

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós Graduação em Biologia Parasitária

TAINAH SILVA GALDINO DE PAULA

Os sítios adicionais de *trans-splicing* na 5' UTR dos genes trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* e avaliação de seus efeitos sobre a tradução.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Adeílton Brandão, D.Sc., Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas
- IOC- Fiocruz

Constança Felicia De Paoli de Carvalho Britto, D.Sc., Laboratório de
Biologia Molecular e Doenças Endêmicas - IOC-Fiocruz

Rio de Janeiro

2013

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

P324 Paula, Tainah Silva Galdino de

Os sítios adicionais de *trans-splicing* na 5' UTR dos genes trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* e avaliação de seus efeitos sobre a tradução / Tainah Silva Galdino de Paula. – Rio de Janeiro, 2013.

xvi, 99 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2013.

Bibliografia: f. 82-92

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Trans-Sialidase. 3. 5'UTR, Lise Celular. 4. Tradução *in vitro*. 5. Espectrometria de Massas. I. Título.

CDD 616.9363

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós Graduação em Biologia Parasitária

Os sítios adicionais de *trans-splicing* na 5' UTR dos genes trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* e avaliação de seus efeitos sobre a tradução.

Apresentada por:

Tainah Silva Galdino de Paula

Orientadores: Adeílton Alves Brandão, D.Sc e Constança Britto, D.Sc

Aprovada em: 20 /12 / 2013

Banca Avaliadora:

Dra. Ana Carolina Paulo Vicente (IOC – FIOCRUZ) - Presidente

Dra. Patrícia Cuervo Escobar (IOC – FIOCRUZ)

Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto (UFF / RJ)

Dr. Alexandre Bello (UERJ) - Suplente

Dr. Saulo Cabral Bourguignon (UFF / RJ) - Suplente

Rio de Janeiro, 20 de dezembro 2013

*"Fu gosto de você
F gosto de ficar com você
Meu riso é tão feliz contigo
O meu melhor amigo
F o meu amor"
(Velha Infância – Tribelistas)*

*Ao Rodrigo Galdino de Paula, meu Gal, por todo amor, toda amizade, todo respeito
e companheirismo.*

Agradecimentos

“Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho” (Wave - Tom Jobim)

Ao Dr. Adeílton Brandão, por toda confiança depositada em mim ao longo desses sete anos, por todo incentivo, pelas longas e frutíferas conversas – até mesmo as que terminavam em discussões sobre o “Glorioso Borroló”; Mas acima de tudo, agradeço pela amizade construída ao longo dessa caminhada! “Houston”, muito Obrigada!!!!

À Dra. Constança Britto, por todo carinho, respeito e disposição em me ajudar. Agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório e ter permitido que se descortinasse para mim o mundo da Biologia Molecular, mundo esse que me encanta, me instiga e tanto me fascina.

Ao Dr. Dário Eluan Kalume, profissional que tive a honra de conhecer e admirar o seu trabalho, a princípio à distância, mas que por essas deliciosas surpresas da vida passamos a trabalhar juntos, a dividir a bancada por horas a fio com extremo bom-humor e longas risadas. Obrigada por ser meu “orientador adotivo” e muito, muito obrigada por ser meu amigo!

Obrigada aos amigos Franklyn Samudio (O Panamenho) e Myllena Melo (meu acarajé-pimenta) pelas muitas discussões produtivas, por toda ajuda - física, ou emocional nos momentos de estresse. Enfim, por toda parceria estabelecida e pelas muitas risadas.

Às minhas Naths: Nathália Motta e Nathália Pinho, amigas super queridas, por todo carinho, toda amizade e por estarem sempre ao meu lado ao longo desses anos tornando a caminhada mais amena e divertida.

Ao Dr. Otacílio Moreira, pelo carinho, incentivo, por estar sempre disposto a me ajudar e apoiar. Obrigada pela amizade.

À Dra. Ângela Junqueira por todo exemplo de honestidade, companheirismo, paixão pelos ideais e por todo carinho dispensado a mim.

Aos amigos bem mais que especiais que em certo momento da vida se encontraram no LIPMED e formaram o grupo mais bacana, divertido e estranho do mundo: Elizabeth Santos (Betinha), Dra. Maria Inês Dória (Inesita), Dra. Simone Santos, Dra. Esther Ricci, Dra. Joseli Nogueira (Jojô), Dr. Dário Kalume e eu essa Tese não seria a mesma sem vocês (muito menos eu!).

À amiga Nédia Nehme por todo carinho, amizade e doçura.

Aos colegas do LIPMED de hoje como a Maria Fantinatti, Dra. Mariângela Ziccardi, David Provance (Bill) entre outros companheiros atuais, assim como os que sempre serão LIPMED: Dr. Fábio Alves, Társis Brust, Dra. Cátia Sodré, Carla Sodré, Dra. Elisabeth Sanches, Dra. Helena Toma, Dra. Martha Mutis e toda sua equipe de “malaretas”, muito especialmente às queridas Vivian Franco e Renata Miguel. Carinhosamente, agradeço particularmente às amigas Rosimar Baptista, a Dra. Luiza de Oliveira Pereira, a Dra. Márcia Pereira e a Dra. Regina Barbosa pela imensa torcida e por me envolverem positivamente me fortalecendo e impulsionando rumo à finalização desse ciclo.

À minha mãe, por ter sido meu grande exemplo de força, honestidade e perseverança. Parafraseando Nando Reis: “É bom olhar pra trás e admirar a vida que soubemos fazer...”. Te amo! Ao Enio, pela descoberta da amizade.

Ao meu pai, por sempre acreditar nos meus projetos, me incentivando e se emocionando ao meu lado.

Aos meus sogros queridos, pais de coração que Deus me emprestou, agradeço por cada gesto de carinho, cada momento que estamos juntos; agradeço por me acolherem, me apoiarem e pelo lindo laço que nos une. Amo muito vocês!

À Dani e Vanessa irmãs de alma, Júnior e Rafael e ao meu irmão João, por toda força, companheirismo e amizade.

Aos amigos de toda a vida de Volta Redonda – “A Galera” – pela amizade que atravessa o tempo, que sustenta nos momentos de fragilidade e que alimenta a alma.

À comissão de pós-graduação da Biologia Parasitária á qual tive imensa honra em fazer parte. Agradeço pelo tanto que aprendi, pelo tanto que cresci, por todo respeito e paciência que tiveram comigo. Não consigo mensurar o quanto sou grata e feliz por ter feito parte desse grupo! Aos doutores Carlos Roberto Alves, Ana Maria Gaspar, Ana Carolina Paulo, Mirian Cláudia, Luzia Pinto e Rafael Maciel, meu enorme OBRIGADA!

À equipe da secretaria acadêmica, em especial, à Rita Gomes, Luciane Wandermurem, Ana Paula Fontoura, Giselia Ricardo, Eduardo Portugal, Henrique Oliveira e Julimar Loures, por terem sido verdadeiros anjos na minha vida durante essa etapa me ajudando e fazendo, muitas vezes, mais que as suas obrigações em prol das minhas conquistas.

À equipe da cantina da “tia Penha” (Viviane, Sônia, “Dulce / Jurema e a tia Penha) pela amizade, carinho e respeito por mim ao longo dessa jornada.

Aos queridos Elton Batista e Luciano (os dois) por toda ajuda que vocês me concederam.

Às plataformas de Sequenciamento e Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho – IOC/PDTIS.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

*“Você não sabe o quanto caminhei pra chegar até aqui,
Percorri milhas e milhas antes de dormir, eu não cochilei.*

Os mais belos montes escalei...”

(À Estrada – Cidade Negra)

Resumo

A regulação gênica em tripanossomatídeos é policistrônica e ocorre de maneira pós-transcricional. Nas extremidades 5' e 3' dos RNA mensageiros existem segmentos que podem conter elementos regulatórios chamados UTR (*Untranslated Regions*), os quais são regiões transcritas, porém não-traduzidas. Para verificar se UTR de tamanhos diferentes possuem impacto na transcrição e, por conseguinte, na tradução de proteínas, selecionou-se genes da família de trans-sialidases, devido à importância destas no processo de invasão celular. A metodologia envolveu a extração de RNA total de *T. cruzi* CL-Brener, seguido da síntese de cDNA, PCR, clonagem dos produtos amplificados e seqüenciamento por Sanger e pelo uso do 454 Junior (*Next Generation Sequencing* – NSG). Como as trans-sialidases correspondem a uma família gênica de cópias múltiplas, usou-se a estratégia de seqüenciamento de alto-desempenho na tentativa de cobrir o maior número possível de genes desta família. Para isso foram obtidos cDNAs de trans-sialidases de CL-Brener nas formas epimastigota e tripomastigota com o iniciador 5'UTRTCNA, os quais apresentaram UTR com tamanhos variados entre 65 – 187 pb, além da obtenção de cDNAs para esta família de proteínas, em epimastigotas CL-Brener, com o iniciador 5'TcTS, apresentando UTR variando de 171 a 221 pb, com similaridade de seqüências entre elas. Com o intuito de avaliar a correspondência entre a transcrição dos RNAs de trans-sialidases e a sua tradução, houve a necessidade de identificação das proteínas. Desenvolvemos uma metodologia de lise celular e produção de extrato proteico (denominado TcS12) a partir de células de *T. cruzi* no estágio epimastigota. As cepas selecionadas para esse estudo foram CL-Brener (TcVI), Dm28c (TcI), Y (TcII) e 4167 (TcIV). O processo de lise celular foi otimizado para 10^7 parasitos/mL ressuspensos em 200 μ L de tampão de lise hipotônica (por 30 minutos a 4°C), associado ao sonificador de banho (por 30 minutos a 4°C). A eficiência da metodologia foi validada pela citometria de fluxo mostrando que aproximadamente 72% das células foram marcadas com iodeto de propídeo (PI). A qualidade dos extratos proteicos foi analisada por LCMS/MS usando-se a estratégia MS^E *label free* para quantificação relativa de proteínas. Foram identificadas 1153 proteínas totais, cuja expressão proteica das cepas 4167, Dm28c e Y, quando comparada à CL-Brener (cepa referência), apresentou 32, 51 e 73 proteínas *up-expressed*, enquanto que 80, 92 e 60 proteínas mostraram-se *down-expressed*, respectivamente. Entre as trans-sialidases identificadas, a única cópia encontrada no extrato TcS12 (número de acesso no UniProt - Q4DGV8) apresentou seu RNAm correspondente no banco de dados de cDNA de CL-Brener, com UTR de 214 pb, estando, portanto, na faixa de tamanhos das outras UTR de trans-sialidases obtidas neste estudo. Esse resultado sugere que outros fatores, não necessariamente o tamanho *per se* das UTR, podem influenciar no fenômeno de tradução nesses tripanossomatídeos. Em relação aos extratos proteicos de epimastigotas gerados a partir das outras cepas, a quantidade de trans-sialidases identificadas foram de 1 (cepa 4167), 2 (cepa Dm28c) e 117 (cepa Y) cópias, indicando assim a tradução satisfatória de pelo menos uma das muitas cópias desta família gênica.

Abstract

Gene regulation in trypanosomatids is polycistronic and occurs in a post-transcriptional way. There are also regulatory elements named UTRs (Untranslated Regions) that are transcribed regions, but not translated. To verify the impact of UTRs presenting different sizes in the transcription machinery and protein translation, genes from trans-sialidase family were selected due to its importance in the cell invasion process. The methodological strategies involved the extraction of total RNA from *T. cruzi* CL-Brener strain, followed by cDNA synthesis, PCR, cloning and sequencing of amplified products by Sanger and by using the 454 Junior (Next Generation Sequencing – NGS). Considering that trans-sialidase is a multi-copy gene family, this high-throughput sequencing strategy was employed in an attempt to cover the largest number of trans-sialidase genes. Trans-sialidase cDNAs from CL-Brener epimastigote and tripomastigote were obtained with 5'UTRTCNA primer showing UTR sizes between 65 - 187 bp. The cDNA from this protein family were also obtained with the 5'TcTS primer from CL-Brener epimastigotes, generating UTRs with 171 - 221 bp. Both 5'UTR presented sequence similarities between them. In order to evaluate the correspondence between trans-sialidase gene transcription and translation, it was necessary to accomplish the identification of proteins. Therefore, we developed a methodology for cell disruption, which resulted in a protein extract (referred as TcS12) from epimastigote *T. cruzi* cells. The strains selected for this study were CL-Brener (TcVI), Dm28c (TcI), Y (TcII) and 4167 (TcIV). The process for lysing the cells was optimized to 10^7 parasites/mL resuspended in 200 μ L hypotonic lysis buffer (30 minutes at 4°C), followed by water bath sonication (30 minutes at 4°C). The process efficacy was confirmed by FACS, showing that near 72% of the cells were successfully stained with propidium iodide solution (PI). The quality of the protein extracts was analyzed by LCMS/MS using the strategy MS^E label free for relative quantification of proteins. A totality of 1153 proteins were identified and the comparison of the expression profiles between the strains 4167, Dm28c and Y, using the CL-Brener as reference, showed 32, 51 and 73 proteins up-expressed, and 80, 92 and 60 proteins were shown to be down-expressed, respectively. We observed that 117 trans-sialidasases were identified in Y strain, whilst in 4167, Dm28c and CL-Brener were found 1, 2 and 1 trans-sialidasases, respectively. Moreover only one copy of trans-sialidase found in the TcS12 extract (UniProt accession number - Q4DGV8), also met its corresponding mRNA in the CL-Brener cDNA database, presenting an UTR of 214 bp, in the size range of the others trans-sialidase UTRs obtained herein. This result suggests that other factors, but not exclusively the UTR sizes *per se*, could be related to the translation phenomenon in these trypanosomes.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1 - <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	1
1.2 - Organização Genética e Processamento do mRNA de Tripanossomatídeos.....	6
1.3 – O Papel da Trans-Sialidase na Invasão Celular	9
1.4 - Sistema de Síntese na Tradução Acelular <i>in vitro</i>	14
1.5 – Abordagem Proteômica	15
2. Justificativa:	18
3. Objetivos.....	20
3.1 – Objetivo Geral	20
3.2 – Objetivos Específicos.....	20
Desenho Experimental do Projeto	21
4. Materiais e Métodos	22
4.1 – Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> :.....	22
4.1.1 – Meio de Cultura BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>):.....	22
4.2 - Extração de RNA total de <i>T. cruzi</i> :.....	22
4.3 – Transcrição Reversa e PCR qualitativa (RT – PCR):.....	23
4.4 – Preparo das Células Quimicamente Competentes:	24
4.5 – Preparo das Células Eletrocompetentes:.....	25
4.6 - Clonagem dos Produtos Amplificados	26
4.6.1 – Obtenção dos Clones Através da PCR Colônia:.....	28

4.7 – Sequenciamento	29
4.7.1 – Sequenciamento por Sanger	29
4.7.2 - Análise das sequências:.....	29
4.7.3 – Sequenciamento pelo uso do 454 Júnior (<i>Next Generation Sequencing</i> – NSG).....	30
4.8 - Síntese <i>in vitro</i> do RNA:.....	31
4.8.1 - Linearização do Plasmídeo:	31
4.8.1.a – Síntese <i>in vitro</i> de RNA não marcado em menor escala - T7 RNA polimerase (Promega®):	32
4.8.1.b - Síntese <i>in vitro</i> de RNA não marcado em maior escala – RiboMAX™ <i>Large Scale RNA Production System</i> - T7 (Promega®)	32
4.9 – Elaboração do Extrato Protéico de <i>T. cruzi</i> – Sistema Alternativo para Lise Celular	33
4.10 – Verificação da Eficiência do Sistema Alternativo de lise celular pela Análise de Citometria de Fluxo (FACS)	33
4.11 – Análise por Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC)	34
4.12 - Verificação do Sistema de Lise pela Espectrometria de Massas.....	34
4.12.1 – Digestão Enzimática do Extrato Proteico TcS12	34
4.12.2 – Análise por Espectrometria de Massas	35
4.12.3 - Análises de Bioinformática dos Espectros de Massas	37
4.12.4 - Quantificação Relativa de Proteínas	38
4.13 – Sistema de Tradução <i>in vitro</i>	38
5. Resultados.....	39
Bloco 1 de Resultados: Obtenção da 5' UTR de trans-sialidases.....	39
5.1 – Elaboração de um Banco de cDNA para o Gene da Trans-Sialidase de <i>T. cruzi</i> :	39
5.2 – Clonagem e Sequenciamento pelos Métodos de Sanger e 454 Junior:	40
Bloco 2 dos Resultados: Extrato Proteico de <i>T. cruzi</i>	45
5.3 – Elaboração do Extrato Proteico de <i>Trypanosoma cruzi</i> – Sistema Alternativo para Lise Celular:.....	46

5.4 - Análises de Citometria de Fluxo (FACS) e por Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC):.....	48
5.5 – Perfis proteicos dos quatros extratos de <i>T. cruzi</i> (TcS12):.....	51
5.6 - Análise por Espectrometria de Massas:.....	52
5.6.1 – Dados das análises de proteínas identificadas:.....	52
5.6.2 – Predição da Localização subcelular das proteínas:.....	53
5.6.3 – Expressão de Proteínas:.....	54
Bloco 3 de Resultados: Comparação da única trans-sialidase encontrada no extrato TcS12 com as demais trans-sialidasas presentes nos bancos de cDNA	60
Bloco 4 de Resultados:	63
5.7 – Síntese <i>in vitro</i> do RNA.....	63
5.8– Desenvolvimento de método para caracterização de cepas de <i>T. cruzi</i>	68
6. Discussão	71
7. Conclusões	80
8. Perspectivas	81
9. Bibliografia.....	82
10. Anexos	93
11. Apêndice	114
9.1 – Soluções:	114
I - PBS 1 X (Phosphate Buffered Saline) - Sigma Aldrich®	114
II - Solução de Lise Hipotônica (Lise Celular):.....	114
III- Meio LB (Luria-Bertani) - HIMEDIA®:	11114
IV – Meio BHI (<i>Brain Heart Infusion</i>) – Warren modificado.....	115
V – Tampão Tris – EDTA (TE) – Sigma Aldrich®	115
VI – Tampão TBE 10X (Tris – Borato / EDTA) - Sigma Aldrich®.....	115
VII – Meio <i>Terrific Broth</i> (Sigma Aldrich®).....	115
VIII – Bis – Acrilamida 40% (Bio-Rad®)	116
IX - Soluções para <i>midprep</i> (Sigma Aldrich®):	116
9.2 – Protocolos:	117

I - Preparo de Células Eletrocompetentes (One Shot TOP 10 Electrocompetent <i>E. coli</i>)	11117
II – Extração de Plasmídeo (<i>midprep</i> – preparo <i>in house</i>):.....	117
III – Procedimento Para Digestão por Tripsina e Preparo das Amostras para LC-MS	118

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 1.2 - Estimativa da população global infectada pelo <i>T. cruzi</i> (Coura & Dias, 2009)	4
Figura 1.3 – Transcrição e Processamento do mRNA em tripanossomatídeos.	7
Figura 1.4 – Representação esquemática da molécula de mRNA madura de um <i>T. cruzi</i>	8
Figura 1.5 - Representação das classes estruturais de trans-sialidases de <i>T. cruzi</i> em epimastigotas e tripomastigotas.	10
Figura 1.6 – Esquema resumindo a invasão celular pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 1.7 – Esquema representando a configuração de um espectrômetro de massa combinado com um sistema cromatográfico.	17
Figura 4.1 – Mapa do plasmídeo pGem T – easy vector (Promega®).....	26
Figura 4.2 – Mapa do plasmídeo pCR 4 – TOPO (Invitrogen®).....	27
Figura 4.3 - Mapa do plasmídeo pGlow (Invitrogen®).....	27
Figura 4.4 – Fluxo do alinhamento do 454 Junior.	31
Figura 5.1- Gel de agarose a 1% corado com GelRed	39
Figura 5.2 – Visualização do fragmento amplificado de cDNA da 5' UTR de trans-sialidase de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> CL-Brener.....	40
Figura 5.3 – Logos representando as UTR referentes à classes de trans-sialidases identificadas em CL-Brener no estágio tripomastigota tendo o iniciador 5'UTRTCNA como alvo.....	41
Figura 5.4 – Logos representando as UTR referentes às classes de trans-sialidases identificadas em CL-Brener no estágio epimastigota, tendo o iniciador 5'UTRTCNA como alvo.....	42
Figura 5.5 - A referência Tc00.1047053507085.30 pode ser evidenciada em ambos os estágios (tripomastigotas e epimastigotas).	43
Figura 5.6 – Sequenciamento por Sanger mostrando duas cópias do gene de trans-sialidase diferindo apenas pela posição do ATG.	43
Figura 5.7 – Análise por FACS da permeabilidade de membrana de células epimastigotas de CL-Brener.....	48
Figura 5.8 – Análise por microscopia (DIC) de lise celular de <i>T. cruzi</i>	50
Figura 5.9 – Gel de poliacrilamida 12% revelado por prata dos extratos proteicos de <i>T. cruzi</i> de quatro cepas distintas: Dm28c (A), Y (B), CL-Brener (C) e 4167 (D).	51

