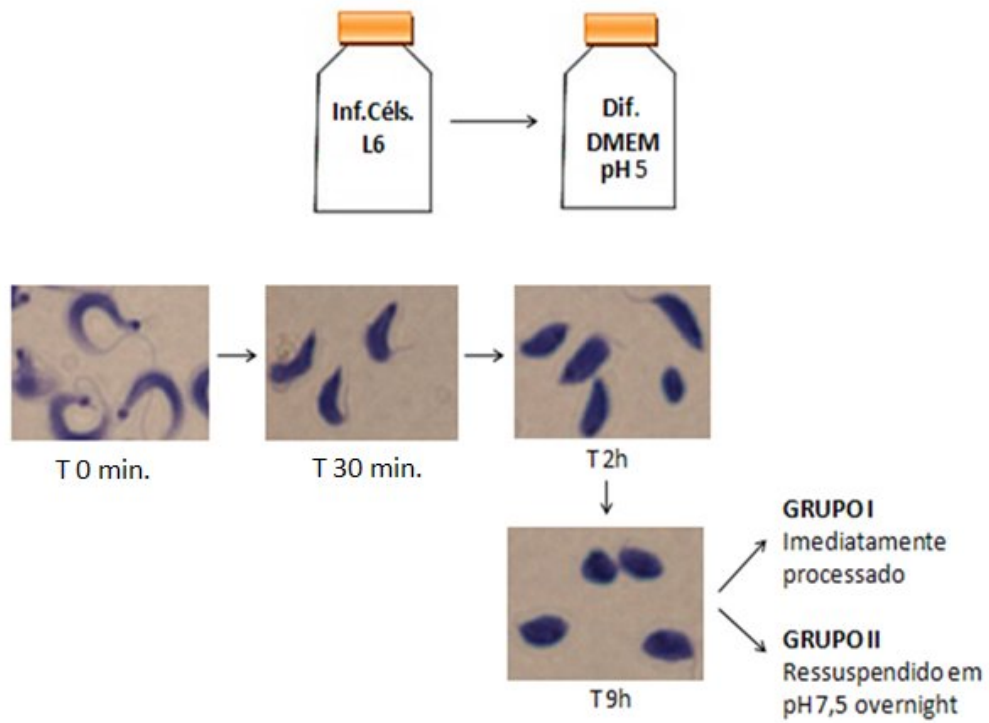


Figura 14. Amastigogênese *in vitro* e preparo das amostras para *western blot*. Células L6 foram infectadas com as formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Após a infecção, as eclôsões de tripomastigotas foram coletadas e expostas a pH ácido (5,0) para induzir a amastigogênese. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 30 min, 2 h e 9 h. Após término da diferenciação, as amostras foram separadas em dois grupos: os que seriam imediatamente processado e os que seriam incubado *overnight* em pH 7,5

Os parasitas apresentaram diferenças marcantes em seus perfis proteicos quando analisados em gel SDS-PAGE (Figura 15). O perfil de proteínas em gel unidimensional demonstrou que uma banda de aproximadamente 62 kDa naqueles parasitas que foram apenas diferenciados em meio de cultura pH 5 e em seguida processados. Já os parasitas que foram incubados *overnight* em pH 7,5 apresentaram um perfil bastante diferente daqueles pertencentes ao primeiro grupo. Por espectrometria de massas identificamos que essa banda de 62 kDa corresponde à albumina sérica bovina (BSA) (Figura 16). Isto sugere que os parasitas em pH 5,0, de alguma forma, incorporam BSA ou este pode associar à sua superfície, talvez por mudança em sua carga elétrica devido ao diferente pH.

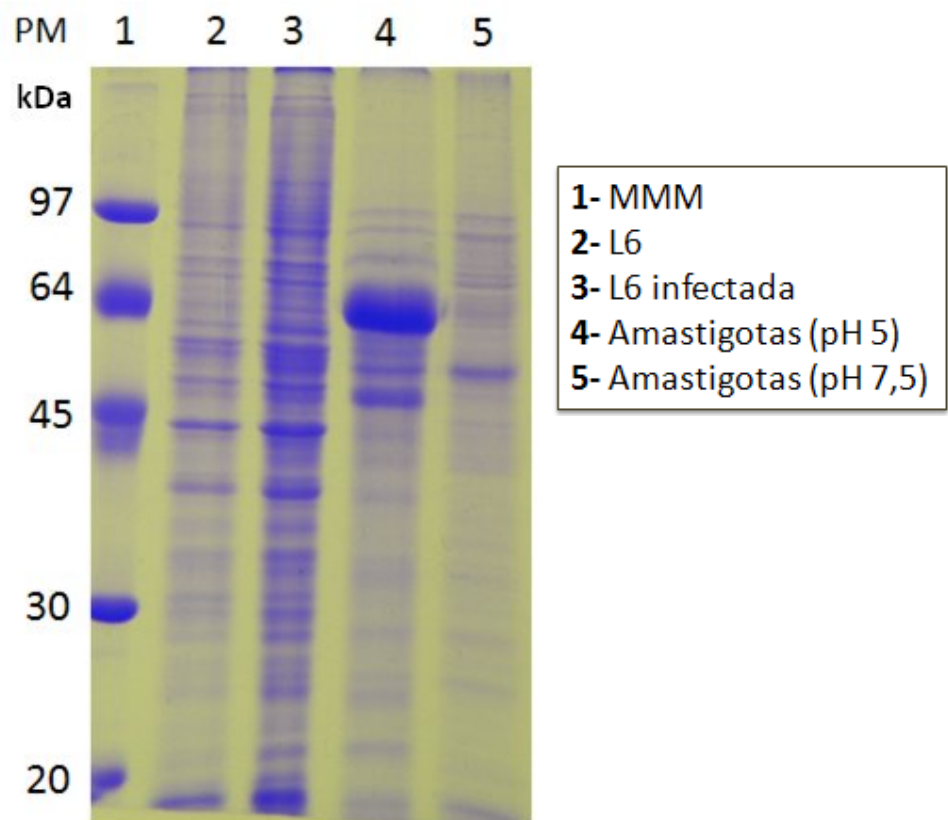


Figura 15. Análise extratos proteicos para posterior análise por *western blot*. 1 – Marcador de Massa Molecular (MMM) (Sigma *standart Mixture for SDS-PAGE*). 2 – Extrato proteico de células L6. 3 – Extrato proteico de células L6 infectadas com *T. cruzi*. 4 – Extrato proteico de amastigotas diferenciados em pH 5,0. 5 – Extrato proteico de amastigotas diferenciados em pH 5,0 e incubados em pH 7,5 *overnight*.

