

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PATRÍCIA MELLO FERRÃO

Estudo da modulação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* em resposta ao estímulo de TGF- β : uma abordagem proteômica.

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

Orientadoras: Dr^a. Leila de Mendonça Lima
Dr^a. Mariana Caldas Waghabi

RIO DE JANEIRO

2009

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F395

Ferrão, Patrícia Mello.

Estudo da modulação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* em resposta ao estímulo de TGF- β : uma abordagem proteômica / Patrícia Mello Ferrão. – Rio de Janeiro, 2009.

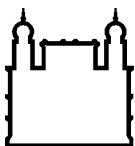
xx, 136f. : il. ; 30cm

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 112-136

1. TGF- β . 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Fosforilação de proteínas. 4. Fosfoproteômica. I. Título.

CDD 616 9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PATRÍCIA MELLO FERRÃO

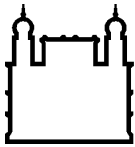
Estudo da modulação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* em resposta ao estímulo de TGF- β : uma abordagem proteômica.

**ORIENTADORAS: Dr^a. Leila de Mendonça Lima
Dr^a. Mariana Caldas Waghbi**

Aprovada em: 06/11/2009

EXAMINADORES:

- Dr^a.** Tânia Cremonini de Araújo-Jorge (IOC/FIOCRUZ) – Presidente
- Dr.** Adeílton Alves Brandão (IOC/FIOCRUZ) – Titular
- Dr.** Gilberto Barbosa Domont (IQ/UFRJ) – Titular
- Dr^a.** Claudia Masini d'Avila Levy (IOC/FIOCRUZ) – Revisora e Suplente
- Dr.** Richard Hemmi Valente (IOC/FIOCRUZ) - Suplente



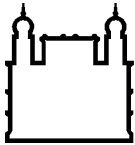
Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Estudo da modulação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* em resposta ao estímulo de TGF- β : uma abordagem proteômica.

RESUMO

Estudos recentes mostraram que TGF- β está envolvido na cardiopatia chagásica aguda e crônica. O aumento de seus níveis plasmáticos e a ativação da sua via de sinalização celular são aspectos peculiares da doença chagásica crônica. Além do seu relevante papel na patologia chagásica, também se observou que esta citocina está intimamente associada ao *T. cruzi* como um regulador de diferentes etapas de seu ciclo de vida. Trabalhos anteriores demonstraram que *T. cruzi* é capaz de ativar TGF- β latente, utilizando-o na invasão às células hospedeiras e que amastigotas de *T. cruzi* se ligam e internalizam TGF- β recombinante, estando este evento relacionado à capacidade de proliferação de amastigotas e sua diferenciação em tripomastigotas no final do ciclo intracelular. Este conjunto de informações nos levou ao questionamento de quais moléculas de *T. cruzi* poderiam estar envolvidas nos processos de proliferação e diferenciação celular frente ao estímulo por TGF- β . Neste sentido, o presente projeto tem por principal objetivo a caracterização de moléculas responsivas ao estímulo de TGF- β através de uma abordagem fosfoproteômica. Para tal, extratos de proteínas totais de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), incubadas ou não com TGF- β , foram preparados durante a fase exponencial de crescimento do parasito. Evidenciamos que a dose ótima de TGF- β para maior indução de fosforilação seria de 5 ng/ml. Em seguida, o tempo ótimo de indução com TGF- β (1, 5, 15, 30 e 60 minutos) foi testado e concluímos que as diferenças entre os padrões de fosforilação são muitos sutis em géis unidimensionais, nos fazendo optar pela análise exclusiva dos perfis em géis bidimensionais de 7 cm com faixa de pH 3-10 não-linear. A avaliação dos perfis bidimensionais demonstrou diferenças nos padrões de fosforilação entre os tempos estudados, nos levando a manter um estudo de cinética de tempo. As imagens dos géis foram analisadas e algumas das proteínas consideradas responsivas a TGF- β foram identificadas por espectrometria de massas. Observamos que as proteínas de choque térmico, tubulinas, desidrogenases, enolases, ciclofilina A, GrpE, cruzipaína, fator de alongamento 1- α , fator de iniciação eucariótica 5a, entre outras, têm sua fosforilação e/ou expressão moduladas em resposta a TGF- β . Buscamos correlacionar a função já descrita na literatura para cada proteína com seu possível papel na sinalização intracelular disparada por TGF- β , em concordância com o comportamento de fosforilação e/ou expressão apresentado em nossas análises. Por último, foi avaliado se a adição de TGF- β a culturas de epimastigotas teria algum efeito sobre a proliferação dos parasitos. Verificamos que a adição de TGF- β promoveu um aumento de até 73% no crescimento dos parasitos nas primeiras 24 horas de estudo. O conjunto de dados obtidos contribui para a elucidação dos mecanismos moleculares relacionados à sinalização de TGF- β , proporcionando uma fonte para detecção de novos alvos terapêuticos para a doença de Chagas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Study of protein modulation in *Trypanosoma cruzi* in response to TGF- β stimuli: a proteomic approach.

ABSTRACT

Recent studies show that TGF- β is involved in the acute and chronic chagasic cardiopathy. High levels of TGF- β and the activation of its signaling pathway were shown to be peculiar aspects of patients with chronic Chagas disease. Besides its relevant role in the pathology of Chagas disease, this cytokine was also observed to be intimately associated with *Trypanosoma cruzi* as a regulator of different stages of the parasite's life cycle. Previous works have shown that *T. cruzi* is able to activate latent TGF- β , using it in the process of host cell invasion. In addition, amastigote forms are able to bind and internalize recombinant TGF- β , and this event is related to their capacity to proliferate and differentiate into trypomastigote forms at the end of the intracellular cycle. Taken together, this set of information raises the question as to which *T. cruzi* molecules are involved in the process of cellular proliferation and differentiation stimulated by TGF- β . Therefore, this work aims to characterize TGF- β responsive molecules through a phosphoproteomic approach. For this purpose, total protein extracts from *T. cruzi* epimastigotes (Y strain), incubated or not with TGF- β , were prepared from parasites in the exponential growth phase. We determined that 5 ng/ml of TGF- β was the dose that induced the highest number of phosphorylation events. Next, the optimal induction time (1, 5, 15, 30 and 60 minutes) was evaluated and we concluded that the phosphorylation patterns from the studied times showed only subtle differences using 1-DE analysis, leading us to evaluate these profiles exclusively through 2-DE gels (7cm pH 3-10 non-linear). The profiles obtained showed differences in phosphorylation patterns during the time-course under study, which led us to maintain a time-kinetics study. Gel images were analyzed and possible TGF- β responsive proteins were identified by mass spectrometry. We observed that heat shock proteins, tubulins, dehydrogenases, enolases, cyclophilin A, GrpE, cruzipain, elongation factor-1 α , eukaryotic initiation factor-5a and others had their phosphorylation and/or expression levels modulated by TGF- β . We tried to correlate the function already described in the literature for each protein with their possible role in intracellular signaling triggered by TGF- β , in agreement with their phosphorylation and/or expression behavior shown in our analysis. Finally, we assessed whether the addition of TGF- β to epimastigotes cultures would have some effect on parasite proliferation. We found that TGF- β addition led to an increase of up to 73% in parasite growth in the first 24 hours of culture. The data presented here contributes to the elucidation of the molecular mechanisms related to TGF- β signaling in *T. cruzi*, providing a source of new potential therapeutic targets against Chagas disease.

Trabalho realizado no Laboratório de
Gênomica Funcional e Bioinformática
(LAGFB/IOC), sob a orientação das
doutoras Leila de Mendonça Lima e
Mariana Caldas Waghabi

Aos meus avós, pelo carinho,
confiança e apoio e a minha mãe,
pela dedicação e ternura.

“Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã. Portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.

DALAI LAMA

"Assim como a semente traça a forma e o destino da árvore, os teus próprios desejos é que te configuram a vida".

EMMANUEL

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”.

ALBERT EINSTEIN

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”.

LOUIS PASTEUR

Agradecimentos

À Deus, por sua sabedoria infinita, que ensina com a paciência e o amor que jamais poderemos alcançar. A Ele que nos dá saúde e forças para que diariamente possamos ter a oportunidade de errarmos e nos reerguemos, bastando apenas ser esta a nossa vontade.

À minha mãe Marília e irmã Marina, pela convivência não mais de todos os dias, mas ainda assim, sempre juntas comigo no meu coração. A minha tia Sandra, pelo exemplo de pessoa boa, honesta e generosa que sempre foi. Ao meu pai Paulo, que apesar da distância, por tantas vezes auxiliou na expansão dos meus pensamentos e idéias. Aos meus avós, Laura e Francisco, por todo amor, carinho e confiança incomensuráveis depositados em mim durante toda a minha vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim!

Às minhas queridas Suzi e Lola, companheiras de todas as horas, que com alegria e simplicidade me lembram a todo o momento a alegria de viver. Ao Zoé, meu pequeno, que ainda vive, no meu coração.

Às minhas velhas amigas Thaís Vilela e Gabriela Vasquez, que me acompanham há tanto tempo e com quem compartilho as alegrias, as tristezas e as últimas novidades. Vocês são minhas jóias raras!

À minha queridíssima amiga Tatiana Gutierrez, aquisição mais sólida e valiosa dos tempos de fundão, com quem vibro a cada nova conquista pessoal e profissional. Obrigada por compartilhar comigo seu alto-astrol e pensamentos positivos. Ah, e curte bem essa vida de casada!

Ao Diego, a maior e melhor surpresa da minha vida. Quem poderia imaginar que daquela conversa informal num domingo de 2x2 no maraca poderia começar uma história de amor tão bonita e tão forte, que até hoje me enche de orgulho e felicidade. Ainda me pego por aí, sonhando acordada e suspirando quando meus pensamentos voam até você. Você ainda mexe muito comigo... Te amo, amo, amo demais!

À minha orientadora Mariana Waghbi, pilar incontestável da idealização e construção desta dissertação. Sem você, nada disso teria acontecido. Apesar dos momentos turbulentos, gostaria que soubesse que tenho grande admiração por você, pela sua paixão e envolvimento com a pesquisa, por você ser uma pesquisadora talentosa e dedicada. Muito obrigada por tudo que me ensinou, pela paciência que teve comigo e por ter me confiado à realização deste trabalho.

À minha orientadora Leila de Mendonça Lima, por ter me dado a oportunidade de estar aqui hoje, tornando possível todo o conhecimento e experiência que adquiri ao longo desses últimos anos. Pela contribuição intelectual à dissertação, através de seu raciocínio lógico e capacidade notável de enxergar os resultados além.

Às meninas do lab 101:

À Palominha, minha doce menina, futura gêninha da pesquisa. Trabalhar com você é fácil e prazeroso. Confio cegamente em tudo o que você faz. Te adoro incondicionalmente, como se fosse minha irmã!

À Fabi, com seus trejeitos engraçados, sempre de bom-humor e disposta a ajudar pessoas perfeccionistas e minuciosas (ou como ela diria, pessoas chatas e lerdas) como eu. Muito obrigada pela ajuda valiosa com a cultura das epis e outros experimentos da dissertação!

À Melissa, aluna sênior do laboratório, que, apesar dos momentos ranzinzas, é um amor de pessoa e ótima companhia, ouvindo, dando bons conselhos e incentivando a todas. Além, é claro, de ser uma ótima consultora de modas (chique demais essa menina!).

À Talita, menina doidinha, sempre perdida num monte de afazeres dentro e fora do laboratório. Obrigada por tudo que me ensinou nesses últimos 5 anos. Torço muito para que você alcance suas aspirações profissionais e, acima de tudo, que seu coração esteja tranquilo e apaixonado como está hoje!

À Cris, a novata do grupo, pelas conversas maduras e pelo exemplo de virar a mesa e dar a volta por cima.

Às meninas do lab 106:

À Márcia, por ser uma pessoa que naturalmente esbanja simpatia e acessibilidade. Você é acima de tudo uma pessoa sincera, que não tem medo de expor seus sentimentos e emoções. O coração imenso de mãe que você guarda no peito é sem dúvida seu maior tesouro. Continue sempre a pessoa amiga, que cativa a todos onde passa.

À Luciana, pela animação diária e histórias divertidas, que tornam o dia-a-dia leve e agradável. Além, é claro, de sua prestatibilidade ímpar, estando sempre disposta a ajudar (e como ajudou)!

À galera do lab 105:

Ao Marcos, Vanessa e Renata pelo alto-astrol e energia que passam pra mim, por serem sempre atenciosos e prestativos nos momentos que precisei de ajuda. Marcelo e Teca, obrigada pelas idéias e sugestões construtivas dadas ao trabalho durante as apresentações nos seminários de laboratório.

Aos amigos, Leonardo, Marcos, Aline e Andressa pelas conversas, conselhos e amizade.

À dona Neiva, cuja ajuda silenciosa é de extrema importância para a realização do trabalho de todos do laboratório.

Aos meninos do lab 201, pelos momentos descontraídos nas festinhas do laboratório.

Às pesquisadoras Cristina Pessolani e Ana Gisele Neves-Ferreira, pela contribuição intelectual dada ao desenvolvimento desta dissertação.

À Claudia Levy, pela revisão desta dissertação, por aceitar participar da banca avaliadora e por, assim como na minha monografia, enriquecer com idéias e sugestões os trabalhos que realizo.

Um agradecimento super, hiper, ultra, mega especial a todos (Paloma, Fabiane, Melissa, Luciana, Talita, Leonardo e Márcia) que bravamente participaram da maratona do processamento de 200 “spots” em uma semana! Serei eternamente grata pela ajuda (e deverei para sempre favores em troca)!

Agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro, através do qual recebi minha bolsa de mestrado e pela oportunidade de realizar este trabalho, que tanto acrescentou no meu amadurecimento profissional.

Às plataformas de Eletroforese 2D (RTP02C) e de Espectrometria de massas - PDTIS/Fiocruz, que viabilizaram a realização deste trabalho.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - grau Celsius

µm - micrômetro

1,3-BPGA - 1,3-bifosfo-D-ácido glicérico

1DE - eletroforese unidimensional

2DE - eletroforese bidimensional

ACN - acetonitrila

ADP- adenosina difosfato

AHADH - desidrogenase L-alfa-hidróxi-ácida aromática

AKR- aldo-ceto redutase

ALK1 – “activin receptor-like kinase 1”

ALK2 – “activin receptor-like kinase 2”

ATP - adenosina trifosfato

BMP – proteínas morfogênicas do osso

BPG- bifosfoglicerato

BSA – albumina de soro bovino

CBB – “coomassie brilliant blue”

CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”

Cdc42- “cell division cycle 42”

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CK2- “casein kinase 2”

Clp – “caseinolytic **protease**”

cm - centímetro

CRM1 – “chromosome region maintenance 1”

Da - dalton

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTT – ditioneitol

EF-1α – “elongation factor 1α” (fator de alongamento-1α)

EIF-5A – “eukaryotic initiation factor 5a” (fator eucariótico de iniciação da tradução – 5a)

ERK- “extracellular signal-regulated kinase”

Fos- “fructo oligosaccharide”

FtsH – “filamentation temperature-sensitive”

g – aceleração da gravidade

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF – fatores de crescimento e diferenciação
GDP- guanosina difosfato
gp63s- glicoproteína 63
GTP- guanosina trifosfato
h – hora
HIV – “human immunodeficiency vírus” (vírus da imunodeficiência humana)
Hsp – “heat shock protein” (proteína de choque térmico)
IEF – “isoelectric focusing” (focalização isoelétrica)
IgE – imunoglobulina E
IPG – gradiente imobilizado de pH
JNK- Jun N-terminal kinase
kb - quilobase
kDa – quilodalton
LAP – “latency associated peptide” (peptídeo associado à latência)
M – molar
mA - miliamper
MALDI – “matrix assisted laser desorption ionization” (desorção/Ionização a Laser Assistido por Matriz)
MAPKs- “mitogen activated protein kinase”
MH2- “MAD homolog 2”
mL – mililitro
mm - milímetro
mM – milimolar
mRNP – “messenger ribonucleoprotein”
MS – espectrometria de massas
MW– massa molecular
MyoD- “Myogenic differentiation”
NAC - complexo associado ao polipeptídeo nascente
NAD(P)- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NTA – ácido nitrilotriacético
OD – “optical density” (densidade óptica)
OMS - Organização Mundial de Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
p/v – peso/volume

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
pb (s) – par(es) de base
PBS – “phosphate buffered saline” (salina tamponada com fosfato)
PDI - proteína dissulfeto isomerase
PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PGFS- prostaglandina F sintase
pH - potencial hidrogeniônico
pI - ponto isoelétrico
PI3K- fosfatidilinositol 3 quinase
PMF – “peptide mass fingerprint”
PP2A- proteína fosfatase 2A
PPIase - peptidil-prolil isomerase
PPM – parte por milhão
PTM- “post-translational modifications” (modificações pós-traducionais)
qsp – quantidade suficiente para
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
SDS – dodecil sulfato de sódio
Smad – união dos nomes “Mothers against decapentaplegic” (MAD) e SMA de *Caenorhabditis elegans*
SnoN- “Ski-related novel protein N”
T - tempo
TAT - tirosina aminotransferase
TBP – tributilfosfina
TCA – ácido tricloro acético
TcMPX - triparedoxina peroxidase mitocondrial
TCTP - proteína tumoral traducionalmente controlada
TEA - trietanolamina
TEMED – N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina
TFA – ácido trifluoro acético
TGF- β – “transforming growth factor beta” (fator transformador de crescimento beta)
TOF – “time of flight” (tempo de voo)
TR- tripanotona redutase
TRIS - tris-hidroxi-metil-amino-metano
TriX - triparedoxina

T β RI - receptor para TGF- β tipo I

T β RII - receptor para TGF- β tipo II

T β RIII - receptor para TGF- β tipo III

v – volts

v/v – volume/volume

WB - *western-blot*

WHO – “World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde)

μ g – micrograma

μ L – microlitro

LISTA DE TABELAS

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1	Solução Inorgânica do meio de cultura LIT	25
3.2	Solução Orgânica do meio de cultura LIT	25
3.3	Meio de cultura LIT	25
3.4	Tampão de amostras de proteína em gel SDS-PAGE (1X)	27
3.5	Géis 12% SDS-PAGE para “strips” de 7cm	27
3.6	Tampão de corrida Laemmli	27
3.7	Parâmetros para focalização isoelétrica	28
3.8	Tampão de Equilíbrio I	29
3.9	Tampão de Equilíbrio II	29
3.10	Comprimentos de onda ideais para emissão e excitação da fluorescência dos corantes ProQ Diamond e Sypro Ruby	31
3.11	Parâmetros utilizados nas buscas do Mascot	35

RESULTADOS

4.1	Identificação das proteínas moduladas por TGF- β	47
4.2	Valores dos “spots” responsivos a TGF- β nos tempos estudados	55

DISCUSSÃO

5.1	Comportamento das proteínas em resposta a TGF- β	95
-----	--	----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

1.1	Mapa da distribuição geográfica da doença de Chagas	01
1.2	Manifestações clínicas da doença de Chagas	03
1.3	Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	04
1.4	Ciclo Biológico de <i>T. cruzi</i>	05
1.5	Superfamília TGF- β	07
1.6	Via clássica de sinalização por TGF- β	10
1.7	Vias alternativas de sinalização por TGF- β	12

RESULTADOS

4.1	Curva de crescimento das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.2	Padronização da dose ótima de incubação com TGF- β	39
4.3	Padronização do tempo ótimo de incubação com TGF- β	41
4.4	Perfis bidimensionais dos extratos protéicos de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β nos tempos de estudo	43
4.5	Quantidade total de “spots” protéicos em cada condição estudada	45
4.6	Mapa protéico do extrato das epimastigotas tratadas com TGF- β por 1 minuto	46
4.7	Comportamento das proteínas de choque térmico	61
4.8	Comportamento da proteína da DnaK	62
4.9	Comportamento da proteína Hsc70	63
4.10	Comportamento da proteína GrpE	64
4.11	Comportamento da proteína Ciclofilina A	65
4.12	Comportamento da proteína β -Tubulina	67
4.13	Comportamento da proteína Prostaglandina F ₂ α sintase	69
4.14	Comportamento da proteína Aldo-ceto redutase	70
4.15	Comportamento da proteína Enolase	71
4.16	Comportamento das proteínas GAPDH e Malato desidrogenase	73
4.17	Comportamento das proteínas dissulfeto isomerase e desidrogenase aromática L- α hidroxiácida	74
4.18	Comportamento da proteína Tirosina aminotransferase	75
4.19	Comportamento das proteínas Hipotéticas	77
4.20	Comportamento da proteína hipotética (“spot” 17)	78
4.21	Comportamento do complexo associado ao polipeptídeo nascente	80

4.22	Comportamento do fator de iniciação eucariótica – 5a	81
4.23	Comportamento do fator de alongamento – 1 α	82
4.24	Comportamento da proteína Cruzipaína	83
4.25	Comportamento da subunidade proteolítica do complexo hslvu	84
4.26	Comportamento da proteína Triparedoxina peroxidase	85
4.27	Comportamento do fator de liberação de histamina dependente de IgE	87
4.28	Proliferação das epimastigotas após adição de TGF- β ao meio de cultura	88

ÍNDICE

Conteúdo	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Doença de Chagas.	01
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .	03
1.3 Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- β).	06
1.3.1 A superfamília TGF- β .	06
1.3.2 Receptores de TGF- β .	08
1.3.3 Via de sinalização clássica por TGF- β .	09
1.3.4 Vias alternativas de sinalização por TGF- β .	11
1.3.5 Genes e fatores de transcrição responsivos a TGF- β	13
1.3.6 Papel do TGF- β na doença de Chagas.	15
1.3.7 Papel de TGF- β na biologia do <i>T.cruzi</i> .	16
1.4 Modificações pós-traducionais.	18
1.4.1 Fosforilação de Proteínas: Aspectos Gerais.	19
1.5 Fosforilação em <i>Trypanosoma cruzi</i> .	20
1.6 Fosfoproteômica.	21
1.7 Proteoma de <i>T.cruzi</i> .	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Gerais	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Cultivo dos parasitos.	25
3.2 Preparo das amostras, Lise e Extração das Proteínas.	26
3.3 Precipitação e Dosagem das Proteínas.	26
3.4 Eletroforese Unidimensional.	27

3.5	Eletroforese Bidimensional.	28
3.5.1	Focalização Isoelétrica (IEF, 1ª Dimensão).	28
3.5.2	Eletroforese em SDS/PAGE (2ª Dimensão)	29
3.6	Coloração dos Géis e Obtenção das Imagens.	30
3.7	Análise de Imagens.	31
3.8	Retirada e Processamento dos “spots”.	32
3.9	Identificação de proteínas por Espectrometria de Massas.	34
3.10	Identificação dos peptídeos.	35
3.11	Proliferação de epimastigotas em resposta a adição de TGF-β.	36
4.	RESULTADOS	37
4.1	Curva de crescimento das formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	37
4.2	Padronização da dose ótima de TGF-β.	38
4.3	Padronização do tempo ótimo de incubação com TGF-β.	40
4.4	Perfis bidimensionais de fosforilação e expressão de proteínas de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em resposta a TGF-β.	41
4.5	Análises dos perfis bidimensionais diferenciais de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em resposta ao TGF-β.	44
4.5.1	Quantidade total de “spots” protéicos em cada condição estudada	44
4.5.2	Identificação dos “spots” presentes nos mapas proteômicos de extratos de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	45
4.5.3	Proteínas moduladas após a adição de TGF-β.	53
4.6	Proliferação das epimastigotas após adição de TGF-β.	88
5.	DISCUSSÃO	89
6.	CONCLUSÕES	111
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A Doença de Chagas, identificada pelo brasileiro Carlos Chagas em 1909, há exatos 100 anos, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e é apontada como a maior causa de miocardite aguda e cardiomiopatia crônica progressiva em regiões endêmicas da América Latina (Moncayo & Silveira, 2009). Estimativas epidemiológicas recentes indicam que cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* e que haja de 100.000 a 200.000 novos casos por ano, com 20 a 40 mil mortes ao ano (Fapesp, 2008).

A distribuição geográfica da doença (Figura 1.1), incluindo seus reservatórios e vetores, se estende do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile. Dessa forma, a infecção cobre praticamente toda a América, onde 90 milhões de pessoas encontram-se expostas a infecção (Coura & Dias, 2009).

Os mecanismos de transmissão da doença de Chagas podem ser divididos em dois grupos: (1) mecanismos principais, por via vetorial (triatomíneos), transfusão sanguínea, alimentos contaminados e transmissão placentária; (2) mecanismos secundários, por acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos, transmissão sexual e compartilhamento de seringas por usuários de drogas (Prata, 2001; Coura, 2007; Coura & Dias, 2009). Devido ao movimento de migração populacional, um número cada vez maior de casos de importação da doença de Chagas tem sido detectado em áreas não endêmicas, como América do Norte e várias partes da Europa, Ásia e Oceania (Schmunis, 2007).

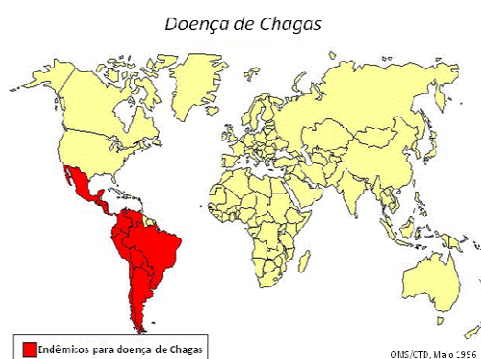


Figura 1.1: mapa da distribuição geográfica destacando (em vermelho) os países onde a doença de Chagas é endêmica. Fonte: Organização Mundial de Saúde (1996).

A doença de Chagas possui duas fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda inicia-se após um período de incubação de 7 a 10 dias e tem como principais características a curta duração (1 a 3 meses) e a presença de parasitos no sangue circulante do indivíduo infectado. Em alguns casos, são encontrados chagomas de inoculação e/ou o sinal de romaña (figura 1.2), que são lesões na porta de entrada do parasita, geradas principalmente em resposta à ruptura das células hospedeiras pelo *T. cruzi*. Apesar disso, a sintomatologia pode passar despercebida, podendo ser confundida com uma gripe comum. Os sintomas mais comuns são febre, astenia, cefaléia, dores no corpo e anorexia, mas também pode ser observada a presença de miocardite aguda em aproximadamente 80 a 90% dos casos agudos. A resposta imune forte e específica associada à resposta imune inata controla a infecção aguda, que evolui para a fase crônica. A cardiomiopatia chagásica é ainda uma doença incurável, sendo segundo dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) uma das principais causas de doenças do miocárdio na América Latina (Zeledon, 1997).

A fase crônica pode ser dividida em duas formas clínicas: (i) a indeterminada (assintomática, mas com sorologia positiva), e a (ii) determinada, na qual sinais e sintomas clínicos (figura 1.2) são observados em cerca de 30% dos indivíduos infectados. As manifestações clínicas da doença de Chagas crônica estão relacionadas com patologias envolvendo o coração, esôfago e intestino (Coura, 2007). Alterações cardíacas são as manifestações mais sérias e frequentes da doença de Chagas crônica e afetam cerca de 20 a 40% dos indivíduos, em geral, anos ou décadas após a infecção inicial (Rassi et al., 2009). A doença cardíaca chagásica é também a causa mais comum de cardiomiopatia na América Latina e, em áreas endêmicas, é a causa principal de morte cardiovascular entre pacientes de 30 a 50 anos (Rassi et al., 2000). A cardiomiopatia chagásica está geralmente associada ao aumento do coração através de uma fibrose exacerbada e disfunções que incluem arritmias, distúrbios de condução elétrica e falência congestiva do coração (Higuchi et al., 1999).

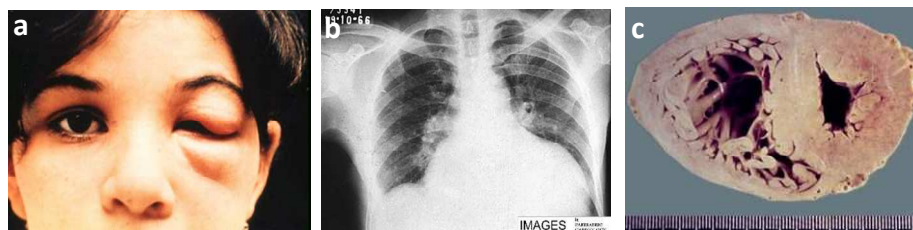


Figura 1.2: Manifestações clínicas características das fases aguda (a) e crônica (b e c) da doença de Chagas. **a.** Sinal de romanã, caracterizado como um edema unilateral bpalpebral (imagem retirada do endereço eletrônico <http://www.jyi.org/features/ft.php?id=185>). **b.** Chapa radiográfica e **c.** coração dissecado, revelando a cardiomegalia característica de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (as imagens **b** e **c** foram retiradas de Gilles, 2000).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas e pertence à família Trypanosomatidae, que compreende um grande grupo de parasitos flagelados heteroxênico capazes de causar doenças em humanos e outros animais (De Souza, 2002). Este parasito possui um ciclo de vida complexo, que se caracteriza pela presença de vários estágios de desenvolvimento observados em hospedeiros vertebrados e invertebrados (Kirchhoff, 1993; De Souza, 2002). Durante seu ciclo de vida, três diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* podem ser facilmente identificadas (figura 1.3) por microscopia ótica em preparações coradas com Giemsa ou por microscopia de fase, sendo elas: (a) Amastigotas, que também são conhecidas como esferomastigotas, micromastigotas ou forma leishmanial. São formas replicativas, que apresentam morfologia arredondada com flagelo curto e cinetoplasto anterior ao núcleo. Estudos com amastigotas, obtidas de fontes variadas, mostraram que as mesmas também são infectivas para células de vertebrados (de Carvalho & de Souza, 1986; Andrews, 1990); (b) Epimastigotas, que possuem formato fusiforme com 20 a 40 μm de comprimento, são formas flageladas replicativas e apresentam o cinetoplasto em forma de disco côncavo, localizado anteriormente ao núcleo. Estas formas de *T. cruzi* são observadas principalmente no intestino de hospedeiros invertebrados. Epimastigotas são também encontradas dentro de células de vertebrados durante o processo de diferenciação amastigota-tripomastigota, sendo denominadas formas “epimastigotas-like” (Almeida-de-Faria et al., 1999); (c) Tripomastigotas são as formas infectivas clássicas e apresentam morfologia alongada com comprimento aproximado de 25 μm e um diâmetro de 2 μm . Estas formas apresentam cinetoplasto redondo e flagelo longo localizados na região posterior e anterior ao núcleo, respectivamente. Elas são observadas em (i)

células tissulares e no sangue de hospedeiros vertebrados, (ii) no intestino posterior, nas fezes, e na urina do hospedeiro invertebrado, (iii) na fase estacionária de crescimento de culturas axênicas, e (iv) na fase líquida de culturas celulares. Essa forma é incapaz de se dividir.



Figura 1.3: Formas evolutivas de *T. cruzi*. **a.** tripomastigotas sanguíneas (imagem retirada de Procopio et al., 1999), **b.** epimastigotas (imagem retirada do endereço eletrônico <http://www.fiocruz.br/~ccs/arquivosite/estetica/chagas.htm>) e **c.** amastigotas (imagem retirada de <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2004/Trypanosomiasis/morphology.htm>).

O ciclo biológico (figura 1.4) começa quando o hospedeiro invertebrado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são membros das famílias Hemiptera e Reduviidae, como *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, entre outros. Durante o repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado são ingeridas pelo inseto. Sabe-se que é no estômago do inseto onde a maior parte das tripomastigotas sanguíneas se transforma em epimastigotas e em formas arredondadas. No intestino, as epimastigotas se dividem repetidamente por um processo denominado fissão binária. Essas formas podem se prender às células intestinais através de hemidesmossomas, e no reto, uma certa parte das epimastigotas se transforma em tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas com as fezes e urina sendo capazes de infectar os hospedeiros vertebrados (Garcia & Azambuja, 1991; Zeledon, 1997; Kollien & Schaub, 2000).

Tem sido demonstrado que formas tripomastigotas podem se transformar em formas arredondadas que possuem um flagelo livre. Esta forma, que aparece no estômago do vetor invertebrado, é capaz de se transformar tanto em pequenas epimastigotas que iniciam um processo de multiplicação no intestino, como em longas epimastigotas que se movem para a região mais posterior do trato digestivo do inseto. Aparentemente essas formas longas de epimastigotas são incapazes de se dividirem. Alguns dias após a ingestão do sangue, as amastigotas capazes de se transformarem em tripomastigotas são encontradas no reto. Com base na

informação disponível até o momento parece que tanto epimastigotas como amastigotas são capazes de se transformar em tripomastigotas (Garcia & Azambuja, 1991; Kollien & Schaub, 2000). As formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes e urina do hospedeiro invertebrado são capazes de penetrar nas células dos vertebrados, onde se transformarão em amastigotas. Estas se dividem repetidamente por fissão binária e dão origem às tripomastigotas, que são capazes de romper as células hospedeiras, sendo liberadas no espaço intercelular, podendo tanto infectar células adjacentes como alcançar a corrente sanguínea (tripomastigotas sanguíneos), invadindo novos tecidos ou serem ingeridas pelo inseto vetor durante novo repasto sanguíneo, iniciando assim um novo ciclo (De Souza, 2002).

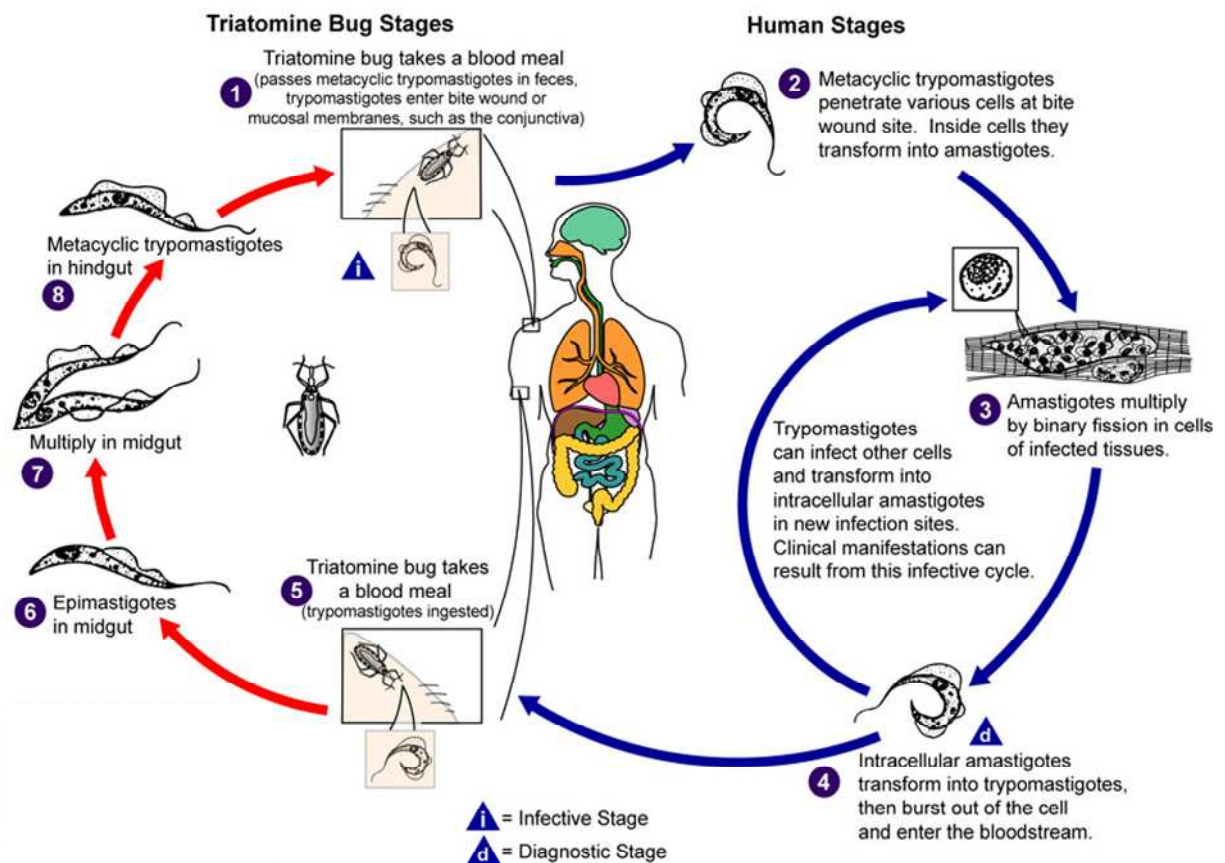


Figura 1.4: Ciclo biológico de *T. cruzi* (imagem retirada do endereço eletrônico <http://www.cdc.gov/>).

1.3. Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- β)

1.3.1. A superfamília TGF- β

O Fator Transformador de Crescimento beta (“Transforming growth factor beta” - TGF- β) pertence a uma superfamília que compreende um grande número de fatores de crescimento polipeptídicos estruturalmente relacionados, capazes de regular uma vasta série de processos celulares, como proliferação celular, determinação de linhagem, diferenciação, motilidade, adesão e morte (Lawrence, 1995; Massague, 1998).

A superfamília TGF- β (figura 1.5) engloba uma ampla variedade de proteínas sinalizadoras, incluindo isoformas do TGF- β , proteínas morfogênicas do osso (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), activinas, inibinas e substância inibidora Mülleriana (Roberts & Sporn, 1993; Piek et al., 1999; Moustakas & Heldin, 2005). Os ligantes TGF- β apresentam moléculas relacionadas estrutural e funcionalmente, codificadas por diferentes genes, e suas isoformas são designadas TGF- β , TGF- β 2 e TGF- β 3 (Burt & Law, 1994).

The TGF-β Superfamily

Ligand	Type II R	Type I R	R-Smad	Co-Receptor	Regulating Molecules (sharing direct interaction with ligand)	
TGF-β	TGF-β RII	ALK-5 ALK-2 ALK-1	smad2/3 smad1/5/8	Betaglycan (TGF-β2+) Endoglin (ALK-1 specific) CD109	α ₂ -macroglobulin BAMBI/NMA+ biglycan cripto+ decorin	KCP/Crim 2 LAP s-betaglycan s-TGF-β RII
Activin	Act RII/IIB	ALK-4 ALK-2	smad2/3 smad1/5/8		activin AC/BC/AE/CE BAMBI/NMA+ cripto DAN FLRG	endoglin follistatin inhibin: betaglycan+ KCP/Crim 2 s-Act RII/IIB
Inhibin	Act RII/IIB BMP RII/IIB	--	--	Betaglycan+		
BMP	BMP RII/IIB Act RII/IIB	ALK-1 ALK-2 ALK-3 ALK-6 ALK-4 ALK-5 ALK-7 ALK-2	smad1/5/8 smad2/3 smad1/5/8	RGM-A/-B/-C	BAMBI/NMA+ chordin: Tsg endoglin FLRG follistatin gremlin inhibin: betaglycan+ KCP/Crim 2	nodal: BMP-7 noggin noggin: SOST PRDC s-ALK-3 SOST USAG-1
GDF	BMP RII Act RIIIB	ALK-5 ALK-6 ALK-4 ALK-5 ALK-6	smad2/3 smad1/5/8 smad2/3 smad1/5/8	Cripto (GDF-1/3)+	DAN follistatin propeptide (GDF-8,11)	
Nodal	Act RII/IIB	ALK-4 ALK-7	smad2/3	Cripto+	BMP-7: nodal cerberus	DAN lefty
Lefty	Act RII/IIB	--	--	Cripto (+nodal)+		
MIS	MIS RII	ALK-2 ALK-3 ALK-6	smad1/5/8			

Note: The GDNF family utilizes a receptor tyrosine kinase (RET) for signal transduction and is not included in the chart above.

Key: + required + membrane-bound s=soluble

Abbreviations:
 MIS: Mullerian inhibiting substance
 BAMBI: BMP and activin membrane-bound inhibitor
 KCP: kelch/chordin-like protein
 FLRG: follistatin-related gene
 ALK: activin-like kinase
 Tsg: twisted gastrulation
 PRDC: protein related to DAN and cerberus
 SOST: sclerostin
 USAG-1: uterine sensitization-associated gene-1

Figura 1.5: Superfamília TGF-β (imagem retirada do endereço eletrônico http://www.rndsystems.com/dam_public/5895.pdf).

A atividade biológica do TGF-β depende de sua interação com receptores específicos que transduzem o sinal bioquímico, resultando em um efeito biológico. Somente a molécula ativa é capaz de se ligar ao seu receptor, e este mecanismo representa um sistema típico de interação ligante-receptor, seguido de transdução de sinal e culminando em um efeito final.

O TGF- β é sintetizado sob uma forma latente contendo domínios C- e N-terminais, que são clivados intracelularmente antes de serem secretados pelas células, mas mantêm-se associados por interações eletrostáticas como um complexo não-covalente (Murphy-Ullrich & Poczatek, 2000). No entanto, para exercer seu efeito biológico, a forma latente precisa sofrer uma alteração na sua conformação passando a um estado ativado. A forma latente é produzida por diferentes tipos celulares, entre eles, macrófagos, plaquetas, fibroblastos e células do baço. A síntese de TGF- β tem caráter heterogêneo: células T e monócitos sintetizam principalmente TGF- β , e células do sistema nervoso central sintetizam altos níveis de TGF- β 3 (Moustakas et al., 2002). A maioria das células em cultura produz TGF- β latente. No entanto, tanto células T ativadas quanto células fagocíticas mononucleares ativadas podem secretar a forma ativa de TGF- β (Chen et al., 2001).

Como os outros membros desta superfamília, a forma latente é uma proteína homodimérica, cujas cadeias de aproximadamente 12,5 kDa são mantidas por pontes dissulfeto. A latência é conferida pelo peptídeo de 75 kDa, denominado LAP (“latency associated peptide”), localizado na região N-terminal da sequência do precursor e que permanece ligado não-covalentemente ao TGF- β após sua secreção (Massague, 1990; Lyons & Moses, 1990; Taipale et al., 1996).

A forma latente pode ser ativada por diferentes fatores incluindo proteases, endoglicosidases e mudanças de pH ou temperatura (Hall et al., 1992). É possível que, em condições fisiológicas (*in vivo*), um mecanismo em particular de ativação de TGF- β latente seja dominante em relação aos outros.