Figura 5.10 – Número de proteínas identificadas em cada cepa de <i>T. cruzi</i>	52
Figura 5.11 – Distribuição das classes de proteínas de acordo com a ortologia (Kegg) encontrada em cada cepa de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 5.12 – Predição de localização subcelular das proteínas identificadas nos extratos das 4 cepas de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 5.13 – Análise diferencial da expressão proteica das cepas de <i>T. cruzi</i> usando <i>ExpressionE</i>	55
Figura 5.14 – Esquema representando a identificação da região 5' UTR no gene de trans-sialidase.	60
Figura 5.15 – Alinhamento das UTR (B10) de trans-sialidasas.....	62
Figura 5.16 – Gel de agarose 2% corado com GelRed.....	64
Figura 5.17 – Gel de agarose 1,5% corado com GelRed para a visualização do amplicon derivado de RT-PCR.....	64
Figura 5.18 – Ensaio de fluorescência da GFP.....	65
Figura 5.19 – Gel de SDS – PAGE 12 % corado com Comassie Blue G250.....	66
Figura 5.20 - Gel de poliacrilamida 12% para verificação da síntese <i>in vitro</i>	67
Figura 5.21 – Transferência em papel de <i>nylon</i>	67
Figura 5.22 – Distribuição característica entre o peso molecular e o número de proteínas identificadas nas cepas de <i>T. cruzi</i> analisadas.	69
Figura 5.23 – Proteínas detectadas exclusivamente em cada cepa de <i>T. cruzi</i>	70

Índice de Tabelas

Tabela 5.1 – Seleção parcial de sequências obtidas pelo 454 Junior – Sequenciamento de alto-desempenho.....	45
Tabela 5.2 - Cinética de lise celular de formas epimastigotas de CL-Brener.	47
Tabela 5.3 – Comparação de expressão entre as classes de proteínas encontradas em Dm28c e CL-Brener	57
Tabela 5.4 – Comparação de expressão entre as classes de proteínas encontradas em CL-Brener e 4167.....	58
Tabela 5.5 – Comparação de expressão entre as classes de proteínas encontradas em Y e CL-Brener	59

Lista de Abreviaturas

- B.O.D:** demanda bioquímica de oxigênio
- BHI:** Brain Heart Infusion
- BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*
- cDNA:** DNA complementar
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- DIC:** *Differential interference contrast*
- dNTP:** desoxirribonucleosídeo trifosfato
- DTT:** Ditioneitol
- ESI:** *Electrospray*
- EST:** *Expressed Sequence Tags*
- EDTA:** ácido etileno-diamino-tetracético
- FACS:** Citometria de Fluxo
- GFP:** *Green Fluorescence Protein*
- LB:** Luria Bertani
- LCMS/MS:** Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
- MALDI:** *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
- ME:** mini-exon
- mL:** mililitro
- μM:** micromolar
- NSG:** *Next Generation Sequencing*
- OD:** densidade ótica
- ORF:** *open reading frame*
- pb:** pares de bases
- PCR:** *Polymerase chain Reaction*
- PI:** Iodeto de Propídeo
- q-oa-ToF:** *tandem time-of-flight*
- Q-Q-ToF:** *hybrid quadrupole orthogonal-acceleration time-of-flight*
- RT:** transcrição reversa
- RNA:** ácido ribonucléico
- RNAm:** RNA mensageiro
- SAPA:** *Shed acute-phase antigen*
- SFB:** Soro Fetal Bovino
- SL:** *spliced leader*

TBE: Tris base, ácido bórico e EDTA

TcS12: Extrato Proteico de *Trypanosoma cruzi*

TCNA: *Trypanosoma cruzi* neuraminidase

TS: trans-sialidase

uORF: upstream open reading frame

UTR: untranslated region; região não traduzida

1. Introdução

1.1 - *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

O protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), pertencente à família Trypanosomatidae, possui relevância epidemiológica por ser o agente etiológico da doença de Chagas. O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, tendo sido descrito detalhadamente por Carlos Chagas em 1909 (Chagas, 1909). Apresenta morfogênese nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, e estágios evolucionários com capacidade de divisão celular (formas replicativas) e infectividade (formas infectivas) (de Souza, 2008).

Consideremos o início do ciclo quando um inseto triatomíneo pertencente à família Reduviidae realiza o repasto sanguíneo direto de um hospedeiro vertebrado infectado com as formas tripomastigotas circulantes (também denominado por alguns autores como tripomastigota sanguíneo). Após a ingestão de sangue infectado, grande parte dos tripomastigotas circulantes será lisada no estômago do inseto (Castro et al, 2007); contudo, os sobreviventes, irão passar por um processo de morfogênese e em poucos dias irão adquirir a forma replicativa denominada epimastigota. Os epimastigotas migrarão para o intestino do inseto vetor se aderindo às membranas perimicrovilares - secretadas através de células intestinais (Alves et al, 2007). Na região posterior do tubo digestivo do inseto, uma parte dos epimastigotas se desprende das membranas perimicrovilares, realiza metacicloogênese transformando-se em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectivas liberadas junto às fezes e urina do triatomíneo (Garcia et al, 2007).

Geralmente, a infecção das células hospedeiras está diretamente associada com a inoculação de tripomastigotas metacíclicos, através das mucosas e tecidos cutâneos lesionados durante a alimentação do inseto vetor. No entanto, existem outros mecanismos de transmissão, tais como as transfusões sanguíneas, as vias transplacentárias, órgãos transplantados e a via oral (Yoshida, 2009).

Uma vez na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos irão invadir as células disponíveis no sítio de inoculação, tais como os macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, através de um reconhecimento entre as células do hospedeiro vertebrado e as células do parasito, em um processo que

envolve uma vasta quantidade de moléculas presentes tanto na superfície do parasito, como é o caso das trans-sialidasas que veremos mais adiante, quanto nas células hospedeiras. O ciclo biológico do parasito envolve uma série de etapas, como a formação de um vacúolo endocítico, vacúolo parasitóforo, que deverá abrigar o tripomastigota metacíclico e induzi-lo a diferenciar-se em amastigota (forma arredondada, apresentando um flagelo curto internalizado com capacidade replicativa). O rompimento da membrana do vacúolo parasitóforo, devido à ação de enzimas liberadas pelo próprio *T. cruzi* (porinas), proporcionará o contato direto das formas amastigotas com as organelas celulares e tecidos do hospedeiro (de Souza et al, 2010) (Figura 1.1).

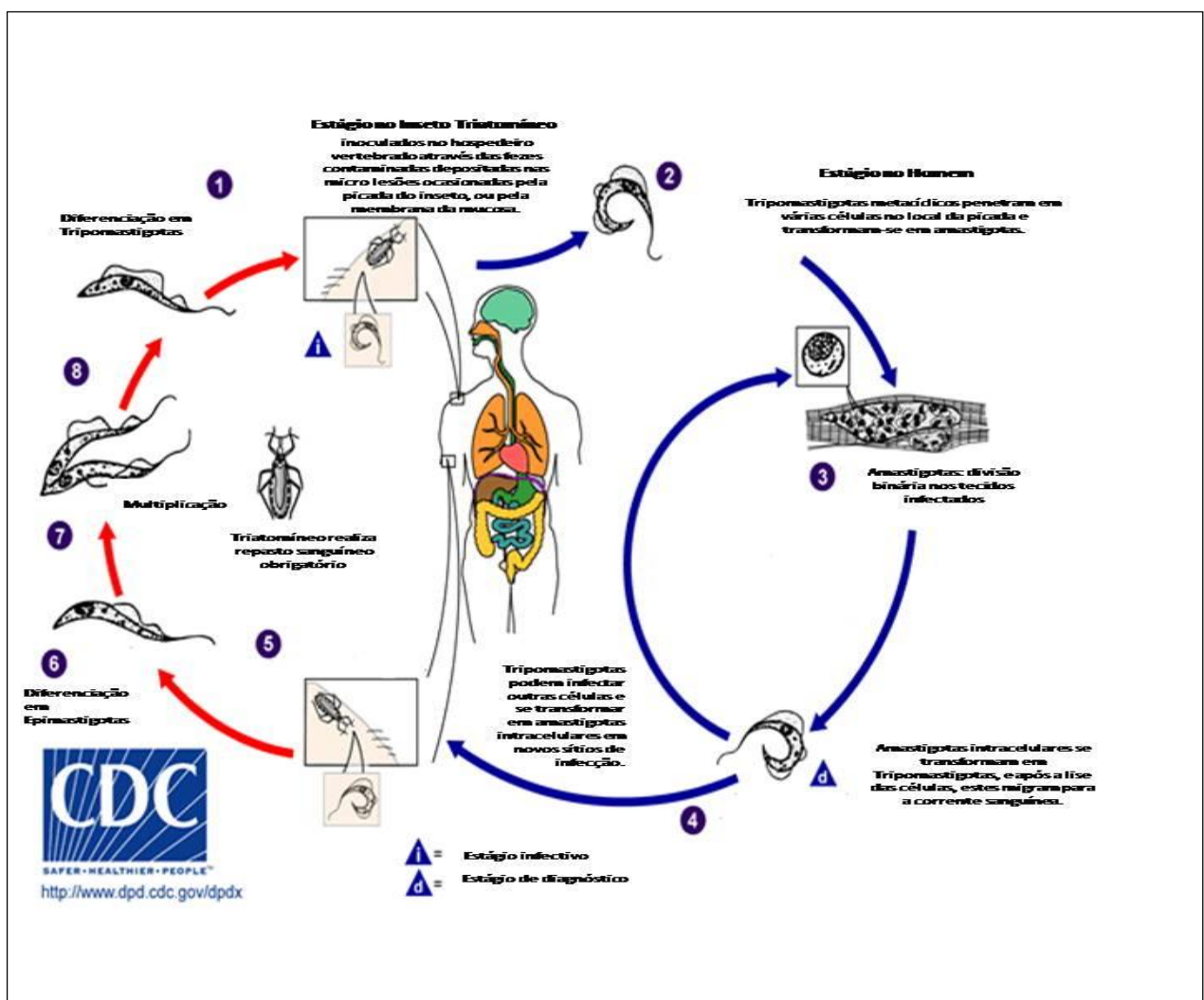


Figura 1.1 - Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*: Inoculação das fezes contaminadas do inseto vetor contendo tripomastigotas metacíclicos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (1). No interior do hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células que estão próximas ao sítio de inoculação e se diferenciam em amastigotas intracelulares (2). No interior das células, os amastigotas se multiplicam por divisão binária (3) e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (4), os quais, após infectarem células de vários tecidos podem se transformar em amastigotas, em novo local de infecção, ou permanecerem na corrente sanguínea (5). Os tripomastigotas circulantes ingeridos pelo inseto vetor em novo repasto sanguíneo transformam-se em epimastigotas na porção anterior do tubo digestivo do inseto (6), consistindo na forma replicativa no interior do tubo digestivo (7), passando por um processo de metaciclo-gênese na ampola retal do inseto (8) e diferenciando-se em tripomastigota metacíclico.

A fase inicial ou aguda da infecção pelo *T. cruzi* possui um intervalo de 4-8 semanas, quando gradativamente se instala a fase crônica, que pode persistir por toda a vida do indivíduo acometido (Dias et al, 1956; Dias, 1984). A fase aguda é usualmente assintomática, mas pode compreender os fenômenos clínicos que se estabelecem nas primeiras semanas da infecção (doença febril não específica). Os sintomas surgem entre a primeira e a segunda semana, no entanto, em alguns casos, podem ocorrer até poucos meses após a infecção (Rassi et al, 2010). O tratamento com benznidazol é responsivo para pacientes na fase aguda, podendo evitar que o indivíduo entre na fase crônica da doença. A morte ocorre ocasionalmente na fase aguda, acometendo geralmente crianças (< 5% dos casos sintomáticos), devido a miocardite grave e / ou meningoencefalite (Andrade et al, 1992; Pinto et al, 2009).

Após a fase aguda, a maior parte dos indivíduos (60 - 70% da população infectada) desenvolve uma resposta imune protetora (desaparecimento progressivo de IgM e elevação dos anticorpos específicos da classe IgG), resultando na queda da parasitemia e ausência de sinais e sintomas clínicos evidentes. Esses indivíduos entram então na forma indeterminada da infecção caracterizada pela presença de sorologia específica e ausência de manifestações clínicas, isso é, sem anormalidades eletrocardiográficas e/ou radiológicas no coração, esôfago ou cólon. Esta fase pode persistir por alguns meses até uma vida inteira (WHO, 2002). A maioria dos casos agudos não tratados evolui para a forma crônica indeterminada.

Os demais 30 – 40% dos indivíduos desenvolverão manifestações típicas da fase crônica, relacionadas com o envolvimento de patologias no coração, esôfago, cólon, ou uma combinação destas, usualmente, de 10 a 30 anos após o início da infecção (Dias, 1995).

A recidiva da doença de Chagas pode acometer indivíduos cronicamente infectados que se tornaram imunologicamente comprometidos, tais como os co-infectados com o vírus HIV ou pelo uso de drogas imunossupressoras (Braz et al, 2008).

O mal de Chagas ainda se inclui no quadro das doenças negligenciadas, com indicadores que apontam 0,25% de investimentos decorrentes de iniciativas públicas e privadas destinadas a essa enfermidade e sem o desenvolvimento de nenhum novo medicamento (Hotez et al, 2006). A doença de Chagas é considerada a doença parasitária com o maior impacto sócio-econômico na América Latina, devido à elevada morbidade e mortalidade, incluindo a ocorrência de mortes súbitas (Santos Lda et al, 2012).

A doença é endêmica em uma ampla faixa territorial que se estende desde o México até a Argentina (Coura & Dias, 2009) (Figura 1.2). Nas últimas décadas, a migração rural para áreas urbanas permitiu a difusão da doença para essas áreas, enquanto mais recentemente, a migração em larga escala de indivíduos de região endêmica para outra não endêmica, tais como Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Japão, Austrália e muitos países da Europa, fez com que a doença se disseminasse pelo mundo, assumindo um aspecto globalizado (Schmunis, 2007);(Gascon et al, 2010). Atualmente estima-se em 8 milhões de pessoas infectadas em 21 países endêmicos, com 28 milhões de indivíduos sob risco de contrair a infecção e incidência de aproximadamente 50.000 casos novos por ano (Rassi et al, 2010);(Santos Lda et al, 2012);(Coura, 2009).

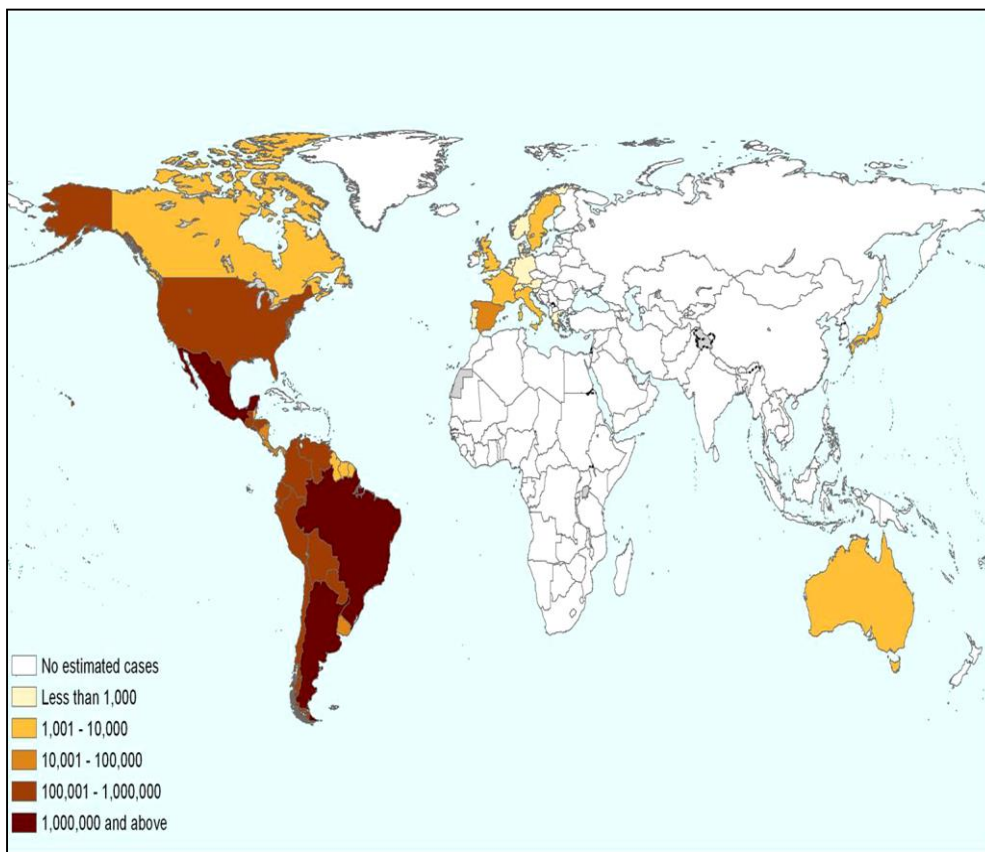


Figura 1.2 - Estimativa da população global infectada pelo *T. cruzi* (Coura & Dias, 2009)

No Brasil mais de 52 espécies de triatomíneos tem sido descritas; porém, cinco espécies em particular possuem importância epidemiológica, por serem prevalentes em áreas de peridomicílio, sendo estas: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (Coura & Dias, 2009). A partir de 1990, iniciativas regionais e internacionais contribuíram para o

controle vetorial do *T. infestans*, reduzindo substancialmente o número de novas infecções na América Latina (WHO, 2002). Considera-se que Chile, Uruguai, Brasil e grande parte da América Central (Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicarágua) estejam livres da transmissão vetorial por *T. infestans* (Coura & Dias, 2009).

Existem vários reservatórios silvestres do *T. cruzi*, dentre eles destacam-se os marsupiais, xenarthra (mamíferos placentários com ausência de dentes, como os tatus e tamanduás), morcegos, roedores e primatas não humanos. Entre os reservatórios domésticos, destacam-se os cães, gatos, ratos peridomiciliados, camundongos e porquinho-da-índia. Animais como pássaros, répteis e peixes não se infectam por apresentarem uma enzima com função lítica que rompe o *T. cruzi* (Barretto, 1964); (Coura, 2009).

O controle da doença de Chagas ocorre através da interrupção dos mecanismos de transmissão. Ao melhorar as condições de habitação para a população exposta, com o devido apoio governamental subsidiando questões relacionadas ao sanitarismo público, educação, e fornecimento de tratamento adequado para os casos agudos e crônicos dos indivíduos acometidos pela enfermidade, aumenta-se o êxito do combate à moléstia (Coura, 2009)

O controle vetorial é empregado principalmente nas áreas com grande presença de insetos próximos às residências, através do uso de piretróides sintéticos. Essas substâncias apresentam um efeito residual duradouro, de 3 a 9 meses dentro do ambiente doméstico. A toxicidade é baixa para humanos e animais domésticos, porém, tóxico para os peixes, tendo, portanto, cuidado com o seu manuseio próximo às fontes de água natural (Coura, 2009)

Em linhas gerais, os mecanismos de transmissão podem ser categorizados em vias principais e secundárias de transmissão do parasito. Em relação às principais vias de transmissão, temos a vetorial, por transfusão sanguínea, transmissão oral através de alimentos contaminados e por via placentária. As vias secundárias referem-se aos acidentes laboratoriais e manuseio de animais contaminados, transplante de órgãos, e transmissão sexual e amamentação de recém-nascidos com leite contaminado de mãe infectada (em caso de ferimentos locais e contato direto com esperma ou fluido menstrual contendo *T. cruzi*) (Coura, 2007; Dias, 1997). O aumento do movimento migratório de indivíduos de áreas endêmicas para áreas não endêmicas têm proporcionado a globalização da doença de Chagas, estabelecendo assim um perfil epidemiológico e sócio-econômico diferentes nas últimas décadas (Schmunis, 2007).