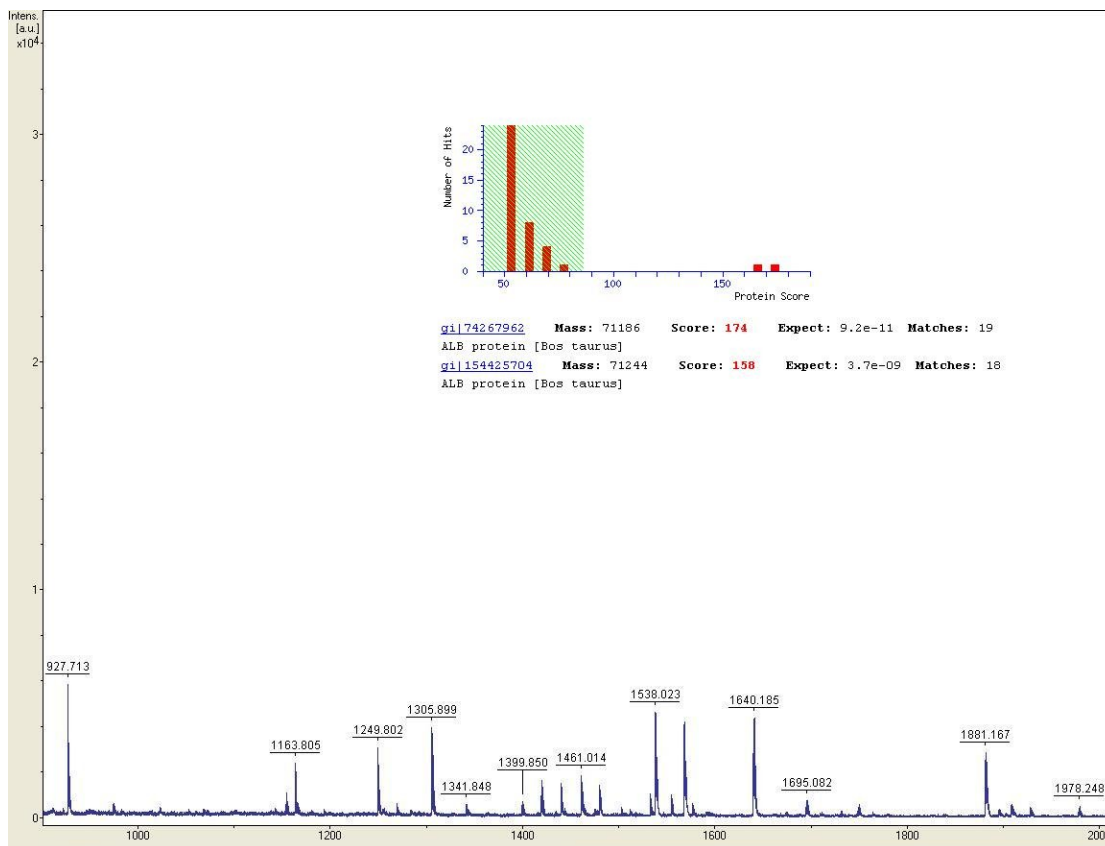


Figura 16. Espectrometria de massas do spot correspondente a 62 kDa. O spot mais intenso observado no gel de proteínas (figura 15) foi digerido e analisado por espectrometria de massas.

Ainda a fim de comprovar a expressão da subunidade SCC1 da coesina nos dois grupos de amastigotas, seus extratos proteicos foram submetidos a *western blot* utilizando um anticorpo anti-SCC1, subunidade fundamental na formação e desempenho da atividade do complexo coesina durante a divisão celular. Aqueles parasitas que pertencem ao primeiro grupo (Figura 14) não expressaram a subunidade SCC1 (65 kDa) do complexo coesina (Figura 17), sugerindo que, apesar de ter sido demonstrado que esses parasitas duplicam o seu DNA, eles não completam de fato todo o processo da mitose. Em contraste, os parasitas que pertencem ao segundo grupo (Figura 14) e que foram incubados em pH fisiológico expressaram a subunidade SCC1 do complexo coesina, sugerindo que esses parasitas mantêm suas propriedades replicativas (Figura 17).

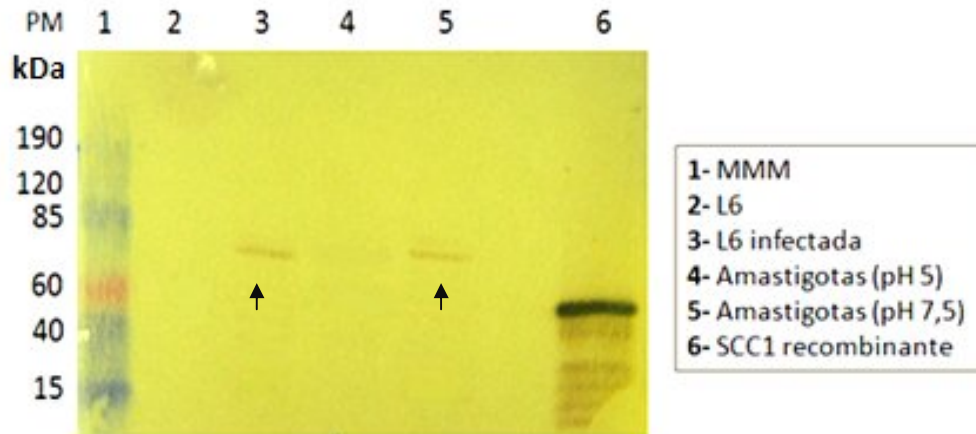


Figura 17. Análise da presença da proteína TcSCC1 nas diferentes formas de amastigotas. 1 – Marcador de Massa Molecular (MMM) (SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standart – Invitrogen). 2 – Células L6 (controle negativo). 3 – Células L6 infectadas com *T. cruzi* (controle positivo). 4 – Amastigotas diferenciados em pH 5,0. 5 – Amastigotas diferenciados em pH 5,0 e incubados em pH 7,5 *overnight*. 6 – SCC1 recombinante expressa em bactérias (controle positivo).

Para a confirmação da presença da subunidade SCC1 utilizamos como controles positivos, amostras de células L6 infectadas com os tripomastigotas da cepa Y. Após 24 horas de infecção, pôde ser observada em microscópio óptico a presença de amastigotas intracelulares e esses foram utilizados como controle positivo para nosso experimento. Além desse controle, utilizamos também uma proteína SCC1 recombinante, produzida em bactérias para servir também como controle positivo. Vale a pena ressaltar que essa proteína recombinante é cerca de 10 kDa menor do que aquelas proteínas encontradas *in vivo*, uma vez que isto se fez necessário durante o seu processo de produção. Como controle negativo, utilizamos apenas as células L6 não infectadas esperando não haver nenhum sinal de reconhecimento de proteína Rad21, homóloga à SCC1 em humanos.

Foi possível observar a presença da subunidade SCC1 do complexo coesina com 65 kDa nos amastigotas que foram incubados *overnight* em pH fisiológico e naquelas amostras de parasitas intracelulares (linhas 5 e 3, respectivamente). A SCC1 recombinante também foi identificada pelo anticorpo contendo 55 kDa, como era esperado. Nas amostras de células L6 e amastigotas processadas após a diferenciação não foi detectada a SCC1. Esses dados sugerem que o retorno ao pH 7,5 pode ser essencial para que esses parasitas se tornem capazes de se replicar. Ou talvez, o tempo no qual os parasitas do segundo grupo ficaram em pH 7,5 foi o suficiente para que começassem a expressar a subunidade SCC1, sendo que a diferença em relação ao primeiro grupo foi de 10 h até serem processados.

É fato que ainda não podemos afirmar com toda a certeza que os amastigotas produzidos extracelularmente resgatem todo o processo natural da amastigogênese bem como todas as propriedades que essa forma apresenta *in vivo*. Porém, várias de suas características, até mesmo suas peculiaridades ainda permanecem. Uma vantagem clara é que o uso desse sistema de produção de formas amastigotas replicativas pode servir para delinear diferenças moleculares e semelhanças entre os amastigotas desses dois grupos, bem como das outras formas de vidas do parasita, proporcionando efetivamente uma alternativa simples e de baixo custo para identificação de novos testes para agentes quimioterápicos e agentes profiláticos.

4. Análise de proteínas reguladas de núcleo na amastigogênese

Diversos trabalhos envolvendo diferentes estratégias proteômicas e sub-proteômicas têm sido descritos. No caso específico de proteômica organelar, o uso de fracionamentos celulares reduz a complexidade das amostras e as proteínas específicas em pequenas quantidades de organelas são então reveladas (TAYLOR et al., 2003).

O núcleo é a principal estrutura de informação genética em células eucarióticas e é comumente referido como o centro de controle da célula (SPECTOR, 1993). Recentes descobertas a respeito da dinâmica e do arranjo espacial do número de corpos nucleares e da maquinaria molecular no processamento e transcrição de RNA evidenciam que o núcleo não é somente um modo de proteger o genoma nuclear. O núcleo oferece um ambiente favorável para a realização da regulação da expressão gênica em níveis de cromatina, transcrição, processamento e exportação de RNA (WIESLANDER, 2004).

Análise computacional de géis bidimensionais do *T. cruzi* revela que uma boa parte das proteínas detectadas apresenta expressão conservativa nas três formas estudadas, sugerindo que as características que diferenciam cada estágio são provavelmente consequência da expressão diferencial de um determinado número de proteínas (PABA et al., 2004).

Diante disto, nesta etapa do trabalho, foram identificadas 1.339 proteínas. Dessas, foram selecionadas 560 proteínas anotadas em bancos de dados como proteínas reguladas. Dentre essas proteínas com localização prevista em núcleos foram encontradas 65, além de 66 proteínas preditas como aquelas pertencentes a complexos proteicos e que são também reguladas (Figura 18).