1.3.2. Receptores de TGF- β

Uma vez ativado, o TGF- β pode então ser reconhecido pelos seus receptores específicos de superfície, desencadeando o processo de sinalização intracelular. TGF- β apresenta três receptores de superfície, sendo eles denominados: receptor para TGF- β tipo I (T β RI), receptor para TGF- β tipo II (T β RII) e receptor para TGF- β tipo III (T β RIII), que existem em virtualmente todos os tipos celulares estudados. Os receptores do tipo I (53 kDa) e do tipo II (75 kDa) são serina/treonina quinase transmembranares. Após a ligação ao TGF- β , T β RI é fosforilado pelo T β RII, que detém as funções de sinalização, sendo mediador da maioria dos efeitos biológicos

de TGF- β (Massague, 1998; Lijnen et al., 2000). T β RII é constitutivamente fosforilado. Em mamíferos, cinco receptores do tipo II e sete do tipo I foram identificados como ligantes da superfamília de TGF- β (Lutz & Knaus, 2002). Todos são receptores transmembranares que contém um domínio intracelular serina/treonina quinase. Além do T β RI, já foram descritos outros receptores de tipo I, como ALK1 e ALK2 que transmitem a sinalização gerada pela ligação ao TGF- β (Massague, 1998).

1.3.3. Via de sinalização clássica por TGF- β

A ligação inicial de TGF- β ativo ao T β RII, é seguida pelo recrutamento de T β RI, formando um complexo heterotetramérico (Massague, 1998; Lutz & Knaus, 2002). T β RI é transfosforilado na sua região justamembranar, rica em glicina e serina, denominada GS-Box. Esta fosforilação é mediada por T β RII, o que leva a ativação de T β RI. Esta ativação não é devida a um aumento da atividade quinase, mas é baseada na criação de um sítio de ligação para as proteínas Smad, que representam o substrato para T β RI (Lutz & Knaus, 2002).

A ligação do TGF- β aos seus receptores de superfície não resulta apenas na sinalização, mas também na endocitose do ligante associado ao receptor, que são direcionados intracelularmente para a via de degradação nos compartimentos tardios da via endocítica (Massague, 1998; Lutz & Knaus, 2002). O mecanismo preciso da endocitose do receptor de TGF- β ainda é controverso. Alguns grupos sugerem que esta internalização ocorre por endocitose mediada por clatrina (Anders et al., 1997), outros por endocitose mediada por receptor independente de clatrina ou ainda pela via das cavéolas (Zwaagstra et al., 2001). O receptor pode ainda, dependendo do estímulo externo, retornar à superfície celular e participar de uma nova cascata de sinalização intracelular (Mitchell et al., 2004).

Na via de sinalização clássica de TGF- β (figura 1.6) participam as proteínas Smad, que compõem uma família de fatores de transcrição, sendo os substratos para o receptor de tipo I (T β RI). Essas proteínas apresentam peso molecular entre 42 e 60 kDa e podem ser divididas em três sub-famílias: (i) Smads ativadas pelo receptor (R- Smad) incluindo Smads ativadas por BMP (Smad 1, 5 e 8) e por TGF- β (Smad 2 e 3); (ii) o mediador comum Smad4 (Co- Smad), e (iii) as Smad inibitórias, Smad 6 e 7 (I-Smad) (Massague, 1998). T β RI causa a fosforilação das R-Smads no

motivo SSXS da porção C-terminal que é conservado entre todas as R-Smads, causando a dissociação do receptor e a formação de um sítio âncora para Smad 4, formando então um complexo heteromérico. O complexo de Smads é translocado para o núcleo, onde se associa a co-fatores e co-moduladores que se ligam ao DNA para ativar a transcrição de determinados genes responsivos a TGF- β . A escolha dos genes alvo é determinada pela composição do complexo de transcrição formado (Massague & Chen, 2000; Lutz & Knaus, 2002).

Esta via clássica das Smads é conservada evolutivamente e é regulada por diversos eventos de fosforilação, transporte núcleo-citoplasmático, degradação proteossomal mediada por ubiquitina e, finalmente, por Smads inibitórias ((I)-Smads) (Shi & Massague, 2003). As proteínas Smad são os únicos substratos conhecidos para T β RI capazes de promover funções de sinalização celular em resposta a TGF- β . Embora outras proteínas também sejam capazes de interagir com o receptor e mediar o processo de sinalização, a característica de transmissão de sinal diretamente do receptor para a maquinaria transcricional é única das Smads (Piek et al., 1999). Por isso, a via clássica de Smads foi por muito tempo considerada como a única via responsiva a TGF- β .

As proteínas Smad inibitórias são induzidas pela sinalização por Smad, acumuladas no núcleo e podem ser então exportadas do núcleo após estímulo das células por TGF- β ou BMP. Em seguida, elas se ligam aos receptores do tipo I e exercem feedback negativa, através do bloqueio da fosforilação de proteínas R-Smads e da formação do complexo R-Smad–Smad 4, estimulando a defosforilação do receptor pelo recrutamento de fosfatases e promovendo a ubiquitinação e degradação lisossomal do receptor (Moustakas & Heldin, 2005).

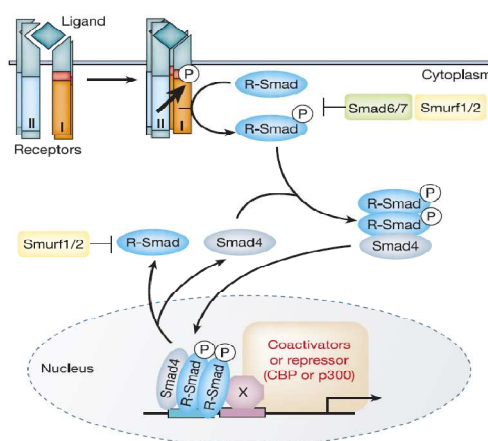


Figura 1.6: via clássica de sinalização por TGF- β (imagem retirada de Derynck & Zhang, 2003).

1.3.4. Vias alternativas de sinalização por TGF- β

A via de Smads representada acima é de extrema importância para a execução precisa de programas tissulares durante o desenvolvimento animal. Tem sido firmemente estabelecido que as vias das Smads são mediadoras centrais da transdução de sinais dos receptores dos membros da superfamília de TGF- β ao núcleo (Barolo et al., 2002; Waite & Eng, 2003). Contudo, novas evidências bioquímicas e de desenvolvimento apóiam a idéia de que, alternativamente, vias não-dependentes de Smads também participam na sinalização por TGF- β (Moustakas & Heldin, 2005).

A sinalização por vias independentes de Smads (figura 1.7) possui três mecanismos gerais que contribuem para as respostas fisiológicas em resposta a TGF- β : (1) vias de sinalização independentes de Smads modificam diretamente (ex.: fosforilam) as Smads, e assim, modulam a atividade de efetores centrais; (2) as proteínas Smad interagem e modulam diretamente a atividade de outras proteínas sinalizadoras (ex.: quinases), deste modo, transmitindo sinais a outras vias; (3) os receptores de TGF- β interagem diretamente com proteínas não-Smad ou fosforilam as mesmas, iniciando uma sinalização paralela que colabora com a via das Smads na produção de respostas fisiológicas.

Assim, transdutores de sinal não-Smad sob o controle de TGF- β fornecem regulação quantitativa da via de sinalização e servem como pontos de interação cruzada com outras importantes vias de sinalização, como as da tirosina quinase, receptores acoplados a proteína G ou outros receptores de citocinas. A seguir, daremos um breve relato sobre as vias alternativas já descritas na literatura.

Algumas evidências científicas relatam a associação de TGF- β a outras vias de sinalização, incluindo as vias MAPKs, ERK, JNK, p38, PI3K, fosfatases PP2A e ainda membros da família Rho. Algumas dessas vias regulam a ativação de Smads, como descrito anteriormente, mas outras podem induzir respostas não relacionadas à transcrição (Derynck & Zhang, 2003). A ativação dessas vias com cinética lenta pode ser resultado de respostas geradas a partir da transcrição induzida pelas Smads, entretanto, a rápida ativação (5 a 15 minutos), sugere independência da transcrição por essas proteínas (Massague & Wotton, 2000).

Estudos científicos usando células deficientes em Smad 4 apóiam a possibilidade da ativação da via MAPK que é independente de Smads (Engel et al.,

1999). Além disso, receptores de TGF- β do tipo I mutados, deficientes na ativação de Smads, ativam a sinalização por p38MAPK em resposta a TGF- β (Yu et al., 2000). Os mecanismos de ativação de ERK, JNK ou p38MAPK por TGF- β e suas consequências biológicas ainda estão pouco caracterizadas. A ativação induzida por TGF- β das vias de ERK e JNK pode resultar na fosforilação de Smads e regular a ativação das mesmas (de Caestecker et al., 1998); (Engel et al., 1999); (Kretzschmar et al., 1999); (Funaba et al., 2002). Já a ativação da sinalização de Ras/Erk MAPK por TGF- β pode induzir a expressão de TGF- β 1, amplificando assim a resposta e induzindo respostas secundárias à TGF- β (Yue & Mulder, 2000). A ativação das vias MAPK por TGF- β pode também afetar respostas de transcrição através de efeitos diretos sobre os fatores de transcrição que interagem com as proteínas Smad (Massague & Chen, 2000; Itoh et al., 2000; Moustakas et al., 2001).

Dependendo da linhagem celular, outras vias de sinalização podem ser induzidas. TGF- β pode rapidamente ativar GTPases semelhantes a Rho (“Rho-like GTPases”), incluindo RhoA, Rac e Cdc42, apesar da ativação atrasada de RhoA e Cdc42 (devido à síntese *de novo* de proteínas) ter sido também observada (Bhowmick et al., 2001; Bakin et al., 2002; Edlund et al., 2002).

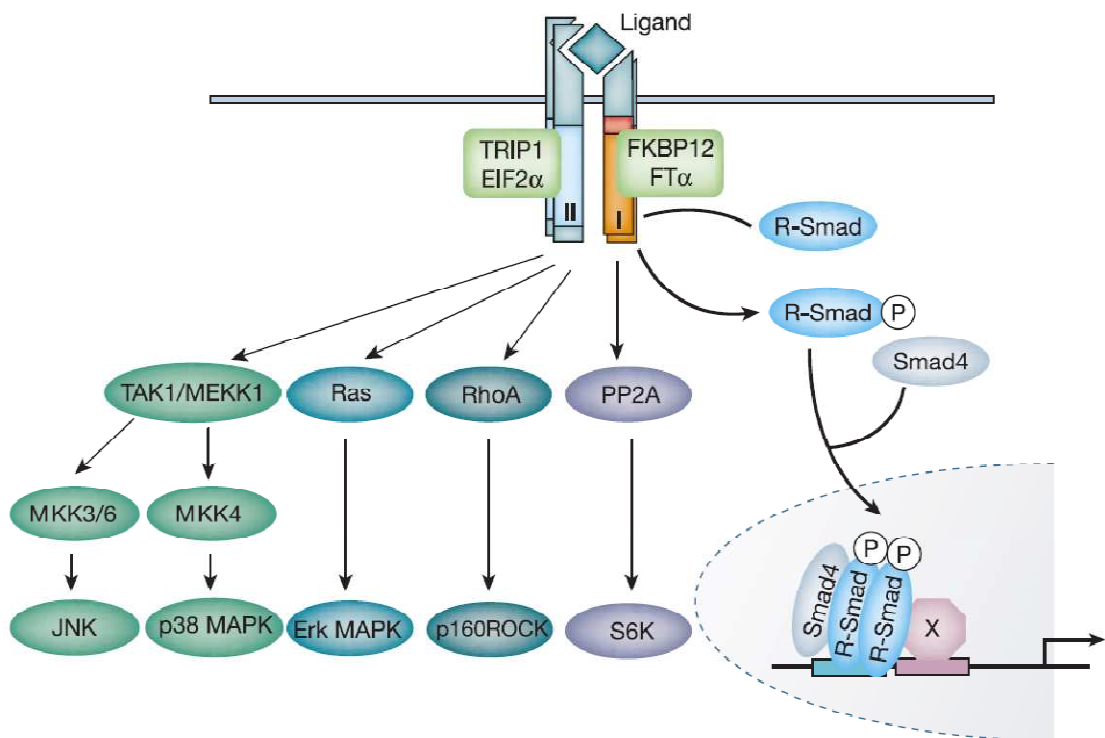


Figura 1.7: vias alternativas de sinalização por TGF- β (imagem retirada de Derynck & Zhang, 2003).

1.3.5. Genes e fatores de transcrição responsivos a TGF- β

TGF- β ativa a transcrição por meio de interações físicas e da ajuda funcional de Smads ligadoras de DNA com sequências específicas de fatores de transcrição e com os co-ativadores CBP e p300 (Derynck & Zhang, 2003). Uma vez que o complexo de Smad se liga ao DNA, ele pode controlar a transcrição de genes alvo alterando a estrutura do nucleossoma, e assim, remodelando o molde de cromatina. Através de seu domínio MH2, as Smads podem se ligar aos co-ativadores p300/CBP, que possuem atividade histona acetil transferase, e também aos co-repressores TGIF, c-ski e SnoN, que recrutam histonas desacetilases (Derynck et al., 1998; Massague & Wotton, 2000). A atividade transcricional do domínio MH2 da Smad se manifesta em fusões com o domínio de ligação ao DNA Gal4p, e exige a presença de uma co-Smad. Smads e co-Smads podem recrutar o conjunto necessário de co-ativadores ou co-repressores para orquestrar uma resposta transcricional. (Massague & Chen, 2000).

O número de fatores de transcrição que se ligam ao DNA, com os quais as Smads podem interagir funcionalmente é impressionante. Muitos genes são ativados em resposta ao TGF- β , enquanto outros são transcricionalmente reprimidos. Assim, dependendo do fator de transcrição com o qual interagem, do promotor e do contexto intracelular, mecanismos distintos levam a sinalização mediada por Smad e determinam se essas proteínas irão ativar ou reprimir a transcrição.

TGF- β inibe a progressão do ciclo celular através da regulação da transcrição dos reguladores do ciclo celular. Entre eles, c-Myc e membros da família Id são regulados negativamente por TGF- β . Em células onde a expressão do c-Myc é regulada negativamente por TGF- β , a Smad3 reprime a transcrição de c-Myc em associação com os fatores de transcrição E2F4 e E2F5, e o co-repressor p107. Este complexo é pré-montado no citoplasma e, em resposta ao TGF- β , é translocado para o núcleo, onde, em associação com a Smad4, se liga a um sítio de ligação E2F-Smad no promotor c-Myc e reprime a expressão de c-Myc. Na regulação negativa de Id1, a Smad3 ativada por TGF- β induz diretamente a expressão de ATF3, e então, a Smad3 junto a ATF3 formam um complexo que reprime o promotor Id1. Da mesma forma, SIP1 induzida por TGF- β , regula negativamente a expressão de E-caderina. TGF- β também inibe a diferenciação de mioblastos, osteoblastos e adipócitos através da repressão funcional de fatores de transcrição-chave que conduzem essas vias de diferenciação. Smad3 reprime a transcrição por

Runx2/CBFA1 na diferenciação dos osteoblastos; MyoD e outros fatores de transcrição miogênicos básicos hélice-alça-hélice nos mioblastos e CCAAT/proteínas estimuladoras de ligação na diferenciação dos adipócitos. A repressão ou ativação da transcrição pelas Smads depende também do tipo de célula e da sequência promotora a qual se ligam (Derynck & Zhang, 2003).

TGF- β pode também causar a rápida inibição da transcrição de genes, como o da fosfatase ativadora de CdK Cdc25A (Iavarone & Massague, 1997), mediando efeitos anti-proliferativos. A ativação transcricional por TGF- β da PAI-1 (Chang & Goldberg, 1995), receptores de ácido retinóico (Chen et al., 1996), α 2 de colágeno(I) e outros genes (Chang & Goldberg, 1995) parece precisar da atividade da AP-1. Além disso, um repressor contendo Fos (“Fos-containing repressor”) foi relacionado à regulação negativa da protease secretora transina/estromalisina por TGF- β (Kerr et al., 1990). Não é certo que as Smads participem em todas, ou até mesmo na maioria das respostas gênicas por TGF- β (Massague, 1998).

Vários genes responsivos a TGF- β têm sido descritos, mas apenas uma fração desses tem as características de uma resposta transcricional imediata. p15^{Ink4b} e p21^{Cip1} são inibidores quinase dependentes de ciclina, cuja rápida indução em resposta a TGF- β medeia a parada do ciclo celular. “Clusters” de sítios do tipo Sp1 próximos ao sítio de início da transcrição de p15^{Ink4b} e p21^{Cip1} contam como regiões responsivas a TGF- β em ensaios de gene repórter.

A expressão estimulada por TGF- β de colágenos intersticiais e outras proteínas da matriz extracelular revelam um papel importante do TGF- β nos processos de desenvolvimento e regenerativos (Massague, 1990; Roberts et al., 1990; Roberts & Sporn, 1993). As regiões responsivas a TGF- β dos genes que codificam as proteínas da matriz extracelular, como α 1 do colágeno (I) (Ritzenthaler et al., 1993), α 2 de colágeno (I) (Rossi et al., 1988; Inagaki et al., 1994), inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) (Keeton et al., 1991; Riccio et al., 1992), elastina (Marigo et al., 1994), e perlecan (Iozzo et al., 1997) se assemelham aos sítios Sp1 ou aos sítios CTF/NF- κ B.

1.3.6. Papel do TGF- β na Doença de Chagas

O TGF- β foi inicialmente descrito como fator transformador de crescimento e proliferação de células tumorais (Todaro et al., 1980). No entanto, estudos posteriores indicaram que ele apresentava uma função pleiotrópica, podendo desempenhar atividades proliferativas e anti-proliferativas, sendo capaz tanto de inibir como estimular o crescimento de um mesmo tipo celular, dependendo das condições da cultura e do grau de confluência das células (Massague, 1998).

Além da ação na proliferação celular, o TGF- β é uma das principais citocinas envolvidas na regulação da formação e degradação de matriz extracelular (Massague, 1998), induzindo a expressão de vários componentes de matriz, como fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina e trombospondina. A inibição da degradação de matriz é devida à diminuição da atividade proteolítica pericelular (Taipale et al., 1996).

A produção exacerbada de TGF- β na infecção pelo *T. cruzi* foi inicialmente descrita por Silva e colaboradores em 1991. Este estudo demonstrou que células do baço de camundongo apresentam no oitavo dia de cultura *in vitro* um aumento na produção de TGF- β , variando aproximadamente de 2 ng/ml na cultura não infectada para 5 ng/ml na cultura infectada por *T. cruzi*. Além disso, o TGF- β se mostrou como um potente inibidor de INF- γ , sendo responsável pelo aumento da replicação de *T. cruzi* dentro dos macrófagos.

Estudos demonstraram o envolvimento do TGF- β na cardiopatia chagásica aguda e crônica, com exacerbação de seus níveis plasmáticos e da ativação da sua via de sinalização celular como aspectos peculiares de pacientes nos estágios mais avançados da doença (Araujo-Jorge et al., 2002; Waghbi et al., 2002).

A cardiopatia chagásica está geralmente associada ao aumento do coração através de uma fibrose exacerbada e disfunções incluindo arritmias, distúrbios de condução elétrica e falência congestiva do coração (Higuchi et al., 1999). A fibrose é uma das manifestações mais significativas da cardiopatia chagásica crônica (CCC) e encontra-se associada com infiltrados inflamatórios e cardiomiócitos em degeneração (Andrade et al., 1989; Rossi & Bestetti, 1995; Rossi, 2001). Além de sua participação na produção de proteínas da matriz extracelular e conseqüente fibrose, TGF- β pode modular outras manifestações cardíacas, incluindo a proliferação e morte dos cardiomiócitos. A sinalização por TGF- β está relacionada a

resposta de hipertrofia dos cardiomiócitos à estimulação pelo receptor β 1-adrenérgico (Rosenkranz, 2004), a qual pode amplificar o crescimento hipertrófico após o infarto do miocárdio e causar a transição entre uma hipertrofia adaptativa e uma hipertrofia descompensada.

1.3.7. Papel de TGF- β na biologia do *T. cruzi*

Diversos estudos foram desenvolvidos demonstrando claramente que TGF- β desempenha várias funções não somente na progressão da doença de Chagas, como também no controle em diferentes etapas do ciclo de vida e infectividade de *T. cruzi* (Waghbi et al., 2002; Waghbi et al., 2005a; Waghbi et al., 2005b; Waghbi et al., 2007; Araujo-Jorge et al., 2008).

Sabe-se que o *T. cruzi* é capaz de ativar diretamente TGF- β latente (Waghbi et al., 2005b), e com isto, dispara sua via de sinalização dependente de Smad, sendo a ativação desta via necessária durante os eventos de invasão à célula hospedeira (Ming et al., 1995; Hall & Pereira, 2000). Estudos com cardiomiócitos infectados *in vitro* por *T. cruzi* demonstram que formas amastigotas de *T. cruzi* são capazes de captar e internalizar TGF- β do hospedeiro, estocando-o, o que sugere um novo papel de TGF- β no ciclo celular do parasito: seu uso no momento de sinalizar a parada da proliferação e iniciar a diferenciação para formas tripomastigotas (Waghbi et al., 2005a), podendo refletir uma dependência do parasito por uma molécula da célula hospedeira que pode ser usada para regular seu próprio ciclo intracelular.

Esses resultados também sugerem a presença de receptores para TGF- β na superfície celular de *T. cruzi*, assim como a existência de uma via de sinalização intracelular capaz de transduzir os efeitos de TGF- β . Genes ortólogos para os receptores serina/treonina quinase canônicos (T β RI e T β RII) e proteínas Smads já foram identificadas no parasito helminto *Schistosoma mansoni*, mas não foram encontradas após análises “*in silico*” do genoma de *T. cruzi* (Waghbi et al., 2005a). Sendo assim, espera-se que neste microorganismo deva ocorrer uma via alternativa de sinalização por TGF- β e que seus possíveis receptores celulares sejam distintos dos já descritos para mamíferos.

Como descrito acima, muitas vias de sinalização Smad-independentes são conhecidas por serem ativadas ou moduladas por TGF- β em células eucarióticas. Entre estas estão incluídas Jun-kinase, p38MAP-kinase, Ras/MEK/ERK, Rho-A/p160ROCK e PP2A/S6kinase. Alguns estudos mostraram a presença de homólogos de Ras (Razani et al., 2001), Rho (Dong et al., 2000) e ERK (Sasaki et al., 2001; Tang et al., 2003) em *T. cruzi* e *T. brucei*, sugerindo que pelo menos algumas dessas vias alternativas de TGF- β possam ser funcionais nesses parasitos, embora os mecanismos envolvidos nesta ativação, assim como suas consequências biológicas, ainda não estejam elucidados (Derynck & Zhang, 2003).

O novo papel do TGF- β da célula hospedeira descrito nesses trabalhos acrescenta complexidade para a biologia do *T. cruzi*, com implicações adicionais para esta citocina na Doença de Chagas. De forma geral, o TGF- β parece: (1) ser ativado na superfície da célula hospedeira a partir de TGF- β latente, mecanismo este mediado pelo parasito, (2) induzir sinalização via receptores de TGF- β da célula hospedeira, favorecendo assim a invasão celular, (3) ser captado e estocado intracelularmente pelos parasitos, participando do processo de diferenciação de formas amastigotas para tripomastigotas, e (4) desencadear a fibrose na cardiomiopatia chagásica.

Outro estudo recente mostra que o bloqueio da via de sinalização intracelular de TGF- β nas células hospedeiras, pela ação de um inibidor do receptor de TGF- β tipo I (TbRI), SB-431542, é capaz de inibir a invasão de *T. cruzi* e induzir um retardo na proliferação de formas amastigotas e na diferenciação destas formas em tripomastigotas ao final do ciclo, mostrando mais uma vez o envolvimento de TGF- β no ciclo de vida de *T. cruzi* (Waghabi et al., 2007). A reversão da capacidade do TGF- β em desenvolver fibrose no miocárdio infectado pelo *T. cruzi* foi testada *in vivo* utilizando-se o modelo murino através do uso de SB-431542. Foi observada uma redução dos níveis de parasitemia, das taxas de mortalidade, dos infiltrados inflamatórios e carga parasitária no coração dos animais infectados tratados na fase aguda da doença (Waghabi et al., 2009).

A atividade final de TGF- β sempre parece ser dependente de eventos de sinalização celular, ativação e degradação de genes responsivos e, em todos estes aspectos, a fosforilação de proteínas ocorre como processo-chave. Daremos a seguir um breve relato sobre fosforilação de proteínas.

1.4. Modificações pós-traducionais

Após serem sintetizadas, as proteínas podem sofrer alterações, denominadas modificações pós-traducionais (“post translational modifications” - PTM). As PTMs alteram as ligações covalentes, modificando as propriedades de uma proteína, através de clivagem proteolítica. As PTMs de uma proteína podem determinar seu estado de atividade, localização, reciclagem (“turnover”) e interação com outras proteínas, além de alterarem as estruturas terciárias e quaternárias da proteína modificada (Mann & Jensen, 2003).

Muitas PTMs foram descobertas durante estudos de proteínas individuais com a ajuda de técnicas moleculares clássicas, como a deleção de aminoácidos carreadores da modificação. Para a análise dessas modificações em uma única proteína é interessante primeiro obtê-la pura, em grandes quantidades, o que normalmente é feito pelo uso dos métodos de purificação cromatográfica, precipitação com anticorpos específicos ou ambas as técnicas combinadas. A análise de modificações é, em geral, feita pela comparação da sequência de aminoácidos obtida experimentalmente para a proteína possivelmente modificada com a sequência de aminoácidos previamente conhecida da proteína intacta. Desta forma, o primeiro passo é a identificação da proteína a ser estudada, o que pode ser feito com alta sensibilidade pelo reconhecimento de anticorpos (western blot) ou por técnicas de espectrometria de massas (MS) (Mann & Jensen, 2003).

A espectrometria de massas tem continuamente aumentado a sensibilidade de detecção das PTMs. A MS mede a razão massa/carga, fornecendo o peso molecular e o padrão de fragmentação de peptídeos derivados de proteínas. Dessa forma, a MS constitui um método geral para a identificação de modificações que alteram a massa molecular de uma proteína. Por essa razão, tem sido vastamente utilizada para mapear a estrutura primária completa de proteínas individuais (Carr et al., 1989; Ling et al., 1991; Roepstorff, 1997).

O novo campo da Proteômica é também promissor na identificação de PTMs. A técnica tem sido bastante valiosa na resolução e identificação de grandes conjuntos de proteínas presentes em organelas ou em todo um organismo em estudo, a partir de um único experimento. A eletroforese bidimensional separa as populações de proteínas com base em suas cargas e massas moleculares. A

técnica oferece resolução suficiente para separar diretamente os diferentes estados modificados de cada proteína presente na amostra (Mann & Jensen, 2003).

A intensidade da coloração dos “spots” protéicos presentes nos géis bidimensionais reflete fortemente a quantidade da proteína contida no gel, especialmente para proteínas similares. Dessa forma, o método é capaz de gerar informações sobre a proporção relativa dos vários estados modificados de uma proteína. Entre algumas das principais modificações pós-traducionais temos: acetilação, metilação, glicosilação, acilação, deamidação, ubiquitinação e fosforilação (Mann & Jensen, 2003).

1.4.1. Fosforilação de Proteínas: Aspectos Gerais

Desde o isolamento da fosfoserina em 1932, descrita primeiramente como ácido fosfórico serina, a fosforilação de proteínas tornou-se uma das modificações pós-traducionais mais estudadas e biologicamente relevantes. A fosforilação é uma modificação reversível, que afeta o enovelamento e, conseqüentemente, a atividade de proteínas, regulando funções essenciais como divisão celular, transdução de sinal, atividade enzimática, entre outras (Paradela & Albar, 2008).

A presença ou ausência de grupamentos fosfato nas cadeias laterais de aminoácidos, tais como serina, treonina e tirosina, é usada para modular a atividade biológica da proteína e propagar sinais em vias e redes de sinalização celular (Cohen, 1992; Cohen, 2000). Sendo a fosforilação um processo dinâmico, os sítios de fosforilação não podem ser preditos a partir da análise da sequência genômica de um organismo, requerendo medições analíticas para a verificação experimental desses sítios de modificação. A análise de sítios de fosforilação pelo uso de espectrometria de massas já é desafiadora quando apenas uma proteína é analisada, e torna-se uma tarefa ainda mais difícil quando se propõe executar medições em escala proteômica (fosfoproteômica) (Goshe, 2006).

A fosforilação e a defosforilação nos resíduos S (serina), T (treonina) e Y (tirosina) são as modificações mais conhecidas envolvidas na ativação e inativação reversível de atividades enzimáticas e modulação de interações moleculares em vias de sinalização nos eucariotos (Pawson, 2002). Contudo, a fração de proteínas fosforiladas é geralmente muito pequena *in vivo* (<0.1%) e a reversão desta

modificação ocorre de maneira rápida. Assim, para detecção específica de peptídeos fosforilados é indispensável o uso de inibidores de fosfatases (Seo & Lee, 2004).

1.5. Fosforilação em *Trypanosoma cruzi*

Com o desenvolvimento do projeto genoma de *T. cruzi*, estima-se que aproximadamente 2% de seu genoma codifica para proteínas quinases, sugerindo um importante papel regulatório para estas proteínas no controle das funções e desenvolvimento deste parasito (Parsons et al., 2005).

Recentemente, um estudo comparativo dos quinomas de tripanossomatídeos mostrou que *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major* possuem 176, 190 e 199 genes preditos como codificantes para proteínas quinases, respectivamente (Parsons et al., 2005; Naula et al., 2005). Dessas quinases, aproximadamente 12% são exclusivas dos tripanossomatídeos (Parsons et al., 2005; Naula et al., 2005), não tendo sido ainda identificadas no genoma de outros organismos. Entre as proteínas fosfatases, *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* possuem 78, 86 e 88 genes, respectivamente. Aproximadamente 40% dos genes codificantes para fosfatases são atípicos, sem nenhum ortólogo claro identificado no genoma de outros eucariotos (Brenchley et al., 2007). As diferenças significativas identificadas entre as quinases de *T. cruzi* e da célula hospedeira sugerem que a inibição específica de enzimas do parasito pode ser alcançada, podendo representar uma nova abordagem terapêutica no controle da doença de Chagas.

Apesar da importância da fosforilação de proteínas em muitos processos celulares, poucos estudos identificaram sítios de fosforilação em proteínas dos tripanossomatídeos (Nakayasu et al., 2009). Recentemente, a análise proteômica de formas amastigotas e promastigotas de *L. donovani* permitiu a identificação de 73 fosfoproteínas com diversas funções biológicas. Contudo, os sítios específicos de fosforilação dessas proteínas ainda não foram identificados (Morales et al., 2008). Outro estudo proteômico em *L. donovani* identificou 18 sítios de fosforilação provenientes de 16 fosfopeptídeos distintos (Rosenzweig et al., 2008).

1.6. Fosfoproteômica

Em geral, a análise das modificações pós-traducionais pode ser feita por um método combinando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. No caso de fosfoproteínas, o poder único de resolução da eletroforese bidimensional permite a separação de diferentes formas modificadas de uma mesma proteína em “spots” distintos no gel (Gianazza et al., 1989). Fosforilações heterogêneas de proteínas geram uma série de “spots” com o mesmo peso molecular, mas com diferentes valores de ponto isoelétrico (pI). Estes “spots” provenientes de uma mesma proteína são visualizados como uma espécie de linha horizontal pontilhada no gel.

As análises de modificações pós-traducionais são mais difíceis do que a identificação direta de proteínas, pelas seguintes razões: (a) métodos altamente sensíveis são requeridos para detecção, devido à baixa estequiometria. Por exemplo, já que apenas 5 a 10% do substrato da proteína quinase é fosforilado, são necessários métodos para detectar a proteína modificada em níveis muito baixos (<5-10 fmol); (b) já que a ligação covalente entre a modificação pós-traducional e a cadeia lateral de aminoácidos é tipicamente instável, é muitas vezes difícil manter o peptídeo em seu estado modificado durante a preparação da amostra e subsequente ionização durante a espectrometria de massas, e (c) modificações pós-traducionais são frequentemente transientes na homeostase dinâmica da natureza (Seo & Lee, 2004).

Corantes fluorescentes foram recentemente desenvolvidos para detectar proteínas, incluindo proteínas modificadas pós-traducionalmente, com alta sensibilidade e linearidade. Um desses corantes se chama ProQ Diamond (Molecular Probes) e é usado para detecção de fosfoproteínas. O ProQ Diamond liga-se direta e especificamente a(s) molécula(s) de fosfato das fosfoproteínas em níveis tão baixos como 1 ng e é totalmente compatível com outros corantes e com a espectrometria de massas (Steinberg et al., 2003; Schulenberg et al., 2004; Agrawal, 2009).

Portanto, a combinação de eletroforese bidimensional com ProQ Diamond permite a análise quantitativa de fosfoproteínas em uma escala global, sendo este um grande avanço no campo da fosfoproteômica.

1.7. Proteoma de *T. cruzi*

Durante o processo de diferenciação das formas evolutivas de *T. cruzi* ocorrem mudanças no seu padrão de expressão protéica, como já descrito na literatura na diferenciação das promastigotas para amastigotas em espécies de *Leishmania* (Bente et al., 2003). Algumas proteínas estágio-específicas desempenham papéis importantes na infectividade e sobrevivência, podendo ser considerados como alvos racionais para o desenho de drogas. Com o intuito de entender as bases moleculares da diferenciação do parasito, trabalhos anteriores se interessaram pela identificação de proteínas específicas, expressas nas diferentes formas do parasito (Parodi-Talice et al., 2004; Paba et al., 2004).

A abordagem proteômica é uma ferramenta valiosa para o estudo de padrões globais de expressão gênica (Hancock et al., 1999; Tyers & Mann, 2003). Esta metodologia tem sido empregada no estudo dos tripanossomatídeos (Paba et al., 2004; Parodi-Talice et al., 2004; Atwood et al., 2005; Magalhaes et al., 2008; Ferella et al., 2008; Sodre et al., 2009; Ayub et al., 2009) e sua aplicação tem se mostrado particularmente importante, já que nestes organismos a regulação da expressão gênica ocorre principalmente ao nível pós-transcricional (Clayton & Shapira, 2007). Todos os genes codificantes para proteínas em tripanossomatídeos estão organizados em grandes unidades policistrônicas de transcrição que geram RNAs precursores policistrônicos, onde estes são então processados a RNAs monocistrônicos pelo mecanismo de “trans-splicing”. Supõe-se que nesses microorganismos a regulação gênica ocorra apenas através do controle da estabilidade e/ou tradução de RNAs específicos (Graham & Barry, 1995; Vanhamme & Pays, 1995).

Além disso, modificações pós-traducionais desempenham um papel importante na modulação da função de proteínas nesses parasitos. Juntas, essas considerações apóiam as análises proteômicas como uma abordagem ideal para avaliar os níveis de expressão protéica em diferentes estágios ou sob tratamentos específicos nos tripanossomatídeos. Além disso, uma abordagem proteômica para *T. cruzi* se torna ainda mais significativa dado o fato de que o projeto genoma para este parasito já foi concluído (El-Sayed et al., 2005; Degraeve et al., 2001; Luchtan et al., 2004).

Análises proteômicas em larga escala ou “high-throughput” são ainda incompletas, uma vez que as metodologias disponíveis não possuem faixa dinâmica suficiente para identificar e quantificar todas as proteínas expressas por um organismo. Nos estudos realizados até o momento, estima-se que aproximadamente 50% de todo espectro possível de proteínas pode ser mapeado dentro de 67 grupos de proteínas mais abundantes (Atwood et al., 2005). Um número maior de proteínas de baixa abundância pode ser revelado após a depleção dessas proteínas altamente abundantes, antes da realização da análise proteômica. Análises do proteoma de *T. cruzi* revelam a operação de várias vias estágio-específicas, previamente não documentadas e que podem ser alvos apropriados para o desenvolvimento de novas drogas contra a Doença de Chagas. Entre os alvos mais interessantes estão as vias propostas para geração de energia em amastigotas e epimastigotas. Adicionalmente, a identificação das proteínas expressas em abundância em formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* forneceram uma nova fonte substancial de candidatos para o desenvolvimento de vacinas (Atwood et al., 2005).

Possíveis novos candidatos poderiam surgir do mapeamento de vias de transdução de sinais essenciais para sobrevivência e desenvolvimento desses parasitos, porém ausentes em seus hospedeiros vertebrados. A fosforilação de proteínas desempenha um papel importante em diversas vias de sinalização de *T. cruzi*, e seu estudo pode constituir fonte para a detecção de novos alvos terapêuticos contra a doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Nosso trabalho possui como principal objetivo a caracterização dos padrões de fosforilação de proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* em resposta a adição de TGF- β ao meio de cultura, através de uma abordagem proteômica; e a identificação de moléculas envolvidas na via de sinalização disparada por TGF- β nesse microorganismo.

2.2. Objetivos Específicos

Para o alcance dos principais objetivos do nosso trabalho, temos como metas específicas:

- (1) Padronizar a dose ótima de indução de fosforilação nas proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* com TGF- β ;
- (2) Caracterizar o tempo ótimo de indução de fosforilação nas proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* com TGF- β ;
- (3) Analisar as diferenças entre os perfis unidimensionais dos extratos protéicos das epimastigotas incubadas ou não nos tempos de 1, 5, 15, 30 e 60 minutos com TGF- β a 4°C;
- (4) Analisar as diferenças entre os perfis bidimensionais das epimastigotas incubadas ou não nos tempos de 1, 5, 15, 30 e 60 minutos com TGF- β a 4°C;
- (5) Identificar os “spots” referentes às proteínas que em resposta a TGF- β apresentam alterações nos padrões de fosforilação e expressão;
- (6) Observar o efeito na proliferação de epimastigotas após adição de 5 ng/ml de TGF- β à cultura de *T. cruzi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo dos parasitos

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y foram mantidas em cultura axênica em meio LIT (“Liver Infusion Tryptose”) (tabelas 3.1, 3.2 e 3.3) a 28°C. Passagens consecutivas foram realizadas sempre no 7º dia de crescimento, obtendo-se ao final do processo uma concentração de $5,0 \times 10^6$ células/mL.

Tabela 3.1: Preparo da solução inorgânica (2x) do meio de cultura LIT.

NaCl	8 g/L
KCl	0,8 g/L
Na ₂ HPO ₄	16 g/L

O meio de cultura é esterilizado em autoclave.

Tabela 3.2: Preparo da solução orgânica (2x) do meio de cultura LIT.

Triptose	10 g/L
Liver Broth Infusion	10 g/L

O meio de cultura é esterilizado em autoclave.

Tabela 3.3: Preparo do meio de cultura LIT.

LIT	Para preparo de 1 litro de solução
Sol. Inorgânica 2x	445 ml
Sol. Orgânica 2x	445 ml
Glicose (0,2 g/ml)	10 ml
Hemina (450 mg/ml)	500 µl
Soro Fetal Bovino	100 ml

3.2. Preparo das Amostras, Lise e Extração das Proteínas

Para o preparo de extratos de proteínas totais, os parasitos foram coletados da cultura no quinto dia após a passagem, quando as epimastigotas encontram-se no final da fase logarítmica de crescimento. Epimastigotas na concentração de 5×10^8 parasitos/ml passaram por dois ciclos de lavagem em PBS/BSA 0,1% seguido por centrifugação a 720xg por 15 minutos, sendo finalmente ressuspensos nesta mesma solução. Os parasitos foram então transferidos para microtubos. Para os ensaios da dose ótima de TGF- β indutora de fosforilação de proteínas, foi adicionado ou não TGF- β recombinante humano (R&D) nas concentrações de 1,25 / 2,5 / 5 e 10 ng/ml durante 15 minutos a 4°C. Para avaliarmos o tempo ótimo de indução de fosforilação, os parasitos foram incubados ou não com TGF- β (5 ng/ml) nos tempos de 1, 5, 15, 30 ou 60 minutos a 4°C. Após os tempos de incubação acima determinados, os tubos foram centrifugados a 720xg por 5 minutos e lavados duas vezes com PBS. O processo de lise dos parasitos se inicia após a retirada do sobrenadante, quando então o sedimento é ressuspense em 500 μ l de tampão de lise (PBS diluído 10x/coquetel de inibidores de protease 1:100 (Sigma)/coquetel de inibidores de fosfatase 1:100 (Sigma). Em seguida, as células são completamente lisadas com quatro ciclos de congelamento/descongelamento e armazenadas a uma temperatura de -70°C.

3.3. Precipitação e Dosagem das Proteínas

As proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético a uma concentração final de 17% por 10 minutos a -20°C seguido de centrifugação por 10 minutos a uma velocidade de 16.100xg. Após centrifugação, o sedimento foi lavado com solução gelada de acetona/trietanolamina 1%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspense em tampão de focagem isoelétrica (tampão IEF - 8M Uréia/2% CHAPS) contendo inibidores de fosfatase (1:100; Sigma). A dosagem de proteínas foi realizada pelo Kit de dosagem RCDC - BioRad (modificado de Lowry et al., 1951), segundo instruções do fabricante, empregando-se BSA como padrão.

3.4. Eletroforese Unidimensional

Uma quantidade de 20 µg de amostra de extratos totais de epimastigotas de *T. cruzi* foi misturada a tampão de amostra de proteína 1x (tabela 3.4) para um volume final de 20 µl. A mistura foi em seguida aquecida a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em géis 12% SDS-PAGE (tabela 3.5) de 7 centímetros em tampão de corrida Laemmli (Laemmli, 1970) a 200 volts (tabela 3.6).

Tabela 3.4: Tampão para aplicação de amostras de proteína em gel SDS-PAGE (1X).

Tris-HCl (pH6,8)	62,5mM
SDS	2%
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de bromofenol	0,002%
Glicerol	10% (v/v)

Tabela 3.5: Géis 12% SDS-PAGE para “strips” de 7cm.

Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	1,5mL
Acrilamida 30%/ Bis Acrilamida 0,8%	2,4mL
SDS 10%	60µL
APS 10%	60µL
TEMED	6µL
H ₂ O Milli-Q	1,98mL

Tabela 3.6: Tampão de corrida Laemmli.