1.2 - Organização Genética e Processamento do mRNA de Tripanossomatídeos

O *T. cruzi* representa uma espécie heterogênea que consiste em um grupo de cepas ou isolados circulantes entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados (Zingales et al, 2012) A sua elevada heterogeneidade tem instigado estudos biológicos, bioquímicos e moleculares com o intuito de entender a variabilidade das manifestações clínicas da doença de Chagas e suas diferenças geográficas, segundo a morbidade e mortalidade da enfermidade (Macedo et al, 2004).

As sequências genômicas para os estudos em tripanossomatídeos foram obtidas através de sequenciamento aleatório (*whole – genome shotgun*). Para a obtenção do genoma de *T. cruzi*, foi escolhida a cepa híbrida CL-Brener, por ser bem caracterizada experimentalmente, e identificou-se um tamanho de 60.3 Mb, organizado em 41 cromossomos (Weatherly et al, 2009) contendo 12.000 genes haplóides, geralmente agrupados entre 10 e 100 genes na mesma fita de DNA (El-Sayed et al, 2005).

Cerca de 50% do genoma de *T. cruzi* é formado por uma grande família gênica de retrotransposons, regiões de repetição subteloméricas e proteínas de superfície (El-Sayed et al, 2005). A maioria desses genes codifica proteínas de superfície, tais como as mucinas associadas a proteínas de superfície (MASP), membros das trans-sialidases (TS), mucinas e a glicoproteína de superfície gp63, as quais são *T. cruzi* específicas e representam aproximadamente 18% do total de genes codificadores de proteínas (El-Sayed et al, 2005).

O DNA mitocondrial dos tripanossomatídeos apresenta-se de forma peculiar. Possui uma estrutura em rede única conhecida como DNA do cinetoplasto (kDNA), composto por milhares de minicírculos e dezenas de maxicírculos topologicamente interligados que se replicam em momentos específicos, apresentando portanto, diferenças significantes em relação aos demais eucariotos (El-Sayed et al, 2005).

Os tripanossomatídeos são essencialmente diplóides, porém, a reprodução sexual não é uma obrigatoriedade de seu ciclo de vida (El-Sayed et al, 2005).

Os genes codificadores de proteínas nos tripanossomatídeos estão organizados em uma longa unidade transcricional policistrônica, e a regulação gênica ocorre de maneira pós-transcricional (Araujo & Teixeira, 2011). Exceto pela presença do promotor *Spliced Leader* (El-Sayed et al), também denominado de mini-exon, nenhum outro promotor foi, até o presente momento, identificado para o reconhecimento da RNA

polimerase II. Além disso, poucos fatores de transcrição têm sido descritos (Cribb & Serra, 2009); (Cribb et al, 2010).

A transcrição é iniciada nas duas direções entre grupos gênicos divergentes, a fim de produzir um pré-mRNA policistrônico (Martinez-Calvillo et al, 2003);(Monnerat et al, 2004). Após a formação do pré-mRNA, duas reações simultâneas denominadas, de *trans-splicing* e poliadenilação, ocorrem para a geração do transcrito monocistrônico maduro - mRNA (Teixeira & daRocha, 2003).

O mRNA maduro de todo tripanossomatídeo apresenta uma sequência de 39 nucleotídeos na extremidade 5' (mini-exon); essa sequência é oriunda de um pequeno RNA doador presente no genoma de kinetoplastidas. O gene desse RNA doador é constituído de um exon, que corresponde a sequência altamente conservada de 39 pares de bases que deverá ser transportada para o mRNA monocistrônico; um intron, que é uma região moderadamente conservada, e uma região intergênica ou espaçador não traduzido (Liang et al, 2003); (Liang et al, 2007). Como a sequência consenso eucariótica AAUAAA não está presente nos tripanossomatídeos, um trato rico em polipirimidina na região intergênica, guia a adição do mini-exon na extremidade 5' e, ao mesmo tempo, a poliadenilação na extremidade 3', resultando em uma molécula de mRNA madura (Araujo & Teixeira, 2011) (Figura 1.3).

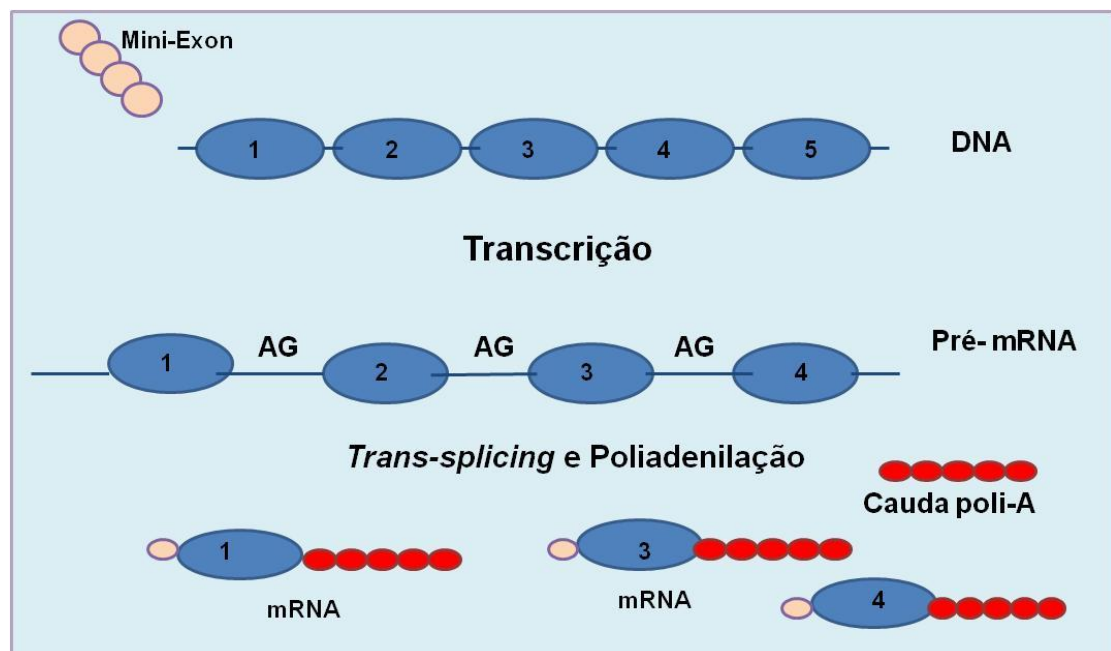


Figura 1.3 – Transcrição e Processamento do mRNA em tripanossomatídeos. Os genes são transcritos como um pré-mRNA policistrônico, e processados por reações de *trans-splicing* e poliadenilação. Trato de polipirimidina (sequências ricas em CT) – sinais de *trans-splicing*, atrelados aos sítios de *trans-splicing* orientam a inserção do mini-exon na extremidade 5' enquanto uma cauda poli-A é inserida, ao mesmo tempo à extremidade 3' gerando, dessa forma, transcritos monocistrônicos de mRNA maduro.

Muitos fatores de *trans-splicing* são identificados através de análises *in silico* (Gunzl, 2010). Um exemplo desses estudos são os fatores envolvidos nos mecanismos de *splicing* identificados pela bioinformática como o PRP43 e PRP31 (Liang et al, 2006). Tanto a proteína PRP43 quanto a PRP31 possuem funções essenciais para a formação e desmontagem do *spliceosoma*, sendo, portanto, funcionalmente equivalentes (Liang et al, 2006). No entanto, o uso de bioinformática como ferramenta para as análises e identificação de proteínas nos tripanossomatídeos ainda é pouco explorada (Gunzl, 2010).

Os genes dos eucariotos apresentam segmentos em suas extremidades 5' e 3' que são transcritos porém não traduzidos. Essas regiões são denominadas de regiões não traduzidas ou simplesmente por 5' e 3' UTR (Brandao, 2006) (Figura 1.4).

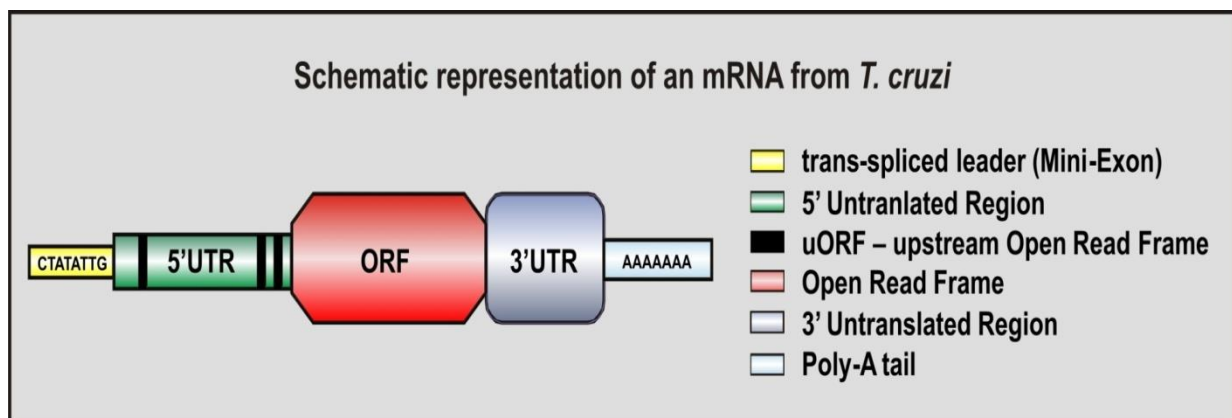


Figura 1.4 – Representação esquemática da molécula de mRNA madura de um *T. cruzi*. O mini-exon está representado pela sequência contendo seus 8 nucleotídeos finais (CTATATTG); a extremidade 5' UTR é entremeadada por pequenas sequências denominadas uORFs. A região codificadora, ORF, localiza-se posterior a 5' UTR e antecede a 3'UTR. O trato de poli-A ou cauda poli-A situa-se ao extremo de 3'UTR. (Galdino *et al* 2011, em 2011 American Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting)

As UTR foram negligenciadas por muito tempo, por acreditarem que não exerciam nenhuma função. No entanto, estudos evidenciaram sequências de elementos regulatórios de diferentes genes, dispostos nessas regiões, atuando como sítios de ligação de proteínas no mecanismo de tradução e modulando mRNA individualmente durante o ciclo de vida do parasito (De Gaudenzi et al, 2003). Foi evidenciado a participação ativa desses elementos no controle transducional, na meia-vida e na estabilidade do mRNA, além da localização subcelular (Pesole et al, 2001).

A região 5' UTR situa-se na extremidade 5' do DNA de todos os genes codificadores de proteína que são transcritos em RNA mensageiro, porém, esta região não é traduzida. Ela desempenha um papel regulatório relacionado com o controle inicial da tradução (Barrett et al, 2012). Em geral, a 5' UTR é mais curta do que a 3'

UTR, com baixa quantidade de GC e sem a presença do códon AUG (Kochetov et al, 1998).

O tamanho médio das sequências compreendidas na 5' e na 3' UTR em *T. cruzi* é de 81 (El-Sayed et al, 2005) e 334 pares de bases, respectivamente (Brandao & Jiang, 2009). Na 5' UTR, 80% das anotações referentes ao seu comprimento está abaixo de 120 pb, enquanto que a 3' UTR apresenta comprimento inferior a 450 pb (Brandao & Jiang, 2009). Essas informações propiciaram o desenvolvimento de ferramentas para os estudos nessa área, como por exemplo, a construção de vetores de transfecção em tripanossomatídeos para uma análise experimental dessas regiões transcritas, porém não traduzidas (Araujo & Teixeira, 2011).

Os genes com *UTR* curtas estão associados a uma maior expressão do transcrito (Davuluri et al, 2000). A adição de sítios de *trans-splicing* pode alterar o comprimento da 5' UTR. Esse fato foi verificado em vários genes repórteres nos quais foram constatados sítios de *trans-splicing* adicionais; além disso, estudos anteriores com as EST (*Expressed Sequence Tags*) de *T. cruzi* mostraram que isso pode ser bastante comum nos genes de forma geral (Brandao et al, 2008). As ESTs são geradas a partir do sequenciamento parcial do cDNA de genes transcritos e a análise de suas sequências apresentou-se como uma boa ferramenta na identificação de genes, pois é capaz de obter perfis detalhados de genes expressos de forma rápida e eficiente (Verdun et al, 1998).

Os estudos de Brandão e Jiang (2009) sugerem que a escolha de genes que se afastam muito da média de tamanhos das *UTR* de mRNAs de *T. cruzi*, pode ser um ponto de partida para os estudos de mecanismos pós-transcricionais dependentes de motivos específicos das *UTR* (Brandao & Jiang, 2009).

1.3 – O Papel da Trans-Sialidase na Invasão Celular

As sialidases e os ácidos siálicos possuem um importante papel nas interações celulares e na modulação do reconhecimento de patógenos invasores das células hospedeiras de mamíferos (Schenkman et al, 1994). O *T. cruzi* expressa uma única enzima metabolizadora de ácido siálico denominada **trans-sialidase** ou **TS**, responsável por catalisar a transferência do ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas aceptoras presentes na membrana plasmática do parasito (Schenkman et al, 1994).

Estudos experimentais (Cazzulo & Frasch, 1992) confirmaram a divisão funcional da enzima em dois domínios: a região amino-terminal, com atividade catalítica, e a região C-terminal com funções estruturais, tais como a oligomerização e o posicionamento do domínio catalítico sobre a membrana plasmática do parasito. O modelo da TS de epimastigota e de tripomastigotas destaca a estrutura da TS em epimastigotas como monomérica, enquanto que em tripomastigotas, esta proteína apresenta-se como multimérica e ancorada à membrana pela âncora de glicosil fosfatidil-inositol. Apesar das diferenças evidenciadas, as duas formas apresentam um domínio catalítico similar (Schenkman et al, 1994) (Figura 1.5).

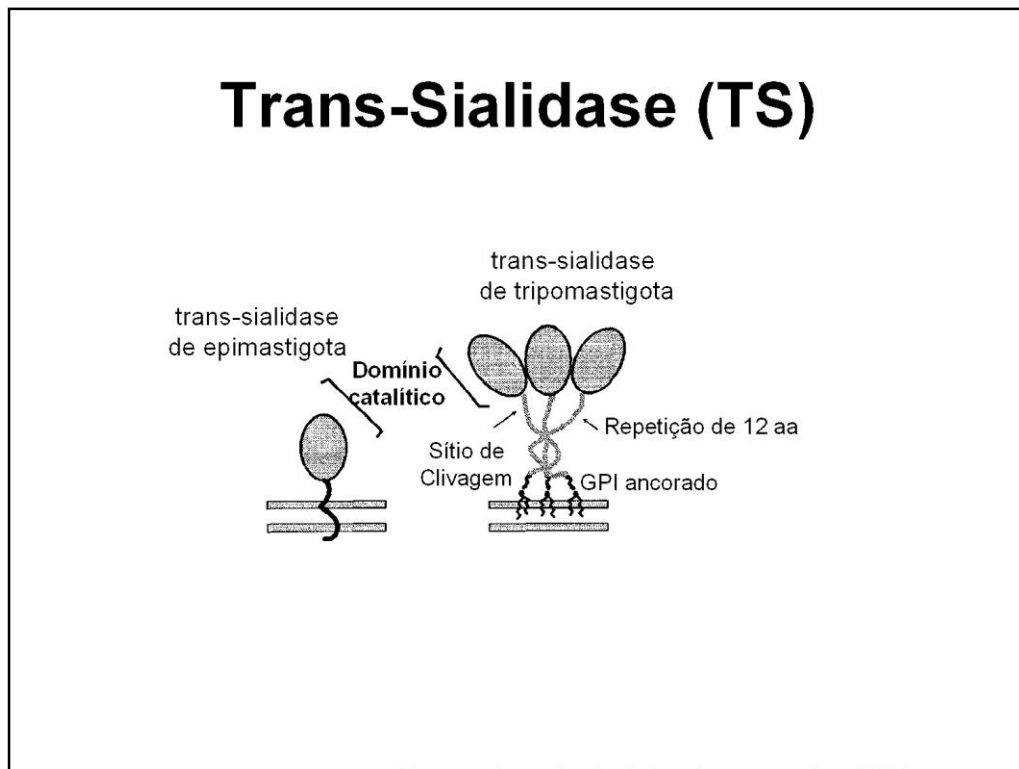


Figura 1.5 - Representação das classes estruturais de trans-sialidasas de *T. cruzi* em epimastigotas e tripomastigotas. Figura adaptada de Schenkman et al, 1994.

Os genes codificadores da enzima TS estão dispostos no genoma de *T. cruzi* como cópias múltiplas (Macina et al, 1989); (Pereira et al, 1991), em vários cromossomos (Henriksson et al, 1990) Encontram-se em regiões subteloméricas (sequências que se estendem das regiões de repetições teloméricas até a primeira sequência não repetitiva) ou no interior dos cromossomos associados a outros genes codificadores de proteínas de superfície (El-Sayed et al, 2005).

A família das TS contém 1430 membros, com tamanhos que oscilam entre 60 kDa a 200 kDa (Colli, 1993; Pollevick et al, 2000). Desses, 12 codificam trans-sialidase

enzimaticamente ativa, 725 codificam proteínas inativas TcTS – *like*, e 693 são pseudogenes (El-Sayed et al, 2005).

Inicialmente, a superfamília foi dividida em quatro grupos baseados na similaridade entre as sequências e em suas propriedades funcionais. Grupo I contendo trans-sialidases ativas tais como TCNA e SAPA (*Shed acute-phase antigen*), além das trans-sialidases expressas em epimastigota (TS-epi) e tripomastigota (TS-tripo). O Grupo II compreende as glicoproteínas de superfície associadas aos mecanismos de ligação e invasão às células do hospedeiro, como a gp85, gp90 e gp82. O Grupo III está representado por proteínas que inibem as vias clássica e alternativa do sistema complemento e tem como representante a proteína FL-160. O Grupo IV tem por membro a proteína TsTc13 de função desconhecida, porém contendo um motivo conservado presente em todos os integrantes dessa família (Schenkman et al, 1994);(Colli, 1993). Contudo, estudos recentes sobre o genoma da cepa CL-Brener revelaram quatro novos grupos identificados como pertencentes à família das trans-sialidases constituindo, portanto, um total de 8 grupos (Freitas et al, 2011).

Essa família gênica é altamente polimórfica, embora apresente vários motivos conservados, sendo o mais conservado, **VTVxNVxLYNR**, localizado acima da terminação carboxi de todos os membros pertencentes a essa superfamília (Freitas et al, 2011). Sua organização estrutural é variável entre cromossomos e as cepas, podendo ser um importante ponto de estudo para a análise de genes com características de TS ativa (Freitas et al, 2011), (Dc-Rubin & Schenkman, 2012).

Dentre as 223 proteínas detectadas pela análise proteômica contendo características da família GH-33 (família pertencente as trans-sialidase), 15 genes são TS enzimaticamente ativos (Atwood et al, 2005). A atividade enzimática foi identificada em epimastigotas (Previato et al, 1985) e nos extratos de tripomastigotas (Zingales et al, 1987). Em culturas axênicas, epimastigotas apresentam baixa atividade enzimática da TS (Chaves et al, 1993). No entanto, a atividade enzimática aumenta quando ocorre a metaciclogênese e os mesmos diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (Yoshida, 1983), evidenciando o importante papel de transferência do ácido siálico dos oligossacarídeos e glicoproteínas do hospedeiro para a superfície do *T. cruzi* (Zingales et al, 1987). A transferência é específica e envolve a molécula de ácido siálico $\alpha - (2 - 3)$ ligada ao doador e à formação de um complexo contendo o terminal do grupo $\beta -$ galactopiranosil no substrato acceptor (Giorgi & de Lederkremer, 2011).

A invasão celular pelo *T. cruzi* (tripomastigotas metacíclicos) caracteriza-se pela formação do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira (Dc-Rubin & Schenkman,

2012). A formação desse vacúolo e a retenção do *T. cruzi* são dependentes da junção entre os lisossomos com a membrana do hospedeiro e a associação precoce dos endossomos com o parasito (Burleigh, 2005) (Figura 1.6).

A superfície do *T. cruzi* recoberta por ácido siálico, interage com uma lectina Ig – like de células dendríticas capaz de suprimir a produção da citocina pró-inflamatória IL-12 responsável pela ativação da resposta imune (Erdmann et al, 2009). Além disso, o ácido siálico na superfície do parasito fornece proteção contra a ação da atividade lítica do sistema imunológico do hospedeiro (Ribeirao et al, 2000), e inibição da ligação do fator B do complemento (Joiner et al, 1986).