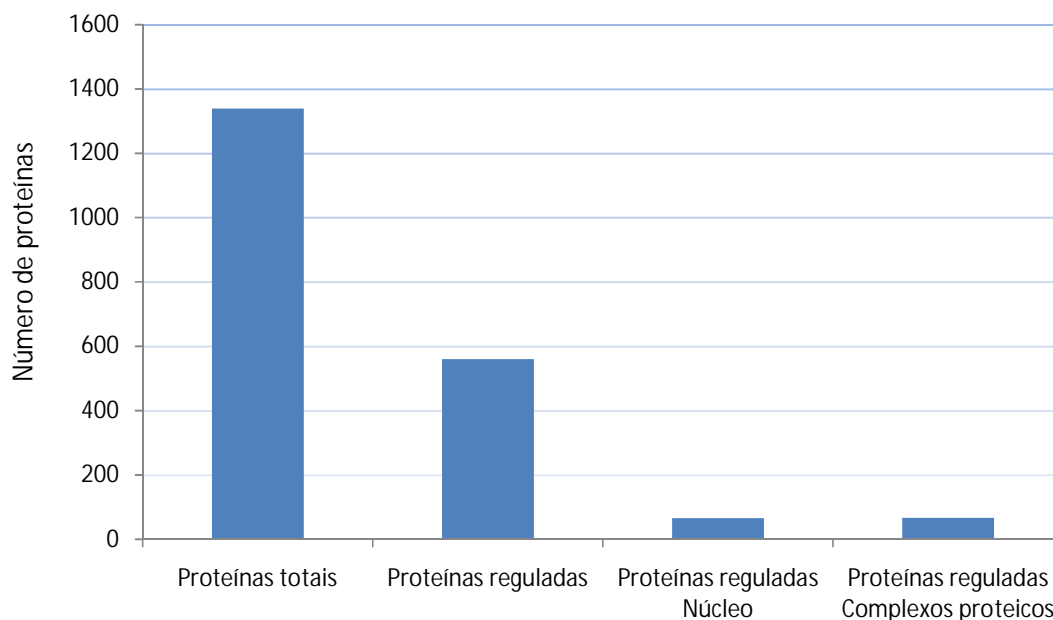


Figura 18. Representação gráfica das proteínas analisadas. Dentre as 1.339 proteínas marcadas durante o processo da amastigogênese 560 são preditas como proteínas reguladas. A partir dessas proteínas foram selecionadas aquelas que têm localização prevista em núcleo e complexos proteicos durante a diferenciação.

Estudos proteômicos envolvendo diferenciação celular em outros protozoários patogênicos demonstraram relativamente poucas diferenças no perfil bidimensional dos estágios de desenvolvimento comparados. Por exemplo, durante a diferenciação de promastigotas de *L. donovani* em amastigotas por mudança no pH do meio, 20 novas proteínas foram sintetizadas e a síntese de outras 50 foram inibidas (THIEL; BRUCHHAUS, 2001). Também em *Leishmania*, El Fakhry et al. (2002) mostraram que as 62 proteínas foram especificamente expressas em amastigotas axênicos entre 2.000 proteínas identificadas. Além desses autores, trabalhando com *T. brucei*, Van Deursen et al. (2003) mostraram que 92% das proteínas detectadas (900) estão presentes nas formas procíclicas e sanguínea do parasita. Em contraste, a comparação da expressão de proteínas entre os diferentes estágios de *Plasmodium* por LC-MS/MS revelou que a variabilidade entre as formas deste parasita é bem maior e poucas proteínas são compartilhadas em todos os estágios (FLORENS et al., 2002).

Dentre das 65 proteínas anotadas em bancos de dados e preditas como nucleares pôde ser observado que a maioria está relacionada a metabolismo de DNA (Figura 19)

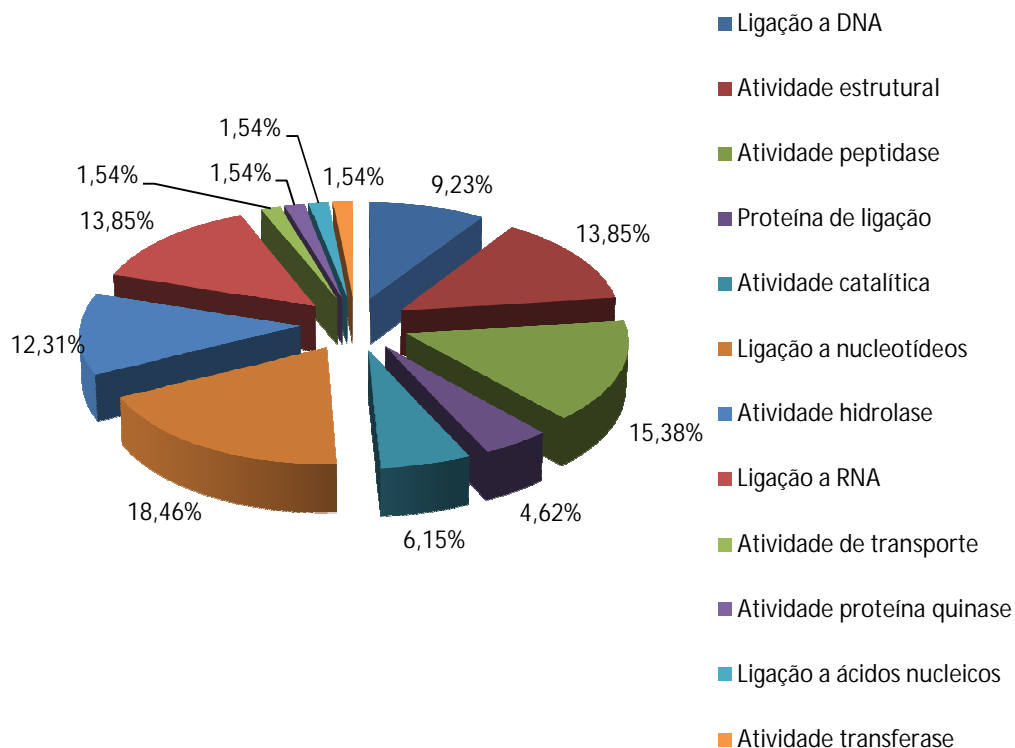


Figura 19. Representação gráfica da porcentagem das principais funções moleculares de proteínas nucleares reguladas durante a amastigogênese. Proteínas identificadas por LC-MS/MS, foram caracterizadas segundo bando de dados UniProtKB/Swiss-Prot ou Gene Ontology, de acordo com os processos metabólicos envolvidos.

Os grupos que correspondem àqueles envolvidos em metabolismo de ácidos nucleicos aparecem como predominantes. Proteínas que se ligam a DNA (9,23%), proteínas de ligação a RNA (13,85%) e proteínas que se ligam a nucleotídeos (18,46%) correspondem juntas 41,54% do total de proteínas nucleares reguladas, corroborando ao fato de que intensa atividade de transcrição e processamento de DNA e RNA ocorre em todas as etapas de diferenciação.

Proteínas que possuem domínios de ligação a RNAs se demonstraram bastante abundantes. Muitas proteínas eucarióticas são conhecidas por possuírem um ou mais cópias de domínios com cerca de 90 aminoácidos que se ligam a fita simples de RNAs. Estes domínios são conhecidos como regiões putativas de ligação a RNAs ou motivos de reconhecimento de RNAs (BANDZIULIS et al., 1989; DREYFUSS et al., 1988). Os motivos de ligação à RNAs são encontrados em uma vasta gama de proteínas ligantes desta molécula, incluindo ribonucleoproteínas heterogêneas (hnRNPs), proteínas

envolvidas em processos de *splicing* alternativo e componentes de pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs). Estes motivos também aparecem associados a fitas simples de DNAs (BIRNEY et al., 1993).

Helicases estão dentro das proteínas que também se destacam. Essa família de proteínas é encontrada em quase todos os organismos e tem papel importante no metabolismo de RNA e DNA, biogênese de ribossomos, transcrição, transporte nucleoplasmático, tradução e decaimento de RNAs. São enzimas que desenrolam os ácidos nucleicos de forma dependente de ATP (CARUTHERS; MCKAY, 2002).