Tris-base	24,6 mM
Glicina	192 mM
SDS	3,48 mM

3.5. Eletroforese Bidimensional

3.5.1. Focalização Isoelétrica (IEF, 1ª dimensão)

Para a focalização isoelétrica foram utilizadas 100 µg (gel de 7 centímetros) ou 500 µg (gel de 17 centímetros) de proteínas dos extratos de epimastigotas obtidos como descrito acima, já solubilizadas na presença de agentes caotrópicos. As amostras foram descongeladas a 4°C e a cada uma delas foram adicionados: o agente redutor TBP para uma concentração final de 2 mM, 1% de anfólitos (p/v), traços de azul de bromofenol e o volume final foi ajustado para 125 µl (géis de 7 cm) ou 300 µl (géis de 17 cm) com tampão IEF. A mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por uma hora, período suficiente para interação entre amostra e reagentes. Ao término do período, as amostras foram colocadas em contato por uma hora com tiras de gel (“strips” - ReadyStrip IPG Strip - BIO-RAD) com gradiente de pH imobilizado na faixa de pH de 3 a 10 não-linear. As tiras de gel foram colocadas cuidadosamente na cuba de focagem isoelétrica (BioRad). Após uma hora, as tiras IPG são cobertas com 1 ml (7 cm) ou 2 ml (17 cm) de óleo mineral e a cuba é colocada na célula de focalização isoelétrica (Protein IEF Cell - BioRad). A reidratação ativa é realizada por 11 horas a 50 volts e após seu término, inicia-se o programa de focalização isoelétrica apropriado, conforme instruções do fabricante, descrito na tabela 3.7.

Tabela 3.7: Parâmetros para focalização isoelétrica.

Géis de 7 centímetros	Géis de 17 centímetros
Passo 1: 250V – Corrente constante – 20 minutos	Passo 1: 250V – Corrente constante – 20 minutos
Passo 2: 4000V – Corrente constante – 2 horas	Passo 2: 10000V – Corrente constante – 2,5 horas
Passo 3: 4000V – 12500V - Rampagem Rápida	Passo 3: 10000V – 80000V - Rampagem Rápida
Passo 4: 500V – Rampagem Rápida – 5 horas	Passo 4: 500V – Rampagem Rápida – 5 horas

3.5.2. Eletroforese em SDS/PAGE (2ª dimensão)

Uma etapa fundamental é aplicada às proteínas separadas por focalização isoeétrica antes da corrida de segunda dimensão. O processo denominado equilíbrio dos “strips” é responsável por: (1) manter a redução das pontes dissulfeto e (2) alquilação dos grupos sulfidrilas resultantes dos resíduos de cisteína.

Dessa forma, ao final da focalização isoeétrica as tiras de IPG são incubadas por 15min, sob leve agitação à temperatura ambiente no tampão de equilíbrio I (tabela 3.8). Em seguida, o tampão de equilíbrio I é devidamente descartado e as tiras IPG são incubadas com o tampão de equilíbrio II (tabela 3.9) por 15min à temperatura ambiente, sob leve agitação.

Tabela 3.8: Tampão de Equilíbrio I.

Uréia	6 M
SDS 10% (p/v)	2%
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	0,375 M
Glicerol 100%	20%
DTT	130 mM

Tabela 3.9: Tampão de Equilíbrio II.

Uréia	6 M
SDS 10% (p/v)	2%
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	0,375 M
Glicerol 100%	20%
Iodoacetamida	135 mM

As tiras IPG são então lavadas em tampão Laemmli e aplicadas cuidadosamente na superfície de géis 12% SDS-PAGE, onde as proteínas serão separadas, perpendicularmente à primeira dimensão, de acordo com sua massa

molecular. Para os géis de 7cm foi utilizada uma voltagem constante de 200 volts; para os géis de 17 cm utilizamos uma corrente de 20 mA durante 1h, e 40 mA até o final da corrida, conforme instruções do fabricante.

3.6. Coloração dos Géis e Obtenção das Imagens

Após os ensaios de eletroforese uni- e bi-dimensionais, os géis foram corados com corante fluorescente Pro-Q Diamond (Molecular Probes), que permite a visualização das proteínas fosforiladas. O corante permite a detecção direta no gel de grupamentos fosfatos ligados a resíduos de tirosina, serina ou treonina, sem a necessidade de anticorpos ou radioisótopos. A coloração por ProQ Diamond permite a detecção das fosfoproteínas em quantidades tão pequenas como 1 a 16 ng por banda de géis unidimensionais. Para fosfoproteínas individuais (“spots” nos géis bidimensionais), a força do sinal se correlaciona com o número de grupamentos fosfatos, sendo linear por mais de três ordens de magnitude. Na seqüência, os géis foram corados com o corante fluorescente Sypro Ruby (Molecular Probes), que se liga covalentemente a aminoácidos básicos e ao esqueleto da cadeia polipeptídica, permitindo a coloração da maioria das classes de proteínas, incluindo glicoproteínas, fosfoproteínas, lipoproteínas, proteínas ligadoras de cálcio, proteínas fibrilares e outras proteínas de difícil coloração. O corante possui taxa de quantificação linear de mais de três ordens de magnitude e um limite mínimo de detecção variando entre 0,25 a 1 ng de proteína. Como a visualização das proteínas marcadas por estes corantes só é possível através de aparelhos específicos, coramos por fim os géis com Coomassie coloidal, que nos permite visualizar as proteínas (bandas e “spots”) à olho nu, condição fundamental para a posterior retirada dos “spots” protéicos dos géis, a fim de serem identificados por espectrometria de massas. O Coomassie coloidal G-250 possui uma sensibilidade de detecção de até 10ng e melhores contrastes podem ser obtidos lavando o gel em água após a coloração. As colorações por ProQ, Sypro e Coomassie coloidal são completamente compatíveis para análise dos peptídeos por espectrometria de massas. A captura das imagens dos géis corados com ProQ Diamond e Sypro Ruby foi feita com o scanner Typhoon Trio (Amersham Biosciences). Para os géis corados com Coomassie coloidal foi utilizado o scanner GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad). Os comprimentos de onda considerados ideais de acordo com o fabricante para a excitação e emissão da

fluorescência dos corantes ProQ Diamond e Sypro Ruby (Molecular Probes), assim como as fontes de excitação e emissão utilizadas pelo scanner Typhoon Trio para a captura das imagens estão descritos abaixo (tabela 3.10).

Tabela 3.10: Comprimentos de onda ideais para emissão e excitação da fluorescência dos corantes ProQ Diamond e Sypro Ruby.

	ProQ Comprimento de onda	Sypro Comprimento de onda
Excitação Máxima	555 nm	450 nm
Fonte de Excitação (Typhoon Trio)	532 nm	488 nm
Emissão Máxima	580 nm	610 nm
Filtro de Emissão (Typhoon Trio)	560 nm	640 nm

3.7. Análise das Imagens

Para identificação inequívoca das proteínas fosforiladas, demos atenção especial ao ajuste da escala de cinza na imagem digitalizada. Para a otimização da escala de cinza, é essencial a presença de controles negativo e positivo no gel para proteínas fosforiladas. Por isso, utilizamos em nossos experimentos o marcador de peso molecular PeppermintStick (Molecular Probes), que além de padrão de peso molecular, contém duas proteínas fosforiladas (Ovoalbumina e β -caseína) e outras quatro proteínas não fosforiladas (β -galactosidase, BSA, Avidina e Lisozima). As imagens podem ser facilmente ajustadas focando no poço onde se encontram as bandas do padrão de peso molecular e ajustando a escala de cinza de modo que as proteínas fosforiladas apareçam como bandas escuras, enquanto que as proteínas não fosforiladas aparecem praticamente como uma leve sombra no gel.

Para minimizar possíveis diferenças na quantidade de proteína aplicada no gel é importante analisar em conjunto a imagem do gel corado também com Sypro Ruby, e desse modo comparar a quantidade total de proteínas aplicada com a quantidade total de fosfoproteínas. Através de uma análise ratiométrica de cada poço ou “spot” do gel é possível distinguir uma proteína minimamente fosforilada expressa em grande quantidade de uma proteína altamente fosforilada expressa em

baixa quantidade. Para esse tipo de análise, medimos a intensidade de fluorescência do sinal gerado por ProQ Diamond (P) e por Sypro Ruby (S), e calculamos a razão P/S de cada spot ou poço do gel.

As imagens bidimensionais foram analisadas utilizando-se o programa PDQuest (BioRad). A análise dos géis bidimensionais englobou as seguintes etapas: normalização das imagens; detecção e quantificação dos spots; escolha de spots referência (spots que estejam presentes em todos os géis a serem analisados); alinhamento dos géis a partir da definição dos spots de referência; pareamento automático entre os spots dos diferentes géis e a identificação dos spots diferencialmente expressos.

Em nossas análises, foi utilizado o método de normalização denominado “Total Density in Gel Image”, onde o valor de intensidade de pixel de cada “spot”, medido em partes por milhão (ppm), é dividido pelo valor de intensidade total de todos os pixels presentes na imagem. Este modelo de normalização assume que a densidade total de uma imagem (incluindo densidade do background e densidade do “spot”) será relativamente consistente de gel para gel, favorecendo a validação das análises.

Neste trabalho, foram realizadas análises provenientes de comparações de três experimentos independentes (triplicatas biológicas), entre as diferentes condições estudadas (amostras tratadas ou não com TGF- β nos tempos de 1, 5, 15, 30 ou 60 minutos), observando a expressão qualitativa (presença ou não de determinado “spot”) ou quantitativa em cada condição estudada.

3.8. Retirada e Processamento dos spots

Os “spots” protéicos de interesse foram excisados manualmente do gel, com auxílio de ponteiros de 1 ml, cujas pontas foram cortadas com tesouras devidamente limpas. Os spots de interesse foram transferidos para tubos novos previamente lavados seqüencialmente em metanol/água milli-Q/metanol.

O processamento iniciou-se pela descoloração dos spots, adicionando-se a cada tubo, contendo um spot coletado, 200 μ L de uma solução de acetonitrila (ACN) 50% (p/v)/ bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8.0. Esta etapa é feita por 16 h, com o

intuito de descorar completamente os “spots” e retirar o detergente SDS presente nos géis de SDS-PAGE. Essa lavagem é repetida por mais duas vezes com o mesmo volume e pelo tempo de 15 minutos cada, em agitação contínua. O descorante é então removido e é adicionado a cada tubo um volume de 200µL da solução de ACN 100% (solução de desidratação) por 5 minutos, sob agitação contínua. Ao final desta etapa, os pedaços de géis tornam-se opacos. Em seguida, os “spots” são colocados no evaporador a vácuo (Speed Vac) por 15 minutos, para evaporação de toda a solução de acetonitrila. Posteriormente, foi realizada a etapa de digestão trípica, adicionando-se 10 µL da solução a 20 ng/µL de tripsina (Tripsin Gold, Mass Spectrometry Grade – PROMEGA), de forma a cobrir completamente os pedaços de gel. Os tubos são mantidos no gelo durante este procedimento de digestão enzimática, garantindo que a mesma não sofra degradação. Após o período de 1 h, todo o excesso de tripsina é removido e adiciona-se 20 µL de solução de bicarbonato de amônio 50mM, disparando-se a digestão. Os tubos são incubados por 16 h, a 37°C.

Aos tubos contendo as amostras é aplicado ultrassom por 10 minutos e em seguida são agitados no vortex. Os 20 µL da solução acima são removidos para um tubo limpo de 500 µL e o material restante re-extraído com 30 µL de solução de ácido fórmico 5% (v/v) / ACN 50% (v/v). Os tubos são agitados em vortex por 20 segundos e a solução permanece no tubo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, é novamente aplicado ultrassom por 2 minutos, seguido por agitação no vortex. A solução contendo os peptídeos é removida e unida aos 20 µL de solução reservada anteriormente em tubo de 500 µL. A extração é repetida mais uma vez e todos os extratos são, ao final do processo, combinados em um mesmo tubo, com um volume final de aproximadamente 60 µL. A amostra é então concentrada no evaporador a vácuo até atingir o volume aproximado de 5-10 µL. Os peptídeos foram armazenados a -20°C para posterior dessalinização.

Para retirar os possíveis contaminantes e sais que interferem na identificação das proteínas por espectrometria de massas, além de concentrar a amostra protéica para melhorar a sua identificação, utilizamos ponteiras contendo uma resina de fase reversa (Zip Tip C18 - Millipore).

O ZipTip deve ser preparado previamente à sua utilização. Cada ponteira foi umedecida em ACN 100% e equilibrada em uma solução de 0,1% TFA (ácido

trifluoroacético). Este procedimento é feito com sucessivas aspirações, de forma a reter na resina os peptídeos e deixar no tubo os possíveis interferentes. Os peptídeos são lavados com 0,1% TFA e finalmente eluídos em um novo tubo utilizando uma solução de 0,1% TFA / ACN 50 %.

Depois de concentradas em Ziptip (Millipore), as amostras são co-cristalizadas com uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxâmico em uma placa de aço inox especialmente utilizada para a análise no espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF. Foram misturadas quantidades iguais de amostra e matriz (0,3 μ L) estando a matriz à uma concentração de 1,0 mg/ ml diluída em solução 50% ACN /0,3% TFA em água milliQ, sendo em seguida, armazenados para posterior análise por espectrometria de massas.

3.9. Identificação de proteínas por Espectrometria de Massas

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF-TOF 4700 Proteomics Analyser (Applied Biosystems) da Plataforma de Espectrometria de Massas/PDTIS (Laboratório de Toxinologia, IOC-FIOCRUZ). Inicialmente foi feita uma análise (MS) para determinar as massas dos peptídeos trípticos referentes a cada "spot". Em seguida, o equipamento faz uma nova fragmentação (MS/MS) dos peptídeos com conseqüente geração de íons que, em geral, podem ser íons y e íons b, ambos informativos e complementares entre si. Assim, para cada peptídeo inicial (cuja massa já foi determinada) são gerados vários valores de massa como produtos da fragmentação MS/MS. As diferenças entre esses valores correspondem à massa dos aminoácidos que compõem o peptídeo, permitindo a determinação de sua seqüência. Após a conclusão da determinação das massas dos diferentes peptídeos, os resultados foram capturados através do software integrado ao equipamento (4000 Explorer Remote Client), sendo retirados os picos de contaminantes. Os mesmos foram transferidos para um programa de busca, visando à identificação das possíveis proteínas, como descrito abaixo.

3.10. Identificação dos peptídeos

Os resultados obtidos pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF foram analisados no programa Mascot Online (endereço eletrônico www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS). Para identificação dos peptídeos foram utilizados os parâmetros descritos na tabela abaixo (tabela 3.11):

Tabela 3.11: Parâmetros utilizados nas buscas do Mascot.

Database: NCBIInr
Taxonomy: All entries
Enzyme: Trypsin
Allow up to: 1 missed cleavages
Fixed modifications: none
Variable modifications: Acetyl (protein N-term), Carbamidomethyl (C), Deamidated (NQ), Gln →Pyro-Glu (N-termQ), Glu →Pyro-Glu (N-termE), Oxidation (HW), Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y).
Peptide tol. : ± 1.2 Da
MS/MS tol.: ± 0.6 Da
Peptide charge: +1 Da
Monoisotopic
Instrument : Maldi TOF-TOF
Overview: Report top 50 hits

Consideramos uma identificação encontrada no Mascot como positiva após verificarmos os dados obtidos para alguns dos parâmetros do programa. Foram eles: o valor do “score” obtido para a identificação (valores superiores a 42 foram considerados), se a proteína encontrada era proveniente de um microorganismo da mesma espécie em estudo ou, pelo menos, da família dos tripanossomatídeos, se havia equivalência entre os pontos isoelétricos e massas moleculares teóricas e experimentais e a porcentagem de cobertura das proteínas.

3.11. Proliferação de epimastigotas em resposta a adição de TGF- β

Um total de $2,5 \times 10^6$ parasitos foi obtido a partir de uma cultura inicial de epimastigotas na concentração de 5×10^6 parasitos/mL. Esta massa foi ressuspensa em 500 μ l de meio LIT e a solução final distribuída em placas de 24 poços mantidas a 28°C. Para testar o efeito de TGF- β sobre a proliferação das epimastigotas de *T. cruzi*, 5 ng/mL de TGF- β foram ou não adicionados diariamente às culturas de epimastigotas. A cada 24 horas (24, 48 e 72 horas) os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer com diluição de 1:100 em PBS. As amostras (incubada ou não com TGF- β) foram preparadas em duplicata nos poços da placa. Apresentamos nos resultados o gráfico obtido da média e desvio padrão de três experimentos independentes realizados.

4. RESULTADOS

4.1. Curva de crescimento das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y foram mantidos em cultura axênica em meio LIT a 28°C durante seis dias consecutivos após o inoculo, e estimados diariamente por contagem em câmara de Neubauer (Figura 4.1).

A curva nos mostra que os parasitos apresentam crescimento exponencial ao longo dos dias, onde entre o quinto e o sexto dias de cultura este aumento é bastante reduzido. Assumimos o quinto dia de cultura (120 horas) como o final da fase logarítmica de crescimento. Logo, utilizamos para nossos experimentos os parasitos coletados neste dia, pois além de apresentarem-se em grande quantidade no meio, asseguramos que a maioria das células ainda estão viáveis.

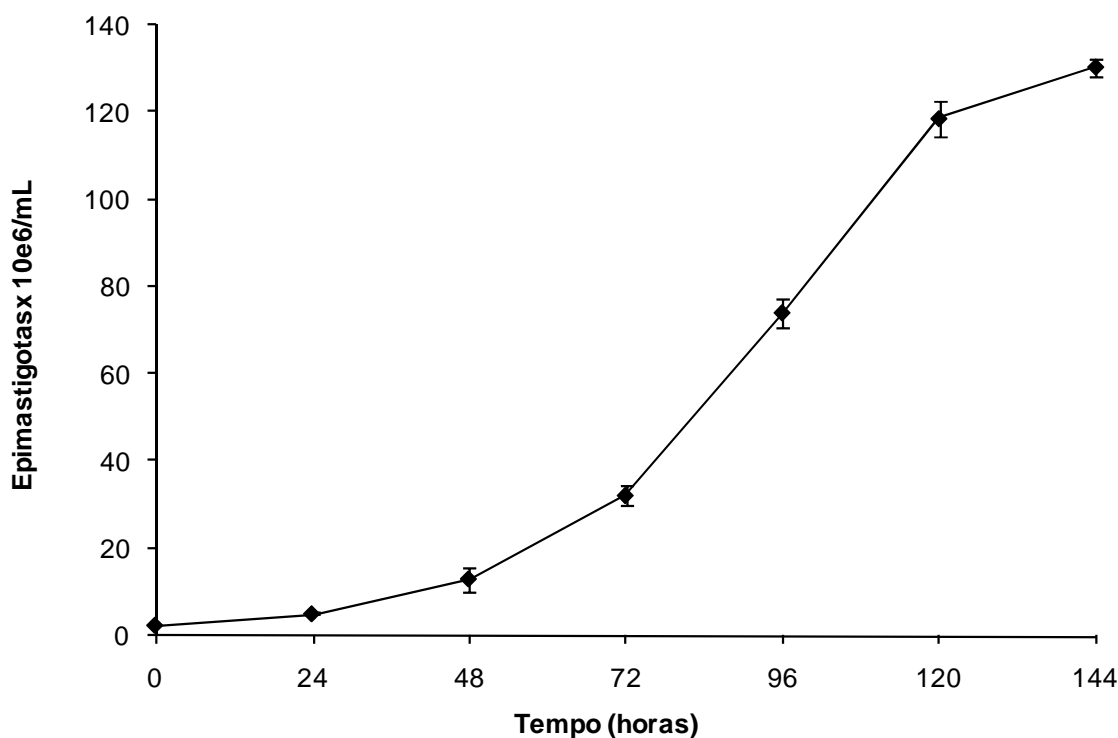


Figura 4.1: Curva de crescimento de epimastigotas cultivadas por seis dias consecutivos em meio LIT. Os parasitos foram quantificados após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas a partir do momento da passagem. Os valores apresentados representam a média e o desvio padrão obtidos de três experimentos independentes (N=3).

4.2. Padronização da dose ótima de TGF- β

Com o intuito de avaliar qual seria a dose ótima de TGF- β capaz de induzir a maior fosforilação de proteínas em formas epimastigotas de *T. cruzi*, iniciamos nossos estudos com um ensaio utilizando diferentes doses desta citocina. Para tal, massas de 5×10^8 epimastigotas foram incubadas por 15 minutos com doses de 1,25 / 2,5 / 5 ou 10 ng/ml de TGF- β , e em seguida, foram preparados os extratos de proteínas totais das epimastigotas. Para avaliarmos qual seria a dose ótima de indução de fosforilação de proteínas em resposta a TGF- β , delimitamos o volume de cada canal (“lane”) do gel, utilizando ferramentas do programa Quantity One (BioRad), tanto na imagem do gel corado com ProQ, como na imagem do gel corado com Sypro. Calculamos então a razão (P/S) entre o valor da intensidade de pixels totais do poço corado com ProQ (P) e o valor da intensidade de pixels totais do poço corado com Sypro (S), com a intenção de normalizar os valores obtidos.

Os resultados obtidos (Figura 4.2) nos permitiram inferir que a dose ótima de incubação com TGF- β , ou seja, aquela capaz de induzir o maior número de eventos de fosforilação de proteínas nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi a de 5 ng/ml.

Sendo assim, adotamos 5 ng/ml como a dose ótima de indução de fosforilação em todos os nossos experimentos.

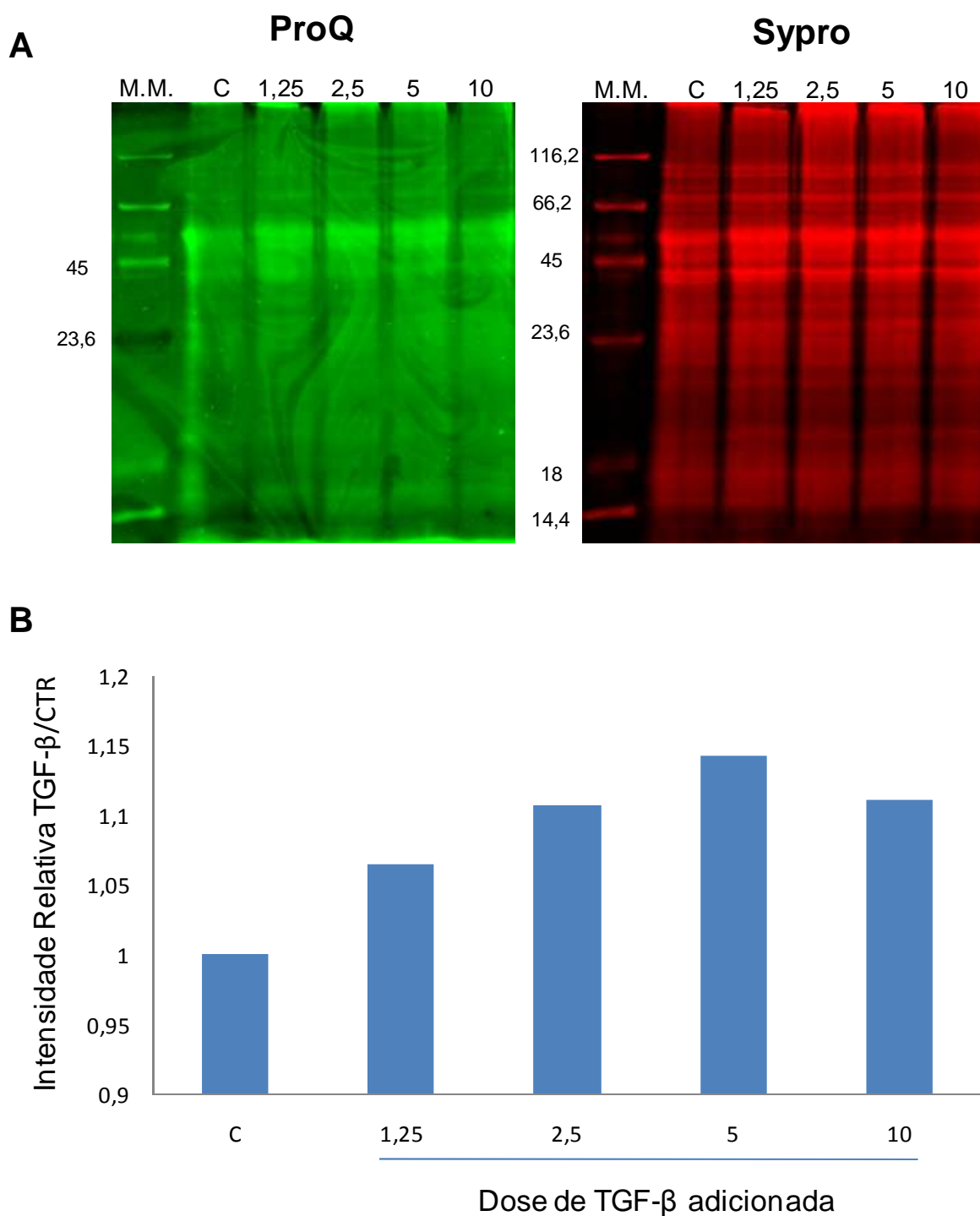


Figura 4.2: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7cm corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagens do gel unidimensional contendo extratos de proteínas totais de epimastigotas, que foram previamente incubados com as doses de 0 (controle), 1,25, 2,5 5 e 10 ng/ml de TGF- β . Marcadores de massa molecular (MM) indicados na figura, em kDa. **B.** Gráfico representativo dos valores de intensidade relativa de pixels da razão ProQ/Sypro de um único experimento (N=1).

4.3. Padronização do tempo ótimo de incubação com TGF- β

A partir da avaliação da dose ótima de TGF- β , realizamos um ensaio para avaliar qual seria o tempo ideal de indução com esta citocina, ou seja, o tempo de incubação com TGF- β capaz de induzir o maior número de eventos de fosforilação de proteínas de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para tal, incubamos ou não massas de 5×10^8 epimastigotas por 1, 5, 15, 30 ou 60 minutos com 5 ng/ml da citocina em estudo, a 4°C. O procedimento é feito em baixa temperatura com o objetivo de retardar os eventos iniciais de fosforilação, que costumam ocorrer muito rapidamente na situação fisiológica natural (*in vivo*). Contudo, incubamos ou não massas de 5×10^8 epimastigotas por 1 ou 5 minutos com 5 ng/ml de TGF- β também a 28°C, temperatura normal de cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Verificamos que o perfil unidimensional das amostras mantidas a 28°C é bastante semelhante àqueles das amostras incubadas a 4°C (dados não mostrados).

O mesmo procedimento de normalização utilizado para a análise da dose ótima foi aplicado na verificação do tempo ótimo de incubação com TGF- β . Nossas análises, utilizando géis unidimensionais (Figura 4.3), indicaram que não há diferenças significativas entre as amostras estimuladas e não estimuladas (controle) de cada tempo estudado. As diferenças entre as amostras estimuladas com TGF- β nos diferentes tempos estudados também parecem ser muito sutis, através da análise unidimensional. Assim, optamos por concentrar nossos esforços na análise do tempo ótimo de indução com TGF- β exclusivamente através de géis bidimensionais, que permitem uma maior resolução das amostras em estudo, além da visualização de diferenças pontuais encontradas em cada proteína estudada ao longo do tempo.

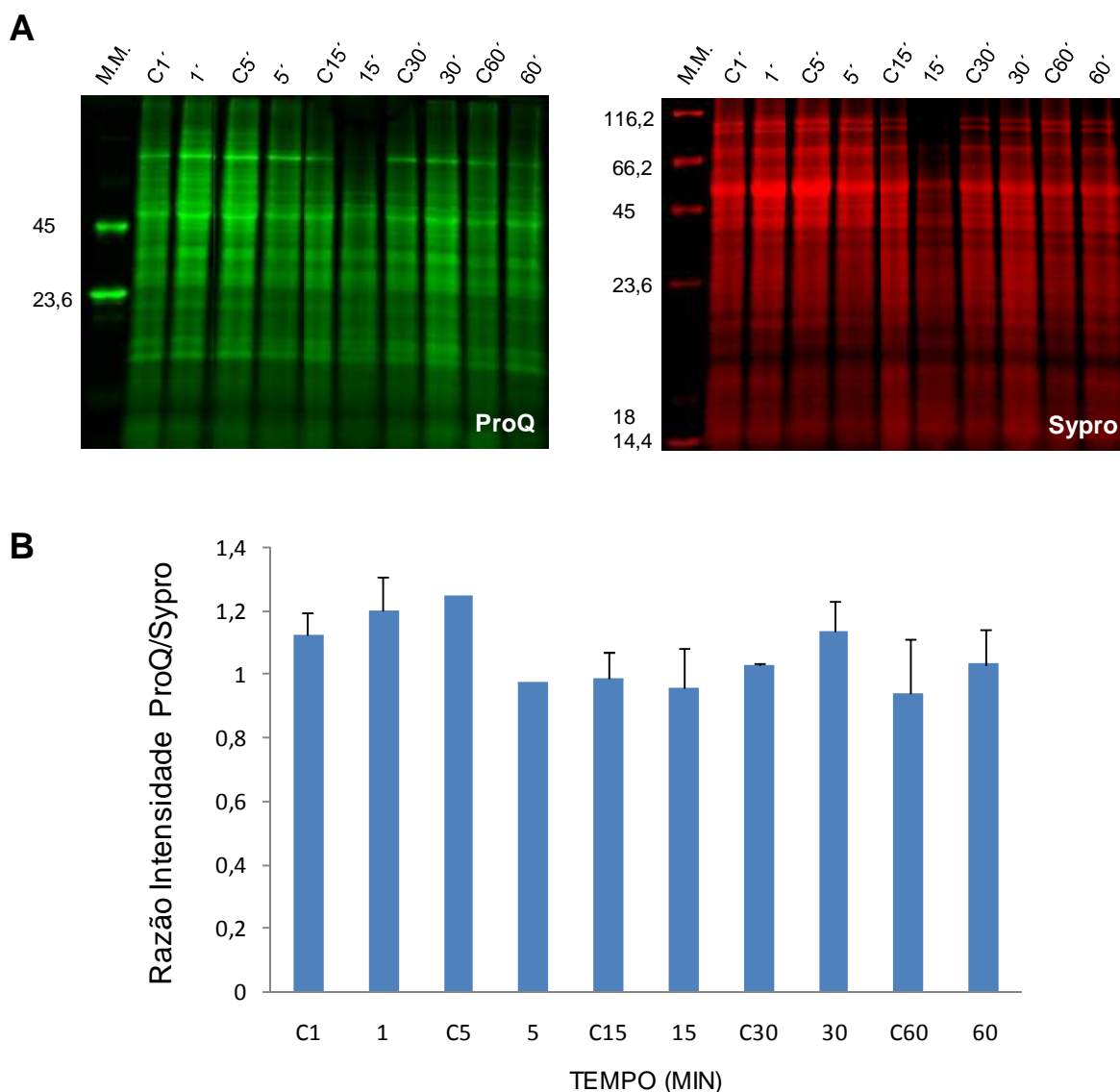


Figura 4.3: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7cm corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagens do gel unidimensional contendo extratos de proteínas totais de epimastigotas, que foram previamente incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml nos tempos de 1, 5, 15, 30 e 60 minutos. Marcadores de massa molecular (MM) indicados na figura, em kDa. **B.** Gráfico representativo dos valores da razão de intensidade de pixels de amostras tratadas com TGF- β /Controle não tratado para cada tempo estudado. N=2.

4.4. Perfis bidimensionais de fosforilação e expressão de proteínas de formas epimastigotas de *T. cruzi* em resposta a TGF- β

Amostras de epimastigotas foram incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml nos tempos de 1, 5, 15, 30 ou 60 minutos a 4°C, e o extrato protéico preparado como já descrito acima. As proteínas foram resolvidas em géis bidimensionais (2DE) de 7cm (faixa de pH 3-10 NL) e coradas com ProQ e Sypro (Figura 4.4). Ao avaliarmos as imagens dos géis bidimensionais corados com ProQ podemos perceber que, em todos os tempos estudados, há uma menor variação no número de “spots” protéicos

fosforilados nas porções mais ácidas (região de pH 3 a 5) e mais alcalinas (região de pH 10) dos géis.

Na região de pH 5 a 8 há uma maior variação no perfil de fosforilação entre os tempos estudados. Ao comparar as imagens, vemos que de 1 a 15 minutos há uma concentração mais forte de “spots” no centro dos géis tratados com TGF- β , contra uma fosforilação mais fraca nesta mesma região nos géis da amostra controle. Nos tempos de 30 e 60 minutos parece haver defosforilação parcial de alguns “spots” nesta região central em relação aos tempos mais curtos de incubação. Nestes tempos mais longos de indução observamos uma fosforilação menos acentuada das proteínas de ambas as amostras (tratadas ou não com TGF- β) e vemos também que os perfis dessas amostras parecem se igualar.

Os perfis de expressão das proteínas nas diferentes condições estudadas foram evidenciados através da coloração das proteínas totais por Sypro. Observamos que, em todos os tempos estudados, os “spots” protéicos encontram-se dispersos nos géis, sendo encontrados praticamente em todas as faixas de pH estudadas, principalmente na região de pH 4 a 10. Contudo, a maior concentração de proteínas encontra-se na faixa de pH 4 a 7.

Assim como nas análises unidimensionais, também preparamos géis bidimensionais com extratos de epimastigotas incubados ou não com TGF- β a 5 ng/ml por 1 minuto a 28°C. Verificamos que o perfil bidimensional das amostras incubadas ou não com TGF- β por 1min a 28°C se apresenta com um perfil intermediário aos perfis das amostras incubadas ou não com TGF- β por 5 e 15 minutos a 4°C (dados não mostrados). É importante ressaltar que nossos resultados são baseados na análise de triplicatas biológicas de cada uma das amostras estudadas. Consideramos apenas como dados dignos de avaliação em nosso trabalho àqueles que foram reprodutíveis em todas as replicatas ou em pelo menos duas das replicatas biológicas obtidas para cada amostra.

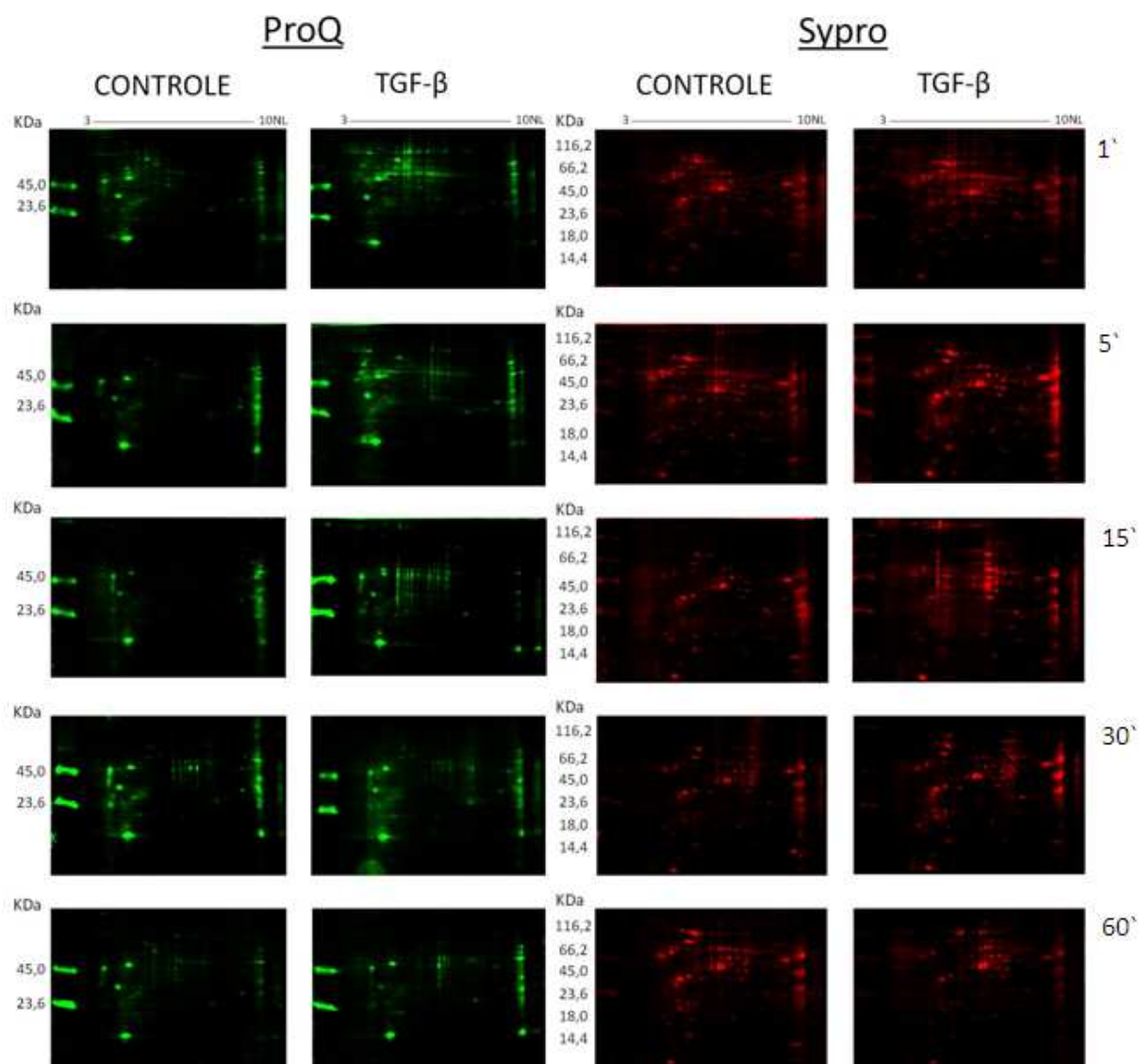


Figura 4.4: Géis SDS-PAGE12% de 7cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas biológicas dos géis bidimensionais dos extratos de proteínas totais de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5ng/ml nos tempos de 1, 5, 15, 30 e 60 minutos. Marcadores de massa molecular indicados na figura, em kDa. N=3.

4.5. Análises dos perfis bidimensionais diferenciais de formas epimastigotas de *T. cruzi* em resposta ao TGF- β

4.5.1. Quantidade total de “spots” protéicos em cada condição estudada

As imagens dos géis bidimensionais (Fig. 4.4) foram analisadas através do programa PDQuest (BioRad). A quantidade total de “spots” presente em cada condição foi obtida através de uma das ferramentas do programa, denominada “Experiment Summary”. Recolhemos os valores obtidos das replicatas de cada condição estudada e calculamos a média e o desvio padrão destes valores, representados graficamente na figura 4.5.

Em todos os tempos estudados observamos um maior número de eventos de fosforilação nas amostras tratadas com TGF- β quando comparadas a seus respectivos controles. Podemos também observar que no tempo de 1 minuto ocorrem mais eventos de fosforilação do que nos outros tempos estudados. Os tempos de 30 e 60 minutos apresentam quantidades semelhantes de eventos de fosforilação, sendo estas inferiores as dos tempos menores de incubação nas amostras tratadas com TGF- β . Após 30 minutos observamos uma tendência do número de “spots” fosforilados em se igualar entre as amostras controle e tratadas com TGF- β .

Com base nestes dados, calculamos a média do percentual de aumento de fosforilação pela adição de TGF- β na cultura nos diferentes tempos. Observamos que nos tempos de 5 e 15 minutos ocorrem os maiores aumentos no índice de fosforilação quando os parasitos são tratados com TGF- β (58% e 41%, respectivamente), seguido do tempo de 1 minuto (13%) e dos tempos de 30 e 60 minutos (9% e 5%, respectivamente).

Por termos observado diferenças nos perfis de fosforilação entre os tempos estudados, resolvemos não mais selecionar um único tempo para análise, e sim realizar um estudo de cinética de tempo.

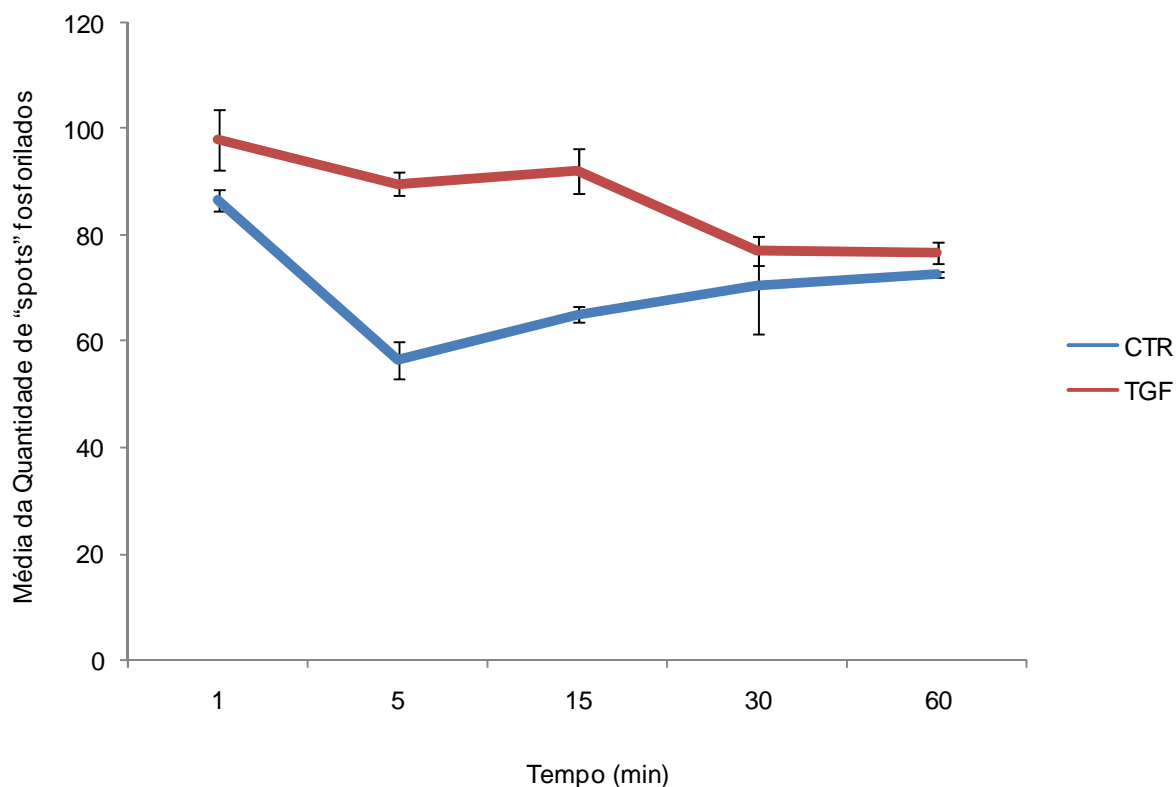


Figura 4.5: Gráfico dos valores das médias e desvios da quantidade de “spots” fosforilados das amostras tratadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml nos tempos de 1, 5, 15, 30 e 60 minutos. Quantidade de “spots” determinada após análise das imagens dos géis no programa PDQuest (BioRad). N=3.