Dessa forma, podemos associar a supressão da resposta imune inata durante o início da infecção com o estabelecimento da infecção (Dc-Rubin & Schenkman, 2012) devido à clivagem da âncora de GPI, e da subsequente remoção de ácido siálico da superfície, levando o paciente a um quadro de trombocitopenia na fase aguda da doença de Chagas (Tribulatti et al, 2005).

No entanto, as manifestações clínicas resultantes são altamente variáveis, levando o paciente desde o estado assintomático até complicações cardíacas graves (Erdmann et al, 2009). Uma possível causa para a variação das manifestações clínicas na doença de Chagas seria a variabilidade genética das cepas de *T. cruzi*, as quais compreendem populações de parasitos altamente heterogêneos (Dvorak, 1984), (Revollo et al, 1998; Zingales et al, 1999).

Utilizando a cepa de *T. cruzi* do grupo I (Tehuantepec) e outra do grupo II (Tulahuen), demonstrou-se que a cepa classificada no grupo II contém maior quantidade de ácido siálico em sua superfície do que a do grupo I, fazendo com que a mesma desenvolva uma parasitemia maior, bem como uma resposta inflamatória aumentada no modelo experimental de infecção. Contudo, ambas as cepas apresentam a mesma capacidade de invasão celular, porém com potencialidade diferenciada para a modulação das células dendríticas e toda a cascata inflamatória (Erdmann et al, 2009).

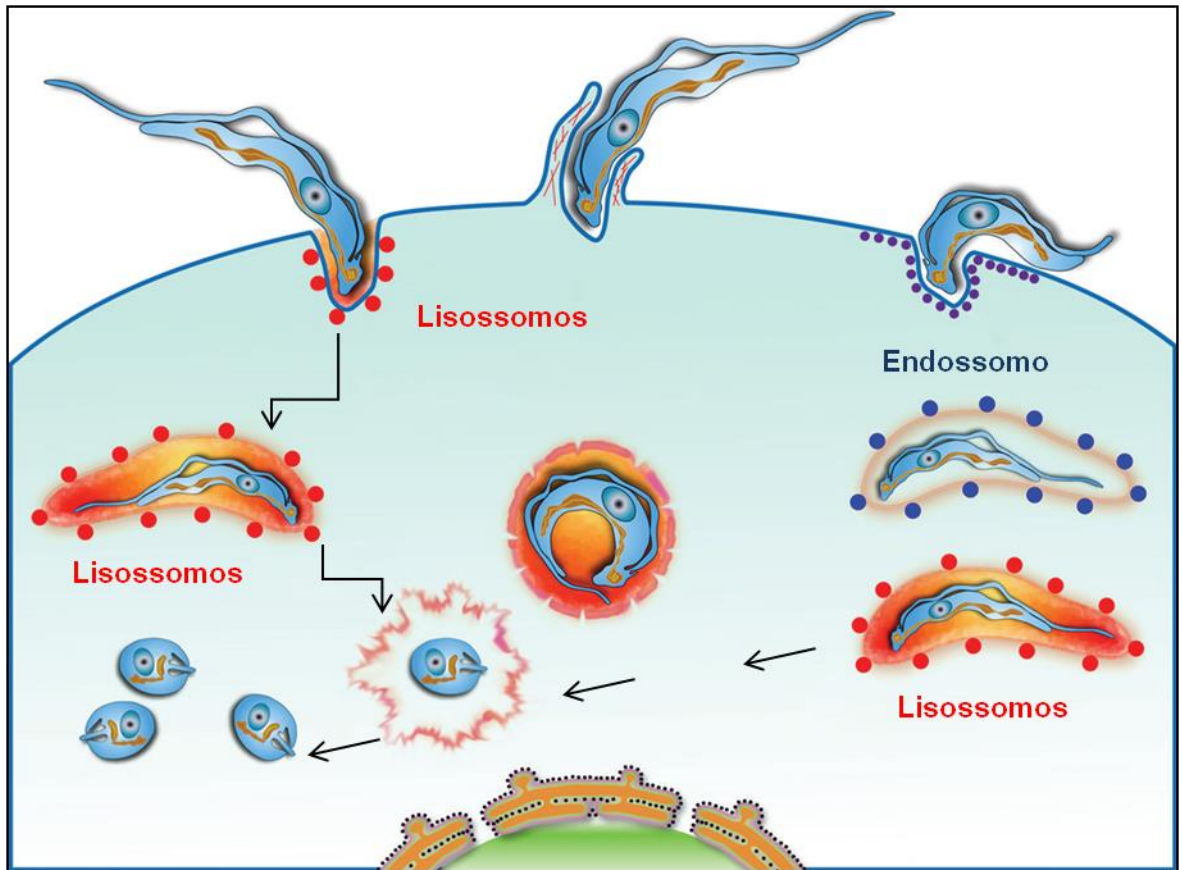


Figura 1.6 – Esquema sumarizando a invasão celular pelo *Trypanosoma cruzi*. No momento da invasão do *T. cruzi* na célula hospedeira, há um aumento nos níveis de cálcio no citoplasma e recrutamento de lisossomos para o local de entrada. Outra via utilizada para a invasão é a invaginação da membrana levando ao acúmulo de PIP₃, formando um vacúolo endossomal que será posteriormente enriquecido com lisossomos. Após a internalização, os Tripomastigotas se transformam gradativamente em amastigotas que, após a ruptura do vacúolo por ação de porinas, como TcTOX, entram em contato direto com o citoplasma passando a se multiplicar (de Souza et al, 2010).

A principal TS expressa pelos epimastigotas não possui a região de repetição SAPA e não está ancorada a membrana por GPI (Briones et al, 1995); além disso, é pouco secretada para o meio (Rubin-de-Celis et al, 2006). Essas trans-sialidases sializam, principalmente, mucinas de 35 – 50 kDa depositando-as sobre a superfície dos epimastigotas e influenciando na migração e diferenciação do parasito frente ao intestino do inseto repleto de sangue (Schenkman & Eichinger, 1993), (Frasch, 2000). Apesar de expressarem apenas 17% das trans-sialidases, quando comparados aos tripomastigotas, provavelmente a sialização nos epimastigotas está envolvida na adesão do parasito às células epiteliais da ampola retal do inseto (Giorgi & de Lederkremer, 2011), bem como na proteção do parasito mediante a ação de enzimas glicolíticas presentes no tubo digestivo do vetor (Garcia & Azambuja, 1991).

Algumas trans-sialidases inativas atuam como *lectina-like*, ou seja, servem de âncora ao interagirem com a porção de carboidrato dos glicoconjugados presentes na

superfície do hospedeiro, facilitando, dessa forma, a transferência do ácido siálico realizado pelas enzimas ativas (Oppezzo et al, 2011).

1.4 - Sistema de Síntese na Tradução Acelular *in vitro*

Estudos sobre o sistema de síntese de proteínas *in vitro* vêm contribuindo ao longo dos anos para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação pós transcricional da expressão gênica (Zamecnik & Keller, 1954).

A síntese acelular oferece várias vantagens quando comparada com a tecnologia celular recombinante convencional, como por exemplo, a isenção de possíveis interações que poderiam ocorrer durante a expressão de proteínas recombinantes nas células dos microorganismos (Nakano & Yamane, 1998).

Essa metodologia tem se mostrado uma alternativa bastante eficiente aos estudos clássicos de expressão gênica *in vivo*. A síntese acelular ocorre em um ambiente perfeitamente modificável sendo capaz de se adequar as necessidades do ensaio; dessa forma, torna-se ideal para investigações de grupos de marcadores seletivos de moléculas proteicas (Torizawa et al, 2004), fornecimento de informações genéticas através da tradução *in vitro* (Rungpragayphan et al, 2003) e de manipulação de proteínas tóxicas *in vitro* que não poderiam ser sintetizadas *in vivo* (Kang et al, 2000). Além disso, vislumbra a expressão de múltiplas proteínas simultaneamente pela adição de bibliotecas de mRNA e cDNA (Kim et al, 2006; Ohuchi et al, 1998).

Os protocolos em vigência para a realização da síntese envolvem etapas extensas e complicadas, consumindo muito tempo e alto custo. Portanto, o desenvolvimento de uma metodologia mais prática e econômica se tornou crucial para a expansão e aplicação da síntese acelular (Kim et al, 2006).

O protocolo elaborado e estabelecido por Pratt (Pratt, 1984) denominado S30, se tornou um método padrão baseado nos extratos de *Escherichia coli*, no entanto, seu preparo envolve várias etapas para a lise celular, tais como, alta centrifugação (30.000g), pré – incubação, diálise e clarificação (Kim et al, 2006).

A fim de melhorar o preparo de extrato protéico de células de *E. coli*, Kim e colaboradores (Kim et al, 2006) desenvolveram uma metodologia, baseada no extrato S30, porém com baixa centrifugação e diminuição das etapas; a esse novo extrato foi dado o nome de extrato S12 (com centrifugação de 12.000g).

Os sistemas de síntese acelular mais comuns em eucariotos são os extratos de gérmen de trigo, reticulócito de coelho e de levedura, utilizados para estudos de engenharia genética voltada para a análise protéica, assim como muitas aplicações no diagnóstico e testes toxicológicos (He & Wang, 2007). No entanto, esse sistema em células eucarióticas não é de fácil obtenção em grande escala, por serem laboriosos e de alto custo em seu preparo, além de serem derivados de organismos de difícil manipulação genética (He & Wang, 2007).

A *Leishmania tarentolae* tem sido o organismo eucarioto extensivamente utilizado como modelo nos estudos de síntese acelular. Isso se deve ao fato de serem facilmente manipuladas geneticamente e em meio de cultura e não serem patogênicas para os mamíferos (Breitling et al, 2002); (Niculae et al, 2006); (Fritsche et al, 2008).

Com o advento da era proteômica, houve uma expansão dessa técnica, promovendo várias aplicações relacionadas a estrutura e função das proteínas (Katzen et al, 2005). Portanto, podemos considerar essa tecnologia como uma ferramenta bastante flexível, capaz de manipular as condições de reações e gerar novas aplicações, como as pesquisas na área pós-genômica e estudos envolvendo a expressão de proteínas (Katzen et al, 2005);(Mureev et al, 2009).

Sendo assim, com o intuito de contribuirmos com os estudos relacionados aos mecanismos pós-transcricionais e transducionais do *T. cruzi*, elaboramos, no presente trabalho, um novo protocolo, baseado no extrato S12 (denominado TcS12), para a formação de um extrato específico de *T. cruzi*.

1.5 – Abordagem Proteômica

O termo proteoma é referente à análise da expressão proteica por um determinado tipo celular ou organismo em condições definidas (Aebersold & Mann, 2003); (Schilling et al, 2012). A identificação de proteínas fornece uma visão ampliada da rede regulatória celular e de interação entre as várias biomoléculas que compõem um sistema biológico (célula e tecido, por exemplo). Isso permite estabelecer uma ligação entre a proteína identificada e seu gene (ou genes) relacionado(s) e, por conseguinte, todo o código genético da espécie em estudo, levando, então a informações fisiológicas e genéticas (Aebersold & Mann, 2003).

Atualmente, as metodologias baseadas no uso da espectrometria de massas são muito populares no estudo de um determinado proteoma, principalmente devido a

sensibilidade e rapidez de resultados oferecidos por tal técnica. Entre as suas várias finalidades, a espectrometria de massa é usada não somente para se identificar proteínas, mas também para se comparar a expressão diferencial dessas biomoléculas, e até mesmo para se investigar modificações pós-transducionais que comumente ocorrem em todos os aminoácidos (Schilling et al, 2012).

No entanto, a aplicação da espectrometria de massa foi restrita durante muito tempo a investigação de pequenos compostos termoestáveis, devido à falta de uma fonte de ionização capaz de ionizar e transferir as moléculas ionizadas para a fase gasosa sem haver fragmentação excessiva. Não havia ainda técnicas de ionização que fossem capazes de preservar as características do material a ser analisado (Aebersold & Mann, 2003).

As análises feitas pela espectrometria passaram por mudanças drásticas, levando ao aumento de seu uso no estudo de biomoléculas após a introdução das técnicas de ionização, *Electrospray* (Magdesian et al) e *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI), que permitiram a transformação de biomoléculas intactas em íons moleculares (Karas & Hillenkamp, 1988). Concomitantemente, vieram novos analisadores de massa como os *íon trap*, e aqueles atrelados a instrumentos multi-estágios, por exemplo, *hybrid quadrupole orthogonal-acceleration time-of-flight* (Q-Q-ToF[®] e o q-oa-ToF[®]) e *tandem time-of-flight* (ToF-ToF[®]) (Aebersold & Mann, 2003).

Todas as configurações existentes foram desenvolvidas levando-se em conta dois aspectos fundamentais da espectrometria, que são a sensibilidade e precisão de detecção. Aspectos esses que melhoraram os estudos de proteomas. Várias estratégias que combinam a espectrometria de massa com outras técnicas de separação de biomoléculas, como eletroforese e cromatografia líquida também se mostraram muito eficazes na investigação proteômica. Usado frequentemente nesse tipo de estudo, o acoplamento da espectrometria de massa a um sistema de cromatografia líquida (LCMS/MS) (Figura 1.7) permite a identificação de proteínas em abordagens “high-throughput” desvendando então, uma visão da grande complexidade do proteoma das espécies. Nesse trabalho, foi usada a LCMS/MS para se estudar a comparação do proteoma de quatro cepas de *T. cruzi* como será abordado na discussão.

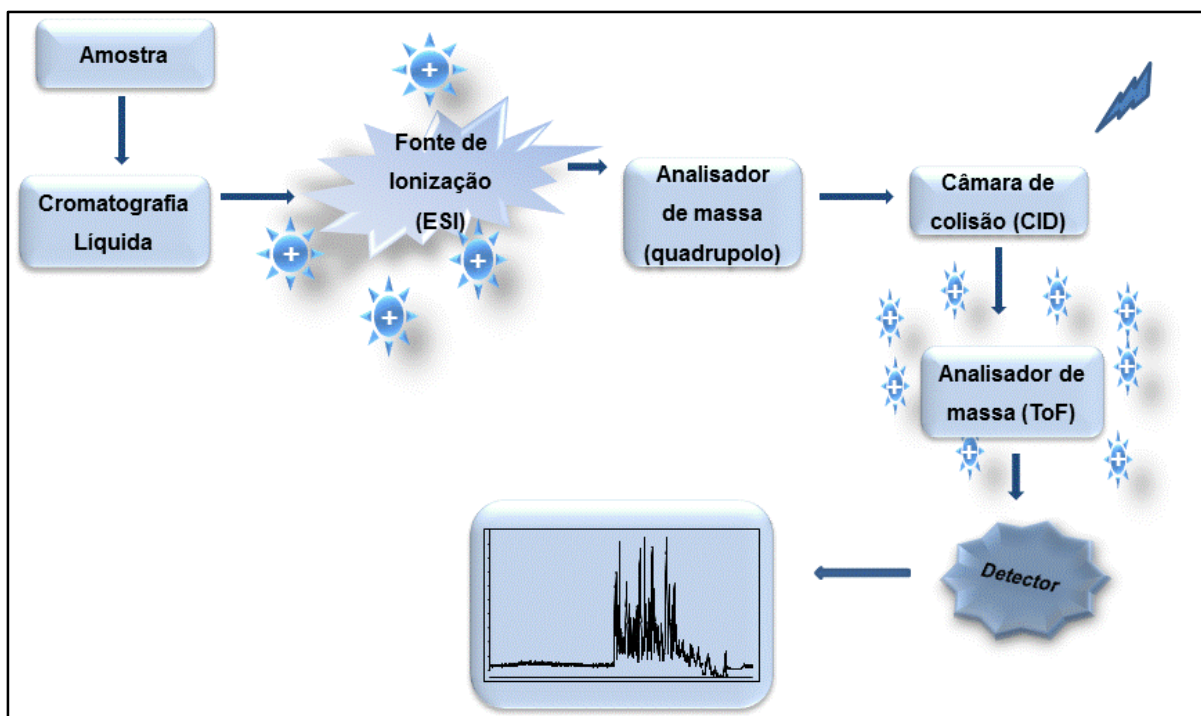


Figura 1.7 – Esquema representando a configuração de um espectrômetro de massa combinado com um sistema cromatográfico. A amostra é inserida em uma coluna de cromatografia líquida onde seus componentes são separados antes de serem injetados em um espectrômetro de massas. O espectrômetro de massas é composto de três partes: uma fonte de ionização como o *Electrospray* e o MALDI, converte as biomoléculas em íons, o analisador de massas, representado pelo quadrupolo e o TOF, onde os íons são separados de acordo com sua razão m/z (razão entre a massa e a carga da biomolécula analisada), e um detector onde os íons são detectados. Os sinais gerados pelo detector são convertidos em um cromatograma e portanto um espectro de massa.

2. Justificativa:

O acúmulo de evidências relatadas sobre a participação de elementos regulatórios nos mecanismos de tradução nas UTR, de diferentes genes, nos motivou a investigar a relação entre a organização gênica de famílias de cópias múltiplas e seu nível de expressão proteica. O gene selecionado nesse trabalho foi o da família das trans-sialidases (TS): (a) por estar representado em múltiplas cópias no genoma de *Trypanosoma cruzi*; (b) por ser importante no processo de infectividade do parasito frente ao seu hospedeiro vertebrado; e (c) por estar envolvido no mecanismo de adesão do protozoário (na forma epimastigota) às paredes do tubo digestivo do reduvídeo, vetor invertebrado (Atwood et al, 2005; Colli & Alves, 1999).

A investigação do perfil proteômico das cepas (na forma epimastigota) em diferentes fases da curva de crescimento, permitirá compreender as diferenças e similaridades da expressão proteica e relacioná-las com o comportamento biológico do parasito.

Metodologias combinadas à espectrometria de massas já são extensivamente usadas para se classificar microrganismos e bactérias (van Veen et al, 2010; Freiwald & Sauer, 2009), porém ainda não há descrições publicadas referentes aos tripanossomatídeos. As estratégias de identificação das DTU de *T. cruzi* (Zingales et al, 2009) envolvem metodologias mais tradicionais que usam marcadores moleculares e bioquímicos, os quais, as vezes não permitem classificar conclusivamente o grupo o qual pertença uma determinada cepa de *T. cruzi*. Sendo assim, uma das contribuições do nosso estudo será conceber uma estratégia simples, de fácil execução e reproduzível, através de um extrato protéico, usando a própria maquinaria do *T. cruzi* como base de análise, permitindo, dessa forma, seu emprego nos laboratórios das Coleções do Instituto Oswaldo Cruz visando, em casos de dúvidas técnicas, a certificação da cepa em manipulação.

O extrato protéico elaborado a partir do *T. cruzi* também poderá ser usado como um sistema acelular para a implementação de ensaios de síntese proteica *in vitro*. Atualmente, há vários sistemas comerciais de tradução acelular, tais como reticulócito de coelho, gérmen de trigo e *Escherichia coli*. No entanto, estudar a regulação (pós-transcricional) da expressão gênica e a tradução de genes multicópias, como a região 5'UTR de trans-sialidases - através do extrato protéico acelular de *T. cruzi* - fornecerão informações mais fidedignas. Vale ressaltar que a organização e a regulação gênica

desses organismos possuem várias particularidades quando comparadas aos demais eucariotos. Portanto, abre-se uma oportunidade para o desenvolvimento de um modelo de estudos da diversidade de organização, composição e funções de famílias gênicas multicópias em protozoários.

Além disso, tanto a ausência de TS nos mamíferos, quanto o papel que desempenha na infectividade do *T. cruzi*, valida essa enzima como um potencial alvo para drogas no tratamento da doença de Chagas (Neres et al, 2008; Carvalho et al, 2010) corroborando, portanto, a escolha da referida proteína como alvo para o presente estudo.