A proteína histona H5 que compõe os nucleossomos também foi encontrada e está envolvida na compactação do DNA em uma estrutura mais ordenada. As proteínas que se associam aos nucleossomos (NAPs) atuam como chaperona de histonas, também foram encontradas e estão diretamente envolvidas na regulação da expressão de genes específicos da diferenciação celular também foram identificadas.

O conteúdo nuclear é especialmente separado do citoplasma por um conjunto de membranas altamente especializadas conhecido por envelope nuclear (MAUL, 1977). A primeira é uma membrana externa, conectada e intimamente associada com o retículo endoplasmático e frequentemente revestida por ribossomos. Esta porção externa do envelope nuclear é associada aos filamentos intermediários do citoesqueleto. A segunda região da membrana é a membrana interna separada da membrana externa por um espaço do lúmen de 20-40 nm. A terceira estrutura, chamada de poros da membrana (WOZNIAK; BLOBEL, 1992), é um domínio ligado às membranas internas e externas através de poros multi-proteicos, o complexo nuclear de poros NPC (*Nuclear Pore Complex*). Enquanto a membrana externa do envelope nuclear parece ter uma composição proteica muito parecida com o retículo endoplasmático rugoso, ao qual está conectado, a porção interna e os poros da membrana têm composição proteica única (EVANS et al., 2004). As nucleoporinas que são os principais componentes do complexo do poro nuclear em células eucarióticas também foram encontradas como bastante reguladas no processo da amastigogênese sendo encontrada no grupo das proteínas reguladas envolvidas em transporte já que elas medeiam o transporte nucleoplasmático de forma bidirecional, especialmente proteínas e mRNAs.

Outro grande grupo é o que corresponde às proteínas com atividades estruturais. É sabido que microtúbulos representam o principal componente do citoesqueleto dos tripanosomatídeos. Eles estão interligados entre si, com a membrana plasmática e, em alguns casos, com o retículo endoplasmático através de pontes proteicas. Essas pontes

apresentam características morfológicas típicas de proteínas associadas aos microtúbulos. Estes microtúbulos apresentam tubulina alfa e beta, organizados de uma maneira que lhe confere estabilidade estrutural. Em nossos dados pode-se observar que esse grupo de proteínas estruturais corresponde a 13,85% do total das 65 nucleares analisadas. Várias mudanças morfológicas acontecem durante a amastigogênese e metacicloogênese do parasita. Elas incluem alterações no comprimento do flagelo, no tamanho e volume celular e a remodelagem do citoesqueleto. Também as características metabólicas e de virulência variam de um estágio para outro (TYLER; ENGMAN, 2002).

As peptidases são enzimas descritas na literatura por clivarem ligações peptídicas entre os aminoácidos de proteínas. O processo é um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas envolvidas nos mais diferentes processos metabólicos. É observado que esse grupo que degrada proteínas está entre as proteínas nucleares mais reguladas, correspondendo a 15,38% do total.

Baseado nestes dados é plausível sugerir que existe um processo de remodelagem nuclear durante o processo da amastigogênese. Isto pode ser visto ao observar a atividade destes maiores grupos de proteínas nucleares que são reguladas. Não apenas as proteínas e componentes nucleares estão envolvidos nessa reorganização morfoestrutural, bioquímica e molecular da amastigogênese. Provavelmente, outros elementos do componente celular estão envolvidos.

5. Análise das principais proteínas reguladas e envolvidas com complexos proteicos durante a amastigogênese

Mais do que as próprias proteínas, os complexos proteicos constituem unidades fundamentais na função do proteoma de uma célula. A maioria dos processos celulares exige interações específicas entre proteínas ou complexos. Os complexos são entidades dinâmicas que se reúnem de forma ordenada no espaço e tempo se tornando capazes de armazenar e retransmitir vários sinais celulares ou contribuir para a arquitetura celular (ALBERTS, 1998; GAVIN, 2003).

Apesar de pouco descrito na literatura, nesse trabalho foram caracterizados complexos proteicos de *Trypanosoma cruzi* de acordo com as suas funções biológicas (Figura 20).

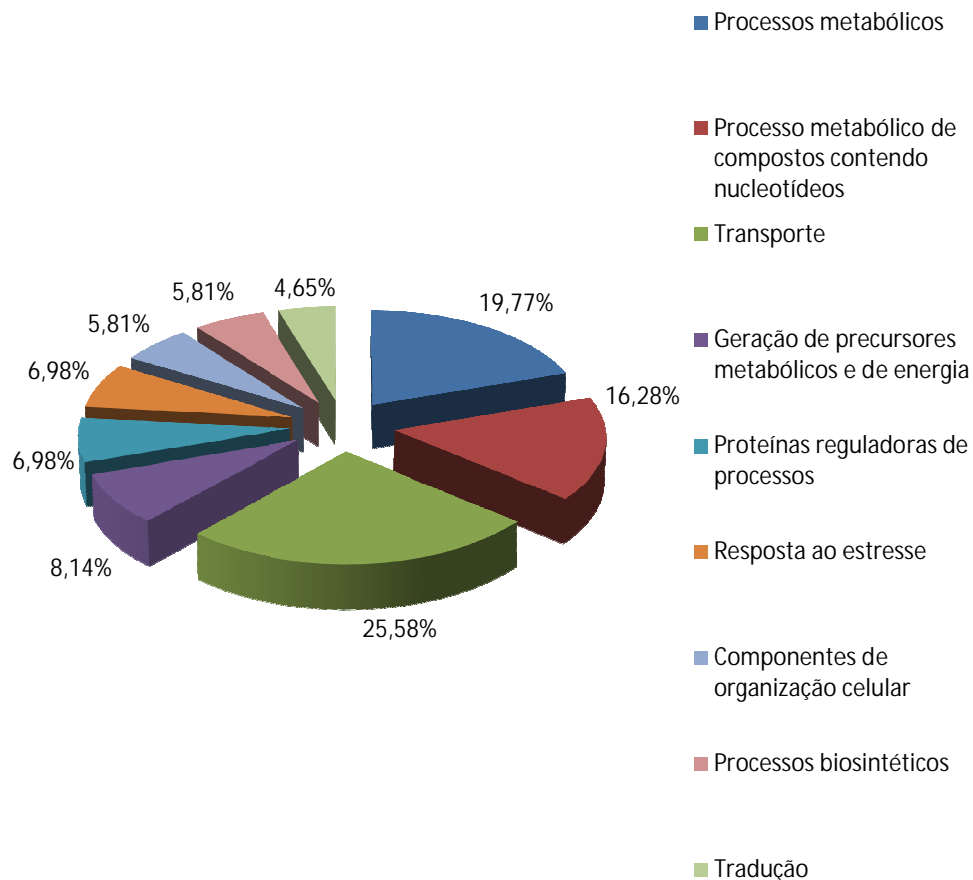


Figura 20. Categorização dos principais processos biológicos envolvendo proteínas reguladas de complexos proteicos. Proteínas identificadas por LC-MS/MS, foram caracterizadas segundo bando de dados UniProtKB/Swiss-Prot ou Gene Ontology, de acordo com suas funções biológicas.

As vias metabólicas são séries de reações enzimáticas consecutivas, que produzem produtos específicos. Seus reagentes, intermediários e produtos são denominados metabólitos. Uma vez que um organismo utiliza muitos metabólitos, ele possui muitas vias metabólicas (VOET; VOET, 2006).

As proteínas envolvidas em processos metabólicos de uma forma geral compreendem um grande grupo daquelas proteínas preditas como reguladas e pertencentes a complexos proteicos. Das 66 proteínas analisadas, alguns domínios proteicos demonstraram amplamente presentes. Dentre eles podemos citar os sítios ativos de proteínas quinases. O domínio Serina/Treonina - proteína quinase é responsável pela fosforilação de proteínas em vários processos biológicos, o qual desempenha muitas atividades no interior celular. Esses domínios catalisam reações de transferência do fosfato gama de nucleotídeos trifosfatos (geralmente ATP) para um ou

mais resíduos de aminoácidos da cadeia lateral do substrato, resultando frequentemente em uma mudança conformacional e afetando a função da proteína (HANKS et al., 1988). Outro domínio amplamente encontrado em proteínas reguladas de complexos proteicos foi o Tiorredoxina-*like*. Esse domínio é amplamente encontrado em proteínas que regulam a atividade de proteínas alvo através de mudanças no seu estado redox dos grupos tiol (S2 a SH2). Tais processos incluem a atividade do sistema NADP/tiorredoxina e o sistema glutationa/glutarredoxina (BUCHANAN; BALMER, 2005).