4.5.2. Identificação dos “spots” presentes nos mapas proteômicos de extratos de epimastigotas de *T. cruzi* que respondem a TGF- β

Para a identificação dos “spots” por espectrometria de massas preparamos géis de 17 centímetros, possibilitando a resolução de quantidades maiores (500 μ g) de proteínas totais. Pela análise prévia das imagens obtidas em cada um dos tempos estudados, escolhemos o tempo de 1 minuto como melhor indutor de fosforilação de proteínas em resposta a TGF- β . Logo, preparamos géis bidimensionais de 17 centímetros com extratos totais de epimastigotas de *T. cruzi*, que foram previamente incubados ou não com 5 ng/ml de TGF- β por 1 minuto a 4°C (N=2).

O mapa protéico obtido (Figura 4.6) apresentou boa resolução. Os “spots” de interesse, ou seja, aqueles que apresentaram diferenças significativas na sua fosforilação e/ou expressão em resposta a TGF- β , foram retirados. As proteínas identificadas por espectrometria de massas foram analisadas no Mascot, como descrito em “Materiais e Métodos”. As identificações encontram-se na tabela 4.1.

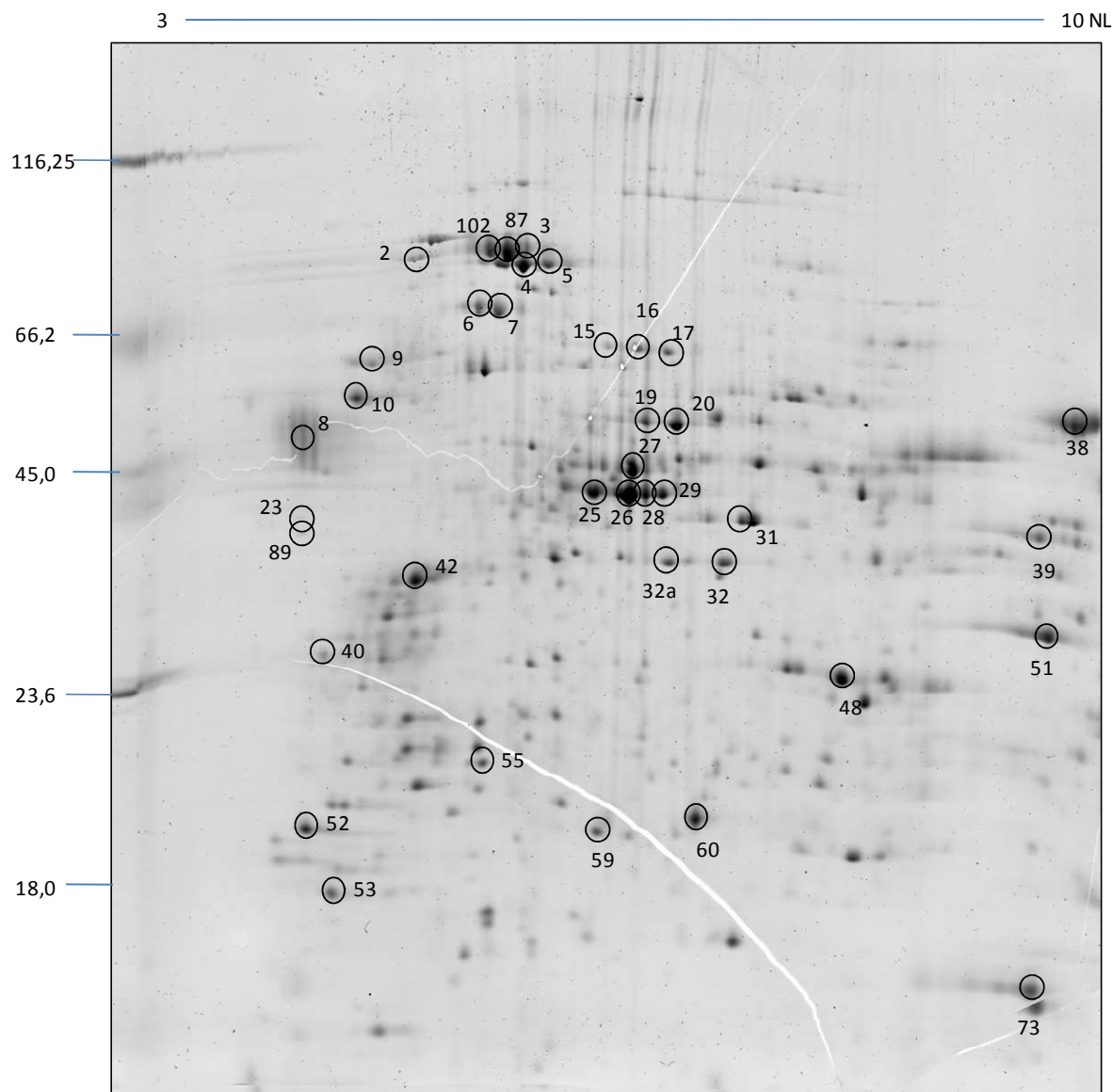


Figura 4.6: Gel SDS-PAGE 12% de 17cm com faixa de pH de 3-10 não linear corado por Coomassie coloidal. Gel bidimensional do extrato proteínas totais de epimastigotas incubada com TGF- β no tempo de 1 minuto. O mapa protéico representado acima apresenta circulado os "spots" identificados em nosso trabalho, cujos valores de fosforilação e/ou expressão variam significativamente nos diferentes tempos estudados. Marcadores de massa molecular indicados na figura, em kDa. N=2.

Tabela 4.1: Identificação das proteínas moduladas por TGF- β .

Proteínas de choque térmico																
Identificação	Número	nº Acesso	gene (T.cruzi CL Brenner)	pl teor	pl exp	MW teor	MW exp	Score	Cob (%)	Peptídeos Identificados						
HSP70, precursor mitocondrial	4	gij71407515	Tc00.1047053507029.30	5,75	5,4	70,9	80,5	198	7%	R.VLENTEGFR.T (Ions score 29) K.ETAENFLGR.K (Ions score 30) K.DAGTIAGLVIR.V (Ions score 54) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (Ions score 99)						
	5			5,75	5,6	70,9	81	154	8%	R.VLENTEGFR.T (Ions score 20) K.DAGTIAGLVIR.V (Ions score 38) K.EISEVVLVGGMTR.M Oxidation (M) (Ions score 23) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (Ions score 85)						
HSP70	3	gij123603	Tc00.1047053511211.170	5,44	5,4	73,7	83,2	123	8%	K.GDDKPVIVQFR.G Deamidated (NQ) (Ions score 23) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q Deamidated (NQ) (Ions score 28) K.ATNGDTHLGGEDFDNR.L Deamidated (NQ) (Ions score 41) R.AVHDVVLVGGSTR.I (Ions score 40) R.VEIIANDQGNR.T (Ions score 31) R.TTPSYVAFTDTER.L (Ions score 68)						
	87									6,19	5,3	40,8	83,6	450	24%	K.GDDKPVIVQFR.G (Ions score 62) K.KAVVTVPAYFNDSQR.Q (Ions score 34) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q (Ions score 83) K.ATNGDTHLGGEDFDNR.L Deamidated (NQ) (Ions score 101) R.FEELCGDLFR.G Carbamidomethyl (C) (Ions score 22)
	102									6,19	5,2	40,8	84	446	24%	R.AVHDVVLVGGSTR.I (Ions score 67) R.VEIIANDQGNR.T (Ions score 47) R.TTPSYVAFTDTER.L (Ions score 76) K.GDDKPVIVQFR.G (Ions score 79) K.KAVVTVPAYFNDSQR.Q (Ions score 40) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q (Ions score 49) K.ATNGDTHLGGEDFDNR.L Deamidated (NQ) (Ions score 104) R.FEELCGDLFR.G Carbamidomethyl (C) (Ions score 36) R.AVHDVVLVGGSTR.I (Ions score 33)

Proteínas de choque térmico (Cont.)										
Identificação	Número	nº Acesso	gene (T.cruzi CL Brenner)	pl teor	pl exp	MW teor	MW exp	Score	Cob (%)	Peptídeos Identificados
HSP60	6	gij71665064 gij71665068	Tc00.1047053507641.280	5,73	5	59,3	74,6	258	13%	R.AVGVILQSVAEQSR.K (Ions score 37) R.GLIDGETSDYNR.E (Ions score 34) R.AAVQEGIVPGGGVALLR.A (Ions score 79) K.ALDSLLGDSSLTADQR.T (Ions score 41) K.VLENNDVTVGYDAQR.D (Ions score 85) R.NVIIEQSYGAPK.I (Ions score 47) R.AVGVILQSVAEQSR.K (Ions score 64) R.GYISPYFVTDAAK.A (Ions score 21)
	7			5,73	5,1	59,3	74,5	345	17%	R.GLIDGETSDYNR.E (Ions score 49) R.AAVQEGIVPGGGVALLR.A (Ions score 27) K.ALDSLLGDSSLTADQR.T (Ions score 63) K.VLENNDVTVGYDAQR.D (Ions score 99)
DNAK	2	gij71649573 gij71408185	Tc00.1047053511257.10 Tc00.1047053509543.50	4,88	4,7	30,1	83,5	87	10%	K.SQTFSTNADNQR.N Deamidated (NQ) (Ions score 60) R.ATLSEPDVEAGITLED.R.Q (Ions score 32) R.VLSGVELEAVNR.V (Ions score 60)
HSC70	10	gij71663660 gij71420437	Tc00.1047053508409.210 Tc00.1047053510143.24	4,91	4,2	41,5	58,8	159	10%	K.AIELMGQALR.I Oxidation (M) (Ions score 28) K.AMYWAQR.A Oxidation (M) (Ions score 23) R.ALDLNPENVR.A (Ions score 52)
GRPE	59	gij71401098	Tc00.1047053509045.20	8,49	6,2	24,3	19,8	89	11%	R.SYGISSFGK.D (Ions score 34) K.TPASSEFPSTGHISIVLK.V (Ions score 55) M.SYKPHHATVPTNPK.V Acetyl (Protein N-term) (Ions score 44)
Ciclofilina A (Peptidil-prolil cis-trans- isomerase)	73	gij71659715	Tc00.1047053506925.300	8,44	8,9	18,7	14	209	27%	K.VFFDVSIGGQSAGR.V (Ions score 70) K.NFGYAGSGFHR.I (Ions score 94) K.FADESFAGK.A (Ions score 10)
Proteínas de citoesqueleto										
beta-tubulina	9	gij18568139		4,74	4,4	49,6	66,4	60	4%	R.INVYFDEATGGR.Y (Ions score 44) R.YLTASALFR.G (Ions score 21) R.INVYFDEATGGR.Y (Ions score 80)
	42	gij1220547	Tc00.1047053506563.40	4,69	4,7	49,4	38,5	266	10%	R.AVLIDLEPGTMSVR.A Oxidation (M) (Ions score 62) R.FPQLNSDLR.K (Ions score 66) K.LAVNLVPPFR.L (Ions score 61)

Identificação	Número	nº Acesso	gene (T.cruzi CL Brenner)	pl teor	pl exp	MW teor	MW exp	Score	Cob (%)	Peptídeos Identificados
Proteínas envolvidas em processos metabólicos										
	15			6,03	6	42,2	67,8	81	3%	K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 81)
				5,83		42,2		81	3%	K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 81)
										M.ATFPELLRPLK.L Acetyl (Protein N-term) (Ions score 34)
										R.IPAYFAASGEK.E (Ions score 55)
				6,03	6,2	42,2	67,5	358	18%	K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 109)
										R.QSGPYAGTTIDTR.C Gln->pyro-Glu (N-term Q) (Ions score 24)
										R.YDFEADQQIR.E (Ions score 83)
	16									K.FIANPDLVER.A (Ions score 61)
										M.ATFPELLRPLK.L Acetyl (Protein N-term) (Ions score 34)
										R.IPAYFAASGEK.E (Ions score 55)
				6,03		42,2		357	18%	K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 109)
										R.QSGPYAGTTIDTR.C Gln->pyro-Glu (N-term Q) (Ions score 24)
										R.YDFEADQQIR.E (Ions score 83)
										K.FIANPDLVER.A (Ions score 61)
										M.ATFPELLRPLK.L Acetyl (Protein N-term) (Ions score 25)
										R.IPAYFAASGEK.E (Ions score 54)
Prostaglandina F2a sintase / desidrogenase (Old Yellow Enzyme)	25	gij945108 gij25006239 gij71659766 gij61741938	Tc00.1047053508461.80	6,03	6,1	42,2	48,6	285	18%	K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 60)
										R.QSGPYAGTTIDTR.C (Ions score 29)
										R.YDFEADQQIR.E (Ions score 67)
										K.FIANPDLVER.A (Ions score 58)
										M.ATFPELLRPLK.L Acetyl (Protein N-term) (Ions score 35)
										R.IPAYFAASGEK.E (Ions score 63)
										K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 115)
	26			6,03	6,3	42,2	48,6	415	18%	R.QSGPYAGTTIDTR.C Gln->pyro-Glu (N-term Q) (Ions score 63)
										R.QSGPYAGTTIDTR.C Deamidated (NQ) (Ions score 82)
										R.YDFEADQQIR.E (Ions score 77)
										K.FIANPDLVER.A (Ions score 52)
										K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 83)
	28			5,83	6,4	42,2	48,6	203	9%	R.YDFEADQQIR.E (Ions score 69)
										K.FIANPDLVER.A (Ions score 56)
										K.ETYGVPEELTDDEVR.D (Ions score 95)
	29			6,03	6,5	42,2	49,5	262	12%	R.QSGPYAGTTIDTR.C Deamidated (NQ) (Ions score 29)
										R.YDFEADQQIR.E (Ions score 96)
										K.FIANPDLVER.A (Ions score 50)

Identificação	Número	nº Acesso	gene (T.cruzi CL Brenner)	pl teor	pl exp	MW teor	MW exp	Score	Cob (%)	Peptídeos Identificados
Proteínas envolvidas em processos metabólicos (Cont.)										
Aldo-ceto redutase	48	gij14279174 gij189396135	Tc00.1047053511287.49	7,18	7,9	32,4	31,1	177	13%	R.WAIEAGYR.H (Ions score 41) R.HIDTAYFYNNK.G (Ions score 77) K.NHVLGEIAK.K (Ions score 24) R.QIDELNEDKR.F Gln->pyro-Glu (N-term Q) (Ions score 42) R.QIDELNEDKR.F (Ions score 35) R.MGAEVYHSLK.S Oxidation (M) (Ions score 23)
	19			5,59		37,6		118	9%	K.QYNLTFK.S (Ions score 25) K.AQVVGDDLTVTNVSR.I (Ions score 77)
Enolase	20	gij71665461 gij5566209	Tc00.1047053504105.140	5,92	6,6	46,4	58	173	13%	R.SAVPSGASTGIHEACELR.D Carbamidomethyl (C) (Ions score 24) K.AGSFNEALR.M (Ions score 37) K.AQVVGDDLTVTNVSR.I Deamidated (NQ) (Ions score 84) K.INQIGTITEAIEASK.F (Ions score 40)
	20a			5,59	6,9	37,6	58,6	34	4%	K.AQVVGDDLTVTNVSR.I (Ions score 36)
GAPDH	39	gij120679	Tc00.1047053506943.50	8,87	9,5	39	45,1	79	4%	R.VPTPDVSVVDLFTTAAR.D (Ions score 79)
Malato desidrogenase	51	gij2961256 gij71423452	Tc00.1047053511293.69	8,96	9,6	34,1	37,4	42	3%	R.RLPIGPITTVK.E (Ions score 42)
				8,82		34		42	3%	R.RLPIGPITTVK.E (Ions score 42)
Proteína dissulfeto isomerase	31	gij71410849	Tc00.1047053509505.10	7,79	7,1	29,5	46,3	51	5%	K.AAADLTGVEAVQYPR.I (Ions score 53)
				7,79		29,5		76	5%	K.AAADLTGVEAVQYPR.I (Ions score 78)
Desidrogenase aromática L-alfa hidroxil-ácida	32	gij7109725		6,82	7	33,7	41,5	67	9%	K.NAAIFSEHGR.L (Ions score 57) R.EAIKDDAYLDGEFMTTVQQR.G Oxidation (M) (Ions score 15) R.EAVATWWR.N (Ions score 18)
Tirosina aminotransferase	27	gij71659493	Tc00.1047053510187.30	5,82	6,3	46,1	51	122	10%	R.KHVEDIVR.L (Ions score 18) K.GKDPNATFTSVADFETTVP.V (Ions score 56) K.NLVVPGWR.L (Ions score 37)

Identificação	Número	nº Acesso	gene (T.cruzi CL Brenner)	pl teor	pl exp	MW teor	MW exp	Score	Cob (%)	Peptídeos Identificados
Proteínas hipotéticas										
Proteína hipotética	17	gij71661816	Tc00.1047053511903.40	6,17	6,4	54,7	67,6	99	10%	R.LILNYDVDPAR.I (Ions score 37) R.IGFLGLGTESSTDNSAGSIIVR.G (Ions score 21) R.ADKDFSSLLSR.K (Ions score 24) K.EFVVAHIGSR.N (Ions score 22)
Proteína hipotética	23	gij71405542	Tc00.1047053507569.10	4,86	3,9	93	43,6	54	2%	K.SYPLNTPSQR.L (Ions score 23) R.YEYGLEAR.Y (Ions score 37)
	89	gij71409780	Tc00.1047053504423.30	4,85	3,9	93,6	40,5	69	1%	R.LEYEEVLR.M (Ions score 45) R.YEYGLEAR.Y (Ions score 26)
Proteínas associadas ao processo de tradução										
Complexo associado a peptídeo nascente	40	gij71419111	Tc00.1047053510579.70 Tc00.1047053510241.60	4,66	4,1	19,5	30,6	167	17%	R.AVSGVVPETESR.V (Ions score 55) R.VEEVPTTAETPETVPVPAEK.T (Ions score 113) K.VSIVATDIFTGNK.M (Ions score 96)
Fator de iniciação eucariótico 5a	53	gij71659667	Tc00.1047053506925.120	4,82	4,2	18	15,7	394	35%	K.MEDQAPTTHNVDPFVK.T Deamidated (NQ); Oxidation (M) (Ions score 75) K.TSTYSVLDIQEDR.T (Ions score 131) R.DNLDMPNAELAAQIK.E Oxidation (M) (Ions score 94)
Fator de elongação 1 alfa	32a	gij704459		7,55	6,6	43,5	41,9	105	4%	K.SVNFAQER.Y Deamidated (NQ) (Ions score 36) K.IGGIGTVPVGR.V (Ions score 73) R.FIPISGWQGDNMIDK.S Oxidation (M) (Ions score 26)
Fator de elongação 1 alfa	38	gij1929445 gij52424046 gij704459	Tc00.1047053510119.20	7,55	9,6	43,5	61	123	18%	K.IGGIGTVPVGR.V (Ions score 19) R.VETGTMKPGDVVTFAPANVTTEVK.S Oxidation (M) (Ions score 23) K.SIEMHHEQLAEATPGDNVGFNVK.N Oxidation (M) (Ions score 65)
Proteases/peptídates										
Cruzipaína	8	gij1136308	Tc00.1047053509429.320	5,63	3,9	49,6	53,3	106	2%	K.NSWTTQWGEDGYIR.I (Ions score 108) K.NSWTTQWGEDGYIR.I Oxidation (HW) (Ions score 71) K.NSWTTQWGEDGYIR.I Deamidated (NQ); 2 Oxidation (HW) (Ions score 38)
Sub-unidade proteolítica do complexo Hslvu	55	gij71416273	Tc00.1047053506275.20	6,77	5,2	22,8	22,8	157	15%	R.KGDTVVLIGDR.Q (Ions score 56) R.LEASLIVCGR.E Carbamidomethyl (C) (Ions score 25) R.ALIDVDGYDAEK.I (Ions score 77)

Identificação	Número	nº Acesso	gene (T.cruzi CL Brenner)	pl teor	pl exp	MW teor	MW exp	Score	Cob (%)	Peptídeos Identificados
Proteínas envolvidas na regulação do estresse oxidativo										
Tryparedoxina peroxidase	60	gij17224953 gij71396508 gij58176947	Tc00.1047053507259.10 Tc00.1047053487507.10	5,71		22,7		209	19%	R.GGLGQMNIPIADK.T Oxidation (M) (Ions score 52) K.SYGVLKEEDGVAYR.G (Ions score 81) K.EEDGVAYR.G (Ions score 18) R.QITVNDLPVGR.D Gln->pyro-Glu (N-term Q) (Ions score 52) R.QITVNDLPVGR.D (Ions score 64)
Proteínas envolvidas na transdução de sinal										
Fator de liberação de histamina dependente de IgE	52	gij71407834	Tc00.1047053506207.50 Tc00.1047053510065.30	4,52	4.0	19,5	18,7	184	25%	K.GSYIEVGGEDYGIAANVDEDAGEGAK.G (Ions score 121) R.VVDVVHNNR.Y (Ions score 45) K.NSYMAHIR.G Oxidation (M) (Ions score 20)

4.5.3. Proteínas moduladas após a adição de TGF- β

A partir de nossas análises foi possível observar que a adição de TGF- β às culturas de epimastigotas de *T. cruzi* induziu tanto a fosforilação de determinadas proteínas, principalmente nos primeiros minutos após a introdução da citocina, quanto o aumento ou redução na expressão relativa de proteínas do extrato total de *T. cruzi*. Para esses “spots” que sofreram algum tipo de modulação (seja no perfil de fosforilação seja no perfil de expressão) obtivemos, através do programa PDQuest (BioRad), os seus valores de intensidade de pixel quando corados com ProQ e com Sypro, respectivamente. Dessa forma, para cada “spot” obtivemos dois valores de média de intensidade: um referente ao seu nível de fosforilação (ProQ) e outro referente ao seu nível de expressão (Sypro).

Tanto para as análises de fosforilação (ProQ), como para as de expressão (Sypro) calculamos a razão (C/I) entre o valor da amostra controle (C) e da amostra estimulada com TGF- β (I) e vice-versa (razão I/C) para cada “spot” de interesse. Consideramos como expressão ou fosforilação significativas quando encontrado um aumento ou uma redução superior a duas vezes o valor da intensidade de pixel do “spot” tratado com TGF- β em relação a seu controle.

Nas análises de fosforilação calculamos, além da razão descrita acima, a razão (P/S) da intensidade de pixel do “spot” corado por ProQ (P) pela intensidade de pixel do “spot” corado por Sypro (S), de modo a normalizar a quantidade total de fosforilação pela quantidade total de proteína presente no gel.

Estas análises demonstram que alguns “spots” apresentam diferenças quanto ao seu nível de fosforilação, mantendo seus níveis de expressão constantes ao longo do tempo estudado; outros - fosforilados ou não – apresentaram diferenças apenas quanto aos seus perfis de expressão ao longo do tempo estudado; um terceiro grupo apresentou alterações significativas tanto no nível de fosforilação quanto de expressão. Estas proteínas foram classificadas em grupos funcionais e o comportamento de cada uma delas ao longo do tempo encontra-se representado graficamente nas figuras a seguir.

A cada “spot” do gel foi atribuído um número que permite a sua localização no mapa proteômico (Figura 4.6). Algumas proteínas são identificadas em diferentes

“spots” no gel e observamos que o comportamento de fosforilação e expressão destes podem apresentar diferenças entre si.

Em nossas análises, quando encontramos diferentes “spots” (de mesma massa molecular, que apresentavam apenas pequenas variações de pI), identificados como uma proteína com seqüência idêntica de aminoácidos, relacionamos esses “spots”, somando seus valores e os representando também unificados em gráficos. A nossa intenção é mostrar o comportamento geral da proteína, já que no gel bidimensional uma mesma proteína pode ser separada em vários “spots” horizontalmente dispostos, devido a modificações pós-traducionais (como fosforilação) que essas proteínas podem sofrer durante diversos processos celulares.

Os valores da média da intensidade de pixel (em ppm) dos “spots” em cada tempo de estudo estão representados na tabela a seguir. Na tabela, as proteínas estão organizadas em grupamentos funcionais (tabela 4.2).

Tabela 4.2: Valores das médias da intensidade de pixels dos “spots” responsivos a TGF- β ao longo dos tempos estudados.

Identificação	Número		1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Proteínas de choque térmico							
HSP70 precursor mitocondrial	4	Fosforilação	8,39	-1,39	0	1,76	-2,33
		Expressão	1,02	1,01	-4,65	-1,75	-1,75
	5	Fosforilação	3,22	0	0	4,23	2,43
		Expressão	1,50	1,58	-1,91	4,23	2,43
HSP70	3	Fosforilação	0	0	0	0	0
		Expressão	1,04	6,15	-2,72	-3,35	-2,65
	87	Fosforilação	1,95	1,09	1,11	2,05	1,48
		Expressão	0	1,55	0,82	-3,78	-19,20
HSP60	102	Fosforilação	0	0	0	0	-2,16
		Expressão	0	0	0	0	5,72
	6	Fosforilação	3,65	0	0	1,11	1,92
		Expressão	1,62	0,85	-6,00	-3,27	-2,10
DNAK	7	Fosforilação	0	0	0	0	0
		Expressão	1,09	1,28	-3,20	-2,33	-3,55
	2	Expressão	3,90	3,13	-2,33	-3,18	0
		Fosforilação	1,90	1,33	0,95	1,35	-1,88
Proteína de interação a Hsc70	10	Expressão	1,08	1,55	-1,39	1,14	1,22
		Expressão	-1,65	0,93	5,34	2,83	2,24
GrpE	59	Expressão	-1,65	0,93	5,34	2,83	2,24
Ciclofilina A	73	Expressão	-1,2	1,11	-3,50	4,13	0,63
Proteínas de citoesqueleto							
beta Tubulina	9	Fosforilação	1,06	2,88	1,08	2,13	-2,32
		Expressão	2,23	3,39	1,71	-4,39	-2,38
	42	Fosforilação	3,13	1,00	-2,86	1,33	-2,24
		Expressão	-1,35	1,27	-2,64	-1,41	-2,45

Valores positivos representam a média de ppm da razão TGF-beta/ Controle

Valores negativos representam a média de ppm da razão Controle/ TGF-beta

Identificação	Número		1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Proteínas de metabolismo							
Prostaglandina F2 alfa sintase/ Desidrogenase (Old yellow enzyme)	15	Fosforilação	6,36	0	0	0	3,91
		Expressão	1,18	1,70	1,22	1,16	-2,2
	16	Fosforilação	5,10	4,48	0	-1,21	3,72
		Expressão	-2,59	-1,19	1,64	0,95	-5
	25	Expressão	1,51	1,00	-5	-5,16	-1,37
	26	Fosforilação	-2,26	-9,80	0	3,34	-2,67
		Expressão	1,37	4,14	-2,99	-4,07	1,67
	28	Fosforilação	0	0	0	0	1,55
		Expressão	2,58	2,95	1,15	-4,0	1,18
	29	Expressão	-1,72	3,52	0	6,20	-1,98
Aldo-Ceto Redutase	48	Expressão	-1,39	1,29	1,32	-2,70	-1,34
	19	Fosforilação	3,26	-12,44	0	-3,59	1,61
Enolase		Expressão	-1,96	13,06	-3,80	1,48	1,32
	20	Fosforilação	0	0	0	2,06	2,30
Expressão		-1,34	-1,22	-2,78	-6,92	1,92	
Gliceraldeido 3 Fosfato Desidrogenase	39	Fosforilação	3,42	-5,51	0,96	1,13	2,52
		Expressão	-2,55	2,34	1,12	0,95	-1,84
malato Desidrogenase glicossomal	51	Fosforilação	-3,09	2,12	17,79	1,66	24,07
		Expressão	1,06	3,37	2,91	1,37	-5,86

Valores positivos representam a média de ppm da razão TGF-beta/ Controle

Valores negativos representam a média de ppm da razão Controle/ TGF-beta

Identificação	Número		1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
<i>Proteínas de metabolismo (Cont.)</i>							
Proteína dissulfeto isomerase	31	Expressão	1,09	8,07	1,07	1,05	1,32
Desidrogenase aromática L-alfa hidroxí-ácida	32	Expressão	0,99	2,70	-1,52	-1,86	0,97
Tirosina aminotransferase	27	Expressão	1,12	1,38	-3,06	1,69	1,19
<i>Proteínas Hipotéticas</i>							
	23	Fosforilação	1,79	-9,80	-8,74	-6,80	-4,02
		Expressão	1,17	-0,90	5,17	16,71	1,29
Proteína Hipotética	89	Fosforilação	-2	0,58	-1,64	2,05	4,28
		Expressão	-2,36	7,84	1,22	1,58	-3,55
	17	Expressão	2,20	8,03	4,26	-3,78	7,24
<i>Proteínas associadas ao processo de tradução</i>							
Complexo associado ao polipeptídeo nascente	40	Fosforilação	2,31	-17,39	-2,70	3,99	-1,89
		Expressão	1,07	1,57	-1,30	1,38	1,04
Fator de Iniciação eucariótico 5a	53	Fosforilação	-1,61	0,93	-1,42	-1,60	2,19
		Expressão	1,46	-1,21	1,00	0,95	1,03
Fator de elongação 1 alfa	32a	Expressão	0,95	24,62	1,13	-1,88	1,24
	38	Expressão	1,09	4,20	-1,32	1,55	-3,51

Valores positivos representam a média de ppm da razão TGF-beta/ Controle

Valores negativos representam a média de ppm da razão Controle/ TGF-beta

Identificação	Número		1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Proteases/ Peptidases							
Cruzipaina	8	Expressão	-1,24	38,07	-4,00	-2,43	1,49
Sub-unidade proteolítica do complexo Hslvu	55	Expressão	0,94	4,00	2,02	-1,38	-1,9
Proteínas de regulação de estresse oxidativo							
Triparedoxina peroxidase	60	Expressão	-1,6	1,38	1,15	-1,39	11,82
Proteínas de Transdução de sinal							
Fator de liberação de Histamina dependente de IgE	52	Fosforilação	1,90	-1,35	-7,70	4,58	18,58
		Expressão	0,80	-1,23	1,00	1,82	-2,90

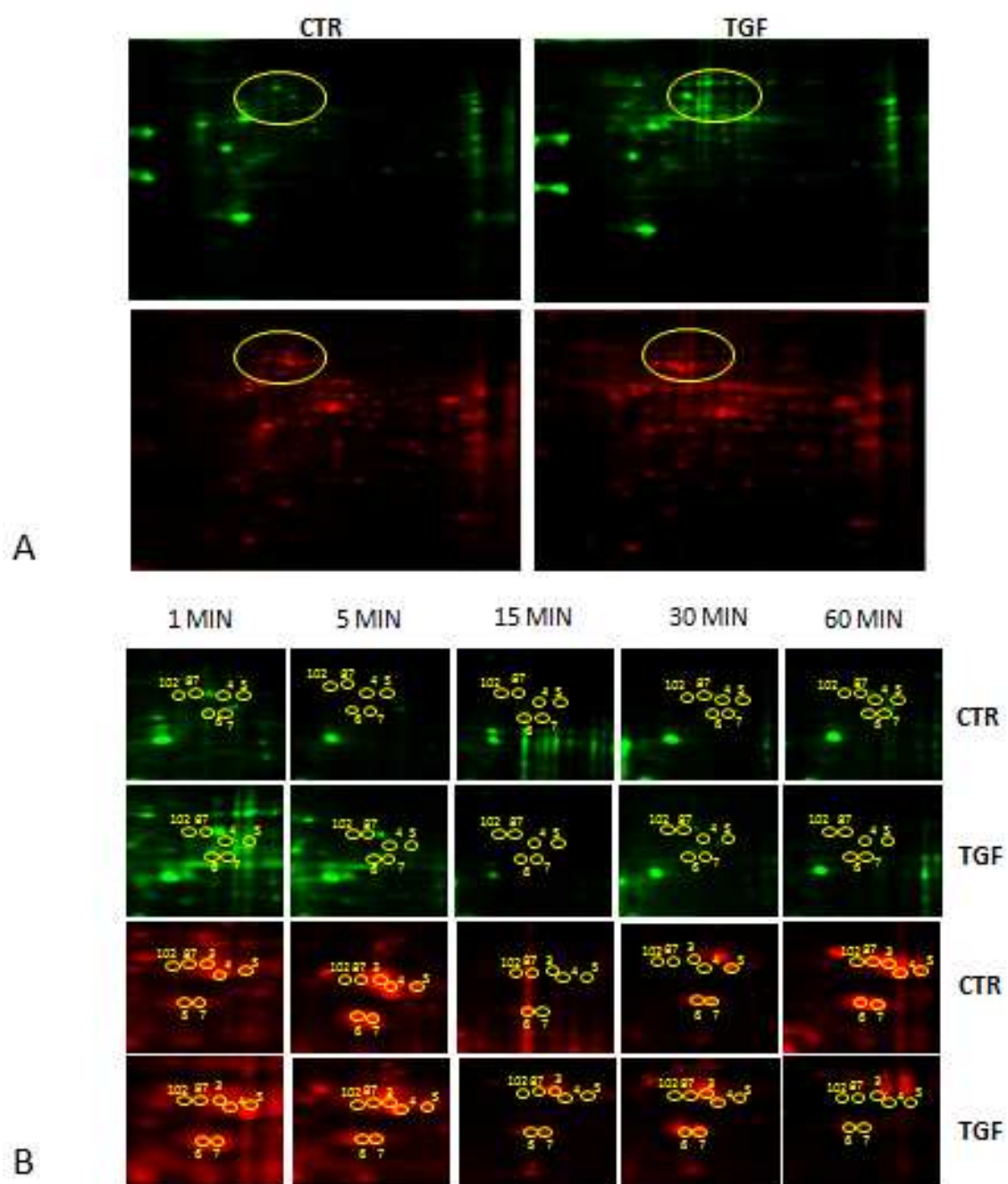
Valores positivos representam a média de ppm da razão TGF-beta/ Controle

Valores negativos representam a média de ppm da razão Controle/ TGF-beta

- **Proteínas de choque térmico: HSPs (“heat shock proteins”)**

No mapa proteômico encontramos 5 “spots” identificados como HSP70 (“heat shock protein 70 kDa”), dentre estes, dois “spots” são diferencialmente fosforilados (“spots” 4 e 5) e dois “spots” diferencialmente expressos (“spots” 3 e 4). A união dos “spots” 4 e 5 gera um gráfico onde se observa um aumento na fosforilação em 1 minuto e expressão reduzida em 15 minutos. A união dos “spots” 3, 87 e 102 gera um gráfico onde se observa um aumento na fosforilação em 1 e 30 minutos. A expressão é aumentada em 1 minuto e reduzida em 15, 30 e 60 minutos (Figura 4.7).

No mapa proteômico encontramos 2 “spots” identificados como HSP60 (“heat shock protein 60 kDa”); observamos que um “spot” é diferencialmente fosforilado (“spot” 6) e dois “spots” diferencialmente expressos (“spots” 6 e 7) (Figura 4.7).



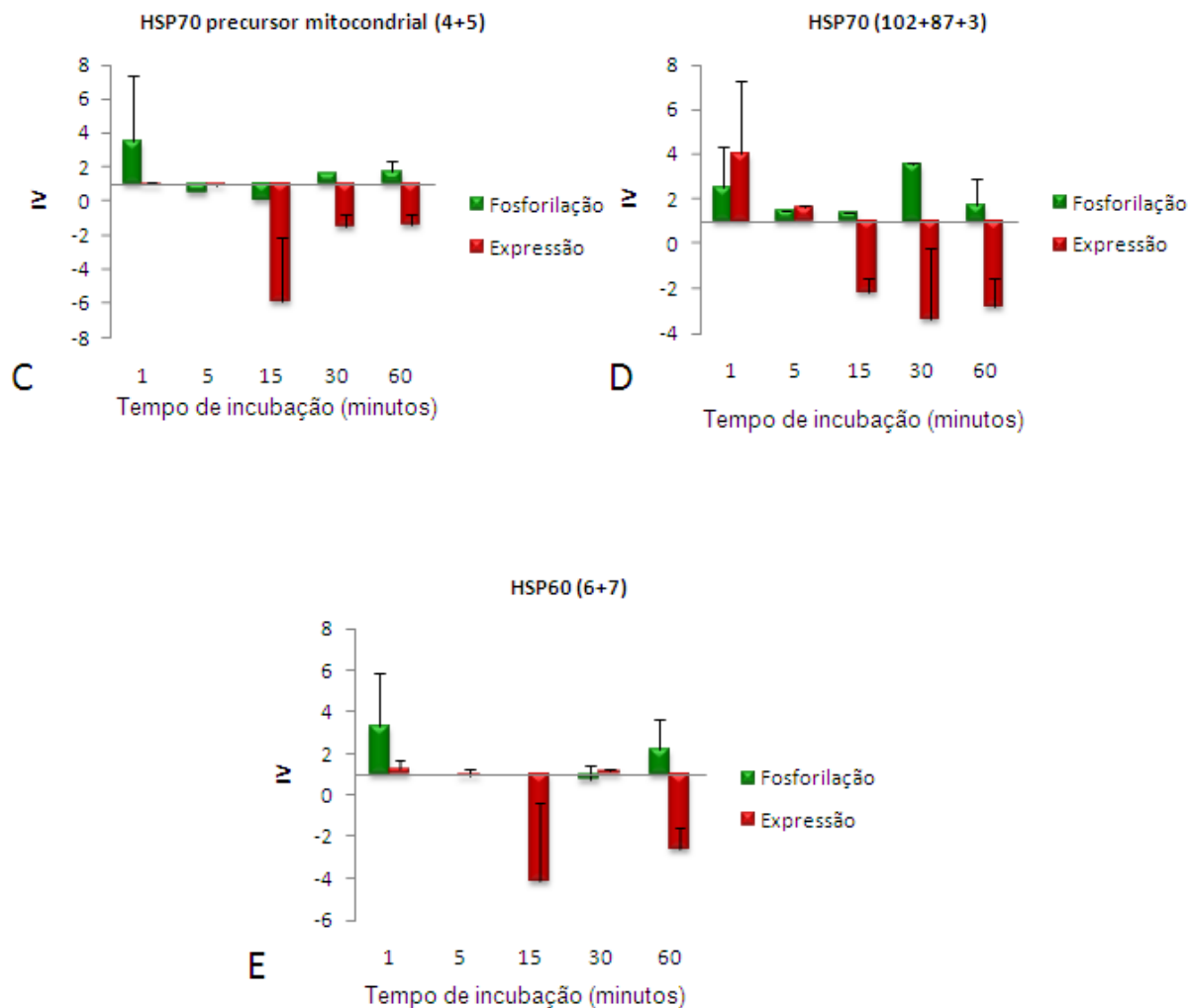


Figura 4.7: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localizam os “spots” de interesse (indicados por círculos e numerados). Gráficos da média do índice de variação (IV) de fosforilação e expressão dos “spots” de três replicatas biológicas, identificados como: **C.** HSP70 precursor mitocondrial (união dos “spots” 4 e 5); **D.** HSP70 (união dos “spots” 3, 102 e 87) e **E.** HSP60 (união dos “spots” 6 e 7).

O “spot” 2 (figura 4.8) identificado como proteína DnaK tem sua expressão aumentada nos tempos de 1 e 5 minutos em resposta a TGF- β .

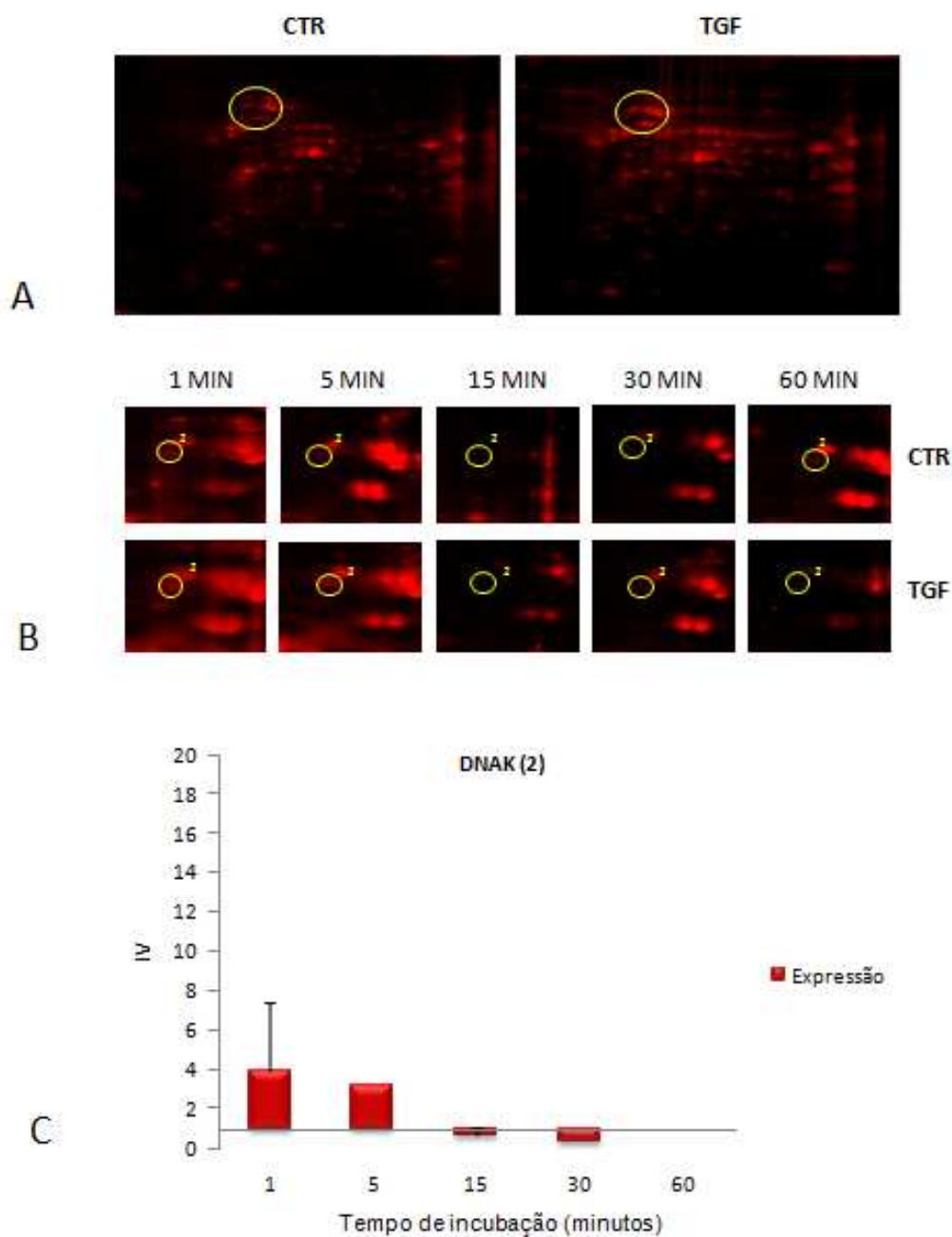


Figura 4.8: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como DnaK (“spot” 2).