3. Objetivos

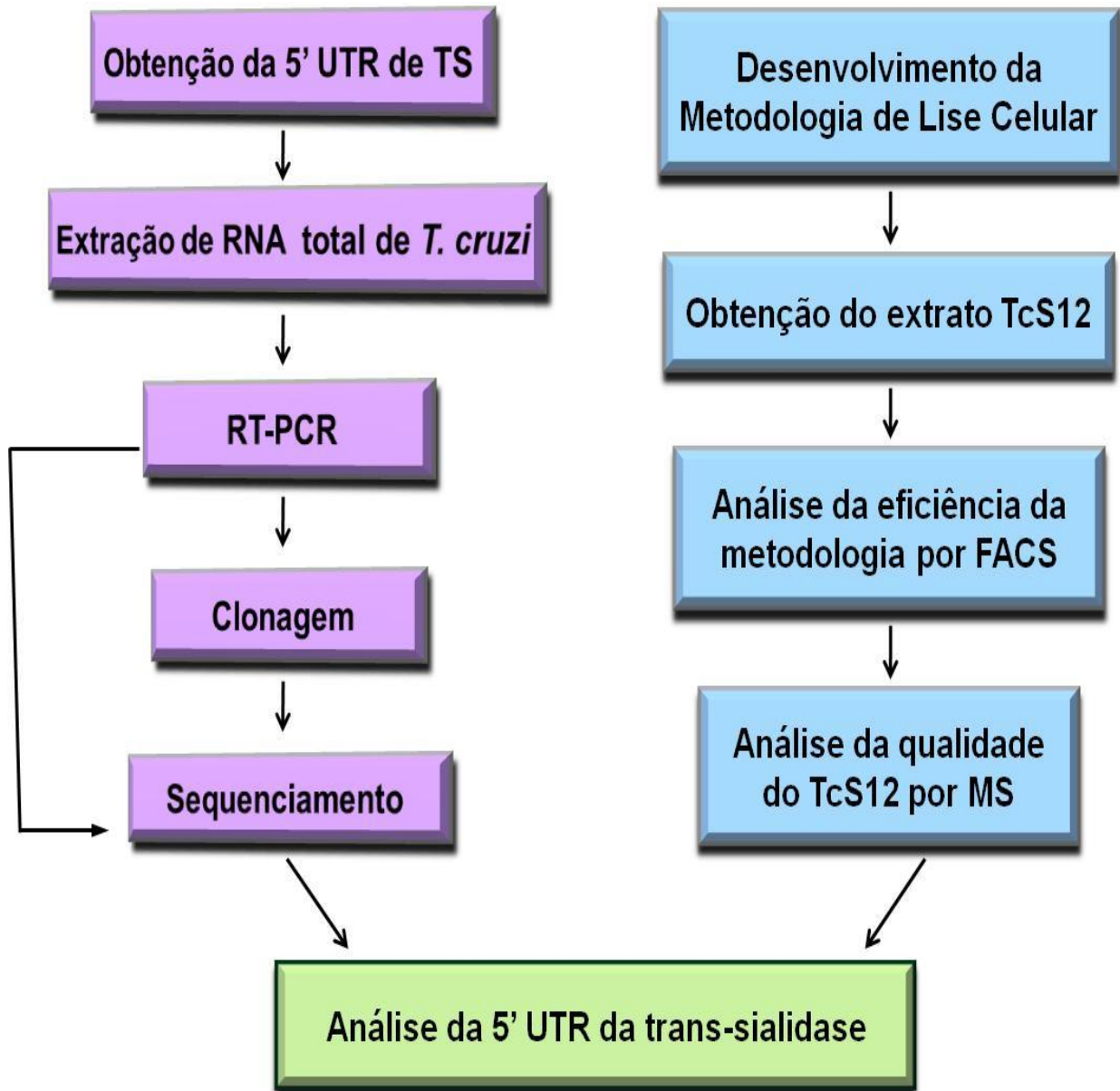
3.1 – Objetivo Geral

- Caracterizar as regiões não traduzidas (5' UTR) de trans-sialidases em *Trypanosoma cruzi* e avaliar a influência da variação dos sítios de *trans-splicing* na tradução destas proteínas:
 - ❖ Através de um gene repórter
 - ❖ Por espectrometria de massas

3.2 – Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver metodologia de lise celular para elaboração de extrato proteico acelular de *T. cruzi*.
- ✓ Avaliar a qualidade dos extratos proteicos das cepas Dm28c (TcI), Y (TcII), CL-Brener (TcVI) e 4167 (TcIV) por espectrometria de massas.
- ✓ Analisar comparativamente a expressão proteica dos extratos das quatro cepas de *T. cruzi* gerados a partir da metodologia de lise celular através do uso de espectrometria de massas.
- ✓ Caracterizar a presença de sítios adicionais de *trans-splicing* nas regiões não traduzidas (5' UTR) de trans-sialidase em *T. cruzi* (CL-Brener).
- ✓ Através do banco de dados de cDNA de trans-sialidases de CL-Brener gerado no presente estudo, correlacionar esta classe de proteínas identificadas por espectrometria de massas buscando avaliar a composição e o tamanho das 5' UTR na tradução.

Desenho Experimental do Projeto



4. Materiais e Métodos

4.1 – Cultivo de *Trypanosoma cruzi*:

Foram cultivadas células no estágio epimastigota de cepas de CL-Brener, Y, Dm28c e 4167, todas oriundas da coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz (COLPROT).

4.1.1 – Meio de Cultura BHI (*Brain Heart Infusion*):

As quatro cepas de *T. cruzi* foram crescidas a 28°C em cultura axênica em meio Warren modificado (Silva et al, 2006b; Warren, 1960) (*Brain Heart Infusion*) (DIFCO-BD, Sparks, MD, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). Foram inicialmente cultivadas até atingirem a fase logarítmica, de acordo com o perfil da curva de crescimento de cada uma: Dm28c e Y no sétimo dia de crescimento, CL-Brener e 4167 no nono e quarto dia, respectivamente.

Os epimastigotas foram avaliados antes de cada repique, por contagem em hemocítomero de Neubauer (câmara de Neubauer) para atingir uma densidade celular na ordem de 10^7 células/mL.

No meio da fase logarítmica de cultivo, 10^7 células foram obtidas por centrifugação da cultura a 800 g durante 10 minutos, lavadas três vezes com Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2 (PBS) e ressuspendidas em trizol, para a posterior extração de RNA ou em solução tampão de lise hipotônica (HEPES KOH 20 mM e DTT 2 mM), para a obtenção do extrato TcS12 (item 4.9).

4.2 - Extração de RNA total de *T. cruzi*:

Após a contagem de células e sua centrifugação para a formação de um concentrado (*pellet*), adicionou-se 1mL de Trizol (Invitrogen®), podendo ser esse volume variável, de acordo com a quantidade de células disponíveis na cultura, e o protocolo seguiu as instruções do fabricante com pequenas modificações. Após a homogeneização do concentrado celular com o Trizol, acrescentamos 200 µL de

clorofórmio e centrifugamos a 12.000 g por 15 minutos. Em seguida, transferimos o sobrenadante (fase aquosa) para um microtubo de 1,5 mL limpo (RNase / DNase free), e colocamos 500 µL de isopropanol; também acrescentamos 3 µL de poliacrilamida linear e incubamos no gelo por 10 minutos a 4°C. Após os 10 minutos de incubação, centrifugamos a 12.000 g por mais 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, cuidadosamente, e realizou-se a lavagem do concentrado com 500 µL de etanol 75% a 7.500 g por 5 minutos. Descartamos o sobrenadante e secamos a 37°C de 5-10 minutos; o concentrado foi ressuscitado em 30 µL de água ultra-pura.

A amostra foi quantificada por espectrofotômetro (NanoDrop™ – Thermo Scientific®) a fim de adicionarmos a quantidade desejável de RNA na etapa de transcrição reversa. A pureza e integridade do RNA extraído foram definidas pela eletroforese em gel de agarose a 1%. Foram aplicados 4 µL de RNA total recém extraído, acrescidos de 4 µL de formamida, incubados por 10 minutos a 25°C antes de serem aplicados no gel, objetivando a eliminação das estruturas secundárias inerentes ao RNA, além de melhorar a visualização do mesmo. A coloração de todos os géis de agarose realizados nesse trabalho foram feitas com o reagente GelRed® (Biotium, Califórnia, EUA).

4.3 – Transcrição Reversa e PCR qualitativa (RT – PCR):

A primeira etapa dessa técnica foi a conversão do RNA em cDNA (DNA complementar) através do uso de uma transcriptase reversa. A síntese da primeira fita do DNA foi feita utilizando *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen®) de acordo com as condições do fabricante: 2 – 5 µg de RNA, 1 µM (0,1µM) de iniciador aleatório (*Random Primer* de 6 nucleotídeos, Invitrogen®), 1µL (0,25 mM) de dNTP (Invitrogen®), seguido de incubação a 65°C por 5 minutos; acréscimo dos demais reagentes, como 4µL de *First Strand Buffer* 5X, 2 µL de DTT (0,1 mM) , 1 µL de *RNaseOUT* (40 U / µL) (Invitrogen®) ou *RNasin* (Promega®) e 200 U / µL de *SuperScript III Reverse Transcriptase*, incubando por mais 1h a 50°C. Para esse protocolo, há necessidade de inativação da enzima a 70°C por 15 minutos.

Como controle negativo da reação foi adicionado um tubo contendo RNA com os demais reagentes, exceto a transcriptase reversa.

A segunda etapa consistiu em realizar a amplificação do cDNA. Para tanto, utilizamos 0,2 µM de cada iniciador: 5UTRTCNA (5' TGT TTC GTA GCG AGC GTC CG

3'), referente a neuroaminidase (também pertencente a família das trans-sialidasas), pareado com o iniciador do mini-exon, denominado ME3 (5' AAC TAA CGC TAT TAT TGA TAC AGT T 3'), ou o mesmo ME3 pareado com um iniciador para a trans-sialidase contendo um pequeno trecho da ORF – denominado TcTs reverso (5' GCC GGG ACA TGT TGG GCC TC 3'). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Invitrogen® e diluídos em solução de TE 1X (10 mM Tris-HCL e 10 mM EDTA pH8,0) a uma concentração de 100 µM (solução estoque) e diluídos em água ultra pura a uma concentração de 10 µM (solução de uso). Os iniciadores utilizados foram armazenados a -20 °C.

Os referidos iniciadores pareados foram introduzidos a uma solução contendo 0,2 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 5 µL 10X de tampão de PCR, 1 U / µL *Taq recombinante* - Invitrogen® e H₂O ultra pura livre de DNase para completar 48 µL, além de 2 µL de cDNA. As condições do ciclo da PCR foram: 96°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos, perfazendo 35 ciclos, seguido de 10 minutos de extensão a 72°C no termociclador *Eppendorf Mastercycle® gradient*.

Os fragmentos amplificados foram revelados em alíquotas de 10 µL, aplicados em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE 0,5X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM) corados com GelRed®. Os resultados foram visualizados por transiluminação com luz ultravioleta e registrados digitalmente com o auxílio do sistema de fotodocumentação de imagens em gel (Bio-Rad®).

Os produtos amplificados contendo as 5' *UTR* dos respectivos cDNAs foram clonados usando células eletrocompetentes e/ou células quimicamente competentes.

4.4 – Preparo das Células Quimicamente Competentes:

A metodologia teve início após a semeadura de uma cultura de *Escherichia coli* linhagem TOP10 ou DH5α em placa de Petri contendo meio LB sólido (Luria-Bertani acrescido de Agar-Agar) sem antibiótico, e crescimento por 18h a 37°C. Após o tempo de crescimento, uma colônia foi selecionada e adicionada em 25 mL de meio *Terrific Broth* ou meio LB líquido (Luria- Bertani) sem antibiótico e incubação por mais 18h a 37°C com agitação de 200 rpm. Decorrido as 18h de incubação, é esperado que a cultura tenha atingido densidade óptica (da Silva et al) em 550 nm, equivalente a fase log.

Em seguida 5% da cultura inicial em 25 mL (1,25 mL) são transferidos para 100 mL de meio *Terrific Broth* ou LB e incubados por mais 2h a 37°C e agitação de 200 rpm. Posteriormente, a cultura é dividida em dois microtubos de 50 mL e incubada a 4°C por 10 minutos. Ao término desse período, o material é centrifugado a 1.260 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante é descartado e 30 mL de solução filtrada contendo MgCl₂ 20 mM e CaCl₂ 80 mM são adicionados ao concentrado de células, com incubação por 10 minutos a 4°C. As células são centrifugadas a 1.260 g por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 2 mL de solução contendo CaCl₂ 100 mM filtrado e 10% de glicerol previamente autoclavado.

Por fim, o volume final é dividido em alíquotas de 100 µL, distribuídas em microtubos de 1,5 mL e submetidas a congelamento instantâneo com gelo seco e álcool ou nitrogênio líquido, antes de serem estocados a - 80°C até o momento do uso.

4.5 – Preparo das Células Eletrocompetentes:

Após o descongelamento a 4°C de dois microtubos de 1,5 mL contendo as células eletrocompetentes (Invitrogen®), as alíquotas de cada tubo (100 µL de células) foram transferidas para uma garrafa de cultura estéril contendo 100 mL e para outra garrafa menor contendo 5 mL de meio LB e as células foram crescidas a 37°C, por 18h sob agitação de 200 rpm.

Decorrido o tempo de incubação, da garrafa de cultura menor, foram retirados 10 µL que, em seguida, foram semeados em placa de Petri (contendo meio LB e Agar-Agar) sem ampicilina para servir de estoque, posto que a 4°C as células possuem viabilidade de até 3 meses.

Para a garrafa de cultura de maior volume, foi transferido 1 mL de seu conteúdo para uma nova garrafa contendo 499 mL de meio LB, seguido de incubação a 37°C, por mais 3h, sob agitação de 200 rpm. Ao final desse intervalo a cultura terá atingido uma OD de 0,5.

A cultura foi centrifugada a 4°C, por 10 minutos a 4000 g. O sobrenadante foi descartado e submetido a três processos de lavagem, sendo a primeira com 100 mL de solução gelada de água contendo 10% de glicerol estéril, a segunda lavagem em 25 mL de solução gelada de água e 10% de glicerol, e a terceira com 10 mL de solução igualmente gelada de água e 10% de glicerol. Cada processo de lavagem foi realizado por centrifugação a 4°C, por 10 minutos a 4000 g.

Após a última centrifugação, o sedimento de células foi ressuscitado em 2 mL de uma solução final, também gelada, contendo água e 10% de glicerol. Em todas as etapas envolvendo soluções com glicerol, o glicerol foi autoclavado previamente antes da elaboração das soluções para uso. Alíquotas de 50-100 µL das células foram submetidas a um processo de congelamento prévio com gelo seco e álcool antes de serem estocadas a - 80°C.

4.6 - Clonagem dos Produtos Amplificados

A primeira etapa da clonagem, após a obtenção dos produtos amplificados, é a ligação do respectivo inserto ao sítio de inserção no vetor (processo que pode variar de acordo com o fabricante). Nesse trabalho usamos basicamente três plasmídeos: pGem (Promega®), pCR 4 – TOPO (Invitrogen®) e pGlow (Invitrogen®) (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3).

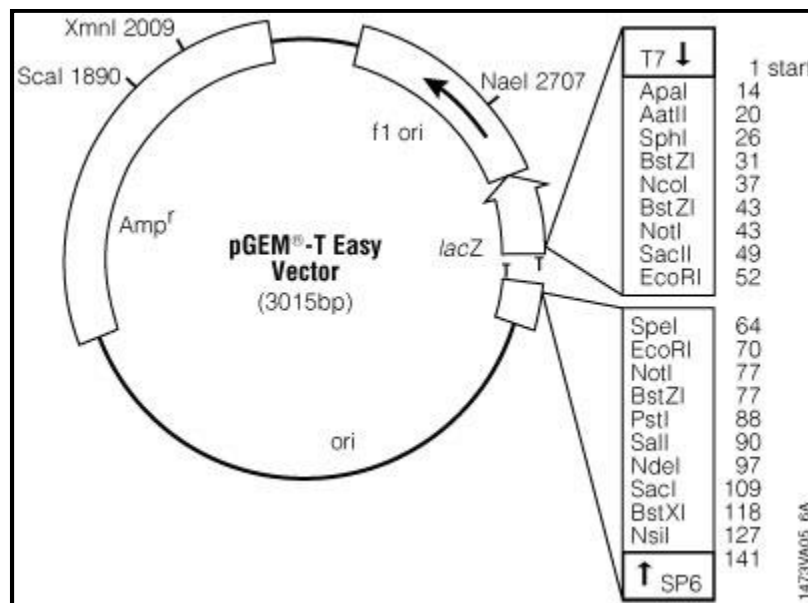


Figura 4.1 – Mapa do plasmídeo pGem T – easy vector (Promega®)

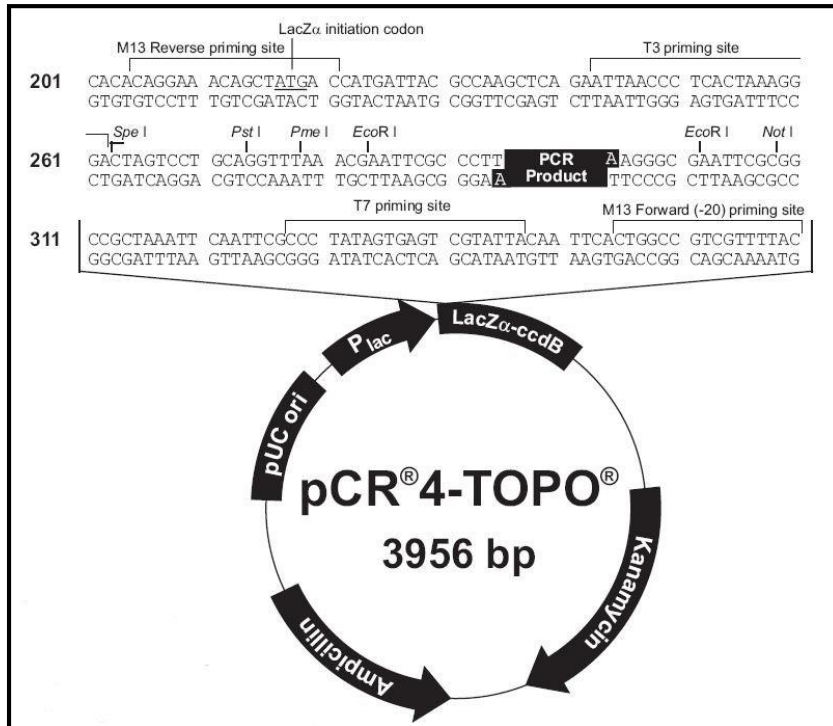


Figura 4.2 – Mapa do plasmídeo pCR 4 – TOPO (Invitrogen®).

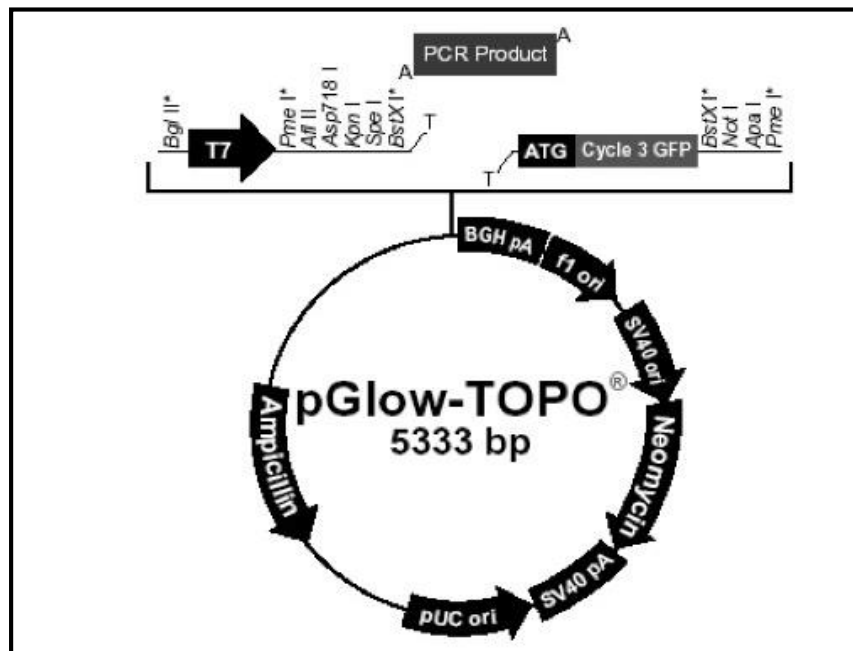


Figura 4.3 - Mapa do plasmídeo pGlow (Invitrogen®).