O domínio ATPase tipo AAA, muito abundante no grupo de proteínas envolvidas em processos metabólicos (Figura 20) pertence a uma grande família e desempenha importante papel em vários processos celulares como a desagregação e proteólise de proteínas, biogênese de organelas e transporte intracelular. Alguns desses domínios dessa família funcionam como chaperonas moleculares, subunidades de complexos proteolíticos ou proteases independentes (KEDZIERSKA, 2006). Proteínas com esse tipo de domínio se reúnem em grande complexos proteicos que forma uma estrutura em anel com um poro central. Essas proteínas produzem um motor molecular que acopla ou hidrolisa ATP provocando mudanças conformacionais em substratos (SMITH et al., 2006).

Vários estudos demonstram o envolvimento da via proteolítica dependentes de ubiquitina e do proteassoma em vários processos biológicos essenciais para a sobrevivência celular, como no ciclo celular e metabolismo, apoptose, mecanismos de transdução de sinal e na resposta imune. Essa via proteolítica é capaz de catalisar a degradação irreversível de proteínas implicando em um sistema regulatório coordenado pela ubiquitina. A atuação cooperativa da ubiquitina e o proteassoma levam a degradação de proteínas no tempo/espaço de forma coordenada e específica que parece ser tão importante quanto a sua biosíntese (HERSHKO, 1996; HOCHSTRASSER, 1996). As subunidades alfa e betas foram as proteínas mais amplamente encontradas como reguladas durante todo o processo da amastigogênese e foram agrupadas juntas àquelas envolvidas em processos metabólicos. As modificações que ocorrem durante o ciclo de vida do *T. cruzi* podem estar diretamente associadas à presença da atividade dos proteassomas, uma vez que uma característica marcante do processo da amastigogênese é o profundo remodelamento morfológico e molecular que este sofre durante o seu desenvolvimento tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado.

Os processos metabólicos que envolvem nucleotídeos foi o terceiro grupo o qual apresentou maior número de proteínas e/ou domínios regulados na amastigogênese, correspondendo a 16,28% do total de proteínas analisadas. O principal subgrupo desse grupo compreende as proteínas que se ligam a RNAs, como aquelas pertencentes ao complexo *spliceosome*. Antes que ocorra a catálise do pré-RNA durante o *splicing* um grande complexo proteico se associa aos introns e exons, formando o *spliceosome*, composto por várias ribonucleoproteínas (snRNPs) e várias outras proteínas não-snRNPs. Isto ocorre de uma maneira extremamente ordenada e dividida em múltiplos passos, o qual o *spliceosome* assume várias conformações (BROW, 2002). Essas proteínas podem ser divididas em: núcleo Sm; um heteroheptâmero, uma estrutura em forma de anel composta por 7 Sms (Smd3B, D1D2, EFG, U1, U2, U4 e U5 snRNPs; Lsm2-8 e U6 snRNP); e proteínas específicas snRNA (KAMBACH et al., 1999; WILL et al., 2006). Apesar de a remoção de introns ser um evento raro em tripanosomatídeos (IVENS et al., 2005), cerca de 30 proteínas foram descritas associando às SmB em *T. brucei* (PALFI et al., 2009).

As pequenas GTPases formam uma grande família independentes dentro de uma classe maior de hidrolases reguladoras que se ligam a GTP. Esta superfamília contém proteínas que controlam um grande número de processos importantes e possuem um domínio de ligação a GTP estruturalmente conservado (BOURNE et al., 1990). Das proteínas reguladas envolvidas com transporte, 25,58% total analisado, a mais abundante foi a proteína Ran-GTP. Essa proteína está amplamente distribuída no contexto intracelular e participa de importantes processos dentre eles o transporte nucleoplasmático de proteínas e RNAs, tráfego de vesículas, tráfego de vesículas contendo proteínas no complexo de Golgi, etc. Função bastante coerente com a grande mudança morfológica, bioquímica e molecular do parasita durante a amastigogênese.

Outro grande grupo encontrado foi daquelas proteínas envolvidas na produção de energia na célula. Não é de se estranhar a abundância de proteínas regulatórias envolvidas na manutenção do complexo F1F0-ATPase. Esse complexo é responsável pela grande parte da produção de energia em todos os organismos eucarióticos. O complexo II da cadeia respiratória é essencial para a produção de energia em organismos aeróbicos e está diretamente envolvido no processo de adaptação do parasita no hospedeiro (ROOS et al., 1994; SARUTA et al., 1995). Em *T. cruzi* o complexo II purificado apresentou composição diferente de subunidades comparado a outros metazoários, demonstrando que o complexo é composto por 6 subunidades

hidrofílicas (SDH1,SDH2_N,SDH2_C, e SDH5–SDH7) e 6 subunidades hidrofóbicas (SDH3, SDH4, e SDH8–SDH11) e que são codificadas no núcleo. Genes ortólogos também foram encontrados em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (MORALES et al., 2009).

Uma das principais características das proteínas é que muitas de suas funções celulares tais como replicação de DNA, transcrição, tradução, *splicing*, secreção e controle de ciclo celular não são realizados individualmente, mas na forma de complexos proteicos, que podem variar desde pequenos oligômeros (dímeros, trímeros) a complexos formados por dezenas de cadeias polipeptídicas e com a presença de ácidos nucleicos e cofatores. Isso pode ser resultado tanto de uma determinada mudança conformacional induzida pelo ligante quanto pelo fato de a proteína no estado ligado adquirir uma conformação adequada para realização de sua função. Desse modo, interações entre proteínas, descritas como sociologia molecular da célula, são vitais para a manutenção de qualquer processo biológico e, conseqüentemente, da vida de determinado organismo.

CONCLUSÕES

- Foi possível detectar possíveis complexos solúveis das formas epimastigotas de *T. cruzi* por Blue Native Page (BN-PAGE).
- Foram construídos plasmídeos para a clonagem do gene da subunidade SCC1 fusionado com o gene da EGFP e para a clonagem do gene da subunidade SCC3 fusionado com o gene RED2.
- Foi demonstrado que os amastigotas produzidos em cultura axênica tornam-se capazes de expressar a subunidade SCC1 do complexo coesina após incubação por 10 h em meio de cultura pH 7,5, indicando a manutenção de suas propriedades replicativas.
- Análise proteômica das formas tripomastigota, amastigota e estágios intermediários da amastigogênese indicaram proteínas preditas como nucleares e reguladas possivelmente envolvidas com mudanças na remodelagem nuclear durante o processo da amastigogênese. Adicionalmente foram observadas proteínas reguladas envolvidas na formação de complexos proteicos provavelmente envolvidas com as mudanças observadas na transformação do parasita, visto o rearranjo morfoestrutural foi a principal mudança observada.