O “spot” 10 (figura 4.9) identificado como proteína Hsc70 tem sua fosforilação aumentada em 1 minuto em resposta a TGF- β .

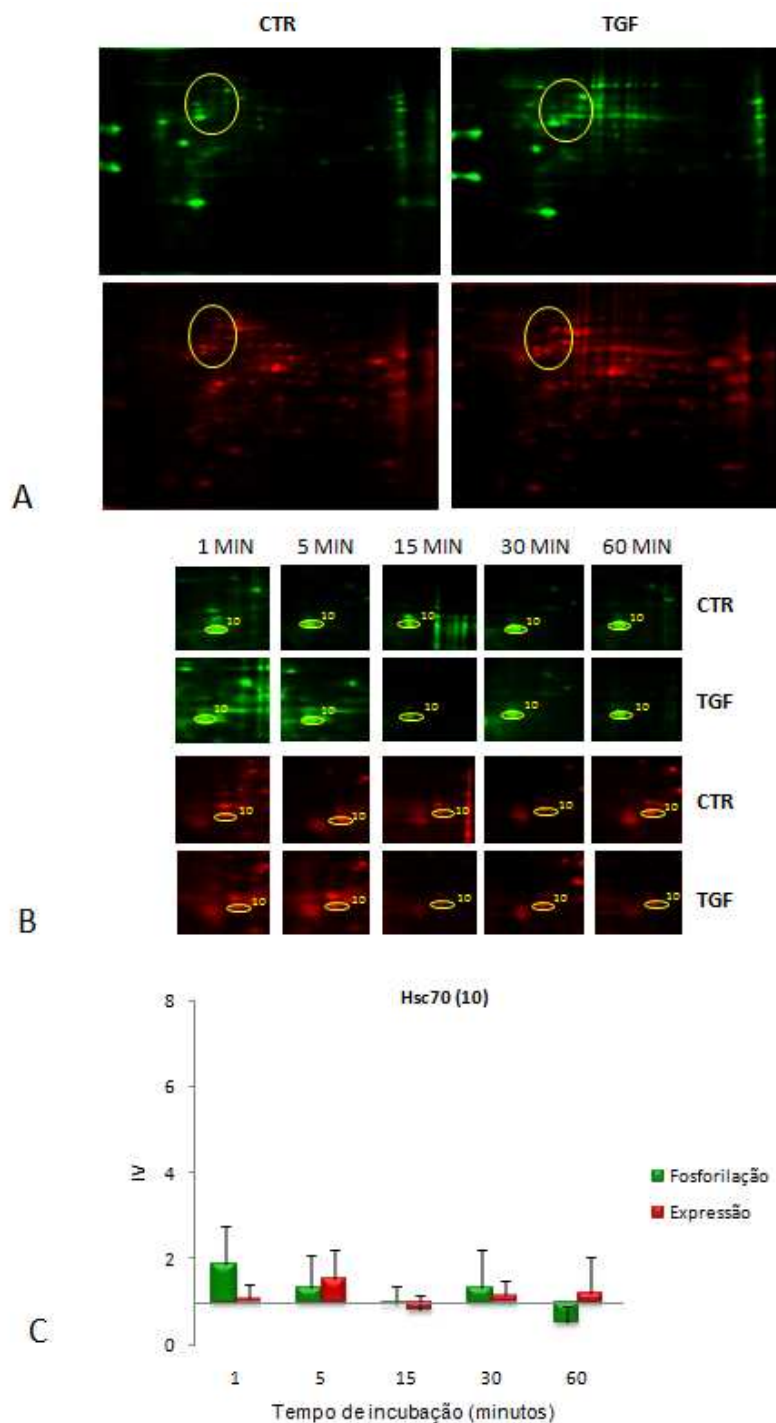


Figura 4.9: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Hsc70 (“spot” 10).

O “spot” 59 (figura 4.10) identificado como proteína co-chaperona GrpE tem sua expressão aumentada nos tempos de 15, 30 e 60 minutos em resposta a TGF- β .

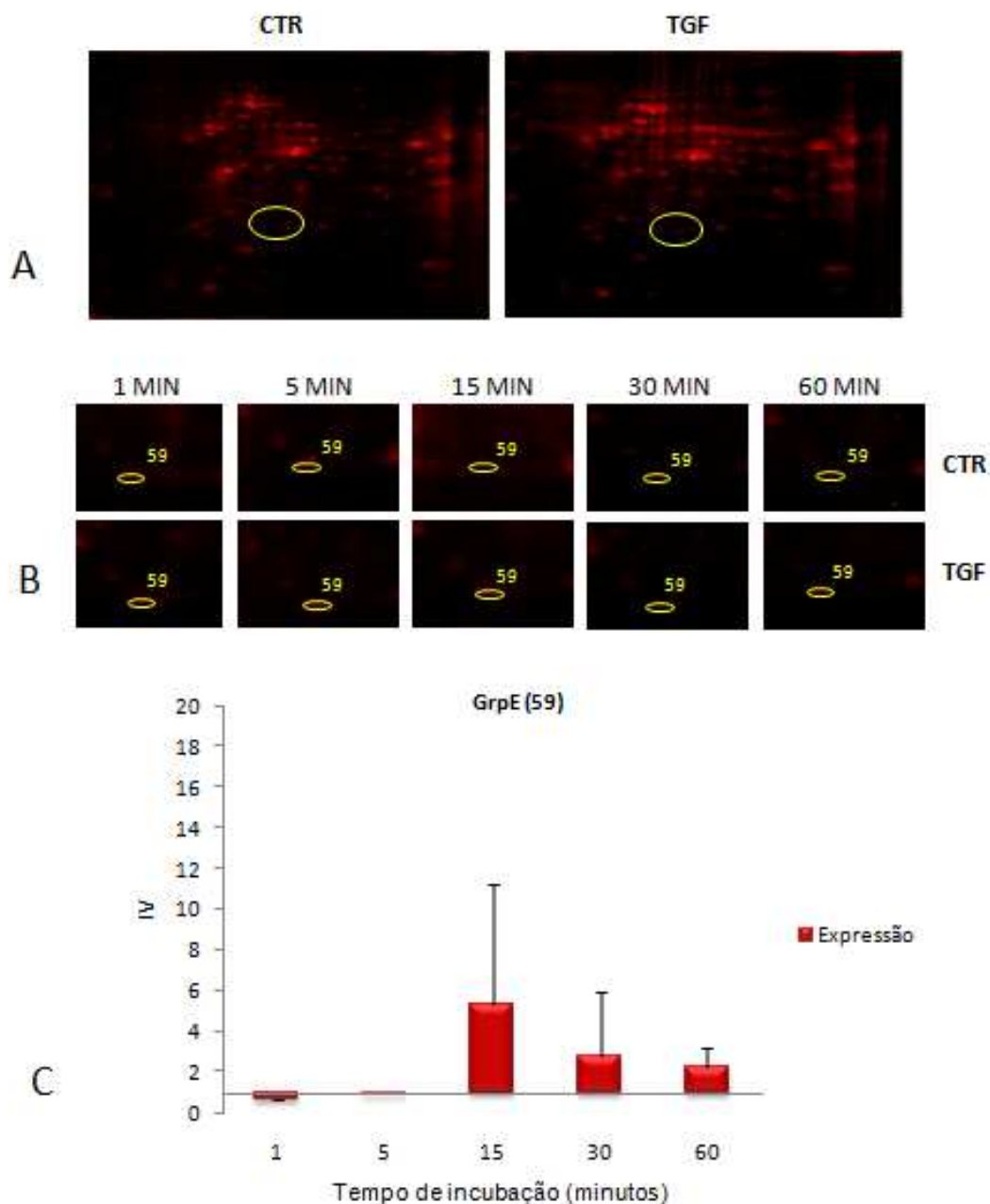


Figura 4.10: **A.** Géis SDS-PAGE 12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como GrpE (“spot” 59).

O “spot” 73 (figura 4.11) identificado como proteína Ciclofilina A tem sua expressão reduzida em 15 minutos e aumentada em 30 minutos.

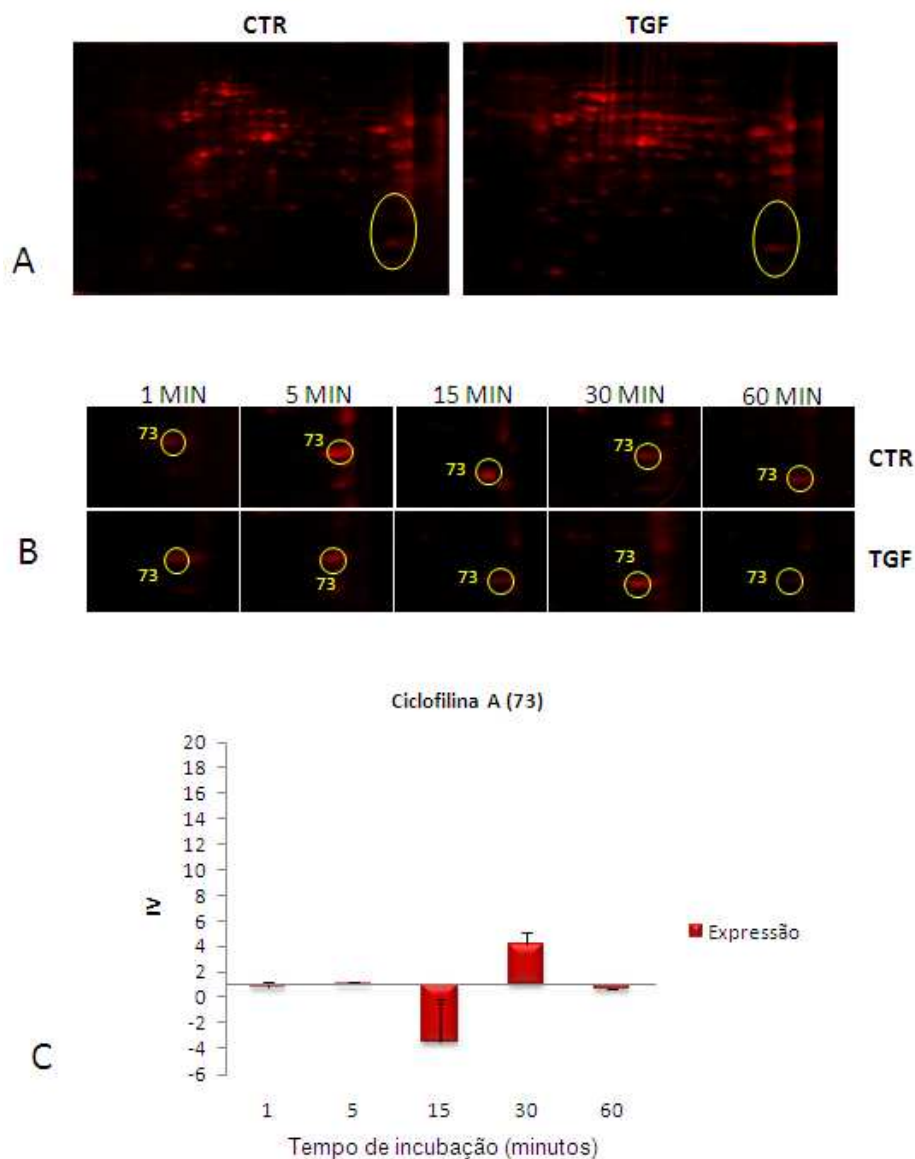


Figura 4.11: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Ciclofilina A (“spot” 73).

- **Proteínas de citoesqueleto (β -tubulina).**

No mapa proteômico observamos dois “spots” identificados como β -tubulina, ambos diferencialmente fosforilados e expressos (“spots” 9 e 42).

O “spot” 9 (figura 4.12) apresenta um aumento na fosforilação em 5 e 30 minutos e sofre defosforilação em 60 minutos. A sua expressão é aumentada em 1 e 5 minutos e reduzida em 30 e 60 minutos.

O “spot” 42 (figura 4.12) tem fosforilação aumentada em 1 minuto e é defosforilado em 15 minutos. Sua expressão é reduzida em 15 minutos e 60 minutos.

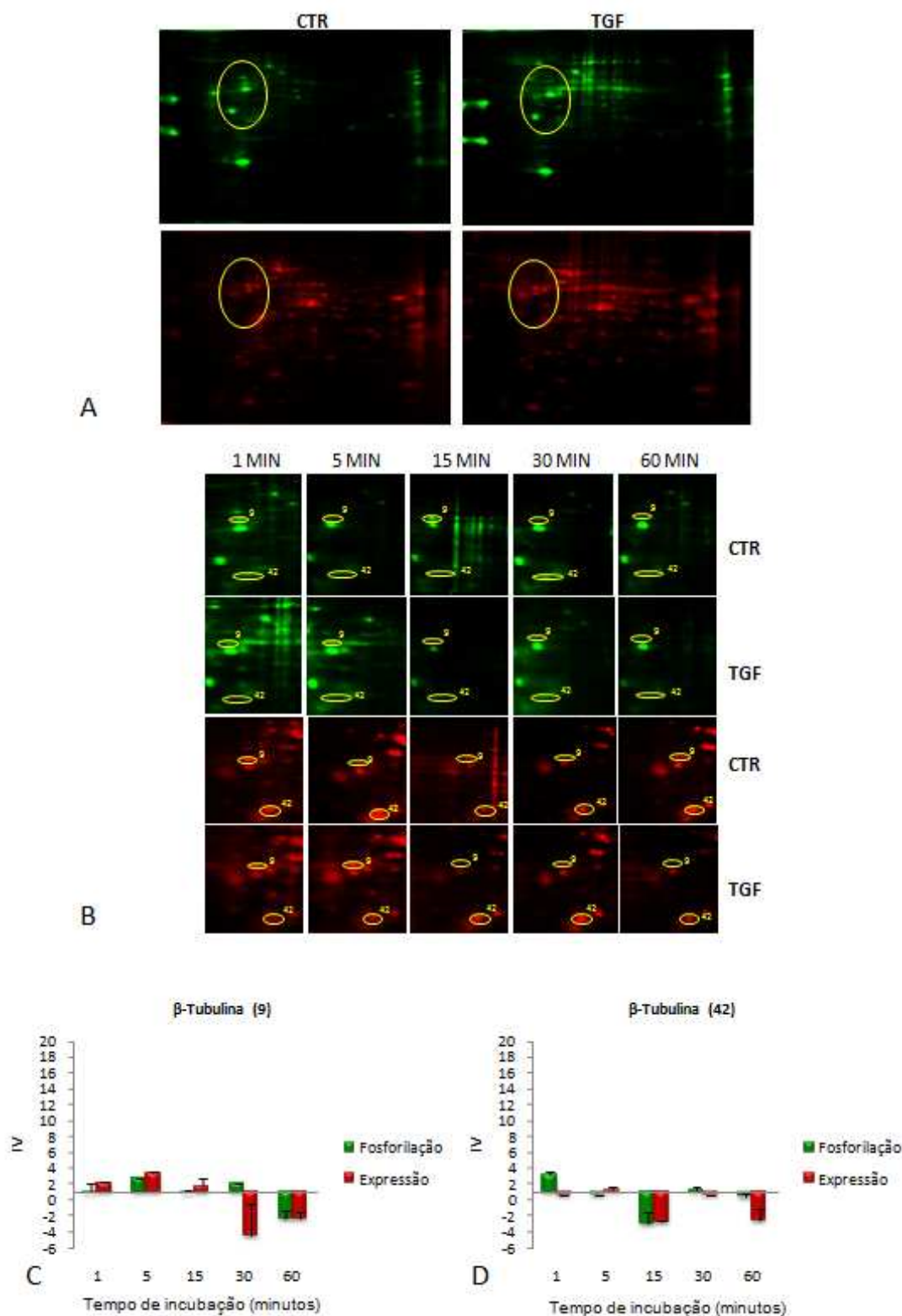


Figura 4.12: **A.** Géis SDS-PAGE 12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). Gráficos da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como: **C.** β -Tubulina (“spot” 9) e **D.** β -Tubulina (“spot” 42).

- **Proteínas envolvidas em processos metabólicos**

No mapa proteômico, foram observados nove “spots” identificados como diferentes tipos de desidrogenases; dentre estes, cinco são diferencialmente fosforilados (“spots” 15, 16, 26, 39 e 51) e seis diferencialmente expressos (“spots” 25, 26, 28 32, 39 e 51) (figura 4.13).

Os “spots” 15, 16, 25, 26, 28 e 29 foram identificados como prostaglandina F₂α sintase. A partir da união dos “spots” 15 e 16, observa-se que ocorre fosforilação aumentada nos tempos de 1, 5 e 60 minutos e defosforilação em 15 e 30 minutos. A expressão destas proteínas é rapidamente reduzida em 1 minuto, mas aumentada em 5 minutos, tornando a reduzir em 15 e 60 minutos de indução com TGF-β (figura 4.13). A união dos “spots” 25, 26, 28 e 29 gera um gráfico (figura 4.13) onde se observa defosforilação em 5 minutos e aumento na fosforilação em 30 minutos. A sua expressão é aumentada em 5 minutos e reduzida em 15 e 30 minutos.

O “spot” 48 (figura 4.14) identificado como proteína aldo-ceto redutase tem sua expressão reduzida apenas em 30 minutos, não sofrendo regulação nos demais tempos de estudo.

No mapa proteômico, foram observados dois “spots” identificados como enolase, onde ambos são diferencialmente fosforilados e expressos (“spots” 19 e 20). A união dos “spots” 19 e 20 gera um gráfico (figura 4.15) onde se observa uma defosforilação em 5 minutos e um aumento na fosforilação em 30 e 60 minutos. A sua expressão é reduzida em 1, 15 e 30 minutos e aumentada em 5 minutos.

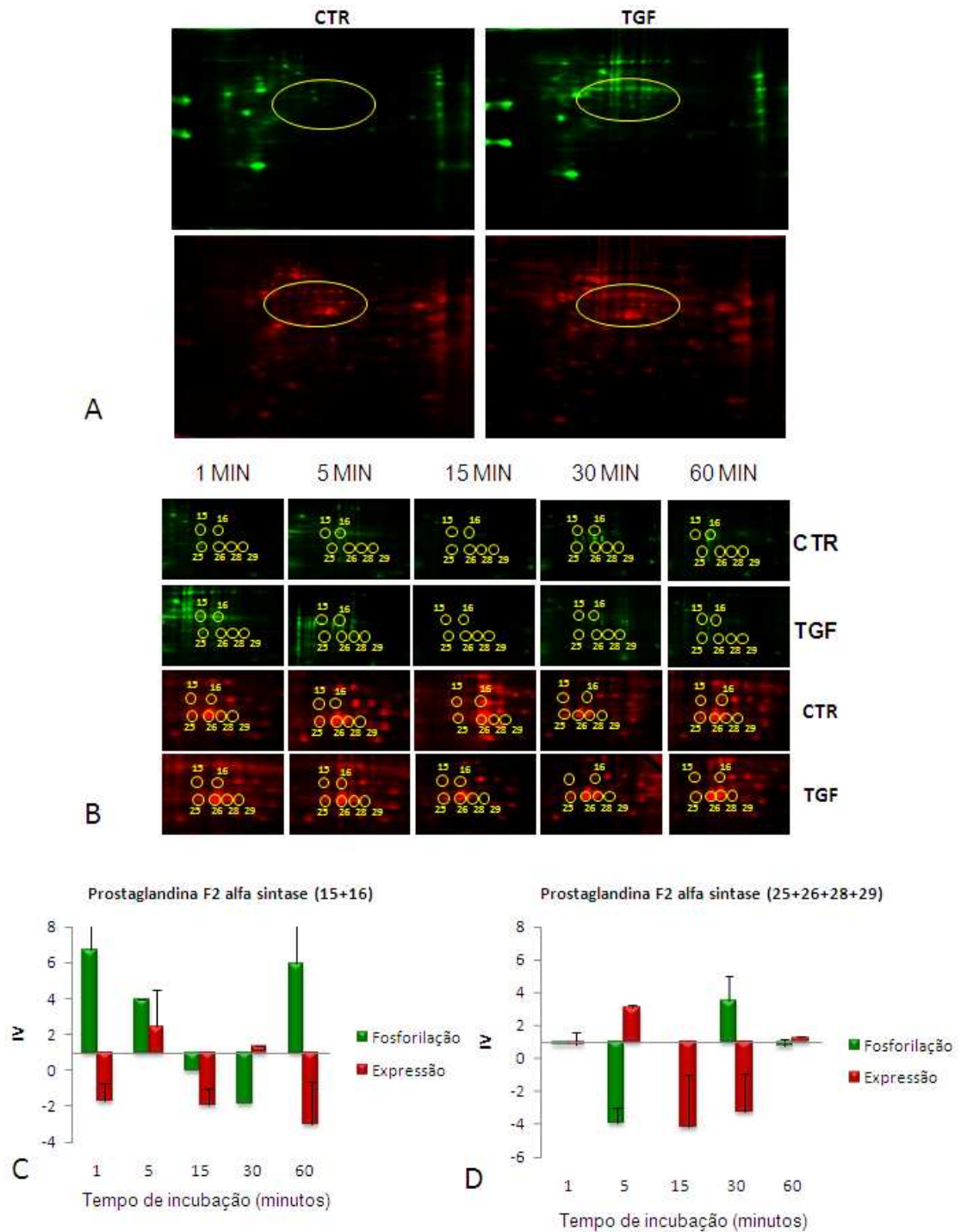


Figura 4.13: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). Gráficos da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como: **C.** Prostaglandina F2 α sintase (união dos spots 15 e 16); **D.** Prostaglandina F2 α sintase (união dos “spots” 25, 26, 28 e 29).

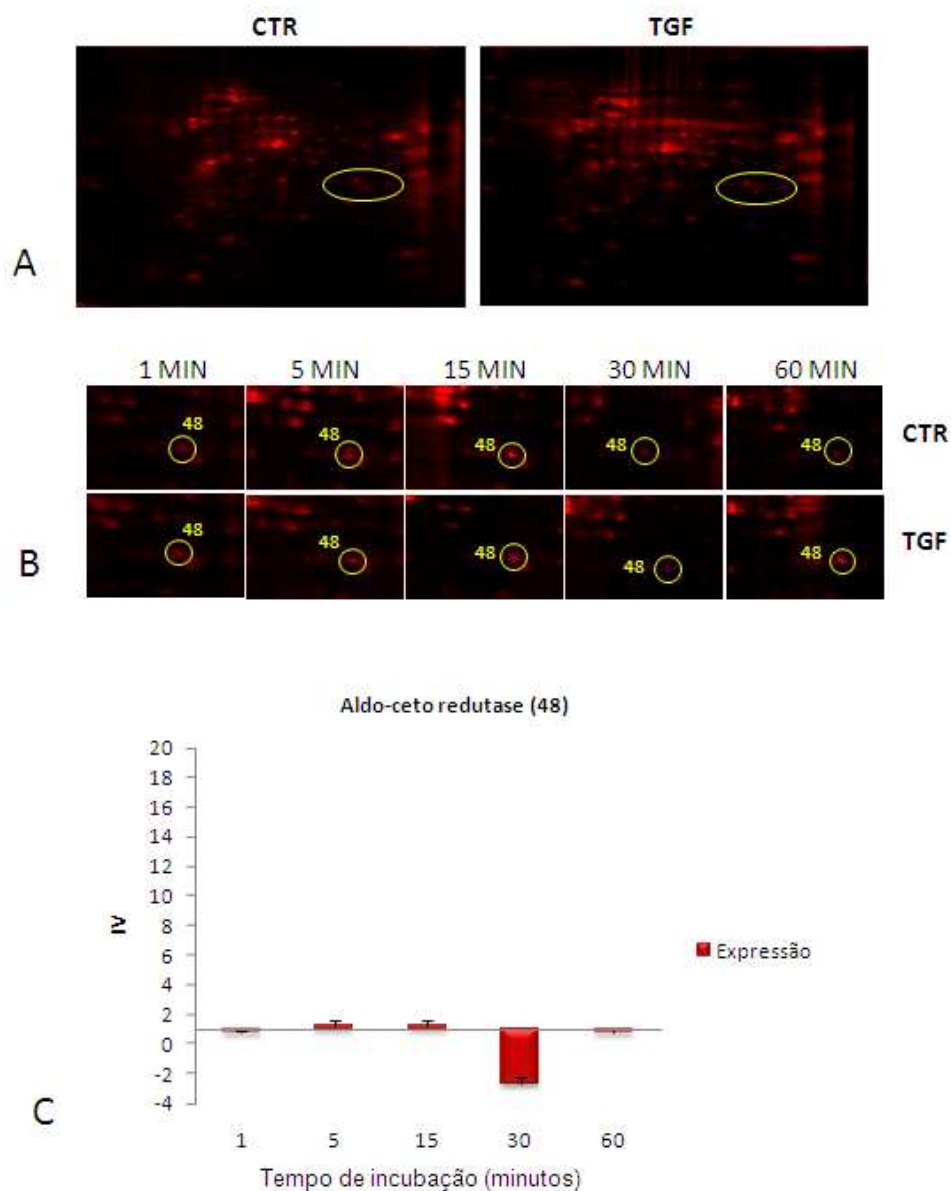


Figura 4.14: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como proteína aldo-ceto redutase (“spot” 48).

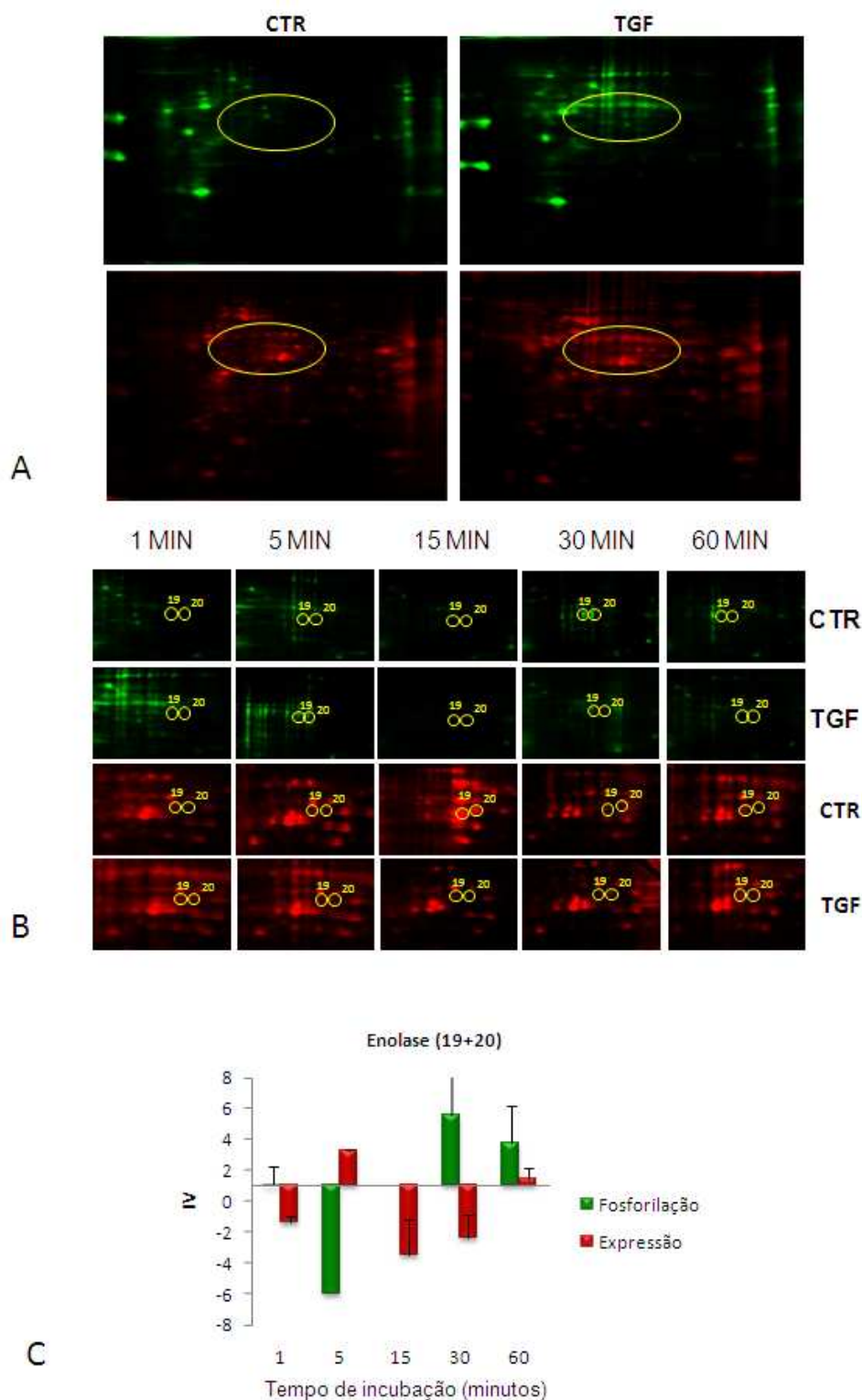


Figura 4.15: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como enolase (união dos “spots” 19 e 20).

O “spot” 39 (figura 4.16), identificado como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), tem sua fosforilação aumentada em 1 e 60 minutos e sofre defosforilação em 5 minutos. Sua expressão é reduzida em 1 minuto e aumentada em 5 minutos. O “spot” 51 (figura 4.16) identificado como malato desidrogenase glicossomal é defosforilado em 1 minuto, mas tem sua fosforilação aumentada em resposta a TGF- β nos tempos de 5, 15 e 60 minutos. Sua expressão é aumentada em 5 e 15 minutos e reduzida em 60 minutos.

Na figura 4.17 identificamos o “spot” 31 como dissulfeto isomerase e o “spot” 32 como desidrogenase aromática L-alfa hidroxiácida. Ambos apresentam expressão aumentada em 5 minutos e apenas o “spot” 32 apresenta expressão reduzida em 30 minutos (figura 4.17).

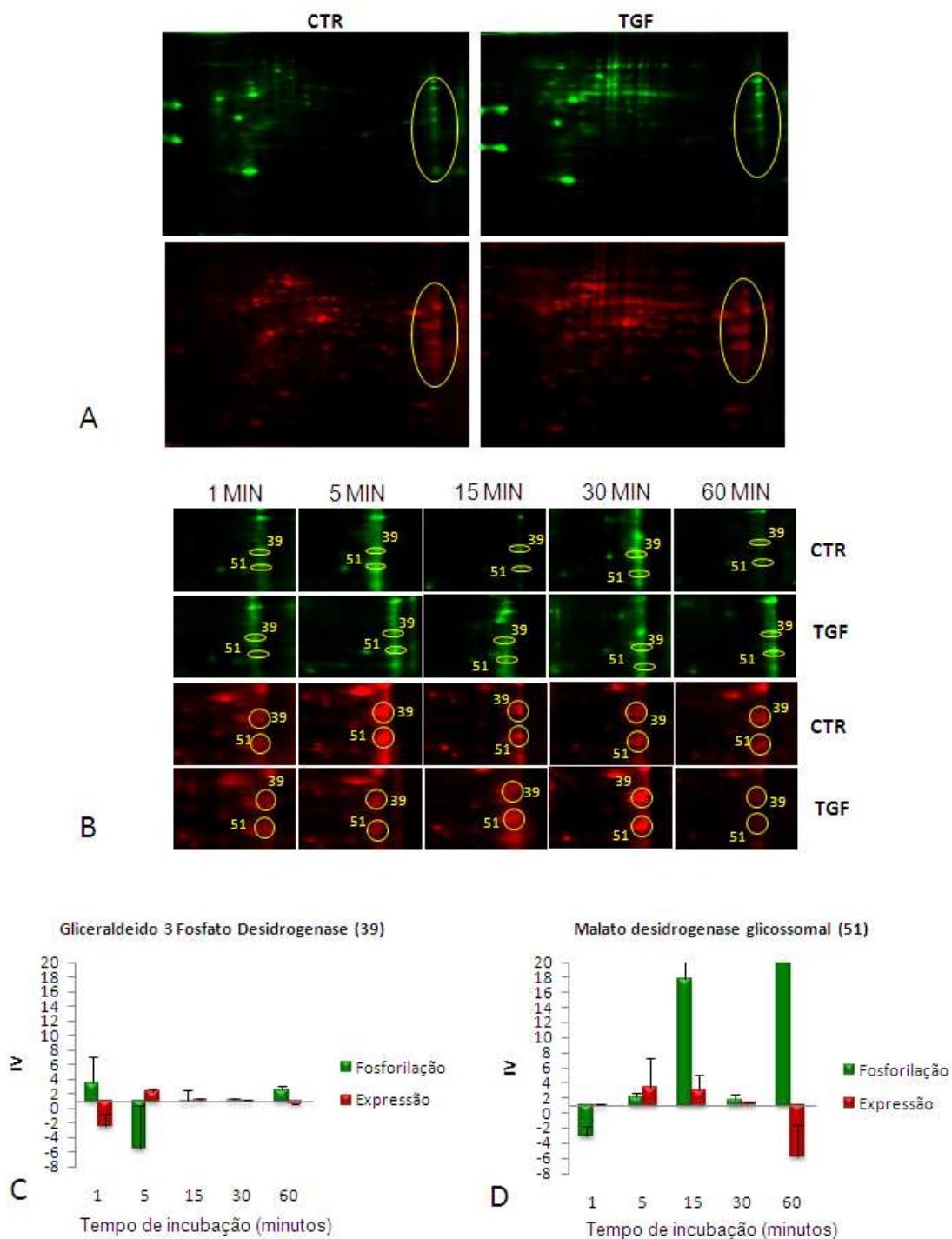


Figura 4.16: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). Gráficos da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como: **C.** Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (“spot” 39); **D.** Malato desidrogenase glicossomal (“spot” 51).

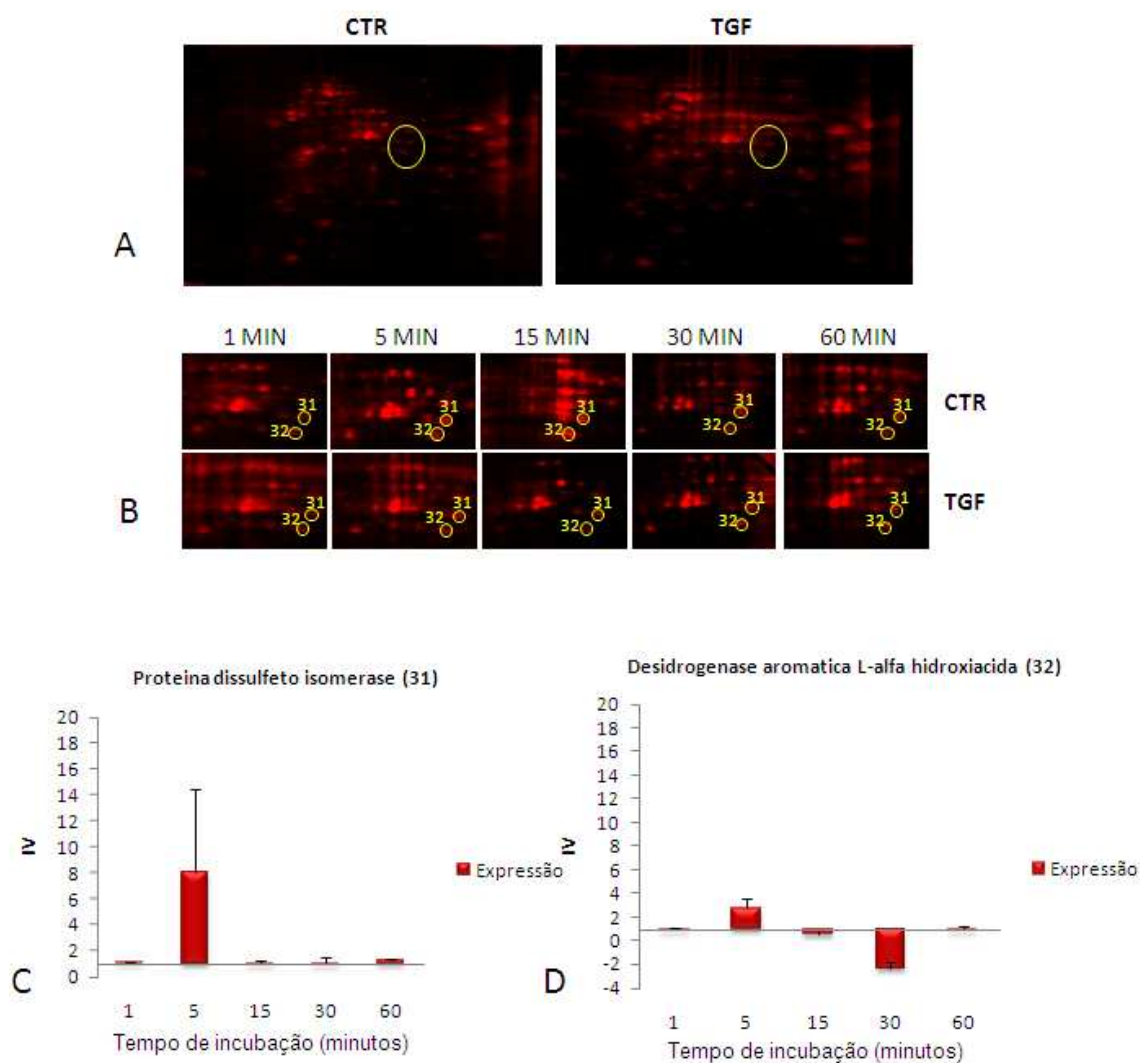


Figura 4.17: **A.** Géis SDS-PAGE 12% de 7cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). Gráficos da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como: **C.** Proteína dissulfeto isomerase (“spot” 31) e **D.** Desidrogenase aromática L-alfa hidroxiácida (“spot” 32).

O “spot” 27 (figura 4.18) identificado como tirosina aminotransferase tem sua expressão reduzida em 15 minutos em resposta a TGF- β .

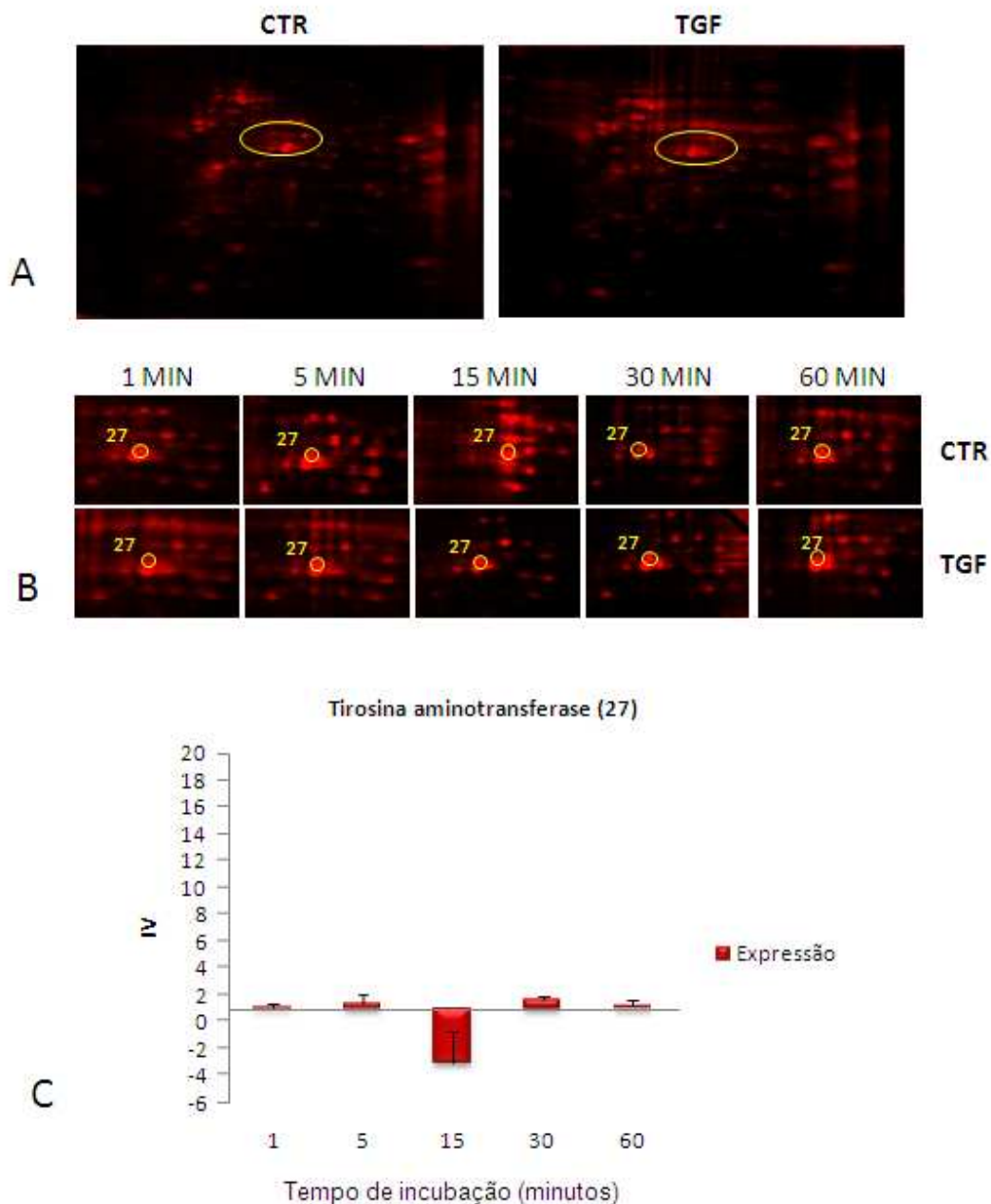


Figura 4.18: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Tirosina aminotransferase (“spot” 27).

- **Grupo das proteínas hipotéticas.**

No mapa proteômico, foram observados três “spots” identificados como proteínas hipotéticas (figura 4.19); dois destes “spots” protéicos foram observados como diferencialmente fosforilados (“spots” 23 e 89) e dois diferencialmente expressos (“spots” 17 e 23).

O “spot” 17 (figura 4.20) tem sua expressão aumentada nos tempos de 1, 5, 15 e 60 minutos e reduzida em 30 minutos.