A etapa de ligação no pGem T – easy (Promega®) foi realizada de acordo com o fabricante, em volume final de 10 µL, contendo 5 µL de tampão de ligação 2X, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (3 unidades/ µL), 1 µL (50 ng/ µL) de *pGem T – easy vector* (Promega®), até 3 µL de produto de PCR purificado (podendo ser menos, caso a concentração de produto esteja alta), e água ultra-pura. A reação foi incubada por 18 h a 4°C.

Para os vetores da Invitrogen®, tanto o pCR 4 – TOPO quanto o pGlow, a ligação ocorreu em volume final de 6 µL, contendo 1 µL do plasmídeo (10 ng/ µL), 1 µL de solução de sal (200 mM de NaCl e 10 mM de MgCl₂) e até 4 µL de produto de PCR purificado, a temperatura ambiente por 5 - 30 minutos.

Após a ligação, independente do plasmídeo utilizado, a etapa de transformação foi realizada a partir de 2 µL da reação de ligação, em microtubo de 1,5 mL contendo as células competentes, descongeladas previamente a 4°C, com a primeira incubação a 4°C por 30 minutos. Em seguida, realizamos o choque térmico de 2 minutos a 42°C e adicionamos 800 µL de meio SOC ou LB aos tubos, com incubação a 37°C por 1 h, sob agitação a 200 rpm.

Em paralelo, placas contendo LB sólido com ampicilina (a uma concentração final de 100 µg/mL) são deixadas por pelo menos 30 minutos a uma temperatura de 37°C, antes do uso. Um volume de 40 µL de X-Gal é adicionado a cada placa, no caso do vetor em questão possuir o gene *Lac Z*, o qual deverá ser inativado na presença de um DNA exógeno (resultante da ligação), formando colônias brancas, ou pela capacidade do vetor em hidrolisar o X-Gal, quando não há incorporação do DNA exógeno, resultando em colônias de coloração azul. As placas são incubadas por 18 horas a 37°C. Após essa etapa, as colônias brancas são selecionadas e transferidas para 3 mL de LB líquido ou meio *Terrific Broth*, contendo 100 µg/mL de ampicilina, para posterior extração do DNA plasmidial por *miniprep*. Alternativamente, estas colônias também foram transferidas para 15 mL de LB líquido ou meio *Terrific Broth*, contendo igualmente 100 µg/mL de ampicilina, para processamento por *midprep*, com incubação a 37°C por 18h sob agitação de 200 rpm. Ambos os procedimentos para a recuperação de DNA plasmidial foram realizados por metodologias *in house*, descritas nos Anexos.

Após o cultivo, para as culturas em volume de 3 mL (*miniprep*), o material foi centrifugado a temperatura ambiente, em velocidade máxima, e o sedimento gerado foi purificado com os kits PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega®) ou NucleoSpin® Plasmid (Macharey-Nagel®), para obtenção do DNA plasmidial. Para o processamento por *midprep in house*, os 15 mL de cultura foram centrifugados a 4.000 rpm, a 4°C por 10 minutos, e o sedimento celular foi tratado com as soluções 1, 2 e 3 descritas nos anexos.

4.6.1 – Obtenção dos Clones Através da PCR Colônia:

Através da amplificação em cadeia da polimerase com iniciadores específicos para regiões do plasmídeo pGem T-easy vector e pCR 4-TOPO, M13 Forward (5' GTA AAA CGA CGG CCAG 3') e M13 Reverse (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'), foi possível recuperar o inserto clonado, diretamente da colônia.

A técnica consiste em adicionar cada clone obtido das placas de Petri em 9 µL de água. Após esta primeira etapa, é preparada a mistura de PCR com 29 µL de H₂O ultra-pura, 5 µL de Tampão 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2 µL de dNTPs (0,2 mM), 0,5 µL de Taq polimerase recombinante (5U/µL- Invitrogen®) e 1 µL de cada iniciador, M13F e M13R, a 0,2 µM, em volume final de 50 µL.

A seguinte ciclagem térmica foi utilizada: 95 °C por 5 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1,5 minuto e 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos, no termociclador *Eppendorf Mastercycle® gradient*.

Ao final da reação os produtos foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed®, para a verificação da qualidade da clonagem e confirmação do tamanho do inserto. Colônias azuis (sem inserto) foram usadas como controle negativo.

4.7 – Sequenciamento

4.7.1 – Sequenciamento por Sanger

Após a extração do DNA plasmidial com o auxílio de *kits* comerciais ou *in house* e posterior purificação do DNA, as amostras foram processadas em reações de sequenciamento, empregando o *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) no equipamento *ABI Prism™*, segundo as especificações do fabricante. Os dados foram armazenados no *software* de análise das sequências de DNA (plataforma de Sequenciamento PDTIS/IOC/Fiocruz).

4.7.2 - Análise das sequências:

Todas as sequências foram editadas em formato FASTA. Para análise, edição e alinhamento utilizou-se os programas BioEdit (*Sequence Alignment Editor*) e MEGA 4.0 (Kumar et al, 2008).

Foi realizada a busca por similaridades de sequências (EST/cDNA) encontradas com as sequências genômicas já depositadas e disponíveis no banco de dados, por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) no banco de

sequências do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando a sequência disponível de CL-Brener como parâmetro para as comparações.

4.7.3 – Sequenciamento pelo uso do 454 Júnior (*Next Generation Sequencing* – NSG)

A metodologia usada para o sequenciamento do amplicon de cDNA de CL-Brener no estágio epimastigota com os iniciadores do mini-exon ME3 pareado com o iniciador reverso TcTs para trans-sialidase, descritos no item 4.3, seguiu a ciclagem otimizada para 96°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos, por 35 vezes, seguido de 10 minutos de extensão a 72°C. Seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante e instruções do operador da plataforma, a amostra foi purificada, quantificada e adaptadores RL foram ligados ao amplicon para posterior análise pelo sequenciador 454 GS Junior – Roche (Plataforma de Sequenciamento de Alto Desempenho – IOC/PDTIS).

Ao término do sequenciamento, mediante os arquivos gerados pelo equipamento, optou-se pela seleção do formato FASTA com posterior edição das sequências através do programa USEARCH (disponível em <http://drive5.com/usearch/>). Em seguida, os seguintes parâmetros foram estabelecidos:

4.7.3 I – *Dereplication*: Define o nível de redundância a ser mantida no conjunto de sequências. Possibilitou a redução de aproximadamente 20.000 para 3.500 sequências.

4.7.3 II – Alinhamento no MUSCLE (<http://drive5.com/muscle/>): Permitiu o agrupamento das trans-sialidases.

4.7.3 III – Eliminação das sequências que não eram trans-sialidases e mapeamento genômico das 5' *UTR*. Esta etapa permitiu a confirmação do tamanho das 5' *UTR* de trans-sialidases desse grupo de epimastigotas, corroborando as informações obtidas pelo sequenciamento de Sanger, bem como, para ratificar os sítios de *trans-splicing*, realização da análise do contexto genômico e do sinal de *trans-splicing* (região rica em polipirimidina, além da verificação da existência de estruturas secundárias).

Sequenciamento de alto-desempenho (454 Junior)

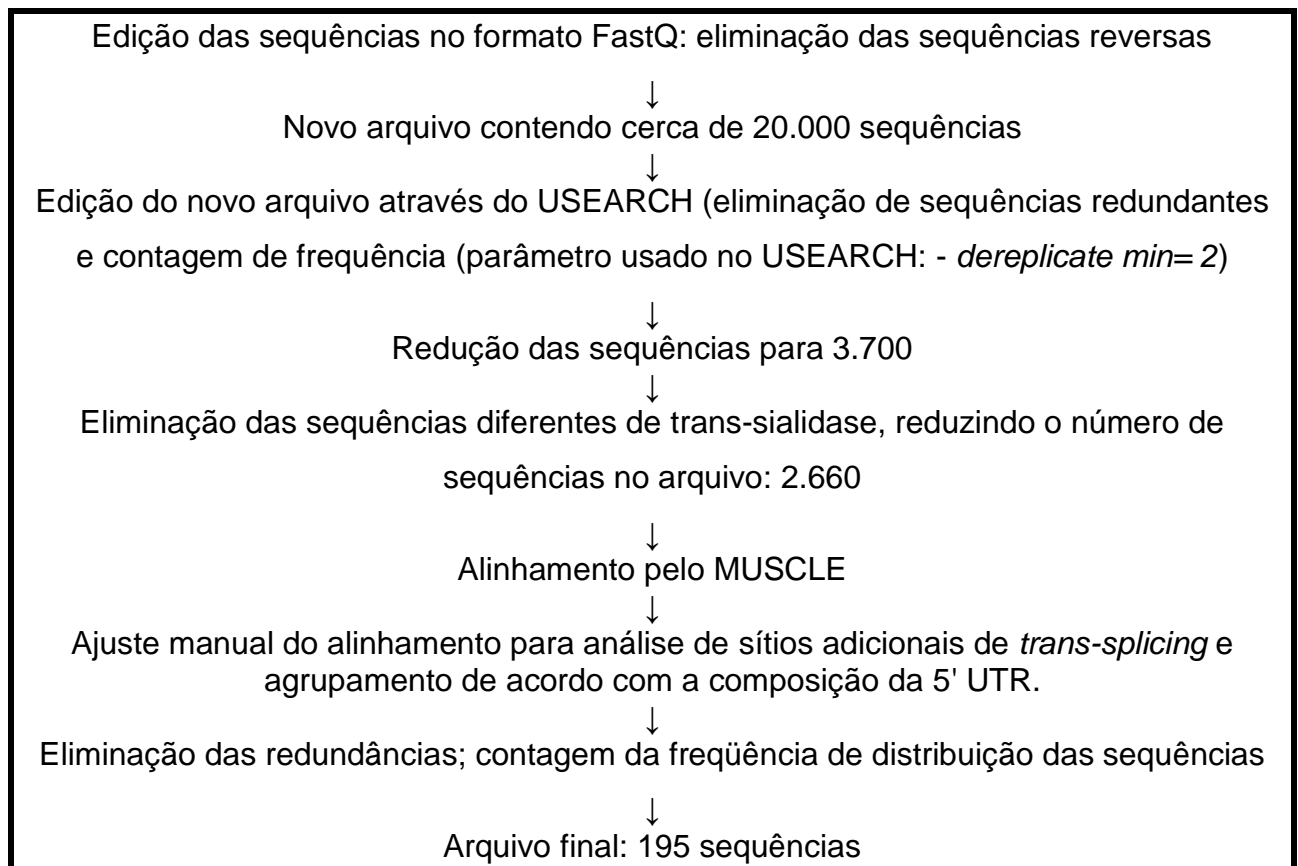


Figura 4.4 – Fluxo do alinhamento do 454 Junior. Manipulação das cópias de trans-sialidase para a retirada das redundâncias e caracterização dos sítios de trans-splicing

4.8 - Síntese *in vitro* do RNA:

Existem dois procedimentos capazes de realizar a síntese de RNA *in vitro*. Ambos são bastante eficientes; a diferença entre eles, basicamente, está relacionada ao rendimento de RNA, gerando até 1 mg de RNA com T7 RiboMAX™ (Promega®), ao passo que com T7 RNA polimerase (Promega®) o rendimento é menor (da ordem de µg de RNA).

4.8.1 - Linearização do Plasmídeo:

Tanto para a produção de RNA sintético em grande escala quanto em pequena escala, a técnica se inicia com a escolha do plasmídeo ou DNA que servirá como molde para a enzima T7 RNA polimerase iniciar a síntese. Em seguida, o plasmídeo

com concentração de 2 – 5 µg/µL, deverá ser linearizado com uma enzima de restrição específica, de acordo com a sua constituição. No caso do uso do pGlow, incubamos com a enzima Sma I (New England BioLabs®), segundo as especificações do fabricante. Antes de iniciar a síntese *in vitro*, é necessária a confirmação do sucesso da digestão, em gel de agarose a 1%, com os devidos marcadores de peso molecular.

4.8.1.a – Síntese *in vitro* de RNA não marcado em menor escala - T7 RNA polimerase (Promega®):

O plasmídeo (pGlow, pGem Teasy vector ou pCR 4 TOPO) previamente linearizado na concentração de 2 – 5 µg/µL é adicionado a uma solução contendo 40 unidades (1µL) de T7 RNA polimerase (Promega®), e seus reagentes, de acordo com as especificações do fabricante: 100 mM de DTT (10 µL), 100 unidades (1 µL) de RNasina recombinante (Promega®), 1 µL de rNTP (25 mM), DNA molde na concentração de 2 – 5 µg, seguido de incubação à 37° C por 2h.

4.8.1.b - Síntese *in vitro* de RNA não marcado em maior escala – RibomAX™ Large Scale RNA Production System - T7 (Promega®)

De acordo com o fabricante, são adicionados 20 µL de tampão de transcrição T7 5X, 30 µL de rNTPs (25 mM), plasmídeo linearizado – pGlow (5 - 10 µg), 10 µL da enzima T7 (a concentração da enzima não está evidenciada pelo fabricante), 1 µL (40 unidades / µL) de RNasin (Promega®) e água para completar um volume final de 100 µL, seguido de incubação a 37°C entre 2 – 4h (de acordo com a quantidade de plasmídeo inserido).

Após a incubação, o RNA produzido é tratado com DNase (RQ1 RNase-free DNase Promega®) através de incubação a 37°C por 40 minutos, com acréscimo de 2 µL da solução de bloqueio (*stop solution*) a 65°C por 10 minutos, para a eliminação do plasmídeo utilizado como molde pela enzima T7. Posteriormente, o RNA sintetizado é purificado com Trizol (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante, visando a obtenção de um RNA de melhor qualidade e mais concentrado.

4.9 – Elaboração do Extrato Protéico de *T. cruzi* – Sistema Alternativo para Lise Celular

Células de *T. cruzi* no estágio epimastigota, compreendendo quatro cepas foram selecionadas para estudo: CL-Brener, 4167, Dm28c e Y. Após atingirem um crescimento na ordem de 10^7 células/mL, estas foram submetidas a uma centrifugação em 700 g, por 10 minutos a 4°C, para obtenção do concentrado celular.

Em seguida, o concentrado foi lavado com 10 mL de PBS por três vezes, a partir de centrifugações a 700 g, por 10 minutos a 4°C. Após este passo, o sobrenadante foi eliminado e 200 µL de solução hipotônica de lise celular composta por 20 mM de HEPES-KOH e 2 mM de DTT foram adicionados para uma subsequente incubação a 4°C por 30 minutos. Em seguida, o material foi incubado por mais 30 minutos em ultrassom de banho (USC 750A, Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil) contendo um pouco de gelo para evitar elevação da temperatura da água.

Após as amostras serem retiradas do ultrassom, elas foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e incubado a 37°C por 30 minutos para a eliminação do mRNA endógeno. Após nova incubação nas mesmas condições, o agora extrato TcS12, foi estocado a – 80 °C até o momento de uso.

Os extratos proteicos provenientes do lisado celular de cada cepa estudada, foram quantificados usando-se o kit Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, Ca, EUA) de acordo com o manual do fabricante.

4.10 – Verificação da Eficiência do Sistema Alternativo de lise celular pela Análise de Citometria de Fluxo (FACS)

Para a quantificação da permeabilidade da membrana celular de *T. cruzi*, cepa CL-Brener, alíquotas de epimastigotas, na ordem de 10^7 células/mL, foram ressuspendidas e incubadas em 200 µL de solução tampão de lise celular (20 mM de HEPES-KOH e 2 mM de DTT) por 0, 10, 20 e 30 minutos a 4°C. Após o período de incubação, os parasitos foram marcados com 6 µL da solução de iodeto de propídeo (PI) a uma concentração de 30 µg/µL (Sigma-Aldrich, MO, USA) e analisados imediatamente no citômetro de fluxo.

Seguindo a incubação a 4°C por 30 minutos, conforme descrito, três alíquotas de epimastigotas foram submetidas ao ultrassom de banho por 10, 20 e 30 minutos, com subsequente marcação com PI no momento de sua visualização microscópica. Todos os experimentos foram realizados por três vezes de maneira independente.

O controle positivo foi obtido pelo tratamento dos parasitos com 0.01% (w/v) de saponina, incubados por 15 minutos a 4°C, seguido pela marcação com a solução de PI.

Os dados desse ensaio foram gerados pelo uso de um citômetro de fluxo *FACSCalibur* (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA) equipado com o *software* Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Jose, CA, EUA). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida como a correspondente para epimastigotas típicos.

4.11 – Análise por Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC)

Para corroborar a análise da eficiência do protocolo de extrato celular, a cinética da lise foi monitorada e gravada através da técnica de microscopia de contraste de interferência (DIC). Epimastigotas CL-Brener na ordem de 10^7 células/mL foram incubados em solução tampão hipotônica de lise por 0, 10, 20 e 30 minutos a 4°C e imagens da suspensão celular foram gravadas. Após os 30 minutos de incubação, as amostras foram submetidas ao ultrassom de banho por 10, 20 e 30 minutos. Lâminas de parasitos frescos obtidos nas condições supracitadas foram preparadas e analisadas imediatamente em um microscópio Zeiss AxioObserver M1 (Oberkochen, Alemanha).

4.12 - Verificação do Sistema de Lise pela Espectrometria de Massas

4.12.1 – Digestão Enzimática do Extrato Proteico TcS12

Antes de se iniciar o procedimento de digestão, uma alíquota do extrato proteico TcS12 ressuspenso em tampão hipotônico (HEPES –KOH 20mM, DTT 2 mM) foi dialisada contra solução de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3 100 mM pH 8.0), usando-se filtro

molecular de *cut off* de 3 kDa (*Amicon*, Millipore, Tullagreen, Cork, Irlanda). Para certificar-se da troca completa de solução-tampão, o procedimento de diálise foi realizado quatro vezes, pela adição de aproximadamente 400 µL de NH₄HCO₃ 100 mM pH 8.0. Ao final, a solução de mistura de proteína retida (e concentrada) de cada amostra foi diluída em 100 uL de NH₄HCO₃ 100 mM pH 8.0 para uma concentração final de 1 µg/µL.

A digestão enzimática dos extratos proteicos por tripsina foi baseada na metodologia descrita por Murad et al. (2011). A cada amostra (100 µL) foi adicionado surfactante *RapiGest*TM (Waters, Milford, MA, EUA) para uma concentração final de 0,1% (p/v, em NH₄HCO₃ 100 mM pH 8,0) com subsequente incubação a 80 °C por 15 minutos sob agitação (900 rpm). Em seguida, adicionou-se ditioneitol (DTT, GibcoBRL, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) para uma concentração final de 5 mM (em NH₄HCO₃ 100 mM pH 8,0), e incubou-se por mais 30 minutos a 60 °C sob agitação de 900 rpm.

Os ensaios foram resfriados a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 6 uL de iodoacetamida (IAA, Sigma-Aldrich, St Louise, MO, EUA) 500 mM (em NH₄HCO₃ 100 mM pH 8,0) ao extrato proteico e incubado no escuro por 30 minutos a 25 °C. Para a digestão enzimática, uma solução de 400 ng/µL de tripsina em NH₄HCO₃ 100 mM pH 8.0 (Promega, Madison, WI, EUA) foi adicionada às amostras na razão de 1:50 (p:p, enzima:substrato). A reação foi realizada a 37 °C por 18h, sob agitação de 900 rpm.

A digestão foi finalizada acidificando-se as soluções com 5 uL de ácido trifluoroacético 20 % (v/v) para concentração final de 0,5 % (v/v), seguida de incubação a 37 °C por 90 minutos, afim de precipitar o surfactante *RapiGest*.

A solução de peptídeos foi, então, centrifugada a 20.200 g por 30 minutos a 6° C. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e seco em centrífuga à vácuo por aproximadamente 2h. As amostras foram estocadas a -20 °C.

4.12.2 – Análise por Espectrometria de Massas

Antes da análise em 2D-LC-MS/MS, todas as amostras foram ressuspensas em 100 uL de tampão de troca iônica (formato de amônio 5 mM, acetonitrila 5% pH 3,2). Os peptídeos foram analisados usando-se o espectrômetro de massas SYNAPTTM G1 HDMSTM System (Waters, Manchester, UK) e todos os espectros foram adquiridos em

modo positivo. O analisador de massas ToF foi calibrado com fragmentos iônicos produzidos por MS/MS de [Glu1]-fibrinopeptideo B (GFP, solução de 100 fmol/μL em 50:50:1, metanol:H₂O:ácido acético) na faixa de 50 a 2000 m/z. Por sua vez, o íon precursor duplamente carregado de GFP (MH²⁺= 785.8426) foi usado como referência, para correção precisa da medida de massas durante cada análise de LC-MS/MS.