PERSPECTIVAS

- Experimentos de transfecção em *T. cruzi* e co-localização das subunidades SCC1 e SCC3 em epimastigotas.
- Desenvolver condições ideais para melhorar a resolução da primeira e segunda dimensão do BN-PAGE, bem como identificação de suas subunidades por espectrometria de massa.
- Analisar complexos proteicos das diferentes formas de vidas do *Trypanosoma cruzi* bem como suas fases intermediárias durante a amastigogênese.
- Delinear novos experimentos para estudar a divisão celular de amastigotas intracelular, uma vez que estes são capazes de se multiplicar em cultura axênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. **Cell**. v. 92, 291-294, 1998.
- ALOY, P., PICHAUD, M., RUSSELL, R. B. Protein complexes: structure predictions challenges for the 21st century. **Scien.Dir.** v. 15, 15-22, 2005.
- ALSFORD, S., HORN, D. Trypanosomatid histone. **Mol.Microbiol.** v. 53, 365-372, 2004.
- ARNOLD, I., PFEIFFER, K. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. **EMBO**.v.17, 7170-7178, 1998.
- ANDREWS, N. W., HONG, K. S., ROBBINS, E. S., NUSSEN-ZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp.Parasitol.** v. 64, 474-484, 1987.
- ANGELOPOULOS, E. Pellicular microtubules in the family Trypanosomatidae. **J. Protoz.**v.17, 39-51, 1970.
- ARAÚJO-JORGE, T. C., The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84, 441-462, 1989.
- BANDZIULIS, R. J., SWANSON, M. S., DREYFUSS, G. RNA-binding proteins as development regulators. **Genes Dev.** v. 3, 431-437, 1989.
- BIRNEY, E., KUMAR, S., KRAINER, A. R. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. **Nucleic Acids Res.** v.21, 5803-5816, 1993.
- BORST, P. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. **AnnuRev. Biochem.**v. 55, 701-732, 1986.
- BOULTON, S.J., et al. Combined functional genomic maps of the *C. elegans* DNA damage response. **Science.** v. 295, 127-131 2001.
- BREITLING, R., et al. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. **FEBS Lett.** v. 573, 83-92, 2012.
- BROW, D. A. Allosteric cascade of spliceosome activation. **Annu. Rev Genet.** v. 36, 333-360, 2002.
- BOURNE, H. R., SANDERS, D. A., MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. **Nature**.v. 348, 125-132, 1990.
- BUCHANAN, B. B., BALMER, Y. Redox regulation: a broadening horizon. **Annu Rev Plant Biol.** v. 56, 187-220, 2005.

BURLEIGH, B. A., ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annual Review of Microbiology**. v. 49, 175–200, 1995.

BURLEIGH, B.A., WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell Microbiol**. v. 4, n. 11, p. 701-11, 2002.

CALER, E.V., VAENA, S. A., HAYNES, P.A., ANDREWS, N.W., BURLEIGH, B.A. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J**. v. 17, 4975-4986, 1998.

CAMACHO-CARVAJAL, M. M., WOLLSCHIED, B., AEBERSOLD, R., STEIMLE, V., SCHAMEL, W. W. A. Two-dimensional blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates. **Mol. Cell. Proteo**. v. 3, 176-182, 2004.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosoma in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 6, 93-100, 1964.

CARUTHERS, J. M., MCKAY, D. B. Helicases structure and mechanism. **Curr. Opin. Struct. Biol**. v. 12, 123-133, 2002.

CHAKALOVA, L., DEBRAND, E., MITCHELL, J. A., OSBORNE, C. S., FRASER, P. Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. **Nat. Rev. Genet**. v. 6, 669-677, 2005.

CHUNG, S. H., GILLESPIE, R. D., SWINDLE, J. Analyzing expression of the calmodulin and ubiquitin-fusion genes of *Trypanosoma cruzi* using simultaneous, independent dual gene replacements. **Mol Biochem Parasitol**. v. 63, 95-107, 1994.

CIOSK, R.; SHIRAYAMA, M.; SHEVCHENKO, A.; TANAKA, T.; TOTH, A.; SHEVCHENKO, NASMYTH, K. Cohesin's Binding to Chromosomes Depends on a Separate Complex Consisting of Scc2 and Scc4. **Prot. Mol. Cell**. v. 5, 243–254, 2000.

CLAYTON, C.E.; FUERI, J.P.; ITZHAKI, J.E.; BELLOFATTO, V.; SHERMAN, D.R.; WISDOM, G.S.; VIJAYASARATHY, S.; MOWATT, M.R. Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell Biol**. v. 10, 3036-3047, 1990.

CONESA, A., et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**. v. 21, 3674-3676, 2008.

COURA, J. R., Tripanossomose, Doença de Chagas. **Ciênc. Cult**. v. 55, 769-780, 1994.

CREMER, T., CREMER, C., BAUMANN, H., LUEDTKE, E. K., SPERLING, K., TEUBER, V., ZORN, C. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. **Hum. Genet**. v. 50, 46-56, 1982.

- CRIBB, P.; SERRA, E. One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex. **Int. J. Parasitol.** v. 39, 525-32, 2009.
- CUNHA, J. P., NAKAYASU, E. S., ELIAS, M. C et al. *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 140, 75-86, 2005.
- DE SOUZA W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr.Pharm.Des.**, v. 8, p. 269-85, 2002.
- DIETRICH, P.; SOARES, M.B., AFFONSO, M.H.T.; FLOETER-WINTE, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene.** v. 125, 103-107, 1993.
- DREYFUSS, G., SWANSON, M. S., PINOL-ROMA, S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. **Trends Biochem.Sci.**v.13, 86-91, 1988.
- DU, T.G., SCHIMD, M., JANSEN, R.P. Why cells move messages: The biological functions of mRNA localization. **Semin.Cell.Dev. Biol.** v. 18, 171-177, 2007.
- DVORAK, J.A., HYDE, T.P. *Trypanosoma cruzi*:interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Exp Parasitol.**v.34, 268–283, 1973.
- DZIEMBOWSKI, A., SÉRAPHIN, B. Recent developments in the analysis of protein complexes. **Febs.Lett.**v. 556, 1–6, 2005.
- EL FAKHRY, Y., PAPADOPOULOU, B. A. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **Proteom.**v. 2, 1007-1017, 2002.
- ELIAS, M. C., FARIA, M., MORTARA, R. A., MOTTA, M. C., DE SOUZA, W., THIRY, M., SCHENKMAN, S. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryot.Cell.** v. 6, 944-953, 2002.
- ELIAS, M.C., FARIA, M., MORTARA, R.A., MOTTA, M.C.M., DE SOUZA, W., THIRY, M. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryot.Cell.** v. 1, 944–953, 2002.
- ELIAS, M. C., MARQUER-PORTO, R., FREYMULER, E., SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 112, 79-90, 2001.
- EVANS, D. E., BRYANT, J. A. The nuclear envelope: a comparative overview. **Symp.Soc. Exp. Biol.** v.56, 1-8, 2004.

- EVERS, R.; HAMMER, A.; KOCK, J.; JESS, W.; BORST, P.; MEMET, S.; CORNELISSEN, A.W. *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. **Cell**. v. 56, 585-597, 1989.
- FARIA, A. M., FREYMULLER, E., COLLI, W., ALVES, J. TRYPANOSOMA CRUZI: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Exp.Parasitol**. v. 92, 263–274, 1999.
- FERREIRA, J., PAOLELLA, G., RAMOS, C., LAMOND, A. I. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. **J. Cell Biol**. v. 139, 1597–1610, 1997.
- FERNANDES, M. C., ANDREW S, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS. Microbiol. Rev.** v. 36, 734–747, 2012.
- FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=26> Acesso em: 02/08/2012
- FLORENS, L. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature**.v.419, 520-526, 2002.
- GAVIN, A.C. and SUPERTI-FURGA, G. Protein complexes and proteome organization from yeast to man. **Curr.Opin.Chem. Biol**. v.7, 21–27, 2003.
- GALVIN, A. C., BOSCHE, M., KRAUSE, R. et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complex. **Nature**. v. 415, 141-147, 2002.
- GIOT, L., et al. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. **Science**. v. 302, 1727–1736, 2003.
- GLUENZ, E., TAYLOR, M.C., KELLY, J.M. The *Trypanosoma cruzi* metacyclic-specific protein Met-III associates with the nucleolus and contains independent amino and carboxyl terminal targeting elements. **Int. J. Parasitol**. v. 37, 617–625, 2007.
- GOTTLIEB, M. A carbohydrate containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. **J. Immun**.v.119, 465-470, 1977.
- GUTTIYAMA, L.M., DA CUNHA, J.P., SCHENKMAN, S. Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* is concentrated in the nucleolus region and disperses upon phosphorylation during progression to mitosis. **Eukaryot.Cell**.v. 7, 560–568, 2008.
- GRUBER, S.; HAERING, C.H.; NASMYTH, K. Chromosomal Cohesin Forms a Ring. **Cell**. v. 112, 765-777, 2003.
- HAERING, C.H.; LOWE, J.; HOCHWAGEN, A.; NASMYTH, K. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. **Mol.Cell**. v. 9, 773-788, 2002.