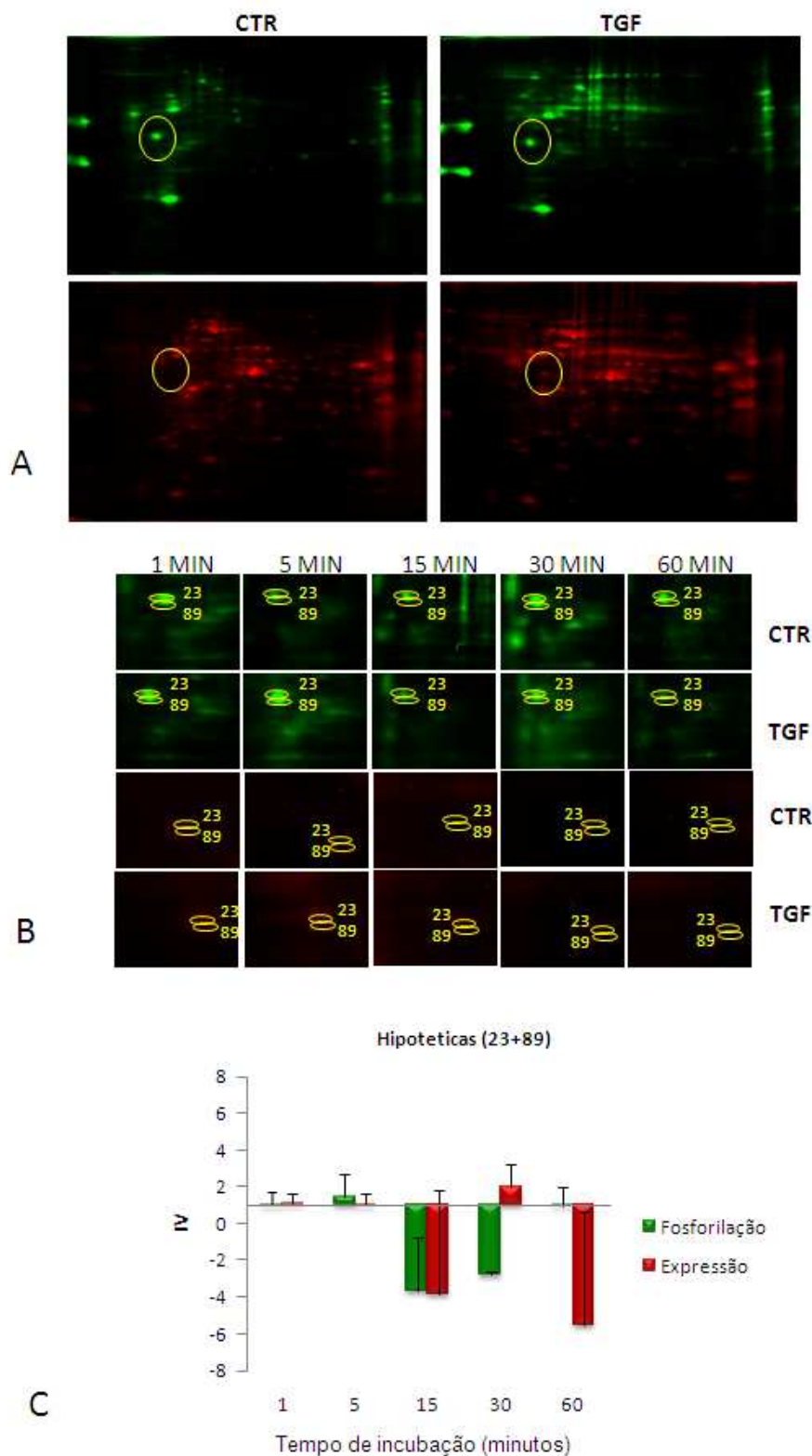


Figura 4.19: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Proteínas Hipotéticas (união dos “spots” 23 e 89).

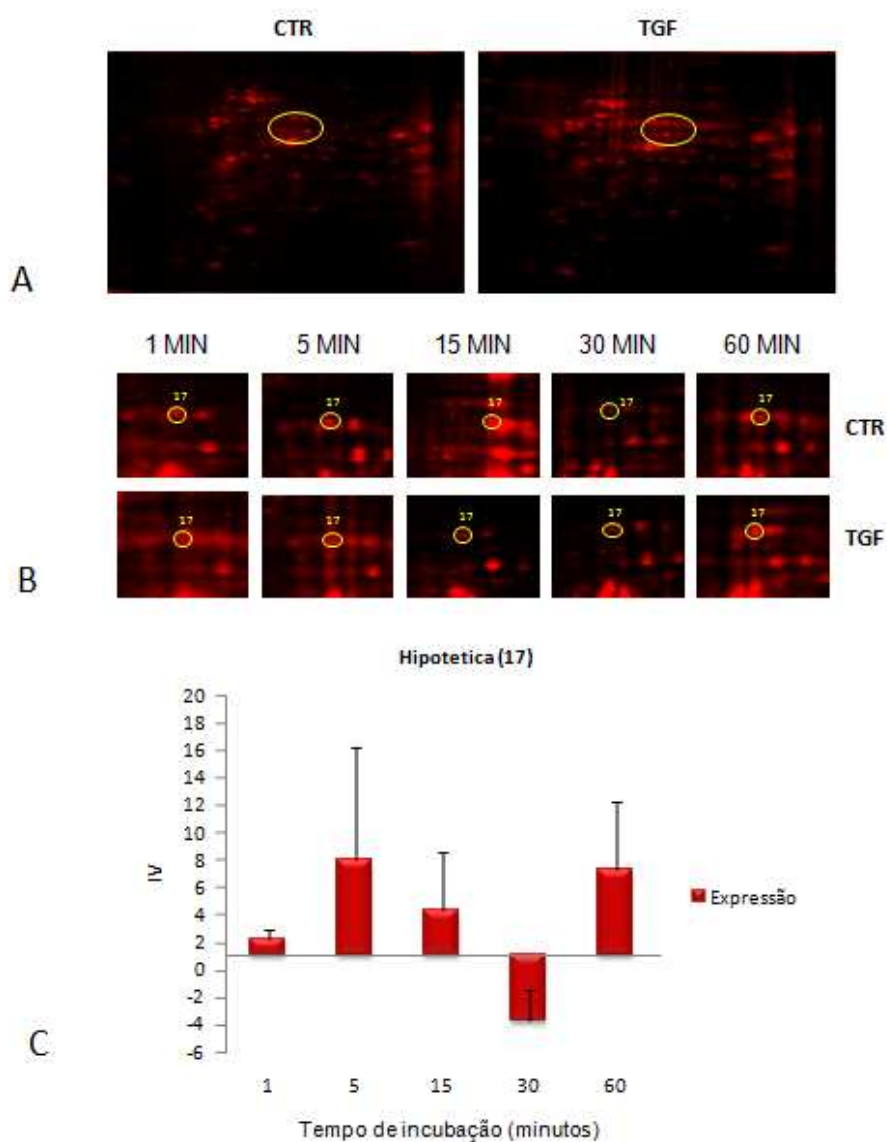


Figura 4.20: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Proteína Hipotética (“spot” 17).

- **Proteínas associadas ao processo de tradução (fator de alongamento 1 alfa, fator de iniciação eucariótico 5a e complexo associado ao polipeptídeo nascente).**

O “spot” 40 (figura 4.21) identificado como subunidade do complexo associado ao polipeptídeo nascente tem sua fosforilação aumentada em 1 minuto e sofre defosforilação em resposta a TGF- β nos tempos de 5 e 15 minutos, sendo mais marcante em 5 minutos. Já o “spot” 53 (figura 4.22) identificado como fator de iniciação eucariótica 5a tem sua fosforilação aumentada apenas no tempo de 60 minutos em resposta a TGF- β , sem nenhuma alteração em sua expressão ao longo do tempo estudado.

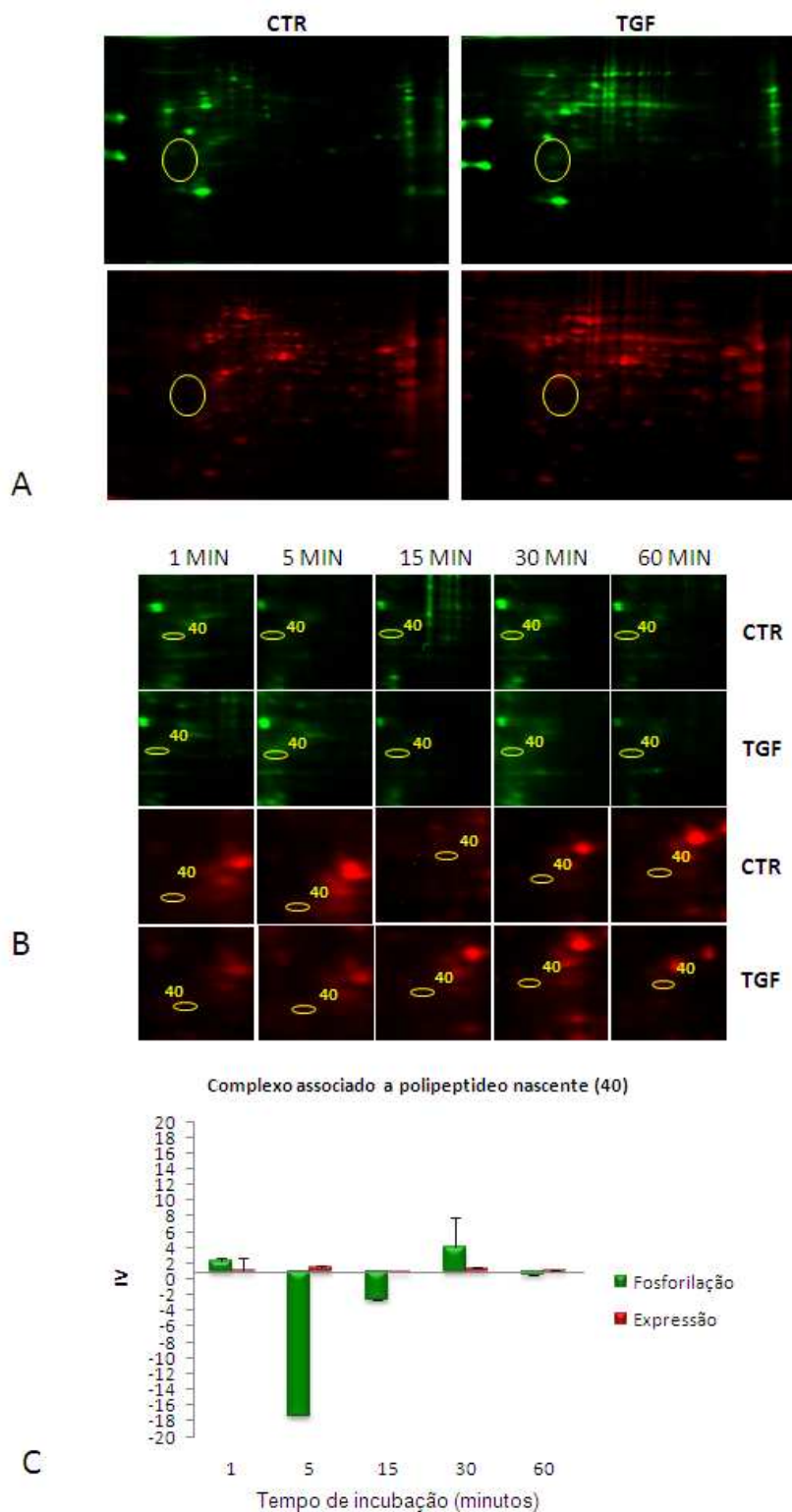


Figura 4.21: **A.** Géis SDS-PAGE 12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o "spot" de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do "spot" de três replicatas, identificado como Complexo associado ao polipeptídeo nascente ("spot" 40).

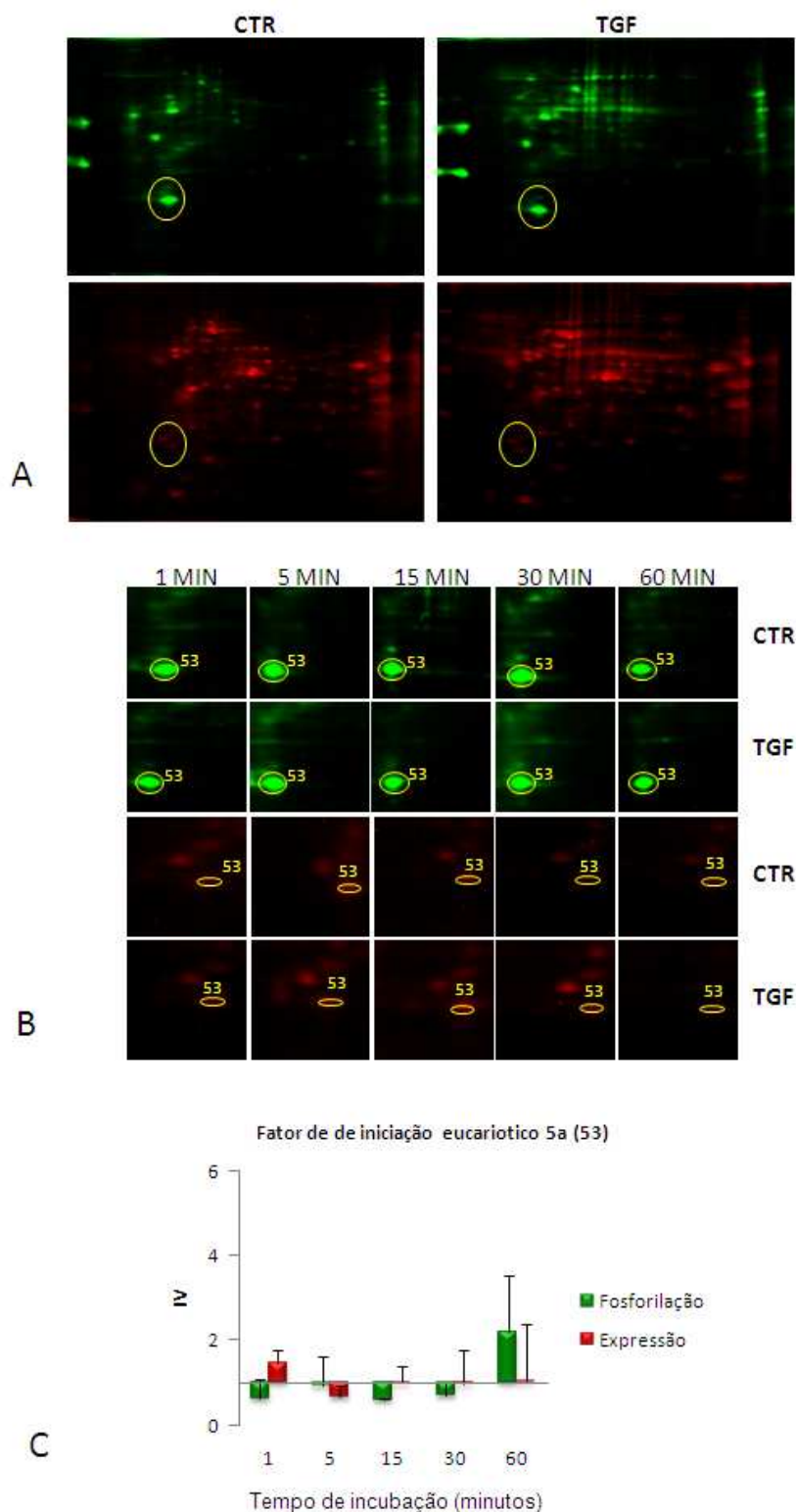


Figura 4.22: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Fator de iniciação eucariótico 5a (“spot” 53).

No mapa proteômico observamos dois “spots” identificados como fator de alongamento-1 α , localizados em regiões distintas do gel 2DE (regiões 1 e 2 marcadas na figura 4.23), e os resultados demonstram que ambos são diferencialmente expressos (“spots” 32a e 38), com expressão aumentada em 5 minutos. Além disto, o “spot” 38 também apresenta modulação no tempo de 60 minutos, no qual se observa uma redução de expressão.

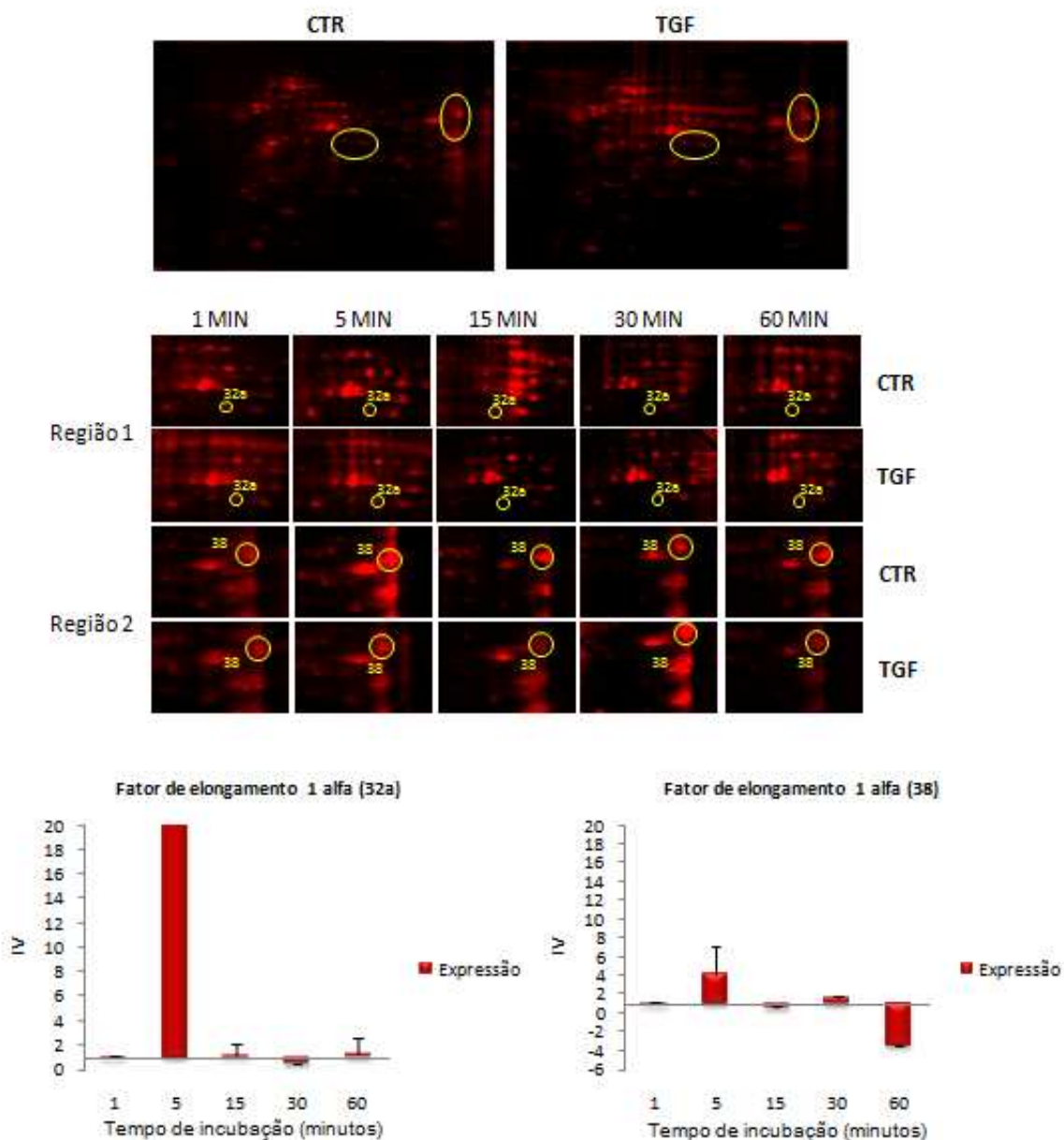


Figura 4.23: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel A aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). Gráficos da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como: **C.** Fator de alongamento-1 α (“spot” 32a) e **D.** Fator de alongamento-1 α (“spot” 38).

- **Proteases e Peptidases (cruzipaína, e subunidade proteolítica do complexo Hslvu).**

O “spot” 8 (figura 4.24) identificado como cruzipaína tem sua expressão aumentada em 5 minutos e reduzida em 30 minutos.

O “spot” 55 (figura 4.25) identificado como subunidade proteolítica do complexo Hslvu tem sua expressão aumentada em 5 e 15 minutos.

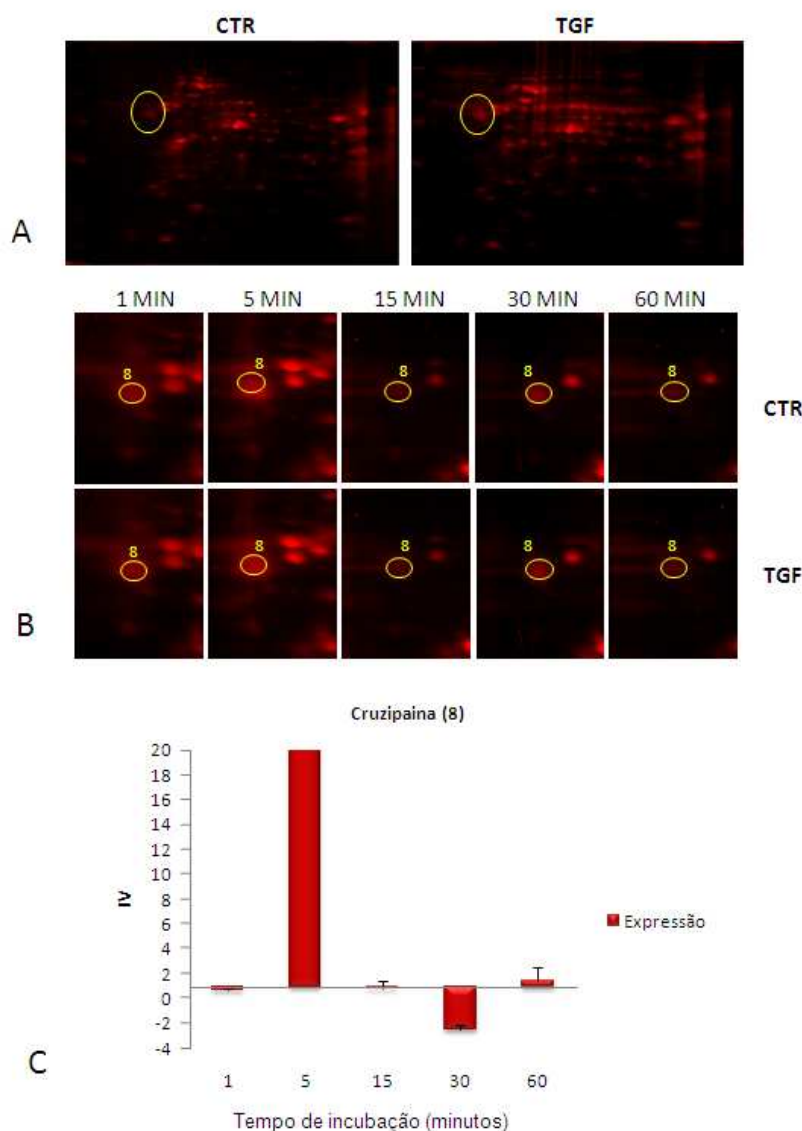


Figura 4.24: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Cruzipaína (“spot” 8).

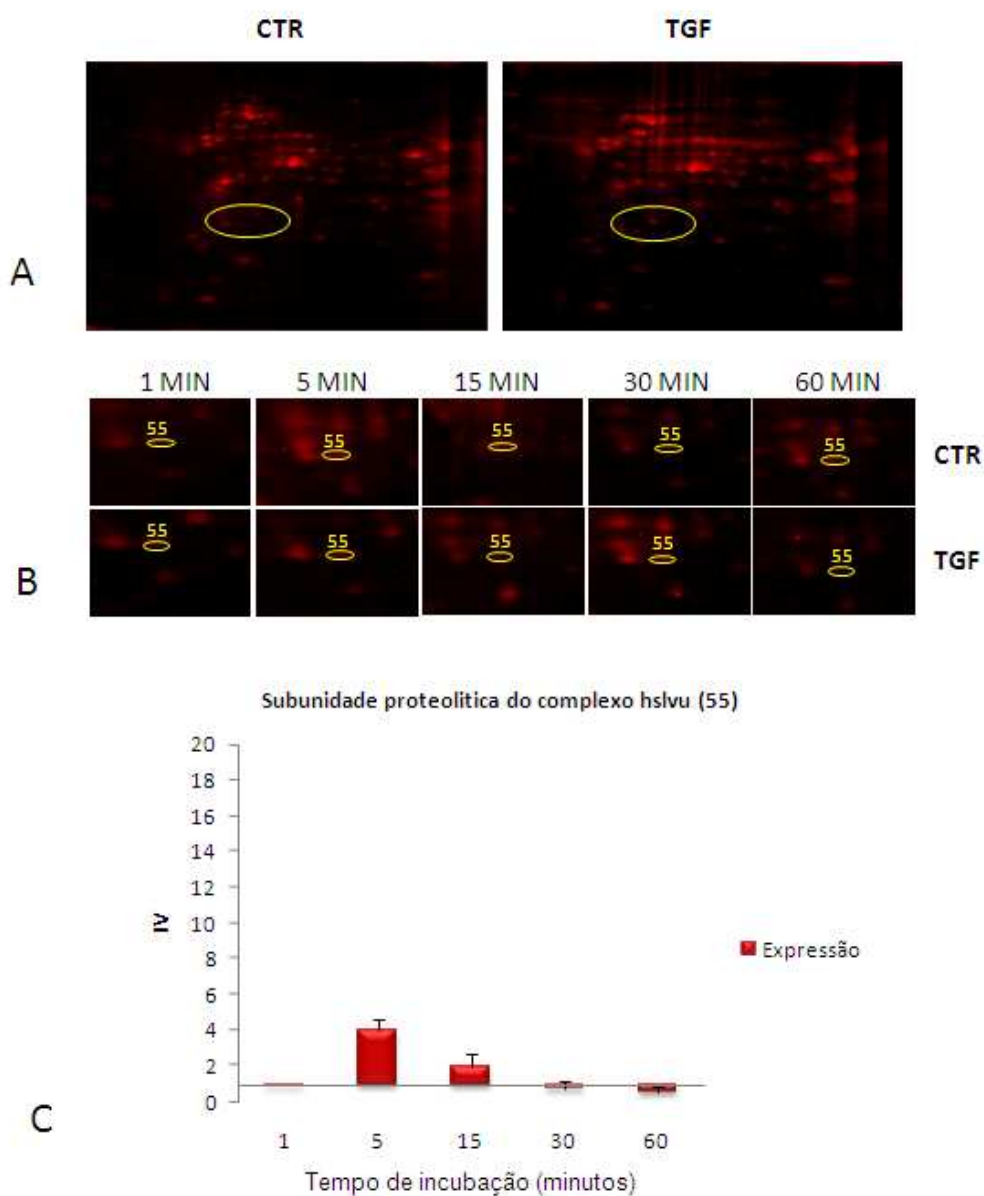


Figura 4.25: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Subunidade proteolítica do complexo hslvu (“spot” 55).

- **Proteínas envolvidas na regulação do estresse oxidativo (triparedoxina peroxidase).**

O “spot” 60 (figura 4.26) identificado como triparedoxina peroxidase é modulado apenas em tempos tardios, apresentando sua expressão aumentada em 60 minutos de incubação com TGF- β .

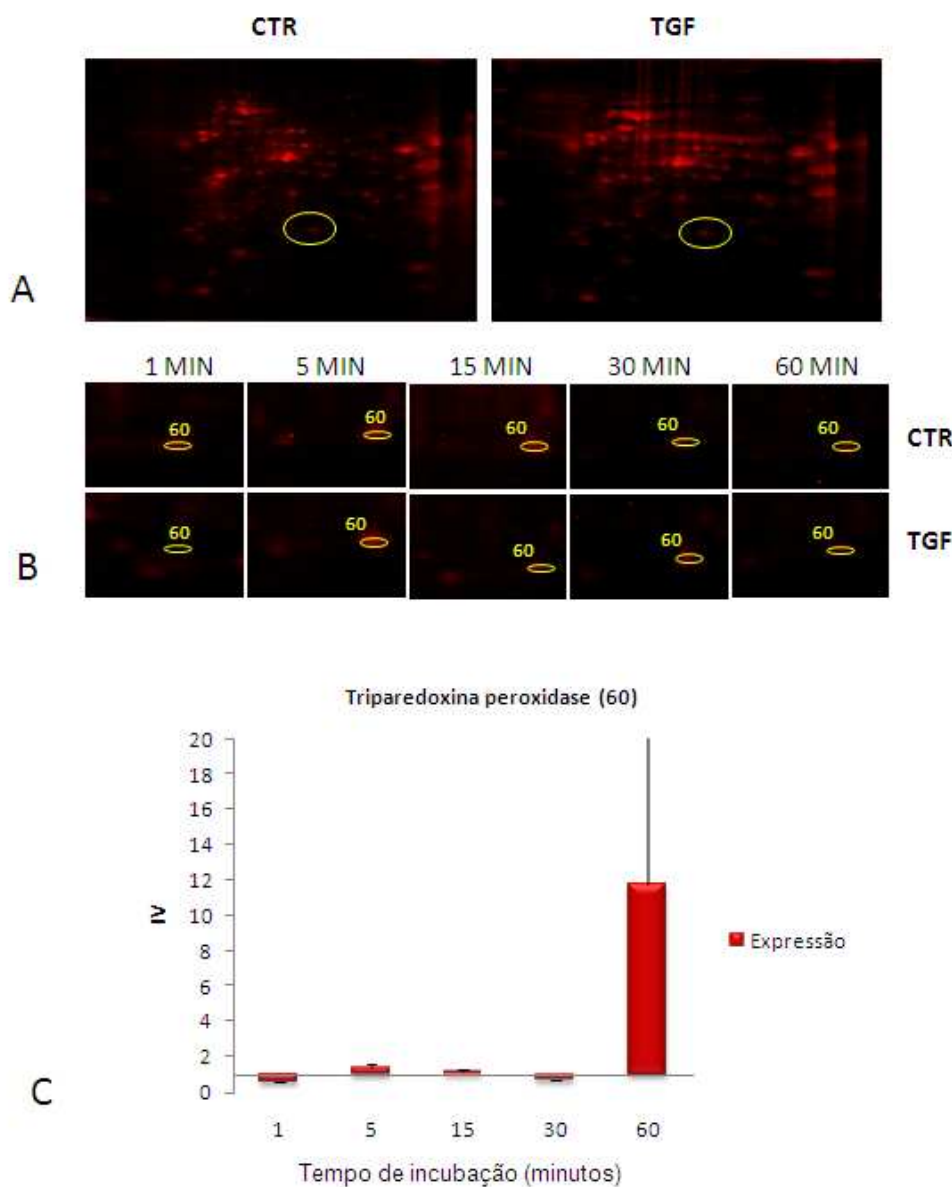


Figura 4.26: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Triparedoxina peroxidase (“spot” 60).

- **Proteínas envolvidas na transdução de sinal (fator de liberação de histamina dependente de IgE).**

O “spot” 52 (figura 4.27) identificado como fator de liberação de histamina dependente de IgE sofre defosforilação em 15 minutos, mas volta a ter sua fosforilação aumentada nos tempos de 30 e 60 minutos. Sua expressão é reduzida em 60 minutos.

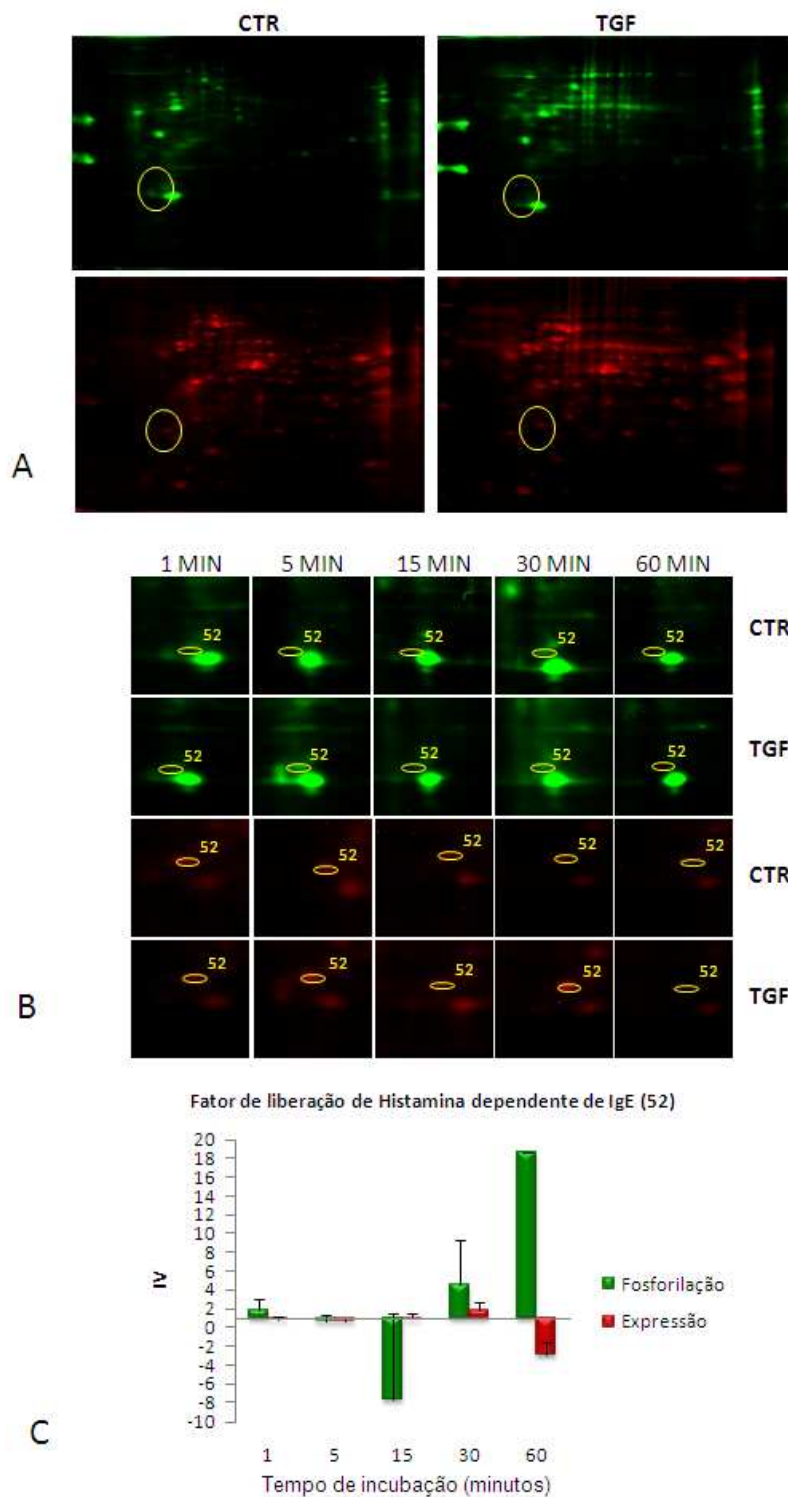


Figura 4.27: **A.** Géis SDS-PAGE12% de 7 cm com faixa de pH de 3-10 não linear corados com ProQ (representado em verde) e Sypro (representado em vermelho). Imagem representativa de uma das três replicatas dos géis bidimensionais dos extratos totais de proteínas de epimastigotas incubadas ou não com TGF- β a 5 ng/ml no tempo de 1 minuto. **B.** Parte das imagens do painel **A** aumentada na região onde se localiza o “spot” de interesse (indicado por círculo e numerado). **C.** Gráfico da média do índice de variação (IV) de expressão do “spot” de três replicatas, identificado como Fator de liberação de Histamina dependente de IgE (“spot” 52).

4.6. Proliferação das epimastigotas após adição de TGF- β

Realizamos ensaios *in vitro* com formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas na ausência (meio LIT) e presença de TGF- β (meio LIT aditivado diariamente com 5ng/ml TGF- β). Nossos resultados (figura 4.28) demonstram que a adição de TGF- β no meio de cultura promove um aumento na proliferação das formas epimastigotas em relação às aquelas crescidas em meio LIT apenas.

Observamos um aumento na proliferação das epimastigotas principalmente em 24 horas, tempo no qual observamos um aumento de 73% no crescimento dos parasitos. Após este período ocorre uma queda neste estímulo, mas ainda observamos que a adição de TGF- β favorece a proliferação dos parasitos, resultando num aumento de 29 e 36% nos tempos de 48 e 72 horas, respectivamente. Este dado foi reproduzido nas três replicatas biológicas realizadas e demonstram claramente a participação direta de TGF- β na biologia do *T. cruzi*.

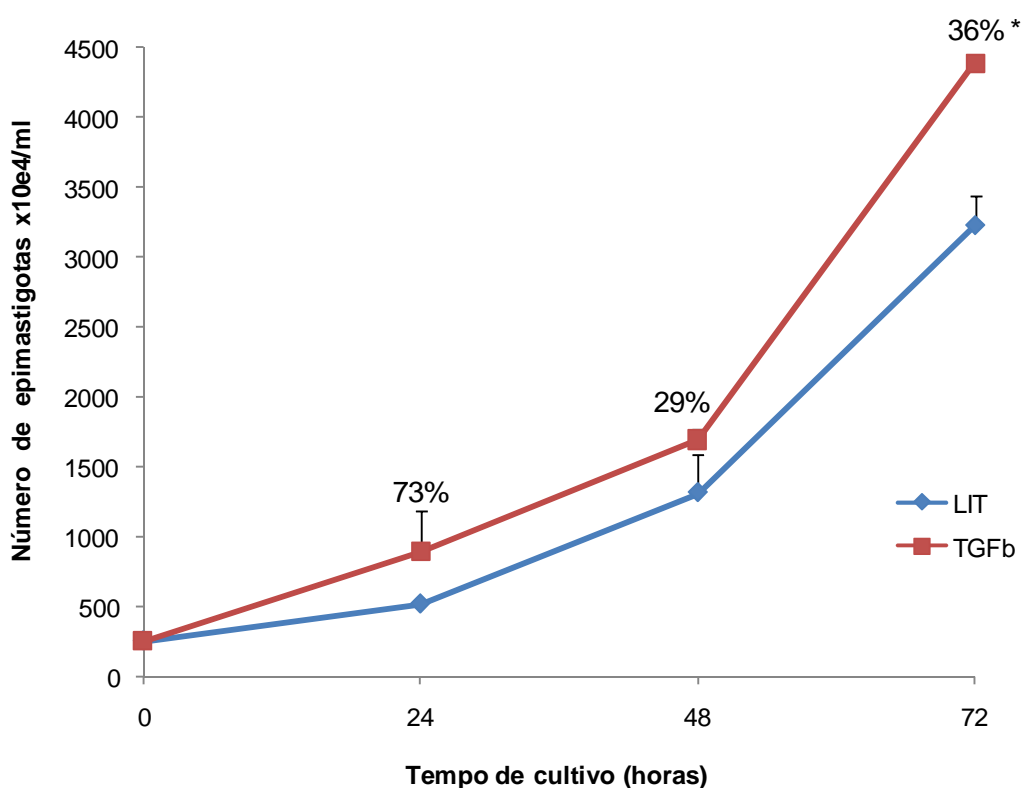


Figura 4.28: Gráfico representativo das médias e desvios do número de epimastigotas presentes nas culturas em meio LIT ou meio LIT acrescido de TGF- β nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. N=3. * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A citocina TGF- β desempenha importantes funções, tanto na doença de Chagas, como no ciclo de vida de *T. cruzi*. De forma sucinta, os dados atuais da literatura indicam que TGF- β participa em pelo menos quatro diferentes processos que influenciam o desenvolvimento da miocardiopatia da doença de Chagas: (a) invasão de fibroblastos e miócitos cardíacos, (b) ciclo intracelular do parasita, (c) regulação da inflamação e da resposta imunológica, (d), fibrose e remodelamento cardíaco durante a doença aguda e crônica (Araujo-Jorge et al., 2008).

Com relação ao seu papel no ciclo intracelular de *T. cruzi*, TGF- β latente é ativado pelo parasito na superfície da célula hospedeira (Waghbi et al., 2005b), favorecendo sua invasão celular através da sinalização via receptores de TGF- β de superfície (Ming et al., 1995; Waghbi et al., 2005b). Amastigotas de *T. cruzi* são capazes de captar e estocar TGF- β da célula hospedeira e usar esta molécula para regular a transição entre parada da proliferação e início da diferenciação para tripomastigotas (Waghbi et al., 2005a). Apesar da importância desta citocina na biologia do *T. cruzi*, ainda não são conhecidos os mecanismos moleculares exatos de transdução dos sinais gerados por TGF- β , que o permitem exercer seus efeitos finais no microorganismo.

Por essa razão, em nosso estudo visamos caracterizar os padrões de fosforilação e expressão de proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* em resposta a adição de TGF- β e identificar moléculas do parasito que estejam relacionadas à via de sinalização disparada por esta citocina.

Para isso, utilizamos uma abordagem fosfoproteômica, que permite analisar, em um único experimento, um conjunto de proteínas possivelmente envolvidas na via de sinalização de interesse. A fosforilação reversível de proteínas é um mecanismo essencial para a regulação de diversos processos biológicos, incluindo, enovelamento, transdução de sinal, atividade enzimática, proliferação, divisão e diferenciação celular, entre outros (Paradela & Albar, 2008). A sinalização por TGF- β envolve a fosforilação de uma série de moléculas, incluindo seus receptores e proteínas transdutoras de sinal, que permite a ativação de sua via, e logo, a efetivação de seu efeito final na célula. Assim, a caracterização do fosfoproteoma de *T. cruzi* nas nossas condições de estudo se torna objeto de grande utilidade para a identificação de uma série de proteínas responsivas a TGF- β , que podem participar

de sua via intracelular de transdução de sinal. O uso do corante fluorescente ProQ Diamond (Molecular Probes) viabilizou a detecção das fosfoproteínas nos géis bidimensionais com alta sensibilidade e linearidade. A coloração seguinte dos géis com o corante fluorescente Sypro Ruby (Molecular Probes) permitiu a avaliação do grau de expressão das proteínas presentes no gel, estivessem elas fosforiladas ou não.

Em nosso trabalho foi utilizada a forma evolutiva epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y). O uso desta forma é ideal para o desenvolvimento da tecnologia proteômica, pois qualquer tipo de contaminante proveniente de outros tipos celulares presente na amostra pode interferir seriamente na interpretação dos resultados. As formas amastigotas e tripomastigotas são obtidas a partir de culturas de células de mamíferos, sendo praticamente impossível obter total separação entre os componentes celulares dos parasitos daqueles dos mamíferos. Em contrapartida, as epimastigotas são mantidas em culturas axênicas, garantindo que todo material avaliado pertença exclusivamente ao parasito e possibilitando um maior controle e reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, trabalhos recentes do grupo demonstraram por diferentes tipos de ensaios biológicos que as formas epimastigotas de *T. cruzi* também são capazes de responder ao estímulo de TGF- β presente nas culturas (Waghabi, M.C., comunicação pessoal). A coleta dos parasitos foi feita sempre no mesmo dia de cultivo e ainda na fase de crescimento exponencial, assegurando que os parasitos estejam em plena atividade biológica, condição fundamental para a realização de nossos ensaios experimentais.