Para as análises de proteômica comparativa do extrato protéico das quatro cepas, foi empregada a metodologia de quantificação de proteínas sem marcação isotópica (*label-free*) (Geromanos et al, 2009; Li et al, 2009; Silva et al, 2006a). Para tal, os parâmetros do SYNAPT foram ajustados para o modo de operação denominado MS^E (Silva et al, 2006b).

A técnica consiste em se adquirir os espectros de massas de todos os peptídeos que são introduzidos na máquina alternando-se a energia de colisão em baixa e alta (voltagem) a cada 0,8 segundos (tempo de escaneamento ou *scan time*), com intervalos de 0,02 segundos entre os *scans* (*interscan delay time*). Os dados de espectros de massas obtidos em baixa energia de colisão foram coletados constantemente a 4 eV (eletron-volt), enquanto que aqueles adquiridos em alta energia foram obtidos de acordo com uma rampa de aumento de energia de colisão de 15 até 55 eV (Silva et al, 2005).

A mistura dos peptídeos resultantes da digestão de cada amostra foi injetada três vezes (triplicatas) no sistema cromatográfico nanoACQUITY UPLC (Waters, Manchester, UK), acoplado ao SYNAPTTM G1 HDMSTM. A configuração do sistema de cromatografia empregada foi baseada no método publicado por Liu et al (2006) com algumas modificações. Nesse sistema, a cromatografia em escala de nano-fluxo consistiu de duas colunas cromatográficas interligadas (*online*) configurando, portanto, um sistema de cromatografia bidimensional (2D-LC). As colunas (180 μm × 20 mm) incluíram uma troca catiônica forte pré-empacotada (nanoACQUITY UPLC SCX TRAP Column) (Waters, EUA) usada para a primeira separação dos peptídeos (primeira dimensão), em conjunção com uma pré-coluna ("trap") de fase-reversa (5 μm Symmetry C18, 180 μm × 20 mm) (Waters, EUA). Essas duas colunas, por sua vez, estavam dispostas *online* com a coluna analítica de fase reversa (nanoACQUITY BEH130 C18 1.7μm, 75 μm x 150 mm) (Waters, EUA), consistindo, portanto, como segunda dimensão.

A fase móvel (5 mM formato de amônio, 5 % acetonitrila pH 3,2) foi bombeada constantemente para a coluna SCX pela bomba auxiliar (ASM). Além disso, a ASM permite executar corridas de gradiente de concentração em etapas (*step gradient*),

injetando na coluna 9 μL de concentrações crescentes de sal e solvente orgânico (*salt plugs*). Tais soluções são compostas de formato de amônio e acetonitrila em concentrações variadas. Oito frações de *salt plugs* foram preparadas, sendo três contendo 5 % (v/v) de acetonitrila e respectivamente, 50, 100 e 150 mM de formato de amônio pH 3.2; outras quatro frações contendo 200 mM de formato de amônio pH 3.2 e 5, 10, 20 e 30 % de acetonitrila, e por fim, uma solução constituída por 350 mM de formato de amônio e 50% acetonitrila pH 3.2.

Após a injeção das soluções *salt plugs* com fluxo de $5\mu\text{L}/\text{min}$ durante 10 minutos, os peptídeos foram eluídos da coluna SCX, porém, novamente retidos na coluna *trap* C18, cujo fluxo era desviado pela válvula de injeção para um reservatório, permitindo assim, o descarte de qualquer composto não retido em ambas as colunas. Após os 10 minutos de “lavagem”, a posição da válvula era reposicionada, o fluxo redirecionado para a coluna analítica e, sincronicamente, iniciado o gradiente linear, executado pela bomba binária (BSM). Com o gradiente, os peptídeos foram eluídos da coluna *trap* C18 e, por sua vez, separados na coluna analítica de fase reversa.

O gradiente linear foi composto de 0,1 % (v/v) ácido fórmico em água (denominada fase móvel A ou “A”) e 0,1 % (v/v) ácido fórmico em acetonitrila (denominada fase móvel B ou “B”) durante 60 minutos. O gradiente executado com fluxo de $300\ \eta\text{L}/\text{min}$ consistiu inicialmente de 95 % A e 5 % B por 5 minutos, seguido de aumento linear para 40 % B (e 60 % A) durante 20 minutos, novo aumento para 85 % B (e 15 % A) por 5 minutos, manutenção da concentração de 85 % B (e 15 % A) por 10 minutos, diminuição do gradiente para 5 % B (e 95 % A) durante 2,5 minutos, e finalmente reequilíbrio da coluna analítica em 95 % A e 5 % B por 17,5 minutos até a injeção do próximo *salt plug* ou amostra.

4.12.3 - Análises de Bioinformática dos Espectros de Massas

Os dados brutos de cada amostra analisada em modo MS^E , gerados pelo espectrômetro de massas, foram processados pelo programa ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 2.5 licenciado (Waters, Manchester, Reino Unido). A busca e a identificação das proteínas das amostras das quatro cepas foram realizadas através do algoritmo *IDENTITY*^E integrado no *software* PLGS, usando-se o banco de dados de proteoma de *T. cruzi* (CL Brener) do UniProtKB (versão 2013_06) contendo anotações revisadas.

Os parâmetros para a busca foram acetilação do N-terminal e oxidação de metionina, como modificações variáveis, e carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, e por fim perda de um sítio de clivagem por tripsina. A tolerância de erro de massa do íon precursor e dos fragmentos iônicos foi ajustada, respectivamente, para 10 e 20 ppm (valores pré-determinados pelo *software*). A identificação positiva de proteínas foi restrita aos seguintes parâmetros: pelo menos três fragmentos iônicos por peptídeo, e sete por proteína, e pelo menos um peptídeo por proteína.

A taxa de identificação de falso-positivos foi de 4 % nas triplicatas técnicas de injeção. A tendência de identificação de falso-positivos tem por propensão a não se repetir com as injeções, e serem minimizadas já que podem ser ruídos químicos.

4.12.4 - Quantificação Relativa de Proteínas

O algoritmo *Expression^E* integrado ao PLGS foi usado para estimar a quantificação relativa das proteínas identificadas entre os extratos proteicos de CL-Brener (controle) e as cepas Y, Dm28c e 4167 (Li et al, 2009; Silva et al, 2005; Silva et al, 2006b).

4.13 – Sistema de Tradução *in vitro*

Para a elaboração da reação de síntese de tradução acelular, adicionamos cerca de 1200 ng do extrato TcS12, 0,6 µL da solução denominada CTX (composta por cloreto de potássio 1M, acetato de magnésio 16 mM e DTT 20mM), 1 µL da solução CPK (creatina fosfato 200 mM e creatina kinase 40 mg / mL), 0,4 µL de aminoácidos, (5 mM de cada rNTP), 0,5 µL de RNasina (Promega[®]) 40 U/µL e água para completar uma reação de volume final de 10 µL. Acrescentar o RNA sintético previamente produzido foi incubado junto à reação por 90 minutos a 25°C.

5. Resultados

Bloco 1 de Resultados: Obtenção da 5' UTR de trans-sialidases

5.1 – Elaboração de um Banco de cDNA para o Gene da Trans-Sialidase de *T. cruzi*:

Devido ao fato dos genes de trans-sialidase serem transcritos de forma abundante, mesmo no estágio epimastigota optamos por não utilizar a seleção de mRNA poliadenilados, normalmente indicada quando se trata de genes de baixa expressão.

Após a extração do RNA total de CL-Brener no estágio epimastigota, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) usando o iniciador aleatório de 6 bases (*Random primers*) para a síntese da primeira fita, seguido de amplificação por PCR convencional. O produto obtido foi um fragmento de aproximadamente 300 pb e o desenho de novos óligos considerou a possibilidade de variações nas extremidades 5' do RNA que o originou. Em seguida, o produto foi purificado conforme as condições descritas previamente em Material e Métodos (Figura 5.1).

O produto amplificado do estágio tripomastigota foi obtido a partir de um cDNA, igualmente sintetizado através do uso de um iniciador aleatório, podendo ser visualizado na Figura 5.2.

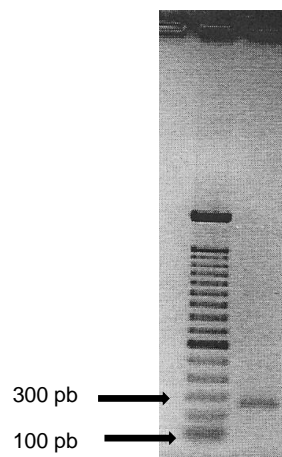


Figura 5.1- Gel de agarose a 1% corado com GelRed; Marcador de peso molecular de 100 pb no primeiro canal, e no segundo canal, o produto de amplificação de CL-Brener no estágio epimastigota (610 ng/μL).

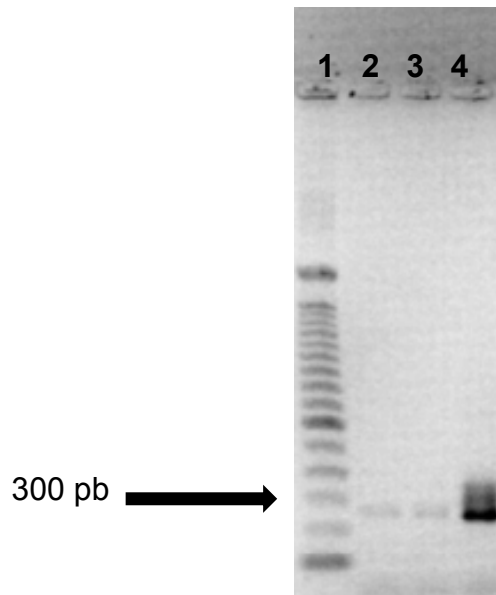


Figura 5.2 – Visualização do fragmento amplificado de cDNA da 5' UTR de trans-sialidase de tripomastigotas de *T. cruzi* CL-Brener. Gel de agarose (1%) corado com GelRed com diferentes concentrações de cDNA adicionados a reação da PCR. Canal 1, marcador de peso molecular de 100 pb; canal 2, 1 µL de cDNA; canal 3, 2 µL de cDNA e canal 4, 1 µL do cDNA diluído 1:10.

Os produtos obtidos através da RT-PCR qualitativa foram utilizados nos ensaios de clonagem e sequenciamento pela metodologia de Sanger nos dois estágios (epimastigota e tripomastigota), e pelo 454 Junior apenas para o estágio epimastigota.

5.2 – Clonagem e Sequenciamento pelos Métodos de Sanger e 454 Junior:

Foram realizadas duas formas de clonagem: a primeira pela via clássica com expansão clonal ao final do processo, e a segunda, denominada de PCR colônia, ambas descritas em Materiais e Métodos. Foram obtidos 199 clones de trans-sialidase com o emprego da PCR colônia e 86 clones realizando a clonagem pela via clássica. Desses 199 clones, 32 sequências são pertencentes ao estágio tripomastigota.

As sequências obtidas para ambos os estágios foram geradas através do uso do par de iniciadores ME3 (5' AAC TAA CGC TAT TAT TGA TAC AGT T 3') e 5'UTRTCNA (5' TGT TTC GTA GCG AGC GTC CG 3'). Os arquivos de alinhamento gerados pelo programa Mega (versão 5.2.2) e, posteriormente analisados com o programa *CLC Genomics Workbench* versão 6.5, mostraram separadamente a formação de cinco grupos para CL-Brener no estágio tripomastigota e três grupos para o estágio epimastigota conforme mostram as Figuras 5.3 e 5.4, respectivamente.

Após a submissão das sequências ao BLAST e sua identificação com as sequências referências oriundas do genoma de CL-Brener, anotadas em bancos de dados como o *Genbank* e o *TritypDB*, em relação aos tripomastigotas, a referência Tc00.1047053507085.30 apresentou homologia para 12 cDNAs clonados e identificou UTR com tamanhos de 66 pb. Além disso, a mesma referência mostrou-se homóloga a 6 cDNAs de epimastigotas (com o mesmo par de iniciadores). A Tc00.1047053506975.80 foi homóloga a 10 cDNAs gerando UTR de 187 pb. As referências Tc00.1047053511233.140, Tc00.1047053508859.118, e Tc00.1047053510025.50 foram homólogas para 1 cDNA cada uma, e suas UTR apresentaram tamanhos iguais a 175, 116 e 65 pb, respectivamente.

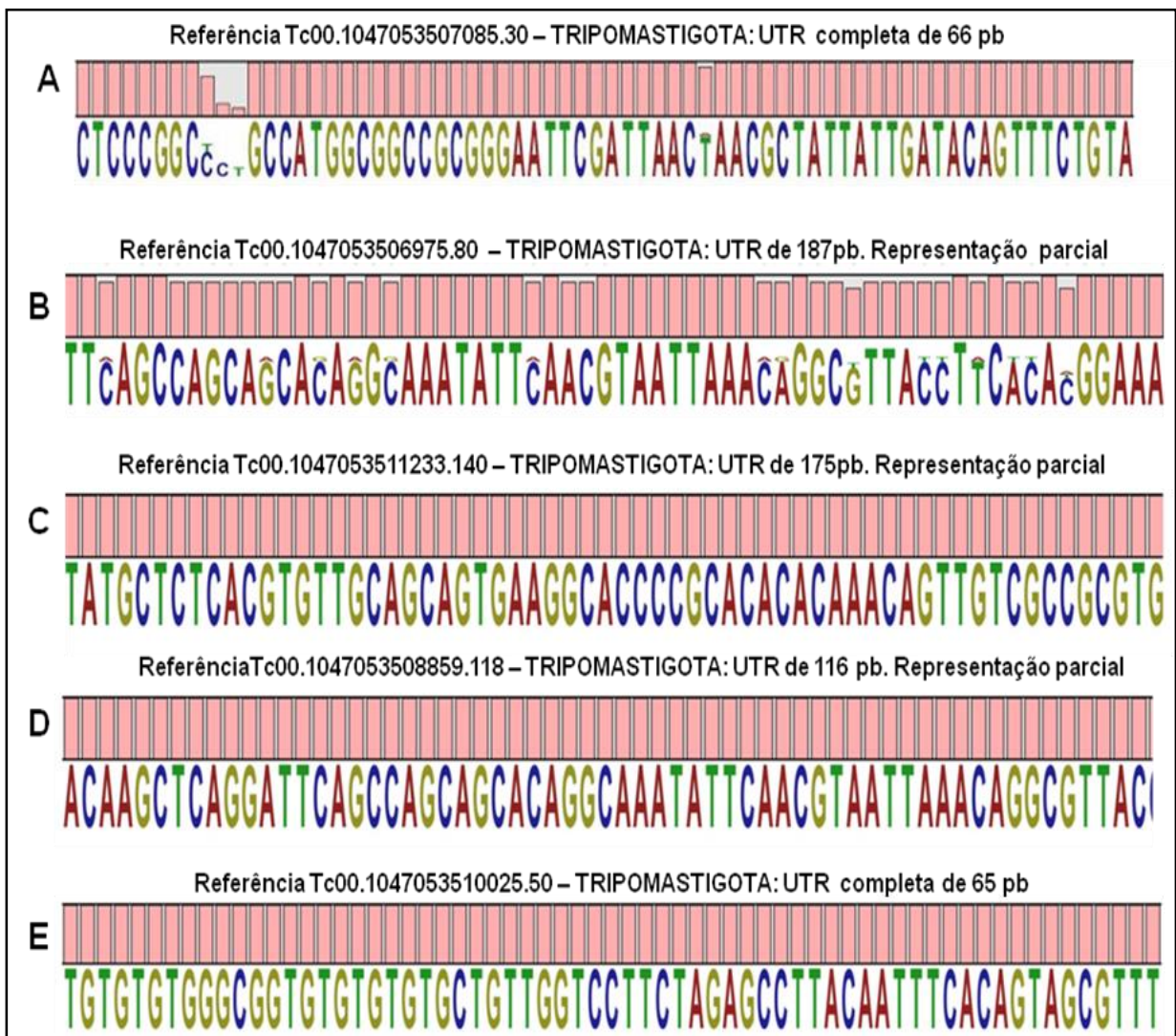


Figura 5.3 – Logos representando as UTR referentes à classes de trans-sialidases identificadas em CL-Brener no estágio tripomastigota tendo o iniciador 5'UTRTCNA como alvo. Em (A), representação das UTR alinhadas com a cepa referência Tc00.1047053507085.30 com tamanhos de 66 pb. Em (B, C e D), partes evidenciadas das UTR de 187, 175 e 116 pb cujas referências são Tc00.1047053506975.80, Tc00.1047053511233.140 e Tc00.1047053508859.118, respectivamente. (E) Representação da UTR em sua íntegra contendo 65 pb e tendo Tc00.1047053510025.50 como referência.

As amostras de epimastigotas amplificadas com o iniciador 5'UTRTCNA foram agrupadas em 3 sequências referência sob as mesmas condições supracitadas, sendo que uma dessas sequências também mostrou homologia com cDNA obtido a partir de tripomastigotas. A Figura 5.4 apresenta os grupos formados com as sequências geradas para formas epimastigotas.

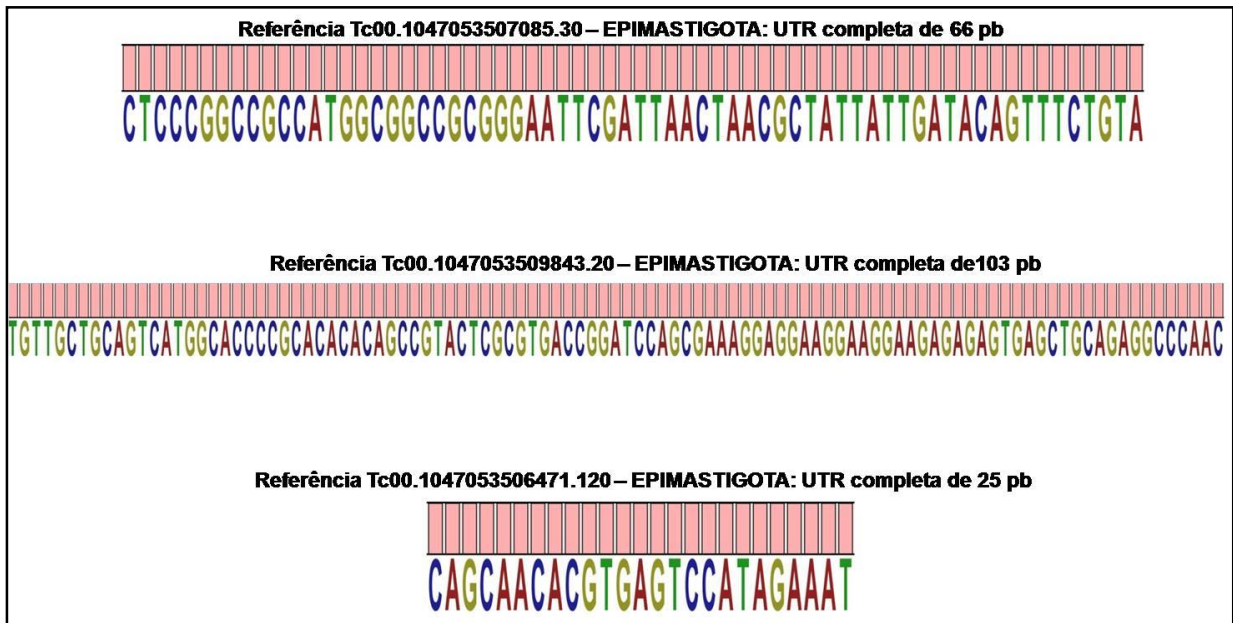


Figura 5.4 – Logos representando as UTR referentes às classes de trans-sialidases identificadas em CL-Brener no estágio epimastigota, tendo o iniciador 5'UTRTCNA como alvo. As UTR de epimastigotas mostraram-se menores quando comparadas as de tripomastigotas para o mesmo alvo. A figura evidencia o tamanho de cada região não traduzida.

Embora a referência Tc00.1047053507085.30 tenha apresentado homologia para os dois estágios evolutivos da cepa CL-Brener, gerando UTR de mesmo tamanho, algumas diferenças composicionais podem ser destacadas ao contrapô-las. Por exemplo, em tripomastigotas, pode ser observada a presença de timina em sítio correspondente nas formas epimastigotas a presença apenas de citosina. Além disso, a quantidade de timinas apresentada em outro sítio em epimastigota mostra-se maior quando comparada ao seu alelo em tripomastigota (Figura 5.5).