- HANKS, S. K., QUINN, A. M. HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**. v. 241, 42-52, 1988.
- HENRIKSSON, J.; ASLUND L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol.Today**. v. 12, 108-114, 1996.
- HERNANDEZ-OSORIO, L.A., et al. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **J Biomed Biotechnol**. 283-842, 2010.
- HEUBERGER, E. H., VEENHOFF, L. M., DUURKENS, R. H., FRIESEN, R. H., HO, Y., et al. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**. v. 415, 180–183, 2002.
- HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu.Rev.Cell Biol**.v.8, 67-113, 1992.
- HIRANO, T. Chromosome cohesion,condensation, and separation.**Annu. Rev. Biochem**. v. 69, 115–44, 2000.
- HIRANO, T. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. **Genes & Dev**. 16, 399-414, 2002.
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**. v. 96(1), 23-28, 1990.
- IRNIGER, S., PIATTI, S., MICHAELIS, C., NASMYTH, K. Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. **Cell**. v. 81, 269-278, 1995.
- ITO, T., CHIBA, T., OZAWA, R., YOSHIDA, M., HATTORI, M., SAKAKI, Y.A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 98, 4569-4574, 2001.
- ITO, T., CHIBA, YOSHIDA, M. Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects.**Trends Biotechnol**. v. 19, 23-27, 2001.
- IVENS, A. C., C. S. PEACOCK, E. A. WORTHEY, L. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**.v. 309, 436–442, 2005.
- JESS, W.; HAMMER, A.; CORNELISSEN, A.W. Complete sequence of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*. **FEBS Letters**. v. 249,123-128,1989.
- KAMBACH, C., WALKE, S., YOUNG, R., AVIS, J. M. , DE LA FORTELLE, E., RAKER, V. A., LUNRMANN, R., LI J., NAGAI, K. Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. **Cell**. v. 96, 375–387, 1999.

- KEDZIERSKA, S. Structure, function and mechanisms of action of ATPases from the AAA superfamily of proteins. **Postepy.Biochem.** v. 52, 330-338, 2006.
- KELLY, J. M., TOMÁS, A. M. An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. **Mol. Biochem. Parasitol.**v. 65,51-62, 1994.
- KOCK, J.; EVERS, R.; CORNELISSEN, A.W. Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III. **Nucl.Acids Res.** v. 16, 8753-8772, 1988.
- LAMOND, A. I., SPECTOR, D. L., Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 4: 605-612.
- LASSERRE, J. P., SYLVIUS, L., JOUBERT-CARON, R., CARON, M, HARDOUIN. Organellar protein complexes of Caco-2 human cells analyzed by two-dimensional blue native/SDS-PAGE and mass spectrometry. **J.Prote. Resear.** v. 9, 5093-5107, 2010.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E, et al. A newly revised classification of the protozoa. **J.Protozool**, v.27, n.1, p.37-58, Feb.1980.
- Li, S., et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. **Science.** v. 303,540–543, 2004.
- LIU, B., LIU, Y., MOTYKA, S, A., AGBO E, E, C. Fellowship of the ring: the replication of kinetoplast DNA. **Trend in Paras.** v. 21, 321-363, 2005.
- LUKES, J., HASHIMI, H., ZIHOVÁ, A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. **Curr.Genet.** v. 48, 277-299, 2005.
- LUSTIG, Y., GOLDSMIDT, H., ULIEL, S., MICHAELI, S. The *Trypanosoma brucei* signal recognition particle lacks the Alu-domain-binding proteins: purification and functional analysis of its binding proteins by RNAi. **J. Cell Sci.** v. 118, 4551–4562, 2005.
- MA, H., SIEGEL, A. J., BEREZNEY, R. Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. **J. Cell Biol.** v. 146, 531–542, 1999.
- MANN, M., HENDRICKSON, R. C., PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Ann. Rev. Biochem.** v. 70, 437-473, 2001.
- MATTHEWS, L. R., et al. Identification of potential interaction networks using sequence-based searches for conserved protein–protein interactions or “interlogs.” **Genome Res.** v.11, 2120–2126, 2001.
- MAUL, G. G. The nuclear and cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution and evolution. **Int. Rev.Cytol. Suppl.** v.6, 75-186, 1977.

- MCNULTY, D.E. AND R.S. ANNAN. Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. **Mol Cell Proteomics**. v.7, 971-980, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38, 1-29, 2005.
- MISTELI, T. Concepts in nuclear architecture. **Bioessays**. v. 27, 477-487, 2005.
- MISTELI, T., The concept of self-organization in cellular architecture and gene expression. **Science**. v. 7, 291-843, 2001.
- MOIR, R. D., SPANN, T. P., HERRMANN H., GOLDMAN, R. D. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. **J. Cell Biol.** V.149, 1179-1192, 2000.
- MONTI, M., ORRÙ, S., PAGNOZZI, D., PUCCI, P. **Biosci.Rep.**v. 25, 45-56, 2005.
- MORALES, J., MOGI, T., TAKASHIMA, S. et al. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. **J. Biol. Chem.** v. 284, 7255-7263, 2009.
- MUNOZ-FERNANDEZ, M. A., FERNANDEZ, M.A., FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.** V. 22, 301-307, 1992.
- NASMYTH, K.; HAERING, C.H. The structure and function of SMC and kleisin complexes. **Annu. Rev. Biochem.** v. 74, 595-648, 2005.
- NASMYTH, K; SCHLEIFFER, A. From a single double helix to paired double helices and back. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 359, 99-108, 2004.
- NARDELLI, S.C., AVILA, A.R., FREUND, A., MOTTA, M.C., MANHAES, L., DE JESUS, T.C. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryot.Cell.** v. 6, 337-345, 2007.
- NARDELLI, S.C., DA CUNHA, J.P., MOTTA, M.C., SCHENKMAN, S. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. **Chrom.** v. 118, 487-499, 2009.
- NAVARRO, M. C., DELIMA, A. R., J., CONTRERAS, V. T. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz.** v. 98, 83-91, 2003.
- NEPOMUCENO-MEJIA, T., LARA-MARTINEZ, R., CEVALLOS, A.M., LOPEZ-VILLASENOR, I., JIMENEZ-GARCIA, L.F., HERNANDEZ, R. The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. **FEMS Microbiol.Lett.**v. 313, 41-46, 2010.

- NOZAKI, T., CROSS, G. A. M. Functional complementation of glycoprotein 72 in a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72 null mutant. **Mol Biochem Parasitol.** v. 67, 91-102, 1994.
- NUNES, L.R.; CARVALHO, M.R.; SHAKARIAN, A.M.; BUCK, G.A. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene.** v.188, 157-168, 1997.
- PABA, J. C. A., RICART, et al. Proteomics analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* development stages using isotope-coded affinity tag reagents. **J. Proteo. Res.** v.3, 517-524, 2004.
- PALENCHAR, J. B., BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 146. 135-141, 2006.
- PALFI, Z., JAÉ N., PREUSSER, C., KAMINSKA, K. H., BUJNICKI, J. M., LEE, J. H., GÜNZL, A., KAMBACH C., URLAUB, H., BINDEREIF A. **Genes Dev.** v.23, 1650–1664, 2009.
- PICCHI, G.F., FERREIRA, A.M., SOUZA, F.S., LOURENCO, E.E., ARAUCO, P.R., LORUSSO, A. *Trypanosoma cruzi*: identification of DNA targets of the nuclear periphery coiled-coil protein TcNUP-1. **Exp. Parasitol.** 127, 147–152, 2011.
- PULIDO, M.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. **Acta Tropica.** v. 62, 163-170, 1996.
- RAIN, J.C., SELIG, L., DE REUSE, H., BATTAGLIA, V., REVERDY, C., SIMON, S., LENZEN, G., PETEL, F., WOJCIK, J., SCHACHTER, V. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. **Nature.** v.409, 211-215, 2001.
- RAMIREZ, M.I., YAMAUCHI, L.M., DE FREITAS, L.H., UEMURA, H., SCHENKMAN, S. The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 111, 235–240, 2000.
- RASKA, I., KOBERNA, K., MALÍNSKY, J., FIDLEROVÁ, H., MASATA, M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. **Biol. Cell.** v.96, 579–594, 2004.
- RASKA, I., SHAW, P. J., CMARKO, D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 18, 325–334, 2006.
- REISINGER, F. AND L. MARTENS. Database on Demand - an online tool for the custom generation of FASTA-formatted sequence databases. **Proteom.** v. 9, 4421-4424.
- ROOS, M. H., AND TIELENS, A. G. Differential expression of two succinate dehydrogenase subunit-B genes and a transition in energy metabolism during the development of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.66, 273–281, 1994.