Inicialmente verificamos que a dose ideal para indução de fosforilação das proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* é de 5 ng/ml. A escolha da dose foi feita a partir da análise do perfil unidimensional dos extratos protéicos de *T. cruzi*, e por esta abordagem, observamos apenas diferenças sutis no padrão diferencial das bandas. Talvez a aplicação da metodologia bidimensional gerasse resultados mais precisos do que aqueles obtidos, mas este processo seria extenso demais para o período de realização do nosso trabalho. Dessa forma, resolvemos nos basear nos resultados das imagens unidimensionais e optamos pela dose que mostrou uma fosforilação um pouco mais acentuada, que é a de 5 ng/ml. Esta dose também coincide com aquela usada pelo grupo em outros ensaios experimentais com as diferentes formas de *T. cruzi* (Waghabi, M.C., comunicação pessoal).

Determinamos em seguida o tempo ótimo de incubação das epimastigotas a 4°C com TGF- β (5 ng/ml), capaz de induzir o maior número de eventos de fosforilação nas proteínas do parasito. As análises em géis unidimensionais não foram capazes de discriminar diferenças significativas entre os tempos estudados. Sendo assim, optamos por realizar os experimentos em géis bidimensionais, empregando todos os tempos acima.

As imagens dos géis bidimensionais mostraram que os perfis protéicos entre os tempos estudados apresentavam diferenças na fosforilação e expressão em função da adição de TGF- β . Esta informação indicou que cada tempo de estudo poderia estar mostrando uma etapa da cascata de eventos disparada pela adição de TGF- β no meio, e sendo assim, optamos por manter um estudo de cinética de tempo.

O uso de “strips” com faixa de pH 3 a 10 é bastante abrangente, o que permitiu a visualização da maioria das proteínas em um único gel. Como muitas proteínas são focalizadas na região central da faixa de pH 3 a 10, usamos gradientes não-lineares (NL), pois os mesmos permitem uma melhor resolução das proteínas na faixa central de pH.

Cada experimento bidimensional foi realizado em triplicatas biológicas, para que somente os dados reprodutíveis fossem selecionados. Notamos que no tempo de 1 minuto houve a indução do maior número de “spots” fosforilados, tanto na amostra não tratada (controle), quanto na tratada com TGF- β . A realização dos experimentos a 4°C retarda o desencadeamento de eventos da cascata de sinalização disparada por TGF- β , e tal fato, permitiu a visualização dos efeitos marcantes sobre a fosforilação de determinados grupos de proteínas em 1 minuto de incubação. O fato de que em 1 minuto também se observa a maior indução de fosforilação nas proteínas de epimastigotas não tratadas com TGF- β (controle) pode ser explicada como uma resposta do parasito para se adaptar ao novo ambiente, com temperatura mais baixa. A fosforilação ainda mais abundante nas proteínas de epimastigotas tratadas com TGF- β por 1 minuto a 4°C pode ser dada pela união de dois novos fatores introduzidos: resposta rápida à baixa na temperatura e adição de TGF- β no meio. Nos tempos mais longos de incubação (30 e 60 minutos) observa-se que a fosforilação das proteínas de ambas as amostras (tratadas ou não com TGF- β) é menos acentuada e que seus perfis tendem a se igualar. Este comportamento

pode estar refletindo o término dos eventos moleculares relacionados à adição de TGF- β ao meio. A resposta de adaptação ao choque térmico, neste momento, pode ou não estar encerrada ou em vias de finalização.

Um total de 463 “spots” foram retirados de géis de 7 ou 17 cm corados com Coomassie coloidal. Destes, 156 “spots” obtiveram identificação positiva, dos quais 38 foram destacados por apresentarem fosforilação e/ou expressão mais de duas vezes aumentada(s) ou diminuída(s) em resposta a TGF- β . Entre os analisados em nosso trabalho, 11 “spots” foram identificados como proteínas de choque térmico, 2 como proteínas de citoesqueleto, 14 como proteínas envolvidas em vias metabólicas, 4 como proteínas associadas ao processo de tradução, 2 como proteases/peptidases, 1 como proteína de regulação de estresse oxidativo, 1 como uma proteína envolvida na transdução de sinal e 3 como proteínas hipotéticas.

É válido ressaltar que para a maioria dos “spots” responsivos a TGF- β , a confirmação da identificação foi feita com pelo menos mais uma replicata biológica. Além disso, as identificações obtidas são confirmadas por dados de outros mapas proteômicos de *T. cruzi* obtidos em nosso laboratório (dados não publicados), e também por outros mapas proteômicos de *T. cruzi* presentes na literatura (Paba et al., 2004; Parodi-Talice et al., 2004; Sodre et al., 2009).

O projeto de sequenciamento do genoma de *T. cruzi* foi feito com base na cepa CL Brener, que é um híbrido de dois genótipos possuindo, assim, alelos distintos para a maioria dos genes. Mais de 50% do seu genoma consiste em sequências repetidas, como retrotransposons e genes para grandes famílias de moléculas de superfície, que incluem as trans-sialidases, mucinas, gp63s e uma nova grande família (mais de 1300 cópias) de proteínas de superfície associadas à mucina (El-Sayed et al., 2005).

As análises dos genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major* (Tritryp) mostram que esses organismos diferem de outros eucariotos no que diz respeito ao seu sistema de reparo de DNA e ao início da replicação, reflexo do seu DNA mitocondrial incomum. Embora o Tritryp não tenha identificado várias classes de moléculas de sinalização, seus quinomas contêm um grande e diversificado conjunto de proteínas quinases e fosfatases, cujo número e diversidade implicam em interações previamente desconhecidas e em processos regulatórios, que podem ser alvos de intervenção farmacológica (Atwood et al., 2005). Recentemente um grupo

de pesquisadores (Nakayasu et al., 2009) identificou, por espectrometria de massas, 237 fosfopeptídeos provenientes de 119 proteínas distintas de epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados indicam que a propagação de cascatas de sinalização celular por proteínas quinases e fosfatases desempenha um papel importante nos processos fisiológicos de *T. cruzi*, incluindo a motilidade celular, metabolismo, transporte de íons, diferenciação e sobrevivência.

É interessante lembrar que o tratamento da doença de Chagas é atualmente limitado a dois medicamentos, o nifurtimox e o benznidazol, que têm eficácia limitada e causam efeitos colaterais graves (Urbina & Docampo, 2003; Wilkinson et al., 2008). Além disso, não existe até o momento uma vacina contra *T. cruzi* para uso em humanos (Garg & Bhatia, 2005; Dumonteil, 2007). Portanto, há uma necessidade crítica de desenvolver novas estratégias terapêuticas para prevenir ou tratar a doença de Chagas. Em consonância com o interesse de desenvolver novos fármacos, a verificação de que *T. cruzi* possui uma série de quinases que participam de vias metabólicas não encontradas nos hospedeiros vertebrados, tem tornado essas proteínas alvos moleculares interessantes para o tratamento da doença de Chagas (Doerig, 2004; Nakayasu et al., 2009).

A análise das imagens dos géis bidimensionais pelo programa PDQuest (BioRad) permitiu a atribuição de um valor numérico para o grau de fosforilação e expressão de cada um dos “spots”. Apesar dos resultados gerarem valores precisos, sabemos que a técnica apresenta limitações por ser baseada na quantificação de proteínas através da avaliação de imagens. Este método de quantificação pode não ser preciso o suficiente para gerar afirmações numéricas exatas. Deste modo, com o intuito de tornar nossas análises menos suscetíveis a erros, nos concentramos apenas na indicação de aumento ou redução da fosforilação e/ou expressão das proteínas em estudo.

Nosso estudo identificou uma série de proteínas cuja fosforilação e/ou expressão parece estar alterada após a incubação de formas epimastigotas, por diferentes tempos, com TGF- β a 5 ng/ml. Essas proteínas são representadas nos géis bidimensionais por um ou mais “spots”. Nos casos onde diferentes “spots” (de mesma massa molecular, mas com pI diferentes) foram identificados para uma mesma proteína com idênticas sequências de aminoácidos, seus valores foram somados, na tentativa de avaliar o comportamento geral da proteína.

Os padrões de fosforilação e expressão das proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* em resposta a adição de TGF- β foram determinados nos tempos de 1, 5, 15, 30 e 60 minutos de incubação a 4°C. Tendo em vista os tempos de estudo podem representar etapas sequenciais da resposta induzida por TGF- β , é possível associar as proteínas que apresentaram fosforilação e/ou expressão alteradas em um tempo de estudo com determinado passo da via, e ainda, propor interações e/ou regulações das proteínas alteradas em tempos tardios pelas proteínas moduladas nos tempos mais curtos de incubação. As proteínas cuja fosforilação e/ou expressão foram moduladas em um ou mais tempo de estudo estão representadas na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Comportamento das proteínas em resposta a TGF- β .

Spot	Identificação	1'	5'	15'	30'	60'
Proteínas de choque térmico						
4+5	HSP70 precursor mitocondrial	↑		↓		
3+87+102	HSP70	↑↑		↓	↑↓	↓
6+7	HSP60	↑		↓		↑↓
2	DNAK	↑	↑			
10	Proteína de interação Hsc70	↑				
59	GrpE			↑	↑	↑
73	Ciclofilina A			↓	↑	
Proteínas de citoesqueleto						
9	Beta Tubulina	↑	↑↑		↓	↓↓
42	Beta Tubulina	↑		↓↓		↓
Proteínas de metabolismo						
15+16	Prostaglandina F2 alfa sintase (PGF2S)	↑	↑↑	↓		↑↓
25+26+28+29	Prostaglandina F2 alfa sintase (PGF2S)		↓↑	↓	↑↓	
48	Aldo-ceto redutase (AKR)				↓	
19+20	Enolase		↓↑	↓	↑↓	↑
39	GAPDH	↑↓	↓↑			↑
51	Malato desidrogenase glicossomal	↓	↑↑	↑↑		↑↓
31	Proteína dissulfeto isomerase (PDI)		↑			
32	Desidrogenase aromática L-alfa hidroxiácida (AHADH)		↑		↓	
27	Tirosina aminotransferase (TAT)			↓		
Proteínas Hipotéticas						
23+89	Hipotética			↓↓	↓↑	↓
17	Hipotética	↑	↑	↑	↓	↑
Proteínas associadas ao processo de tradução						
40	Complexo associado ao polipeptideo nascente (NAC)	↑	↓	↓	↑	
53	Fator de iniciação eucariótico 5a (FIE-5a)					↑
32a	Fator de alongamento 1 alfa (EF-1 α)		↑			
38	Fator de alongamento 1 alfa (EF-1 α)		↑			↓
Proteases/ Peptidases						
8	Cruzipaína (CZP)		↑		↓	
55	Subunidade proteolítica do complexo hslvu		↑	↑		

Proteínas de regulação de estresse oxidativo					
60	Triparedoxina peroxidase (TriX)				↑
Proteínas de transdução de sinal					
52	Fator de liberação de histamina dependente de IgE (FLHdIgE)	↑	↓	↑	↑↓

Tabela 5.1: tabela mostrando o comportamento nos padrões de fosforilação (setas verdes) e/ou expressão (setas vermelhas) de cada proteína ao longo dos tempos de estudo, em função da adição de TGF- β . O(s) número(s) do(s) "spot(s)" que representa(m) cada proteína está(ão) indicado(s) na coluna à esquerda. As proteínas estão ordenadas de acordo com as categorias funcionais indicadas nos resultados.

As proteínas de choque térmico foram inicialmente caracterizadas como proteínas responsivas a alterações bruscas na temperatura ambiente e a situações de estresse celular, mas também desempenham funções vitais no funcionamento celular, como envelhecimento, montagem, localização intracelular, secreção, regulação e endereçamento de proteínas instáveis para a via de degradação proteolítica (Bukau & Horwich, 1998; Nollen & Morimoto, 2002; Young et al., 2004; Mayer & Bukau, 2005). As HSP70 são constitutivamente expressas e estão localizadas em uma variedade de compartimentos celulares, como citoplasma, membrana, no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias e nos cloroplastos. O precursor mitocondrial HSP70 (MPHSP70) exerce a função molecular de chaperona junto a proteínas precursoras mitocondriais. Esses precursores são devidamente envelhados pela MPHSP70 no citoplasma, o que permite sua translocação à matriz mitocondrial, onde exercerão suas funções. A Hsc70 interage com a HSP70, participando no processo de envelhecimento protéico. Uma nova função putativa foi sugerida para estas proteínas, mostrando que as HSP70 e Hsc70 de mamíferos são capazes de se ligar seletivamente a certas sequências de RNA através do seu domínio N-terminal de ligação ATP. A ligação a molécula de RNA parece ser influenciada pela atividade da co-chaperonas HSP40 e pelo co-fator Bag (Zimmer et al., 2001).

Trabalhos recentes demonstraram que TGF- β e chaperonas podem estar diretamente relacionados. Bahn e colaboradores (2007) adicionaram TGF- β a explantes de células epiteliais de ratos previamente aquecidos a 45°C. Eles verificaram que as chaperonas desempenham papel protetor na transição epitélio-mesênquima induzida por TGF- β e estimulam a sobrevivência celular. Xin e colaboradores (2005) evidenciaram um novo mecanismo para regulação da sensibilidade de TGF- β dependente de CHIP (região carboxi-terminal da proteína de

interação Hsc70). CHIP regula os níveis basais de Smad 3, através da degradação ubiquitina-dependente desta proteína. Assim, CHIP é capaz de controlar a amplitude da resposta celular induzida por TGF- β .

O rápido aumento na fosforilação das proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70 e HSP70 precursor mitocondrial e da proteína de interação Hsc70) pode ser explicado como uma resposta combinada do parasito, onde o mesmo busca se adaptar à variação de temperatura do meio (mudança de 28 para 4°C), e também responder rapidamente ao estímulo com TGF- β . As proteínas de choque térmico podem estar atuando como reguladores de outras moléculas, possivelmente alterando suas conformações, o que pode resultar na translocação dessas moléculas do citoplasma para outras organelas, mudança de conformação para um estado ativo ou endereçamento para vias de degradação. A ligação às moléculas de RNA pode, por sua vez, estar regulando positiva ou negativamente a expressão de outras proteínas (através da estabilização ou desestabilização de mRNAs).

Nos procariotos, a proteína equivalente a HSP70 é denominada DnaK, e esta também exerce a função de chaperona e de ligação ao RNA. O aumento rápido na expressão dessas proteínas está provavelmente influenciando o aumento nas atividades já descritas para as proteínas de choque térmico. A GrpE é o co-fator da DnaK, auxiliando a proteína de choque térmico no enovelamento correto de proteínas. A DnaK parece ser capaz de se ligar a certas sequências de RNA, em um processo influenciado pela atividade da GrpE (Zimmer et al., 2001).

O aumento em tempos mais tardios na expressão da GrpE indica que ela pode estar sendo regulada positivamente por outras moléculas responsivas ou ativadas por TGF- β . Sua atividade deve estar relacionada tanto ao correto enovelamento de proteínas, como também a um possível papel na estabilização de moléculas de RNA, regulando a taxa de transcrição, e consequentemente, a expressão de determinadas proteínas.

As ciclofilinas (ou peptidil-prolil isomerases - PPlases) pertencem a um grupo de proteínas com atividade peptidil cis-trans isomerase, conhecidas coletivamente como imunofilinas. As PPlases são enzimas que aceleram o enovelamento de proteínas, catalisando a isomerização das ligações peptídicas anteriores aos resíduos de prolina. As ciclofilinas são encontradas em todas as células de todos os organismos procariotos e eucariotos estudados, entre eles, mamíferos, plantas,

insetos, fungos e bactérias (Marks, 1996). As ciclofilinas são proteínas de 18 kDa, estruturalmente conservadas, que compartilham um domínio comum de aproximadamente 109 aminoácidos, cercado por domínios exclusivos de cada membro da família, associados a compartimentalização subcelular e a especialização funcional (Arevalo-Rodriguez et al., 2004). Estudos recentes têm indicado uma série de funções celulares adicionais para as ciclofilinas, incluindo papéis na sinalização celular e como chaperonas (Wang & Heitman, 2005).

A redução na sua expressão em 15 minutos de incubação com TGF- β pode indicar que esta proteína esteja sendo negativamente regulada por outra molécula direta ou indiretamente ativada por TGF- β em algum dos tempos anteriores de estudo. A redução na sua atividade pode acarretar no retardamento do enovelamento protéico, e assim, atrasar o correto endereçamento e ativação de proteínas por ela reguladas. Pela sua função de chaperona, a redução na sua expressão pode levar a diminuição na marcação de proteínas para vias de degradação, gerando um aumento na abundância de certas proteínas. Contudo em 30 minutos, a sua expressão é aumentada sugerindo retorno da sua atividade fisiológica.

Com relação às proteínas de citoesqueleto, temos que as α e β -tubulinas são os principais componentes dos microtúbulos. As tubulinas delta são encontradas em diversas localidades celulares, mas ao contrário das tubulinas α e β , elas não são igualmente distribuídas entre os eucariotos. As delta tubulinas já foram localizadas nos centríolos e desempenham uma função na formação do fuso mitótico durante a mitose (Dutcher, 2001). Essas proteínas sofrem uma série de modificações pós-traducionais, incluindo acetilação, tirosinação, fosforilação, poliglutaminação e poliglicilação (Chapin & Bulinski, 1991). Os microtúbulos são os principais componentes do citoesqueleto dos tripanossomatídeos e desempenham um papel importante nas mudanças morfológicas associada do seu ciclo de vida (Kohl & Gull, 1998). O citoesqueleto dos tripanossomas é composto por um arranjo complexo de microtúbulos, que incluem a rede subpelicular, o axonema, o corpo basal, o eixo para-flagelar, a zona de aderência ao flagelo e os filamentos responsáveis pela fixação do parasita às células hospedeiras (Robinson et al., 1991).

Alterações na expressão das tubulinas ocorrem durante o ciclo de vida dos tripanossomatídeos, e são responsáveis por uma série de adaptações bioquímicas e

morfológicas sofridas pelos parasitos. Estudos mostraram que a quantidade de transcritos de α e β -tubulinas parece ser de 3 a 6 vezes maior em epimastigotas do que em tripomastigotas e amastigotas, apesar de suas taxas de transcrição serem bastante similares em epimastigotas e amastigotas (Bartholomeu et al., 2002). Um estudo sobre a expressão dos genes de tubulina durante o crescimento de formas epimastigotas do *T. cruzi* por Northern blot mostrou que há uma diminuição nos níveis de mRNAs de α e β -tubulinas quando as epimastigotas passam da fase logarítmica para a fase estacionária de crescimento (Gonzalez-Pino et al., 1999). As alterações foram associadas com uma diminuição semelhante nas taxas de transcrição para ambos os genes. Este estudo observou ainda que a expressão de β -tubulina parece ser controlada em nível pós-transcricional.

A proteína β -tubulina é representada em nosso mapa proteômico pelos “spots” 9 e 42, que apresentam comportamentos diferentes em seus padrões de fosforilação e expressão ao longo de nosso tempo de estudo. Considerando que a β -tubulina é uma proteína encontrada em diversas estruturas do parasito, e que os dois “spots” que a representam em nosso mapa possuem pesos moleculares e pontos isoelétricos bem distintos, é possível que estejamos analisando β -tubulinas de diferentes localizações celulares, que exercem diferentes funções na estrutura celular do parasito. O aumento rápido na expressão da β -tubulina representada pelo “spot” 9 pode indicar que a mesma já existia pronta em vesículas ou organelas de reserva. Um aumento rápido na taxa de transcrição de seu RNA também é possível, apesar de parecer pouco provável pelo curto período de tempo que o parasito teria para re-organizar sua maquinaria replicativa. Outra explicação seria a da redução na taxa de degradação dos mRNAs, o que levaria a um aumento na quantidade de proteínas traduzidas pela célula. A redução mais tardia na expressão de ambos os “spots” pode ser por causa da regulação negativa das β -tubulinas por parte de outras moléculas envolvidas direta ou indiretamente na via de sinalização por TGF- β . Em resposta a TGF- β , as β -tubulinas podem estar alterando a organização dos microtúbulos, permitindo a ocorrência de novas interações entre as moléculas das epimastigotas.

Entre as proteínas envolvidas no metabolismo celular, a prostaglandina F₂alfa sintase (PGFS) é uma aldo-ceto redutase que pertence à família oxidoredutase flavina-dependente (Kubata et al., 2000). Esta enzima localiza-se no citoplasma das epimastigotas (Blehert et al., 1999) e, além da produção de prostaglandinas, tem a

capacidade de reduzir tanto agentes tripanocidas (nifurtimox e outros) como hidroperóxidos. Tem sido sugerido que a Prostaglandina F2 alfa sintase de *T. cruzi* (TcPGFS) seja responsável pela maior parte da atividade antioxidante neste parasito (Kubata et al., 2000). A PGFS catalisa a redução dependente de NADPH da 9,11-endoperóxido a prostaglandina F2 alfa (Okano et al., 2002). A PGFS é uma proteína com estrutura do tipo TIM barrel, e logo, possui um motivo conservado de ligação ao fosfato. O fosfato vem do substrato ao qual a enzima se liga, ou de co-fatores, como a riboflavina-5'-fosfato (FMN).

O aumento na sua fosforilação sugere maior atividade da PGFS, o que pode estar levando ao aumento na síntese de prostaglandinas, que são compostos lipídicos derivados de ácidos graxos, que se ligam a receptores de membranas, como os receptores de membrana acoplados a proteína G. O aumento na síntese das prostaglandinas pode estar associado a regulação de cálcio e ao controle do crescimento e a proliferação celular.

As aldo-ceto redutases (AKR) são oxidoreduases monoméricas, amplamente distribuídas em mamíferos, anfíbios, plantas, fungos, bactérias e protozoários (Mathe et al., 1977; Samuelsson, 1979; Kubata et al., 2000; Ellis, 2002). As AKRs formam uma superfamília de NAD(P)(H) oxidoreduases solúveis, cujo principal objetivo é o de reduzir aldeídos e cetonas a álcoois primários e secundários. As AKRs exibem ampla especificidade de substrato e catalisam a oxidação e/ou redução de substratos, como as prostaglandinas, hormônios esteróides, monossacarídeos, isoflavonóides, aldeídos alifáticos e aromáticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (McCracken et al., 1972; Dubois et al., 1998; Hayaishi, 2000; Okano et al., 2002).

A redução na expressão da AKR indica que a mesma é negativamente regulada por moléculas envolvidas ou ativadas na sinalização por TGF- β . A identificação genérica da proteína como uma aldo-ceto redutase diminui nossas chances de relacionar sua regulação negativa a moléculas ou vias específicas, já que este grupo é formado por uma série de enzimas com funções diversificadas.

A enzima enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase), também conhecida como fosfopiruvato desidratase, é uma metaloenzima responsável por catalisar a desidratação reversível da D-2-fosfoglicerato (PGA) a fosfoenolpiruvato (PEP), tanto na glicólise como na gliconeogênese (Verlinde et al., 2001). A enolase é uma

proteína com dobradamento do tipo TIM “barrel”, possuindo um motivo conservado de ligação ao fosfato. O grupamento fosfato é proveniente tanto de seu substrato como de co-fatores, como a riboflavina-5'-fosfato (FMN). A enolase também já foi descrita como um componente estrutural do degradosoma de RNA de procariotos, promovendo a degradação de moléculas de RNA nestes microorganismos (Kuhnel & Luisi, 2001; Carpousis, 2002). Dessa forma, além de atuar como uma enzima metabólica, a enolase parece também ser induzida por proteínas de choque térmico (entre elas, a DnaK), como parte da resposta a situações de estresse celular.

A defosforilação da enolase pode estar relacionada à redução na sua atividade, acarretando na perda de produção de energia e na regulação positiva ou negativa da degradação de moléculas de RNA.

A enzima glicosomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) desempenha várias funções importantes no processo glicolítico. A GAPDH catalisa a oxidação e a fosforilação da D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP) a 1,3-bifosfo-D-ácido glicérico (1,3-BPGA) na presença de NAD⁺ e de fosfato inorgânico (Tisdale & Artalejo, 2007). Além da sua função no metabolismo da glicose, a GAPDH exerce múltiplas atividades intracelulares, incluindo a participação na ativação da transcrição (Zheng et al., 2003) no transporte vesicular (Tisdale, 2001), na fusão membrana-membrana, na modulação do citoesqueleto, no reparo e replicação do DNA, na apoptose (Tarze et al., 2007) e na exportação do tRNA (Tisdale & Artalejo, 2007).

Sua rápida ativação pode estar associada a um maior requerimento de energia para a viabilização da resposta celular induzida por TGF- β . A GAPDH pode também estar ativando ou ampliando a transcrição de genes, gerando ou aumentando a expressão de proteínas que atuarão na via de sinalização de TGF- β . Além disso, a GAPDH pode estar associada ao transporte de moléculas, permitindo o surgimento de novas interações celulares.

A malato desidrogenase é uma proteína que se liga a NAD, sendo seus sítios ativos altamente conservados, compartilhando um mecanismo catalisador comum (Golding & Dean, 1998). A malato desidrogenase citosólica e a malato desidrogenase mitocondrial trabalham juntas na maioria dos organismos eucarióticos, permitindo a re-oxidação mitocondrial do NADH glicolítico produzido no citosol. Contudo, os tripanossomatídeos são uma exceção, porque a maioria das

enzimas glicolíticas, incluindo a GAPDH, estão presentes no glicosoma (Cannata & Cazzulo, 1984). O sistema de trocas envolve principalmente as malato desidrogenases glicosomal e mitocondrial (Cannata & Cazzulo, 1984; Cazzulo, 1994), e logo, uma malato desidrogenase citosólica se torna inútil para o que pode ser considerado o papel mais importante desta enzima em outros organismos.

A malato desidrogenase encontrada no nosso estudo é glicosomal, e assim, desempenha papel importante no metabolismo do *T. cruzi*. O decréscimo na sua fosforilação sugere a redução na atividade desta proteína, o que deve estar afetando a re-oxidação do NADH e, portanto, o transporte de elétrons e a produção de energia pelo parasito.

As proteínas dissulfeto isomerasas (PDIs) são tiol-dissulfeto oxidoreduases que catalisam a formação, redução e isomerização de ligações dissulfeto, dependendo do ambiente redox, e também podem funcionar como chaperonas moleculares, auxiliando no enovelamento de proteínas, embora este mecanismo não esteja completamente elucidado (Noiva & Lennarz, 1992; Ferrari & Soling, 1999; Rubotham et al., 2005).

O aumento na sua expressão pode estar relacionado à sua maior ativação, o que reflete na geração de uma série de reações envolvidas na formação e ruptura de pontes dissulfeto, as quais desempenham papel importante no enovelamento e estabilidade de proteínas.

No *T. cruzi*, a desidrogenase aromática L-alfa-hidróxi-ácida (AHADH) está envolvida no catabolismo de aminoácidos aromáticos. Esta é uma enzima citosólica muito ativa ligada a NAD (Nowicki et al., 1992), que reduz os alfa-oxiácidos aromáticos para L-alfa-hidróxi-ácidos (Cazzulo Franke et al., 1999).

Embora a AHADH seja completamente incapaz de usar oxaloacetato ou piruvato como substrato, esta enzima apresenta semelhanças na sua sequência de aminoácidos com as enzimas malato desidrogenase e lactato desidrogenase, onde a maior similaridade foi observada com a malato desidrogenase citosólica (Montemartini et al., 1994). As epimastigotas, durante sua vida no intestino do inseto, são quase que exclusivamente dependentes de aminoácidos e proteínas como fontes de energia, porque a glicose presente no repasto sanguíneo é rapidamente esgotada. A expressão diferencial da AHADH nas várias formas do

parasito, com os níveis mais elevados da enzima nas formas do inseto (epimastigota e tripomastigotas metacíclicos), está de acordo com a possibilidade de um catabolismo de aminoácidos mais ativo realizado por essas formas. Isto significa que elas devem ter suas vias catabólicas conectadas (pelo menos parcialmente) a um ciclo de Krebs e a uma cadeia respiratória funcionais, permitindo a utilização de aminoácidos como combustível (Nowicki & Cazzulo, 2008).

O aumento na expressão da AHADH deve estar relacionado ao aumento na degradação de proteínas para geração de energia e de aminoácidos livres, processo essencial, por exemplo, para aceleração no seu desenvolvimento e proliferação.

As epimastigotas de *T. cruzi* têm um conjunto intracelular considerável de aminoácidos livres, que são utilizados na síntese de proteínas e na produção de energia (Rohloff et al., 2003). As principais enzimas envolvidas na troca e eliminação do nitrogênio do grupo amino são as aminotransferases, muitas das quais transferem o grupo amino a 2-oxoglutarato para gerar L-glutamato. A tirosina aminotransferase (TAT) de *T. cruzi* é muito abundante, representando 3% do total de proteínas solúveis; o genoma de *T. cruzi* possui aproximadamente 70 cópias do gene *tat* (Bontempi et al., 1993). Enquanto a TAT dos mamíferos prefere tirosina e alfa-cetoglutarato como substratos (Iwasaki et al., 1973), a enzima de *T. cruzi* aceita três alfa-cetoácidos (piruvato, a-cetoglutarato e oxaloacetato), todos os três aminoácidos aromáticos e alanina como substratos (Montemartini et al., 1993). Esta enzima tem uma ampla especificidade de substrato, utilizando de forma eficiente a leucina, metionina, tirosina, fenilalanina, triptofano e alanina como doadores de aminoácidos (Montemartini et al., 1993; Nowicki et al., 2001; Blankenfeldt et al., 1999).

A redução na sua expressão sugere que a TAT esteja sendo negativamente regulada por outra molécula direta ou indiretamente ativada por TGF- β em algum dos tempos anteriores de estudo e indica uma diminuição na síntese de algumas proteínas e menor produção de energia pela via da TAT.

Entre as proteínas envolvidas no processo de tradução, temos o complexo associado ao polipeptídeo nascente (NAC), que se associa com ribossomos e cadeias nascentes em uma estequiometria aparente de 1:1 (Wiedmann et al., 1994; Funfschilling & Rospert, 1999; Rospert et al., 2002; Olesya, 2009). A NAC é um complexo heterodimérico altamente conservado, presente em arqueobactérias,

leveduras e células de mamíferos. O conhecimento sobre sua função *in vivo* ainda apresenta várias lacunas a serem preenchidas. Alguns estudos especulam que a NAC desempenha um papel no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas, protegendo-as da interação com fatores citosólicos inadequados. Estudos mostram que a NAC pode contribuir para a fidelidade nos processos co-traducionais tais como marcação de alvos e enovelamento (Wang et al., 1995). Há também evidências de que a NAC interaja diretamente com a sequência de reconhecimento de sinal e está envolvida na translocação correta de proteínas para o retículo endoplasmático, através da regulação da acessibilidade do poro de translocação e evitando a marcação errada de proteínas não secretórias (Lauring et al., 1995; Moller et al., 1998). Além disso, um papel regulador da NAC na importação de proteínas para a mitocôndria foi proposto (George et al., 1998; Funfschilling & Rospert, 1999), no entanto, ainda não há evidência direta para apoiar esta hipótese.

A ativação da NAC em resposta a TGF- β pode estar relacionada à síntese de proteínas corretamente enoveladas e ao endereçamento dessas moléculas ao retículo endoplasmático e ao Golgi, onde provavelmente sofrerão modificações pós-traducionais que permitirão o encaminhamento ao local onde exercerão suas atividades celulares.

O fator eucariótico de iniciação da tradução 5A (EIF-5a) é uma proteína de 18 kDa, altamente conservada desde leveduras a células de mamíferos (Schnier et al., 1991; Park et al., 1997; Caraglia et al., 2000). A EIF-5a promove a formação da primeira ligação peptídica durante a fase inicial da síntese de proteínas (Hershey, 1991). Entretanto, a verdadeira função “*in vivo*” da EIF-5a, é apenas parcialmente conhecida. Uma série de observações sugere que a EIF-5a desempenha um papel essencial no crescimento e diferenciação celular. A EIF-5a pode ser uma proteína bimodular, interagindo tanto com RNA quanto com proteínas, e presume-se assim, que ela possua um papel importante na maquinaria de tradução (Park, 2006). Outras funções foram propostas para a EIF-5a, incluindo a de co-fator celular da proteína REV de HIV-1 (Ruhl et al., 1993), de um fator envolvido na exportação nuclear (Lipowsky et al., 2000) e no “turnover” de mRNA (Zuk & Jacobson, 1998; Valentini et al., 2002). A EIF-5a é encontrada no citoplasma em duas situações: uma é livre e a outra é vinculada ao retículo endoplasmático (provavelmente o seu local de ação apropriado) (Shi et al., 1996). No entanto, foi também recentemente relatado que a EIF-5a pode se acumular nos filamentos intranucleares associados ao poro nuclear

em células de mamíferos (Rosorius et al., 1999). Além disso, o fator interage com o receptor nuclear geral de exportação CRM1 e é transportado do núcleo para o citoplasma (Rosorius et al., 1999). Estes dados indicam que a EIF-5A pode também funcionar como uma proteína de translocação núcleo-citoplasma de mRNAs eventualmente correlacionados com a proliferação celular.

O aumento na fosforilação da EIF-5a indica uma resposta tardia desta proteína à sinalização disparada por TGF- β . Sua ativação deve estar relacionada à regulação da tradução de proteínas, e logo, a produção de novas proteínas, que podem ser os efetores da resposta celular a TGF- β .

O fator de alongamento-1 α (EF-1 α) desempenha papel essencial na biossíntese de proteínas eucarióticas (Billaut-Mulot et al., 1996). A EF-1 α se liga a aminoacil-tRNAs no sítio acceptor da subunidade ribossomal 80S através da hidrólise de GTP (Moazed & Noller, 1989). A EF-1 α possui uma série de outras funções além da biossíntese de proteínas. Esta proteína foi encontrada em associação com a valil-tRNA sintetase de mamíferos, complexadas a partículas mRNP, ligada a actina do citoesqueleto da célula, ligada ao retículo endoplasmático ou ao aparato mitótico, estando envolvida na degradação de proteínas ou em associação ao ribossomo (Merrick, 1992). A EF-1 α também tem sido relacionada a uma variedade de processos, como a embriogênese, a divisão celular, a proliferação celular, o envelhecimento e a transformação oncogênica (Janssen et al., 1994). Além disso, uma quantidade considerável de EF-1 α foi localizada no núcleo de diversos tipos de células (Collings et al., 1994; Barbarese et al., 1995). Existe ainda a possibilidade da EF-1 α desempenhar um papel na regulação da transcrição (Blumenthal et al., 1972).

Grandes aumentos nos níveis de mRNA de EF1 α são observadas em células de cultura de rápida proliferação (Sanders et al., 1992), nos embriões (Krieg et al., 1989) e em células tumorais humanas de proliferação rápida (Grant et al., 1992). Estes dados indicam que o nível de expressão de EF1 α se correlaciona com a taxa de crescimento e proliferação celular (Condeelis, 1995). Ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpos para a EF-1 α de *T. cruzi* (TCEF-1 α), visando estudar a distribuição celular da (TCEF-1 α) durante o crescimento in vitro de epimastigotas, revelaram que esta proteína é acumulada no núcleo de parasitos em processo de envelhecimento mostrando níveis elevados de células binucleadas, indicativo de parada na citocinese, e aqueles em processo de morte por apoptose,

sugerindo, portanto, que a TCEF-1 α é capaz de fazer a translocação entre citoplasma e núcleo celular (Billaut-Mulot et al., 1996; Ouaiissi, 2003).

No nosso estudo, a EF-1 α tem sua expressão aumentada em resposta ao TGF- β , podendo, portanto, estar participando da regulação da síntese de proteínas, influenciando positivamente na proliferação das epimastigotas.

Entre as proteases/peptidases, temos a cruzipaina (CZP), uma cisteína protease do tipo papaína, que parece ser maturada no complexo de Golgi (Engel et al., 1998) e é altamente acumulada (Soares et al., 1992) e ativa (Cunha-e-Silva et al., 2002) nos reservossomas, que contêm proteínas usadas na diferenciação para tripomastigotas metacíclicos (Soares et al., 1992). A via que endereça a cruzipaina aos reservossomas não é totalmente compreendida, porém trabalhos anteriores sugerem que esta enzima seja transportada do complexo de Golgi através de vesículas secretórias (Soares et al., 1992) em uma via independente de manose 6-fosfato (Cazzulo et al., 1990). A CZP é expressa em diferentes níveis nas diferentes formas evolutivas do parasito (Cazzulo et al., 1990; Martinez et al., 1991). Esta enzima é a principal protease encontrada na forma epimastigota, sendo ativa pelo menos dez vezes mais nesta forma do que nas amastigotas e tripomastigotas (Campetella et al., 1990; Sant'Anna et al., 2008).

A endocitose e a reciclagem de proteínas são vias metabólicas essenciais para o desenvolvimento do ciclo de vida do *T. cruzi* (De Souza, 2002). A via endocítica está sob controle rigoroso de desenvolvimento nas diferentes fases do ciclo de vida do parasito. As formas epimastigotas são altamente ativas e armazenam macromoléculas obtidas do meio em estruturas denominadas reservossomas (Soares & de Souza, 1991). Esta estrutura não foi observada em formas tripomastigotas ou amastigotas (Soares & de Souza, 1991). Durante o processo de diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, a conversão da forma proliferativa para a forma infectante é realizada com consumo de energia e é dependente da disponibilidade de aminoácidos, sendo necessário o uso dos substratos resultantes da degradação de moléculas pela via endocítica (Soares et al., 1989). Utilizando uma abordagem imunocitoquímica, a cruzipaina também foi localizada na membrana plasmática e na bolsa flagelar do parasito (Souto-Padron et al., 1990). Portanto, é possível que pelo menos uma fração da CZP seja primeiramente endereçada para a superfície do parasito, e em seguida,

internalizada como parte da via endocítica e encaminhada aos reservossomas. Já foi descrita na literatura uma relação entre TGF- β e cruzipaína. A adição de cruzipaína à macrófagos de murinos induziu um aumento na secreção de TGF- β (Stempin et al., 2002). A cruzipaína foi sugerida ainda como a provável molécula ativadora de TGF- β em *Trypanosoma cruzi* (Waghabi et al., 2005b).

A Cruzipaína também está envolvida na virulência do *T. cruzi*. Embora esteja menos presente em amastigotas e tripomastigotas, a cruzipaína é um antígeno imunodominante reconhecido nos soros de pacientes humanos com a doença de Chagas crônica (Martinez et al., 1991; Cazzulo, 2002).

O aumento na expressão da cruzipaína pode estar associado ao aumento na atividade desta proteína, que em resposta a TGF- β deve regular a degradação e reciclagem de proteínas nos reservosomas de *T. cruzi*.

O complexo HsIVU consiste em dois componentes: o componente HsIU, que atua como chaperona e ATPase (Rohrwild et al., 1996; Neuwald et al., 1999; Seong et al., 2000), e o componente HsIV, a treonina protease amino-terminal (Chuang et al., 2005), que confere a atividade peptidase (Azim et al., 2005). A protease HsIVU está envolvida na proteólise de proteínas de vida curta, como a proteína inibidora da divisão celular Sula (Cordell et al., 2003), o fator de choque térmico 32 (Kanemori et al., 1997), e o ativador de transcrição RcsA (Torres-Cabassa & Gottesman, 1987). A protease HsIVU é considerada como um análogo de bactérias do proteassoma 26S eucariótico (Rohrwild et al., 1996; Gille et al., 2003). Essas proteases desempenham um papel essencial no controle dos níveis das principais proteínas reguladoras e na eliminação de polipeptídeos anormais (Park et al., 2005).

O aumento na expressão da subunidade proteolítica do complexo Hsvlu deve se relacionar ao aumento de sua atividade, e assim, esta molécula pode estar desempenhando função semelhante a da cruzipaína, regulando a degradação de proteínas do parasito.

A triparedoxina peroxidase (TriX) 1 é uma tiol-dissulfeto oxidoredutase encontrada em parasitos tripanosomatídeos pertencentes à ordem Kinetoplastida. A principal função biológica da TriX é a de regular o estresse oxidativo como um componente da via da tripanotiona peroxidase (Alphey et al., 2003). Em *Leishmania* e outros tripanosomatídeos, as enzimas da família triparedoxina peroxidase são

consideradas as principais responsáveis pela detoxicação de peróxidos, protegendo as células de danos causados pelo estresse oxidativo (Flohe et al., 2003). Estas enzimas obtêm seus equivalentes redutores da tripanotona, através da proteína triparedoxina ditiol (Wyllie et al., 2008). Várias enzimas antioxidantes, incluindo a triparedoxina peroxidase mitocondrial (TcMPX) são reguladas positivamente durante a transformação da forma não infectiva do inseto (epimastigota) para a forma infectiva tripomastigota metacíclica (Atwood et al., 2005; Piacenza et al., 2008).

O aumento tardio na expressão da triparedoxina peroxidase indica a necessidade prévia da ativação de outras moléculas pela via de TGF- β . TGF- β está envolvido na proliferação das epimastigotas e este evento é fruto de uma série de interações moleculares. O aumento na proliferação das epimastigotas pode estar associado aos primeiros sinais para a diferenciação das epimastigotas em tripomastigotas que, como descrito na literatura, regula positivamente a triparedoxina peroxidase. A ativação da triparedoxina peroxidase deve ocorrer em etapas anteriores à diferenciação, ainda na fase de proliferação das epimastigotas.

O fator de liberação de histamina dependente de IgE está envolvido primordialmente na resposta imunológica produzida por células do sistema de defesa em eucariotos superiores, sendo também conhecida como proteína tumoral traducionalmente controlada (TCTP). A TCTP é expressa em tecidos mitoticamente ativos (Thiele et al., 2000). Em inúmeras situações experimentais e sistemas biológicos, foi estabelecido que os níveis de TCTP são altamente regulados em resposta a uma ampla gama de sinais extracelulares e às condições celulares. Vários relatos destacaram a importância da TCTP para a progressão do ciclo celular e a transformação maligna (Bommer & Thiele, 2004). Normalmente, os sinais de crescimento (Bommer et al., 2002) e citocinas (Nielsen et al., 1998; Teshima et al., 1998) foram relatados por rapidamente induzir a síntese desta proteína. Além disso, a TCTP exerce uma função extracelular como fator de liberação de histamina e tem atividade anti-apoptótica (MacDonald et al., 1995). A TCTP já foi caracterizada em vários organismos parasitos, tais como subespécies de *Plasmodium* (Bhisutthibhan et al., 1999; Walker et al., 2000) e vários vermes parasitos (Gnanasekar et al., 2002; Rao et al., 2002). Em todos estes casos, a proteína do parasito é secretada no organismo hospedeiro e é capaz de causar infiltrados inflamatórios de eosinófilos (Gnanasekar et al., 2002; Rao et al., 2002) e / ou liberação de histamina de basófilos (Rao et al., 2002; MacDonald et al., 2001).

Várias condições de estresse, como privação de nutrientes (Bommer et al., 2002; Bonnet et al., 2000), choque térmico, metais pesados, estresse de cálcio (Xu et al., 1999) ou sinais pró-apoptóticos ou citotóxicos (Sinha et al., 2000) resultam tanto na regulação positiva como negativa dos níveis de TCTP (Bommer et al., 2002; Gachet et al., 1999). A adaptação rápida dos níveis da proteína TCTP a alterações nas condições celulares nos mostra que tanto sua síntese como a degradação são altamente reguladas, existindo várias evidências mostrando que a síntese de TCTP é regulada, tanto no nível transcricional como traducional (Bommer et al., 2002).

TCTP possui uma região de ligação a tubulina e foi mostrado que em células de mamíferos, parte desta proteína se liga aos microtúbulos durante a maior parte do ciclo celular (Gachet et al., 1999). Os níveis de TCTP são regulados positivamente durante a entrada das células no ciclo celular, e logo, acredita-se que esta proteína seja importante para o crescimento e divisão celular. A maioria das publicações descreve a TCTP como uma proteína citoplasmática, mas sua localização nuclear também já foi relatada (Li et al., 2001).

A ativação desta proteína em formas epimastigotas de *T. cruzi* em resposta ao TGF- β pode estar associada a uma série de processos celulares. Assim como as proteínas de choque térmico, a TCTP pode estar sendo duplamente ativada: como resposta à baixa na temperatura do ambiente e em resposta a adição de TGF- β ao meio. Com relação à última, a TCTP pode estar envolvida na proliferação das epimastigotas. Uma hipótese seria a da ligação desta proteína às tubulinas, de modo a provocar re-estruturações no parasito e permitir que novas interações celulares ocorram.

A fosforilação de proteínas está fortemente associada aos processos de sinalização celular e de desenvolvimento nos eucariotos. Apesar do amplo espectro de informação gerado pela fosfoproteômica, é extremamente desafiador conectar as quinases em estudo com seus devidos alvos moleculares. O desafio de associar as quinases a seus substratos reflete a complexidade das funções desempenhadas por essas proteínas. As quinases tendem a exercer seus efeitos biológicos através da fosforilação simultânea de múltiplos resíduos, muitas vezes em componentes de complexos protéicos múltiplos. Embora estes eventos de fosforilação sejam biologicamente significantes, a identificação das quinases responsáveis por eles se torna extremamente difícil. Por isso, apesar de termos identificado uma série de

proteínas responsivas a TGF- β , constitui tarefa difícil relacionar o papel de cada uma delas na sinalização disparada por TGF- β .

Por último, fizemos um ensaio de proliferação das epimastigotas na presença ou não de TGF- β nas culturas. A adição da citocina no meio promoveu um aumento de até 73% no crescimento dos parasitos nas primeiras 24 horas de estudo. Com 48 e 72 horas ainda é observado um aumento na proliferação devido à adição de TGF- β , porém este já não é tão acentuado. Esse dado acrescenta importância ao papel de TGF- β sobre a forma epimastigota de *T. cruzi* e reforça a relevância do nosso estudo, mostrando que esta forma evolutiva também é influenciada positivamente pela citocina em questão.

Considerações Finais

Este estudo integra um amplo conjunto de trabalhos elaborados em nosso laboratório, que visam compreender a relação de TGF- β com o *T. cruzi*. Aprofundar nosso conhecimento acerca de quais papéis TGF- β desempenha e de como os mesmos são executados no parasito é uma oportunidade para entender melhor como *T. cruzi* regula as diferentes etapas de seu ciclo de vida, e conseqüentemente, como ele consegue se desenvolver nos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. A compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à sinalização por TGF- β em *T. cruzi* pode ser de grande relevância para a busca de novos alvos que visem o tratamento ou até mesmo a cura da doença de Chagas. Nosso estudo mostrou que algumas proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* respondem aos estímulos de TGF- β , mas o papel exato que elas desempenham na sua via de sinalização continua sendo objeto de investigação em nosso laboratório. De uma forma geral, podemos dizer que as epimastigotas respondem ao estímulo de TGF- β , que por sua vez é capaz de interagir direta e indiretamente com proteínas do parasito, alterando seus padrões de fosforilação e modulando seus níveis de expressão. TGF- β deve, então, ativar ou desativar via(s) específica(s) do parasito, podendo causar um aumento na sua proliferação, e possivelmente, regulando outras funções celulares neste microorganismo.

7. CONCLUSÕES

Após a realização de nosso estudo, podemos concluir que:

- ✓ A dose de 5 ng/ml de TGF- β induziu o maior número de eventos de fosforilação nas proteínas das epimastigotas de *T. cruzi*;
- ✓ A metodologia fosfoproteômica se mostrou eficaz na caracterização das proteínas de epimastigotas de *T. cruzi* diferencialmente fosforiladas e/ou expressas em resposta a TGF- β ;
- ✓ No estudo de cinética de tempo, os perfis protéicos bidimensionais das epimastigotas tratadas com 5 ng/ml de TGF- β por 1, 5, 15, 30 ou 60 minutos apresentaram diferenças nos padrões de fosforilação e/ou expressão de algumas proteínas;
- ✓ As proteínas responsivas à TGF- β estão relacionadas a diversas funções celulares, entre elas, enovelamento protéico, resposta a choque térmico, formação de citoesqueleto, síntese de proteínas, transdução de sinal, sendo as mais abundantes envolvidas no metabolismo celular;
- ✓ TGF- β modulou positivamente o processo de proliferação das epimastigotas de *T. cruzi*.

8. REFERÊNCIAS

- Agrawal, GK, Thelen, J. A high-resolution two dimensional gel- and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. In: Graauw, Md, editor. Phospho-Proteomics, Methods and Protocols. New York: Humana Press; 2009. p. 3-19.
- Almeida-de-Faria, M, Freymuller, E, Colli, W, Alves, MJ. Trypanosoma cruzi: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp Parasitol. 1999 Aug;92(4):263-74.
- Alphey, MS, Gabrielsen, M, Micossi, E, Leonard, GA, McSweeney, SM, Ravelli, RB, et al. Tryparedoxins from Crithidia fasciculata and Trypanosoma brucei: photoreduction of the redox disulfide using synchrotron radiation and evidence for a conformational switch implicated in function. J Biol Chem. 2003 Jul 11;278(28):25919-25.
- Anders, RA, Arline, SL, Dore, JJ, Leaf, EB. Distinct endocytic responses of heteromeric and homomeric transforming growth factor beta receptors. Mol Biol Cell. 1997 Nov;8(11):2133-43.
- Andrade, SG, Grimaud, JA, Stocker-Guerret, S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with Trypanosoma cruzi. Am J Trop Med Hyg. 1989 Mar;40(3):252-60.
- Andrews, NW. The acid-active hemolysin of Trypanosoma cruzi. Exp Parasitol. 1990 Aug;71(2):241-4.
- Araujo-Jorge, TC, Waghabi, MC, Hasslocher-Moreno, AM, Xavier, SS, Higuchi Mde, L, Keramidas, M, et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardopathy. J Infect Dis. 2002 Dec 15;186(12):1823-8.
- Araujo-Jorge, TC, Waghabi, MC, Soeiro Mde, N, Keramidas, M, Bailly, S, Feige, JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of Trypanosoma cruzi infection and consequent Chagasic myocardopathy. Cytokine Growth Factor Rev. 2008 Oct-Dec;19(5-6):405-13.

- Arevalo-Rodriguez, M, Wu, X, Hanes, SD, Heitman, J. Prolyl isomerases in yeast. *Front Biosci.* 2004 Sep 1;9:2420-46.
- Atwood, JA, 3rd, Weatherly, DB, Minning, TA, Bundy, B, Cavola, C, Opperdoes, FR, et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science.* 2005 Jul 15;309(5733):473-6.
- Ayub, MJ, Atwood, J, Nuccio, A, Tarleton, R, Levin, MJ. Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Apr 24;382(1):30-4.
- Azim, MK, Goehring, W, Song, HK, Ramachandran, R, Bochtler, M, Goettig, P. Characterization of the HsIU chaperone affinity for HsIV protease. *Protein Sci.* 2005 May;14(5):1357-62.
- Bakin, AV, Rinehart, C, Tomlinson, AK, Arteaga, CL. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci.* 2002 Aug 1;115(Pt 15):3193-206.
- Banh, A, Deschamps, PA, Vijayan, MM, Sivak, JG, West-Mays, JA. The role of Hsp70 and Hsp90 in TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in rat lens epithelial explants. *Mol Vis.* 2007;13:2248-62.
- Barbarese, E, Koppel, DE, Deutscher, MP, Smith, CL, Ainger, K, Morgan, F, et al. Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J Cell Sci.* 1995 Aug;108 (Pt 8):2781-90.
- Barolo, S, Stone, T, Bang, AG, Posakony, JW. Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless. *Genes Dev.* 2002 Aug 1;16(15):1964-76.
- Bartholomeu, DC, Silva, RA, Galvao, LM, el-Sayed, NM, Donelson, JE, Teixeira, SM. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. *Exp Parasitol.* 2002 Nov-Dec;102(3-4):123-33.
- Bente, M, Harder, S, Wiesgigl, M, Heukeshoven, J, Gelhaus, C, Krause, E, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics.* 2003 Sep;3(9):1811-29.

- Bhisutthibhan, J, Philbert, MA, Fujioka, H, Aikawa, M, Meshnick, SR. The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur J Cell Biol.* 1999 Sep;78(9):665-70.
- Bhowmick, NA, Ghiassi, M, Bakin, A, Aakre, M, Lundquist, CA, Engel, ME, et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 2001 Jan;12(1):27-36.
- Billaut-Mulot, O, Fernandez-Gomez, R, Loyens, M, Ouaiissi, A. Trypanosoma cruzi elongation factor 1-alpha: nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene.* 1996 Sep 26;174(1):19-26.
- Blankenfeldt, W, Nowicki, C, Montemartini-Kalisz, M, Kalisz, HM, Hecht, HJ. Crystal structure of Trypanosoma cruzi tyrosine aminotransferase: substrate specificity is influenced by cofactor binding mode. *Protein Sci.* 1999 Nov;8(11):2406-17.
- Blehert, DS, Fox, BG, Chambliss, GH. Cloning and sequence analysis of two Pseudomonas flavoprotein xenobiotic reductases. *J Bacteriol.* 1999 Oct;181(20):6254-63.
- Blumenthal, T, Landers, TA, Weber, K. Bacteriophage Q replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF Tu and EF Ts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 May;69(5):1313-7.
- Bommer, UA, Borovjagin, AV, Greagg, MA, Jeffrey, IW, Russell, P, Laing, KG, et al. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA.* 2002 Apr;8(4):478-96.
- Bommer, UA & Thiele, BJ. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Mar;36(3):379-85.
- Bonnet, C, Perret, E, Dumont, X, Picard, A, Caput, D, Lenaers, G. Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. *Yeast.* 2000 Jan 15;16(1):23-33.
- Bontempi, EJ, Bua, J, Aslund, L, Porcel, B, Segura, EL, Henriksson, J, et al. Isolation and characterization of a gene from Trypanosoma cruzi encoding a 46-

- kilodalton protein with homology to human and rat tyrosine aminotransferase. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Jun;59(2):253-62.
- Brenchley, R, Tariq, H, McElhinney, H, Szoor, B, Huxley-Jones, J, Stevens, R, et al. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics.* 2007;8:434.
- Bukau, B & Horwich, AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 1998 Feb 6;92(3):351-66.
- Burt, DW & Law, AS. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res.* 1994;5(1):99-118.
- Campetella, O, Martinez, J, Cazzulo, JJ. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Jan 15;55(1-2):145-9.
- Cannata, JJ & Cazzulo, JJ. Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1984 Apr;11:37-49.
- Caraglia, M, Budillon, A, Vitale, G, Lupoli, G, Tagliaferri, P, Abbruzzese, A. Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new tool for the control of cell proliferation. *Eur J Biochem.* 2000 Jul;267(13):3919-36.
- Carpousis, AJ. The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem Soc Trans.* 2002 Apr;30(2):150-5.
- Carr, SA, Hemling, ME, Folena-Wasserman, G, Sweet, RW, Anumula, K, Barr, JR, et al. Protein and carbohydrate structural analysis of a recombinant soluble CD4 receptor by mass spectrometry. *J Biol Chem.* 1989 Dec 15;264(35):21286-95.
- Cazzulo Franke, MC, Vernal, J, Cazzulo, JJ, Nowicki, C. The NAD-linked aromatic alpha-hydroxy acid dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. A new member of the cytosolic malate dehydrogenases group without malate dehydrogenase activity. *Eur J Biochem.* 1999 Dec;266(3):903-10.

- Cazzulo, JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr.* 1994 Apr;26(2):157-65.
- Cazzulo, JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem.* 2002 Nov;2(11):1261-71.
- Cazzulo, JJ, Cazzulo Franke, MC, Martinez, J, Franke de Cazzulo, BM. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Feb 9;1037(2):186-91.
- Chang, E & Goldberg, H. Requirements for transforming growth factor-beta regulation of the pro-alpha 2(I) collagen and plasminogen activator inhibitor-1 promoters. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4473-7.
- Chapin, SJ & Bulinski, JC. Preparation and functional assay of pure populations of tyrosinated and detyrosinated tubulin. *Methods Enzymol.* 1991;196:254-64.
- Chen, W, Jin, W, Tian, H, Sicurello, P, Frank, M, Orenstein, JM, et al. Requirement for transforming growth factor beta1 in controlling T cell apoptosis. *J Exp Med.* 2001 Aug 20;194(4):439-53.
- Chen, Y, Takeshita, A, Ozaki, K, Kitano, S, Hanazawa, S. Transcriptional regulation by transforming growth factor beta of the expression of retinoic acid and retinoid X receptor genes in osteoblastic cells is mediated through AP-1. *J Biol Chem.* 1996 Dec 6;271(49):31602-6.
- Chuang, DM, Hough, C, Senatorov, VV. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:269-90.
- Clayton, C & Shapira, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol.* 2007 Dec;156(2):93-101.
- Cohen, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci.* 1992 Oct;17(10):408-13.
- Cohen, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci.* 2000 Dec;25(12):596-601.

- Collings, DA, Wasteneys, GO, Miyazaki, M, Williamson, RE. Elongation factor 1 alpha is a component of the subcortical actin bundles of characean algae. *Cell Biol Int*. 1994 Nov;18(11):1019-24.
- Condeelis, J. Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci*. 1995 May;20(5):169-70.
- Cordell, SC, Robinson, EJ, Lowe, J. Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7889-94.
- Coura, JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.
- Coura, JR & Dias, JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.
- Cunha-e-Silva, NL, Atella, GC, Porto-Carreiro, IA, Morgado-Diaz, JA, Pereira, MG, De Souza, W. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Aug 27;214(1):7-12.
- de Caestecker, MP, Parks, WT, Frank, CJ, Castagnino, P, Bottaro, DP, Roberts, AB, et al. Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev*. 1998 Jun 1;12(11):1587-92.
- de Carvalho, TU & de Souza, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986 Jul-Aug;28(4):205-12.
- De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*. 2002;8(4):269-85.
- Degrave, WM, Melville, S, Ivens, A, Aslett, M. Parasite genome initiatives. *Int J Parasitol*. 2001 May 1;31(5-6):532-6.
- Derynck, R, Zhang, Y, Feng, XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*. 1998 Dec 11;95(6):737-40.
- Derynck, R & Zhang, YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.

- Doerig, C. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 11;1697(1-2):155-68.
- Dong, C, Li, Z, Alvarez, R, Jr., Feng, XH, Goldschmidt-Clermont, PJ. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell*. 2000 Jan;5(1):27-34.
- Dubois, RN, Abramson, SB, Crofford, L, Gupta, RA, Simon, LS, Van De Putte, LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*. 1998 Sep;12(12):1063-73.
- Dumonteil, E. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *J Biomed Biotechnol*. 2007;2007(6):90520.
- Dutcher, SK. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Feb; 13(1):49-54.
- Edlund, S, Landstrom, M, Heldin, CH, Aspenstrom, P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell*. 2002 Mar;13(3):902-14.
- El-Sayed, NM, Myler, PJ, Bartholomeu, DC, Nilsson, D, Aggarwal, G, Tran, AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):409-15.
- Ellis, EM. Microbial aldo-keto reductases. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Nov 5;216(2):123-31.
- Engel, ME, Datta, PK, Moses, HL. Signal transduction by transforming growth factor-beta: a cooperative paradigm with extensive negative regulation. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:111-22.
- Engel, ME, McDonnell, MA, Law, BK, Moses, HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem*. 1999 Dec 24;274(52):37413-20.
- Fapesp. Transmissão silenciosa. 2008. Boletim de Comunicação, 2008 atualizado em 21/02/2008. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.agencia.fapesp.br/materia/8445/entrevistas>.

- Ferella, M, Nilsson, D, Darban, H, Rodrigues, C, Bontempi, EJ, Docampo, R, et al. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles. *Proteomics*. 2008 Jul;8(13):2735-49.
- Ferrari, DM & Soling, HD. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J*. 1999 Apr 1;339 (Pt 1):1-10.
- Flohe, L, Budde, H, Hofmann, B. Peroxiredoxins in antioxidant defense and redox regulation. *Biofactors*. 2003;19(1-2):3-10.
- Funaba, M, Zimmerman, CM, Mathews, LS. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41361-8.
- Funfschilling, U & Rospert, S. Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol Biol Cell*. 1999 Oct;10(10):3289-99.
- Gachet, Y, Tournier, S, Lee, M, Lazaris-Karatzas, A, Poulton, T, Bommer, UA. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci*. 1999 Apr;112 (Pt 8):1257-71.
- Garcia, ES & Azambuja, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 1991 Sep;7(9):240-4.
- Garg, N & Bhatia, V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev Vaccines*. 2005 Dec;4(6):867-80.
- George, R, Beddoe, T, Landl, K, Lithgow, T. The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2296-301.
- Gianazza, E, Osnaghi, A, Bontempi, L, Righetti, PG, Celentano, F. Ion retention by immobilized pH matrices. *Appl Theor Electrophor*. 1989;1(3):155-9.
- Gille, C, Goede, A, Schloetelburg, C, Preissner, R, Kloetzel, PM, Gobel, UB, et al. A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. *J Mol Biol*. 2003 Mar 7;326(5):1437-48.

- Gilles, H. Parasitic disease affecting the heart in childhood. *Images Paediatr Cardiol.* 2000;5:28-39.
- Gnanasekar, M, Rao, KV, Chen, L, Narayanan, RB, Geetha, M, Scott, AL, et al. Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002 Apr 30;121(1):107-18.
- Golding, GB & Dean, AM. The structural basis of molecular adaptation. *Mol Biol Evol.* 1998 Apr;15(4):355-69.
- Gonzalez-Pino, MJ, Rangel-Aldao, R, Slezynger, TC. Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *DNA Cell Biol.* 1999 Jun;18(6):449-55.
- Goshe, MB. Characterizing phosphoproteins and phosphoproteomes using mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2006 Feb;4(4):363-76.
- Graham, SV & Barry, JD. Transcriptional regulation of metacyclic variant surface glycoprotein gene expression during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* 1995 Nov;15(11):5945-56.
- Grant, AG, Flomen, RM, Tizard, ML, Grant, DA. Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma lambda gt11 expression library has identified increased transcription of elongation factor EF-1 alpha in tumour cells. *Int J Cancer.* 1992 Mar 12;50(5):740-5.
- Hall, BS & Pereira, MA. Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect Immun.* 2000 Apr;68(4):2077-81.
- Hall, SW, LaMarre, J, Marshall, LB, Hayes, MA, Gonias, SL. Binding of transforming growth factor-beta 1 to methylamine-modified alpha 2-macroglobulin and to binary and ternary alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes. *Biochem J.* 1992 Jan 15;281 (Pt 2):569-75.
- Hancock, W, Apffel, A, Chakel, J, Hahnenberger, K, Choudhary, G, Traina, JA, et al. Integrated genomic/proteomic analysis. *Anal Chem.* 1999 Nov 1;71(21):742A-8A.

- Hayaishi, O. Molecular mechanisms of sleep-wake regulation: a role of prostaglandin D2. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2000 Feb 29;355(1394):275-80.
- Hershey, JW. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:717-55.
- Higuchi, ML, Fukasawa, S, De Brito, T, Parzianello, LC, Bellotti, G, Ramires, JA. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart.* 1999 Sep;82(3):279-85.
- Iavarone, A & Massague, J. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature.* 1997 May 22;387(6631):417-22.
- Inagaki, Y, Truter, S, Ramirez, F. Transforming growth factor-beta stimulates alpha 2(I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J Biol Chem.* 1994 May 20;269(20):14828-34.
- Iozzo, RV, Pillarisetti, J, Sharma, B, Murdoch, AD, Danielson, KG, Uitto, J, et al. Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element. *J Biol Chem.* 1997 Feb 21;272(8):5219-28.
- Itoh, S, Itoh, F, Goumans, MJ, Ten Dijke, P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* 2000 Dec;267(24):6954-67.
- Iwasaki, Y, Lamar, C, Danenberg, K, Pitot, HC. Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. Characterization and metabolic regulation of multiple forms of tyrosine aminotransferase. *Eur J Biochem.* 1973 Apr;34(2):347-57.
- Janssen, GM, van Damme, HT, Kriek, J, Amons, R, Moller, W. The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*. Why two alpha-chains in this complex? *J Biol Chem.* 1994 Dec 16;269(50):31410-7.

- Kanemori, M, Nishihara, K, Yanagi, H, Yura, T. Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma32 and abnormal proteins in Escherichia coli. J Bacteriol. 1997 Dec;179(23):7219-25.
- Keeton, MR, Curriden, SA, van Zonneveld, AJ, Loskutoff, DJ. Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. J Biol Chem. 1991 Dec 5;266(34):23048-52.
- Kerr, LD, Miller, DB, Matrisian, LM. TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. Cell. 1990 Apr 20;61(2):267-78.
- Kirchhoff, LV. Chagas disease. American trypanosomiasis. Infect Dis Clin North Am. 1993 Sep;7(3):487-502.
- Kohl, L & Gull, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. Mol Biochem Parasitol. 1998 May 15;93(1):1-9.
- Kollien, AH & Schaub, GA. The development of Trypanosoma cruzi in triatominae. Parasitol Today. 2000 Sep;16(9):381-7.
- Kretzschmar, M, Doody, J, Timokhina, I, Massague, J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. Genes Dev. 1999 Apr 1;13(7):804-16.
- Krieg, PA, Varnum, SM, Wormington, WM, Melton, DA. The mRNA encoding elongation factor 1-alpha (EF-1 alpha) is a major transcript at the midblastula transition in Xenopus. Dev Biol. 1989 May;133(1):93-100.
- Kubata, BK, Duszenko, M, Kabututu, Z, Rawer, M, Szallies, A, Fujimori, K, et al. Identification of a novel prostaglandin f(2alpha) synthase in Trypanosoma brucei. J Exp Med. 2000 Nov 6;192(9):1327-38.
- Kuhnel, K & Luisi, BF. Crystal structure of the Escherichia coli RNA degradosome component enolase. J Mol Biol. 2001 Oct 26;313(3):583-92.
- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

- Lauring, B, Sakai, H, Kreibich, G, Wiedmann, M. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5411-5.
- Lawrence, DA. Transforming growth factor-beta: an overview. *Kidney Int Suppl*. 1995 Jun;49:S19-23.
- Li, F, Zhang, D, Fujise, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem*. 2001 Dec 14;276(50):47542-9.
- Lijnen, PJ, Petrov, VV, Fagard, RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 2000 Sep-Oct;71(1-2):418-35.
- Ling, V, Guzzetta, AW, Canova-Davis, E, Stults, JT, Hancock, WS, Covey, TR, et al. Characterization of the tryptic map of recombinant DNA derived tissue plasminogen activator by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 1991 Dec 15;63(24):2909-15.
- Lipowsky, G, Bischoff, FR, Schwarzmaier, P, Kraft, R, Kostka, S, Hartmann, E, et al. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J*. 2000 Aug 15;19(16):4362-71.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Luchtan, M, Warade, C, Weatherly, DB, Degrave, WM, Tarleton, RL, Kissinger, JC. TcruziDB: an integrated *Trypanosoma cruzi* genome resource. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D344-6.
- Lutz, M & Knaus, P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal*. 2002 Dec;14(12):977-88.
- Lyons, RM & Moses, HL. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem*. 1990 Feb 14;187(3):467-73.
- MacDonald, SM, Bhisutthibhan, J, Shapiro, TA, Rogerson, SJ, Taylor, TE, Tembo, M, et al. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10829-32.

- MacDonald, SM, Rafnar, T, Langdon, J, Lichtenstein, LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science*. 1995 Aug 4;269(5224):688-90.
- Magalhaes, AD, Charneau, S, Paba, J, Guercio, RA, Teixeira, AR, Santana, JM, et al. Trypanosoma cruzi alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. *Proteome Sci*. 2008;6:24.
- Mann, M & Jensen, ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*. 2003 Mar;21(3):255-61.
- Marigo, V, Volpin, D, Vitale, G, Bressan, GM. Identification of a TGF-beta responsive element in the human elastin promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Mar 15;199(2):1049-56.
- Marks, AR. Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev*. 1996 Jul;76(3):631-49.
- Martinez, J, Competella, O, Frasch, AC, Cazzulo, JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi is antigenic in human infections. *Infect Immun*. 1991 Nov;59(11):4275-7.
- Massague, J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.
- Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91.
- Massague, J & Chen, YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*. 2000 Mar 15;14(6):627-44.
- Massague, J & Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000 Apr 17;19(8):1745-54.
- Mathe, AA, Hedqvist, P, Strandberg, K, Leslie, CA. Aspects of prostaglandin function in the lung (second of two parts). *N Engl J Med*. 1977 Apr 21;296(16):910-4.
- Mayer, MP & Bukau, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Mar;62(6):670-84.

- McCracken, JA, Carlson, JC, Glew, ME, Goding, JR, Baird, DT, Green, K, et al. Prostaglandin F₂ identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nat New Biol.* 1972 Aug 2;238(83):129-34.
- Merrick, WC. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev.* 1992 Jun;56(2):291-315.
- Ming, M, Ewen, ME, Pereira, ME. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell.* 1995 Jul 28;82(2):287-96.
- Mitchell, H, Choudhury, A, Pagano, RE, Leof, EB. Ligand-dependent and -independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrin-mediated endocytosis and Rab11. *Mol Biol Cell.* 2004 Sep;15(9):4166-78.
- Moazed, D & Noller, HF. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature.* 1989 Nov 9;342(6246):142-8.
- Moller, I, Jung, M, Beatrix, B, Levy, R, Kreibich, G, Zimmermann, R, et al. A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13425-30.
- Moncayo, A & Silveira, AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:17-30.
- Montemartini, M, Santome, JA, Cazzulo, JJ, Nowicki, C. Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 1993 Jun 15;292 (Pt 3):901-6.
- Montemartini, M, Santome, JA, Cazzulo, JJ, Nowicki, C. Purification and partial structural and kinetic characterization of an aromatic L-alpha-hydroxy acid dehydrogenase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994 Nov;68(1):15-23.

- Morales, MA, Watanabe, R, Laurent, C, Lenormand, P, Rousselle, JC, Namane, A, et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics*. 2008 Jan;8(2):350-63.
- Moustakas, A & Heldin, CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*. 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573-84.
- Moustakas, A, Pardali, K, Gaal, A, Heldin, CH. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett*. 2002 Jun 3;82(1-2):85-91.
- Moustakas, A, Souchelnytskyi, S, Heldin, CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*. 2001 Dec;114(Pt 24):4359-69.
- Murphy-Ullrich, JE & Poczatek, M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000 Mar-Jun;11(1-2):59-69.
- Nakayasu, ES, Gaynor, MR, Sobreira, TJ, Ross, JA, Almeida, IC. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. *Proteomics*. 2009 Jul;9(13):3489-506.
- Naula, C, Parsons, M, Mottram, JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Dec 30;1754(1-2):151-9.
- Neuwald, AF, Aravind, L, Spouge, JL, Koonin, EV. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*. 1999 Jan;9(1):27-43.
- Nielsen, HV, Johnsen, AH, Sanchez, JC, Hochstrasser, DF, Schiøtz, PO. Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor. *Allergy*. 1998 Jul;53(7):642-52.
- Noiva, R & Lennarz, WJ. Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1992 Feb 25;267(6):3553-6.

- Nollen, EA & Morimoto, RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci.* 2002 Jul 15;115(Pt 14):2809-16.
- Nowicki, C & Cazzulo, JJ. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2008 Nov;151(3):381-90.
- Nowicki, C, Hunter, GR, Montemartini-Kalisz, M, Blankenfeldt, W, Hecht, H, Kalisz, HM. Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Apr 7;1546(2):268-81.
- Nowicki, C, Montemartini, M, Duschak, V, Santome, JA, Cazzulo, JJ. Presence and subcellular localization of tyrosine aminotransferase and p-hydroxyphenyllactate dehydrogenase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992 Apr 15;71(2):119-24.
- Okano, Y, Inoue, T, Kubata, BK, Kabututu, Z, Urade, Y, Matsumura, H, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of *Trypanosoma brucei* prostaglandin F(2 alpha) synthase. *J Biochem.* 2002 Dec;132(6):859-61.
- Ouaissi, A. Apoptosis-like death in trypanosomatids: search for putative pathways and genes involved. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003 Jun 25;2(1):5.
- Paba, J, Santana, JM, Teixeira, AR, Fontes, W, Sousa, MV, Ricart, CA. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics.* 2004 Apr;4(4):1052-9.
- Paradela, A & Albar, JP. Advances in the analysis of protein phosphorylation. *J Proteome Res.* 2008 May;7(5):1809-18.
- Park, E, Rho, YM, Koh, OJ, Ahn, SW, Seong, IS, Song, JJ, et al. Role of the GYVG pore motif of HslU ATPase in protein unfolding and translocation for degradation by HslV peptidase. *J Biol Chem.* 2005 Jun 17;280(24):22892-8.
- Park, MH. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem.* 2006 Feb;139(2):161-9.

- Park, MH, Lee, YB, Joe, YA. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals*. 1997 May-Jun;6(3):115-23.
- Parodi-Talice, A, Duran, R, Arrambide, N, Prieto, V, Pineyro, MD, Pritsch, O, et al. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2004 Jul;34(8):881-6.
- Parsons, M, Worthey, EA, Ward, PN, Mottram, JC. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. 2005;6:127.
- Pawson, T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*. 2002 Sep;38 Suppl 5:S3-10.
- Piacenza, L, Peluffo, G, Alvarez, MN, Kelly, JM, Wilkinson, SR, Radi, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J*. 2008 Mar 1;410(2):359-68.
- Piek, E, Heldin, CH, Ten Dijke, P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J*. 1999 Dec;13(15):2105-24.
- Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001 Sep;1(2):92-100.
- Procopio, DO, Barros, HC, Mortara, RA. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Cell Biol*. 1999 Dec;78(12):911-24.
- Rao, KV, Chen, L, Gnanasekar, M, Ramaswamy, K. Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*. 2002 Aug 23;277(34):31207-13.
- Rassi, A, Jr., Rassi, A, Little, WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol*. 2000 Dec;23(12):883-9.
- Rassi, A, Jr., Rassi, A, Marin-Neto, JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:152-8.

- Razani, B, Zhang, XL, Bitzer, M, von Gersdorff, G, Bottinger, EP, Lisanti, MP. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6727-38.
- Riccio, A, Pedone, PV, Lund, LR, Olesen, T, Olsen, HS, Andreasen, PA. Transforming growth factor beta 1-responsive element: closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-nuclear factor I in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene. *Mol Cell Biol*. 1992 Apr;12(4):1846-55.
- Ritzenthaler, JD, Goldstein, RH, Fine, A, Smith, BD. Regulation of the alpha 1(I) collagen promoter via a transforming growth factor-beta activation element. *J Biol Chem*. 1993 Jun 25;268(18):13625-31.
- Roberts, AB, Flanders, KC, Heine, UI, Jakowlew, S, Kondaiah, P, Kim, SJ, et al. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1990 Mar 12;327(1239):145-54.
- Roberts, AB & Sporn, MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors*. 1993;8(1):1-9.
- Robinson, D, Beattie, P, Sherwin, T, Gull, K. Microtubules, tubulin, and microtubule-associated proteins of trypanosomes. *Methods Enzymol*. 1991;196:285-99.
- Roepstorff, P. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr Opin Biotechnol*. 1997 Feb;8(1):6-13.
- Rohloff, P, Rodrigues, CO, Docampo, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Feb;126(2):219-30.
- Rohrwild, M, Coux, O, Huang, HC, Moerschell, RP, Yoo, SJ, Seol, JH, et al. HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5808-13.

- Rosenkranz, S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004 Aug 15;63(3):423-32.
- Rosenzweig, D, Smith, D, Myler, PJ, Olafson, RW, Zilberstein, D. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics.* 2008 May;8(9):1843-50.
- Rosorius, O, Reichart, B, Kratzer, F, Heger, P, Dabauvalle, MC, Hauber, J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci.* 1999 Jul;112 (Pt 14):2369-80.
- Rospert, S, Dubaquier, Y, Gautschi, M. Nascent-polypeptide-associated complex. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Oct;59(10):1632-9.
- Rossi, MA. Connective tissue skeleton in the normal left ventricle and in hypertensive left ventricular hypertrophy and chronic chagasic myocarditis. *Med Sci Monit.* 2001 Jul-Aug;7(4):820-32.
- Rossi, MA & Bestetti, RB. The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology.* 1995;86(1):1-7.
- Rossi, P, Karsenty, G, Roberts, AB, Roche, NS, Sporn, MB, de Crombrughe, B. A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor-beta. *Cell.* 1988 Feb 12;52(3):405-14.
- Rubotham, J, Woods, K, Garcia-Salcedo, JA, Pays, E, Nolan, DP. Characterization of two protein disulfide isomerases from the endocytic pathway of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):10410-8.
- Ruhl, M, Himmelpach, M, Bahr, GM, Hammerschmid, F, Jaksche, H, Wolff, B, et al. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 1):1309-20.
- Samuelsson, B. Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes: formation and biological roles. *Harvey Lect.* 1979;75:1-40.

- Sanders, J, Maassen, JA, Moller, W. Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation. *Nucleic Acids Res.* 1992 Nov 25;20(22):5907-10.
- Sant'Anna, C, Parussini, F, Lourenco, D, de Souza, W, Cazzulo, JJ, Cunha-e-Silva, NL. All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. *Histochem Cell Biol.* 2008 Dec;130(6):1187-98.
- Sasaki, A, Masuda, Y, Ohta, Y, Ikeda, K, Watanabe, K. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):17871-7.
- Schmunis, GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.
- Schnier, J, Schwelberger, HG, Smit-McBride, Z, Kang, HA, Hershey, JW. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1991 Jun;11(6):3105-14.
- Schulenberg, B, Goodman, TN, Aggeler, R, Capaldi, RA, Patton, WF. Characterization of dynamic and steady-state protein phosphorylation using a fluorescent phosphoprotein gel stain and mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2004 Aug;25(15):2526-32.
- Seo, J & Lee, KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol.* 2004 Jan 31;37(1):35-44.
- Seong, IS, Oh, JY, Lee, JW, Tanaka, K, Chung, CH. The HslU ATPase acts as a molecular chaperone in prevention of aggregation of SulA, an inhibitor of cell division in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 2000 Jul 21;477(3):224-9.
- Shi, XP, Yin, KC, Zimolo, ZA, Stern, AM, Waxman, L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Exp Cell Res.* 1996 Jun 15;225(2):348-56.

- Shi, Y & Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):685-700.
- Silva, JS, Twardzik, DR, Reed, SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med*. 1991 Sep 1;174(3):539-45.
- Sinha, P, Kohl, S, Fischer, J, Hutter, G, Kern, M, Kottgen, E, et al. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000 Aug;21(14):3048-57.
- Soares, MJ & de Souza, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 1991;77(6):461-8.
- Soares, MJ, Souto-Padron, T, Bonaldo, MC, Goldenberg, S, de Souza, W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 1989;75(7):522-7.
- Soares, MJ, Souto-Padron, T, De Souza, W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*. 1992 May;102 (Pt 1):157-67.
- Sodre, CL, Chapeaurouge, AD, Kalume, DE, de Mendonca Lima, L, Perales, J, Fernandes, O. Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Arch Microbiol*. 2009 Feb;191(2):177-84.
- Souto-Padron, T, Campetella, OE, Cazzulo, JJ, de Souza, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci*. 1990 Jul;96 (Pt 3):485-90.
- Steinberg, TH, Agnew, BJ, Gee, KR, Leung, WY, Goodman, T, Schulenberg, B, et al. Global quantitative phosphoprotein analysis using Multiplexed Proteomics technology. *Proteomics*. 2003 Jul;3(7):1128-44.
- Stempin, C, Giordanengo, L, Gea, S, Cerban, F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol*. 2002 Oct;72(4):727-34.

- Taipale, J, Saharinen, J, Hedman, K, Keski-Oja, J. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem.* 1996 Aug;44(8):875-89.
- Tang, Y, Katuri, V, Dillner, A, Mishra, B, Deng, CX, Mishra, L. Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science.* 2003 Jan 24;299(5606):574-7.
- Tarze, A, Deniaud, A, Le Bras, M, Maillier, E, Molle, D, Larochette, N, et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene.* 2007 Apr 19;26(18):2606-20.
- Teshima, S, Rokutan, K, Nikawa, T, Kishi, K. Macrophage colony-stimulating factor stimulates synthesis and secretion of a mouse homolog of a human IgE-dependent histamine-releasing factor by macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):6356-66.
- Thiele, H, Berger, M, Skalweit, A, Thiele, BJ. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *Eur J Biochem.* 2000 Sep;267(17):5473-81.
- Tisdale, EJ. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 2001 Jan 26;276(4):2480-6.
- Tisdale, EJ & Artalejo, CR. A GAPDH mutant defective in Src-dependent tyrosine phosphorylation impedes Rab2-mediated events. *Traffic.* 2007 Jun;8(6):733-41.
- Todaro, GJ, Fryling, C, De Larco, JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980 Sep;77(9): 5258-5262.
- Torres-Cabassa, AS & Gottesman, S. Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *J Bacteriol.* 1987 Mar;169(3):981-9.
- Tyers, M & Mann, M. From genomics to proteomics. *Nature.* 2003 Mar 13;422(6928):193-7.
- Urbina, JA & Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003 Nov;19(11):495-501.

- Valentini, SR, Casolari, JM, Oliveira, CC, Silver, PA, McBride, AE. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics*. 2002 Feb;160(2):393-405.
- Vanhamme, L & Pays, E. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev*. 1995 Jun;59(2):223-40.
- Verlinde, CL, Hannaert, V, Blonski, C, Willson, M, Perie, JJ, Fothergill-Gilmore, LA, et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat*. 2001 Feb;4(1):50-65.
- Waghbi, MC, Coutinho, CM, Soeiro, MN, Pereira, MC, Feige, JJ, Keramidas, M, et al. Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):5115-23.
- Waghbi, MC, de Souza, EM, de Oliveira, GM, Keramidas, M, Feige, JJ, Araujo-Jorge, TC, et al. Pharmacological Inhibition of Transforming Growth Factor Beta Signalling Decreases Infection and Prevents Heart Damage in Acute Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Sep 8.
- Waghbi, MC, Keramidas, M, Bailly, S, Degrave, W, Mendonca-Lima, L, Soeiro Mde, N, et al. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol*. 2005a Oct;167(4):993-1003.
- Waghbi, MC, Keramidas, M, Calvet, CM, Meuser, M, de Nazare, CSM, Mendonca-Lima, L, et al. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Aug;51(8):2905-10.
- Waghbi, MC, Keramidas, M, Feige, JJ, Araujo-Jorge, TC, Bailly, S. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*. 2005b Apr;7(4):511-7.
- Waite, KA & Eng, C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet*. 2003 Oct;4(10):763-73.

- Walker, DJ, Pitsch, JL, Peng, MM, Robinson, BL, Peters, W, Bhisutthibhan, J, et al. Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Feb;44(2):344-7.
- Wang, P & Heitman, J. The cyclophilins. *Genome Biol*. 2005;6(7):226.
- Wang, S, Sakai, H, Wiedmann, M. NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J Cell Biol*. 1995 Aug;130(3):519-28.
- Wiedmann, B, Sakai, H, Davis, TA, Wiedmann, M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*. 1994 Aug 11;370(6489):434-40.
- Wilkinson, SR, Taylor, MC, Horn, D, Kelly, JM, Cheeseman, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5022-7.
- Wyllie, S, Vickers, TJ, Fairlamb, AH. Roles of trypanothione S-transferase and trypanothione peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1359-65.
- Xin, H, Xu, X, Li, L, Ning, H, Rong, Y, Shang, Y, et al. CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor-beta signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation. *J Biol Chem*. 2005 May 27;280(21):20842-50.
- Xu, A, Bellamy, AR, Taylor, JA. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem J*. 1999 Sep 15;342 Pt 3:683-9.
- Young, JC, Agashe, VR, Siegers, K, Hartl, FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct;5(10):781-91.
- Yu, R, Chen, C, Mo, YY, Hebbar, V, Owuor, ED, Tan, TH, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2000 Dec 22;275(51):39907-13.

-
- Yue, J & Mulder, KM. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol.* 2000;142:125-31.
- Zeledon, R, Alvarenga, N. J, Schosinsky, K. . Chagas Disease: Pan American Health Organization 1997 Contract No.: 347.
- Zheng, L, Roeder, RG, Luo, Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell.* 2003 Jul 25;114(2):255-66.
- Zimmer, C, von Gabain, A, Henics, T. Analysis of sequence-specific binding of RNA to Hsp70 and its various homologs indicates the involvement of N- and C-terminal interactions. *RNA.* 2001 Nov;7(11):1628-37.
- Zuk, D & Jacobson, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *EMBO J.* 1998 May 15;17(10):2914-25.
- Zwaagstra, JC, El-Alfy, M, O'Connor-McCourt, MD. Transforming growth factor (TGF)-beta 1 internalization: modulation by ligand interaction with TGF-beta receptors types I and II and a mechanism that is distinct from clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem.* 2001 Jul 20;276(29):27237-45.