SADONI, N., LANGER, S., FAUTH, C., BERNARDI, G., CREMER, T., TURNER, B. M., ZINK D. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. **J. Cell Biol.** v. 146, 1211–1226, 1999.

SARUTA, F., KURAMOCHI, T., NAKAMURA, K., TAKAMIYA, S., YU, Y., AOKI, T., SEKIMIZU, K., KOJIMA, S., KITA, K. Stage-specific Isoforms of Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase) in Mitochondria from the Parasitic Nematode, *Ascaris suum*. **J. Biol. Chem.** 270, 928–932, 1995.

SCHARFSTEIN, J., SCHMITZ, V., MORANDI, V., CAPELLA, M.M., LIMA, A.P., MORROT, A., JULIANO, L., MULLER-ESTERL, W., Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors, **J. Exp. Med.** v. 192, 1289-1300, 2000.

SCHRATTENHOLZ, A. Drug Discovery. **Today Technol.** V. 9, 1–8, 2004.

SCHAGGER, H., CRAMER, W. A., JAGOW, G. V. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. **Anal. Biochem.** v. 217, 220–230, 1994.

SCHAGGER, H., JAGOW, G. V. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. **Anal. Biochem.** v. 199, 223–231, 1991.

SCHAGGER, H., PFEIFFER, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. **EMBO J.** v. 19, 1777–1783, 2000.

SCHWAMMLE, V. AND O.N. JENSEN. A simple and fast method to determine the parameters for fuzzy c-means cluster analysis. **Bioinform.** v. 26, 2841-2848, 2010.

SILVA, L.H.O.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folha Clin. Biol.** v. 20, 191-207, 1953.

SILVA, R., C.G., FREITAS, J.M., PASSOS-SILVA, D.G., FURTADO, C., AUGUSTO-PINTO, L., PEREIRA, M.T. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 149, 191–200, 2006.

SILVEIRA, A. C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cad. Saúde Pública.** v.16, 35-42, 2000.

SMITH, D. M., BENAROUDJ, N., GOLDBERG, A. Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. **J. Struct. Biol.** v. 156, 72-83, 2006.

SMYTH, G.K. Limma: linear models for microarray data., in Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. **Springer: New York**, 2005.

SOLARI, A. J., The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chrom.** V. 78, 239-255, 1980.

SOUZA, W. A. Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz.** v. 94, 17-36, 1999.

SOUZA, W. D, CARVALHO, T. M. U., BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int. J. of Cell Bio.** v. 2010.

SPADILIERO, B., NICOLINI, C., MASCETTI, G., HENRIQUEZ, D., VERGANI, L. Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: in situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. **J. Cell. Biochem.** v. 85, 798–808, 2002.

SPECTOR, D. L. Macromolecular domains within the cell nucleus. **Ann. Rev. Cell Biol.** v.9, 265-315, 1993.

STEINDEL, M., DIAS, J. C. P., ROMANHA, A. J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v. 37, 32-38, 2005.

STRÖM, A.C., WEIS, K. Importin-beta-like nuclear transport receptors. **Genome Biol.** v. 2, 1-9, 2001.

SUMARA, I. ; VORLAUFER, E.; GIEFFERS, C. ; PETERS, B.H.; PETERS, J.M. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. **J Cell Biol.** v. 151, 749-62, 2000.

TARDIEUX, I., WEBSTER, P., RAVESLOOT, J., BORON, W., LUNN, J.A., HEUSER, J.E. ANDREWS N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells, **Cell**, v.71, 1117-1130, 1992.

TAYLOR, S, W., E. FAHY, et al. Global organelar proteomics. **Trends Biotechnol.** v.21, 82-88, 2003.

TAVERNER, T., et al. DanteR: an extensible R-based tool for quantitative analysis of -omics data. **Bioinformatics.** v. 28, 2404-2406.

THIEL, M. BRUCHHAUS, L. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different states of transformation from promastigotes to amastigotes. **Med. Microbiol. Immunol.** v. 190, 33-36, 2001.

THOMAS, S, YU M.C.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. A non-universal transcription factor? The *Leishmania tarentolae* TATA box-binding protein LtTBP associates with a subset of promoters. **Int. J. Parasitol.** v.36, 1217-1226, 2006.

TOMLINSON, S., VANDEKERCKHOVE, F., FREVERT, U., NUSSENZWEIG, V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitol.** v. 110, 547–554, 1995.

TYLER, K.M; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revised. **Int. J. Parasitol.** v. 31, 472-81, 2001.

- TYLER-CROSS, R.E.; SHORT, S.L.; FLOETER-WINTER, L.M.; BUCK, G.A. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. **Mol Biochem. Parasitol.** v.72, 23-31, 1995.
- UETZ, P., GIOT, L., CAGNEY, G., MANSFIELD, T. A., JUDSON, R. S., KNIGHT, J. R., LOCKSHON, D., NARAYAN, V., SRINIVASAN, M., POCHART, P. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature.** v. 403, 623-627, 2000.
- VAN DEURSEN, F. J., THORNTON, D. J., MATTHEWS, K. R. A reproducible protocol for analysis of the proteomic of *Trypanosoma brucei* by 2-dimensional gel electrophoresis. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.128, 107-110, 2003.
- VANHAMME, L., PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol Rev.** v. 59, 223-240, 1995.
- VERONESI, R. **Tratado de Infectologia.** 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- VILLAMIL, F., BALTANAS, S.H., ALONSO, R., VILCHEZ LARREA, G.D., TORRES, S.C., FLAVIA, H.N. TcPARP: a DNA damagedependent poly(ADP-ribose) polymerase from *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.** v. 38, 277-287, 2008.
- VOET, D., VOET, J. G. **Bioquímica.** 3ª Ed. Artmed: Porto Alegre, 2006. pp.551.
- YAFFE, D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 61, 447-483, 1968.
- ZWEYGARTH, E., GUMM, I. D., GRAY, M. A., CHERUIYOT, J. K., WEBSTER, P., KAMINSKY, R. In vitro development of metacyclic *Trypanosoma simiae* derived from bloodstream trypomastigotes. **Acta Tropica.** v. 46, 277-282, 1989.
- WESTERGAARD, G.G., BERCOVICH, N., REINERT, M.D., VAZQUEZ, M.P. Analysis of a nuclear localization signal in the p14 splicing factor in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.** v. 40, 1029-1035, 2010.
- WEITZER, S.; LEHANE, C.; UHLMANN, F. A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. **Curr. Biol.** v.13, 1930-4190, 2003.
- WIESLANDER, L. The cell nucleus. **Exp. Cell. Res.** v.296, 1-3, 2004.
- WILL, C. L., LUHMANN, R. Spliceosome structure and function. The RNA world. **Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor.** 369-400, 2006.
- WITTIG, I. BRAUN, H. P., SCHAGGER, H. Blue native PAGE. **Nat. Protocols.** v. 1, 418-428, 2006.
- WHO. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Acesso em: 01/08/2012.
- WOOLSEY, A. M., SUNWOO, L., PETERSEN, C. A., BRACHMANN, S. M., CANTLEY, L. C., BURLEIGH, B. A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **J. Cell Sci.** v.116, 3611-3622, 2003.

WOZNIAK, R. W., BLOBEL, G. The single transmembrane segment of gp210 is sufficient for sorting to the pore membrane domain of the nuclear envelope. **J. Cell. Biol.** v.119, 1441-1449, 2004.

XIONG, B.; GERTON, J.L. Regulators of the Cohesin Network. **Annu. Rev. Biochem.** v.79, 131-53, 2010.