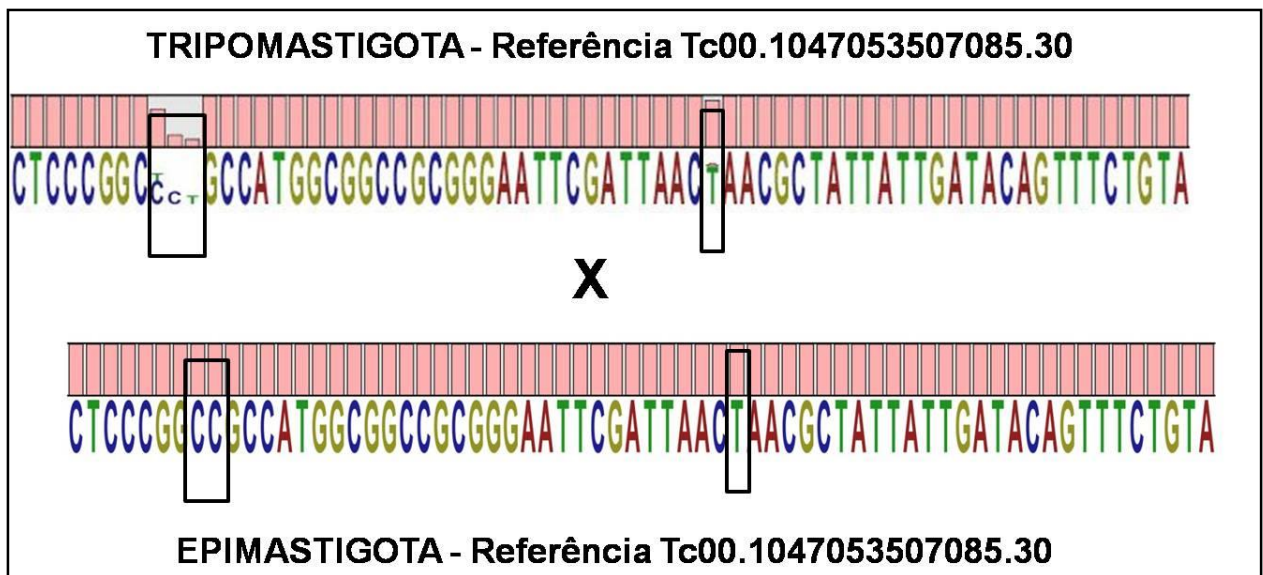


Figura 5.5 - A referência Tc00.1047053507085.30 pode ser evidenciada em ambos os estágios (tripomastigotas e epimastigotas). A variação composicional para os dois estágios evolutivos pode ser evidenciada segundo a ilustração.

A análise das sequências das formas epimastigotas obtidas com o alvo para trans-sialidase TcTs reverso (5' GCC GGG ACA TGT TGG GCC TC 3'), revelou uma variação na posição do códon iniciador (ATG) que nos chamou a atenção para um fenômeno representado na Figura 5.6. Em A, está representado o mini-exon tendo em destaque os 8 nucleotídeos finais de sua composição (CTATATTG). Essas 8 bases tem a função de um *tag*, ou seja, possibilitam evidenciar que o cDNA que encontramos de fato existe pois as mesmas bases não foram utilizadas no desenho dos iniciadores; portanto, identificá-las reduz enormemente a possibilidade de ser algum artefato. Dessa forma, CTATATTG é um controle natural de qualidade para o cDNA.

Em B, ao localizarmos o códon iniciador (ATG), notamos a seguinte situação: a sequência 1 com o códon iniciador no nucleotídeo de número 169, enquanto na sequência 2, este códon foi localizado no nucleotídeo 224.

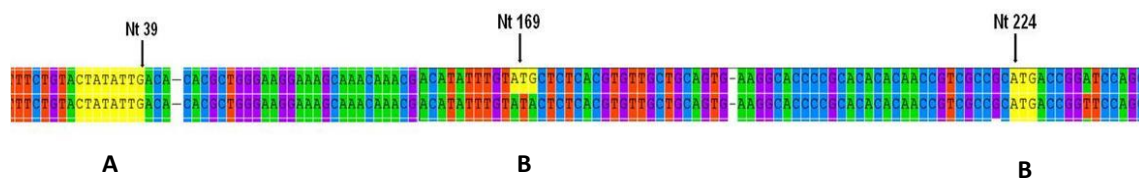


Figura 5.6 – Sequenciamento por Sanger mostrando duas cópias do gene de trans-sialidase diferindo apenas pela posição do ATG. Em A destaque para o controle interno do cDNA. Em B, a trinca em destaque mostra o códon iniciador das sequências até então absolutamente idênticas, diferindo no posicionamento de seus códons sugerindo quebra do paradigma entre as UTR.

De acordo com essas análises, se o ATG que aparece na posição correspondente ao nucleotídeo 169 for realmente o códon iniciador da sequência 1, diferente da sequência 2, no qual o mesmo foi identificado na posição de nucleotídeo

224, poderá estar ocorrendo quebra de paradigma sobre a definição das UTR uma vez que a UTR maior (representada pela sequência 2) terá parte de sua estrutura sendo traduzida considerando que o ATG da sequência menor (1) está localizado em posição anterior.

Para maiores esclarecimentos acerca da região 5' UTR realizamos um ensaio utilizando a plataforma de sequenciamento 454 Junior a partir de um único amplicon de epimastigotas de *T. cruzi* gerado com os iniciadores ME3 (5' AAC TAA CGC TAT TAT TGA TAC AGT T 3') e TcTs reverso (5' GCC GGG ACA TGT TGG GCC TC 3') contendo um pequeno trecho da ORF de trans-sialidase.

Em um total de 195 cópias de trans-sialidase obtidas através do sequenciamento de amplicon pelo 454 Junior, as 10 sequências descritas na Tabela 5.1 representaram 90% dessas cópias transcritas no estágio epimastigota, sendo que apenas as duas primeiras sequências, resultantes de sítios adicionais de *trans-splicing*, totalizaram 60%.

Tabela 5.1 – Seleção parcial de sequências obtidas pelo 454 Junior – Sequenciamento de alto-desempenho

Seq. cDNA 454*	Frequência da sequência no 454	Frequência (%)
Ts 32467 size	11345	43,03
Ts 6159 size	4504	17,08
Ts 14481 size	1115	4,23
Ts 17592 size	1046	3,97
Ts 38132 size	983	3,73
Ts 11273 size	751	2,85
Ts 1149 size	640	2,43
Ts 22153 size	390	1,48
Ts 19703 size	342	1,3
Ts 10198 size	314	1,19

*Lista parcial do alinhamento das sequências do 454 Junior. Descrição das 10 sequências relativamente mais abundantes.

Bloco 2 dos Resultados: Extrato Proteico de *T. cruzi*

5.3 – Elaboração do Extrato Proteico de *Trypanosoma cruzi* – Sistema Alternativo para Lise Celular:

O ponto inicial para a caminhada em busca das respostas alçadas nesse trabalho foi a elaboração de um sistema de lise celular que fosse ao mesmo tempo eficiente e sensível às estruturas celulares internas sem danificá-las. Resolvemos, então, desenvolver uma metodologia própria de simples execução. A Tabela 5.2 resume as condições testadas até a formulação ideal para os nossos ensaios.

Verificamos que a quantidade máxima de parasitos passíveis de serem eficientemente lisados nas condições estabelecidas foi na ordem de 10^7 células/mL, com volume de 200 μ L e tempos de incubação de 30 minutos a 4°C, tanto no tampão hipotônico quanto no ultrassom de banho, conforme descrito na Tabela 5.2.

A técnica foi desenvolvida usando-se as cepas Dm28c, Y, 4167 e CL-Brener, sendo esta última selecionada como cepa referência em nossos estudos, considerando que esta foi a cepa de *T. cruzi* cujo genoma foi seqüenciado e disponibilizado nos bancos de dados públicos (El-Sayed et al, 2005).

Tabela 5.2 - Cinética de lise celular de formas epimastigotas de CL-Brener ^a.

Densidade celular (cel / mL)	Tempo de incubação (minutos)	Solução Tampão de lise hipotônico (μL)	Resultado monitorado pela microscopia óptica
10 ⁶	15	50	Nenhuma lise detectada
		200	
		350	
		500	
10 ⁶	20	50	Nenhuma lise detectada
		200	Lise parcial
		350	Lise parcial
		500	Lise parcial
10 ⁶	30	50	Nenhuma lise detectada
		200	Lise parcial
		350	Lise parcial
		500	Lise parcial
10 ⁷	15	50	Nenhuma lise detectada
		200	
		350	
		500	
10 ⁷	20	50	Nenhuma lise detectada
		200	Lise parcial
		350	Lise parcial
		500	Lise parcial
10 ⁷	30	50	Nenhuma lise detectada
		200	Lise completa
		350	Lise parcial
		500	Lise parcial
10 ⁸	15	50	Nenhuma lise detectada
		200	
		350	
		500	
10 ⁸	20	50	Nenhuma lise detectada
		200	Lise parcial
		350	Lise parcial
		500	Lise parcial
10 ⁸	30	50	Nenhuma lise detectada
		200	Lise parcial
		350	Lise parcial
		500	Lise parcial

^a O tempo de incubação para o ultrassom de banho foi o mesmo usado para a incubação das amostras em solução tampão hipotônica. Cinética segundo a densidade celular, associada ao tempo de incubação em tampão hipotônico e sonicação em banho.

Os resultados preliminares foram corroborados por ensaios quantitativos e também visualmente, a fim de se avaliar a eficiência do sistema de lise que foi desenvolvido. Dessa forma, iniciamos os testes pela citometria de fluxo e também por monitoramento através de registros fotográficos das observações ao microscópio óptico (microscopia de contraste de interferência diferencial – DIC).

5.4 - Análises de Citometria de Fluxo (FACS) e por Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC):

Os resultados dos ensaios para a análise de citometria de fluxo estão resumidos na Figura 5.7.

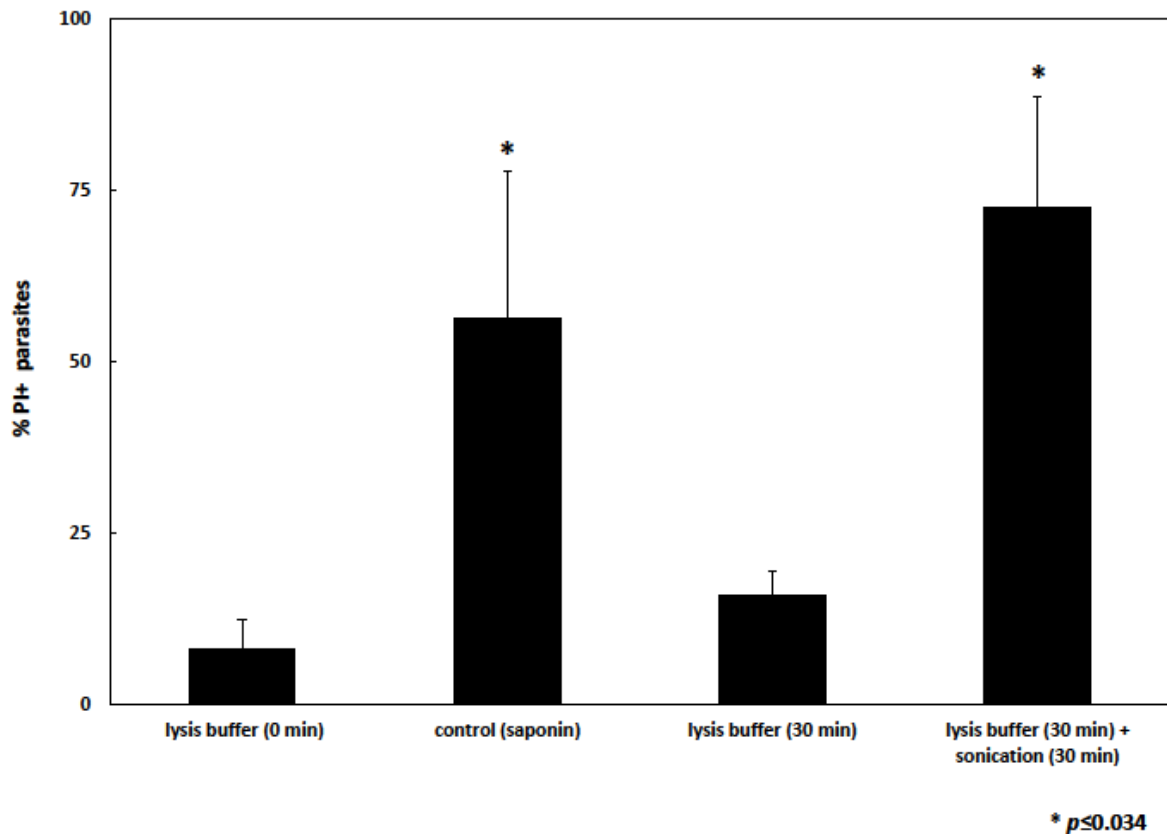


Figura 5.7 – Análise por FACS da permeabilidade de membrana de células epimastigotas de CL-Brener. Após 30 minutos de incubação das amostras em solução tampão de lise a 4°C a suspensão de células foi colocada no ultrassom de banho por 10, 20 e 30 minutos, seguida pela marcação com PI. Todos os experimentos foram realizados por três vezes de maneira independente. A saponina foi usada como controle positivo.

A perda da integridade da membrana plasmática da suspensão celular de epimastigotas incubados em solução tampão de lise hipotônica a 4°C no tempo 0, foi estimada em apenas 8%. Esses resultados refletiram as observações realizadas por DIC, onde, a maioria das células permaneceu com mobilidade e sua morfologia apresentou-se intacta (Figura 5.8A). Aumentando-se o tempo de incubação na solução tampão de lise hipotônica para 30 minutos, a permeabilidade da membrana plasmática foi de aproximadamente 16%. Até este estágio, não foi observada nenhuma lise significativa. Entretanto, observam-se pequenas alterações no formato das células como mostradas pelas imagens captadas por DIC (Figuras 5.8B, 5.8C e 5.8D).

A incubação em tampão hipotônico por 30 minutos a 4°C, porém desta vez, seguida de incubação em ultrassom de banho por 10 e 20 minutos, levou ao início de ruptura celular, com alterações morfológicas, como nitidamente observado nas figuras 5.8E e 5.8F. Há também “perda” do flagelo e arredondamento das células. Quando a suspensão de epimastigotas foi submetida ao ultrassom de banho por 30 minutos, esse processo culminou em um aumento da lise celular de aproximadamente 9 vezes comparado ao controle negativo (tempo 0 de incubação), e portanto, com 72% de células marcadas com PI (Figura 5.7). O processo final está representado na Figura 5.8G, onde se visualiza nitidamente um aumento de fragmentos (*debris*) celulares (pontos brancos diminutos). Ressalta-se que o controle positivo (lise na presença de saponina) apresentou 56% de células marcadas com PI. Portanto, esses dados comprovam a eficiência da nossa metodologia de lise celular.

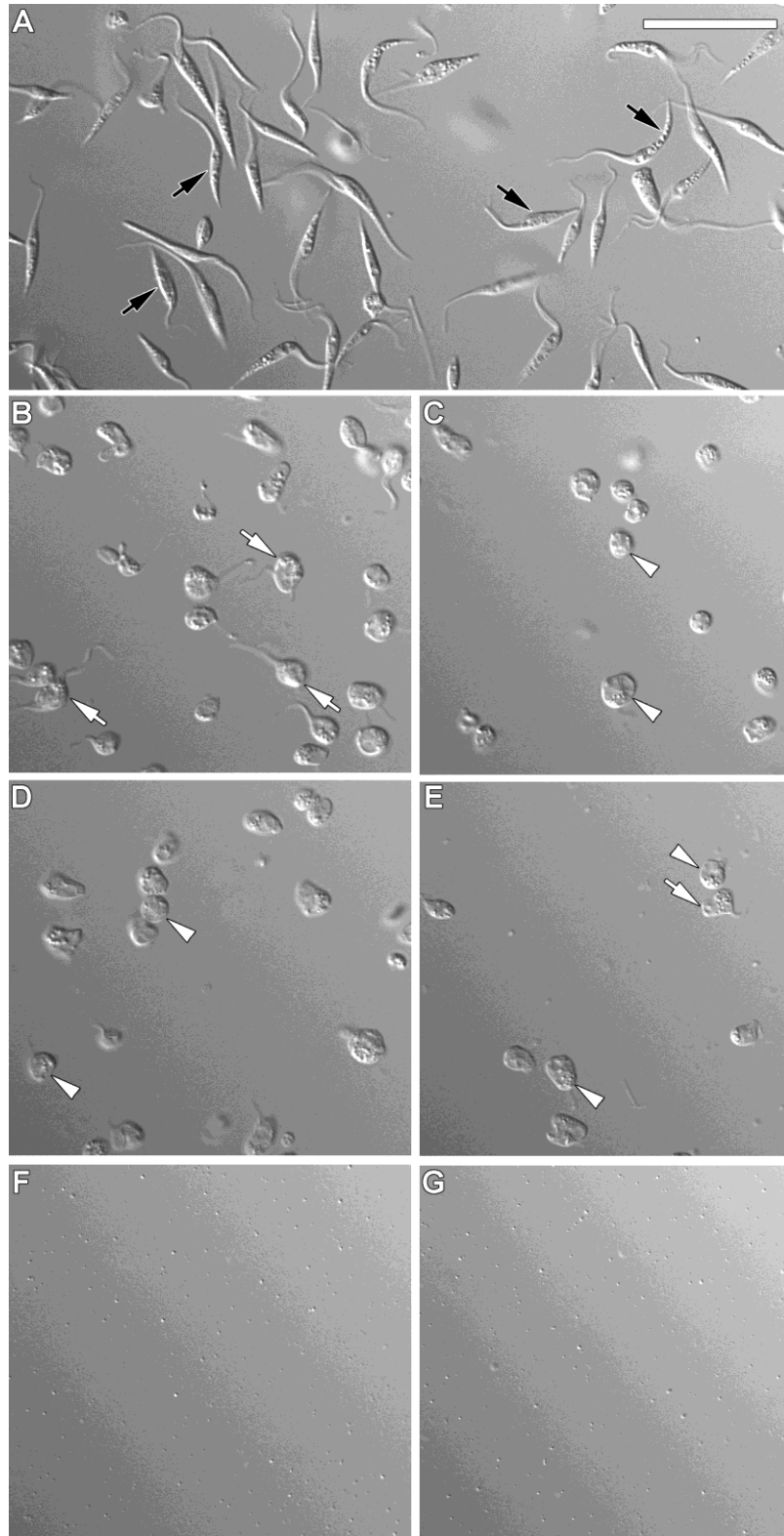


Figura 5.8 – Análise por microscopia (DIC) de lise celular de *T. cruzi*. (A) Controle, parasitos apresentando morfologia típica do estágio epimastigota (setas pretas). (B-D) Epimastigotas incubados com solução tampão hipotônica por 10 (B), 20 (C) e 30 (D) minutos evidenciando retração do corpo (setas brancas). A incubação dos parasitos em solução tampão de lise associada ao uso do ultrassom de banho por 10 (E), 20 (F) e 30 (G) minutos leva a diminuição do número de parasitos observados e aumento de *debris* celulares (pontos brancos diminutos). Barra= 20 μ m.

5.5 – Perfis proteicos dos quatros extratos de *T. cruzi* (TcS12):

Após a elaboração, otimização e padronização da metodologia de lise e a subsequente produção do extrato proteico (TcS12), monitoramos a qualidade do extrato de proteínas em gel de poliacrilamida. Pela análise do perfil eletroforético das bandas, nos certificamos que não ocorreu degradação aparente das proteínas durante a produção do extrato, pois: 1) foi observada a reprodutibilidade do padrão de bandas proteicas; 2) não houve concentração de bandas proteicas próximas a parte inferior do gel; 3) ausência de “background” difuso; 4) presença de bandas proteicas na faixa de alta massa molecular; 5) as bandas apresentaram boa resolução.

Ainda analisando o gel, podemos observar perfis eletroforéticos diferenciados entre as cepas (Figura 5.9).

Mediante essa constatação, resolvemos investigar quais proteínas estariam envolvidas nesses extratos e se elas se diferenciavam por grupos de proteínas ou apenas pela quantidade. Para isso, passamos a fazer uma série de experimentos envolvendo análises proteômicas quantitativas (LCMS/MS).

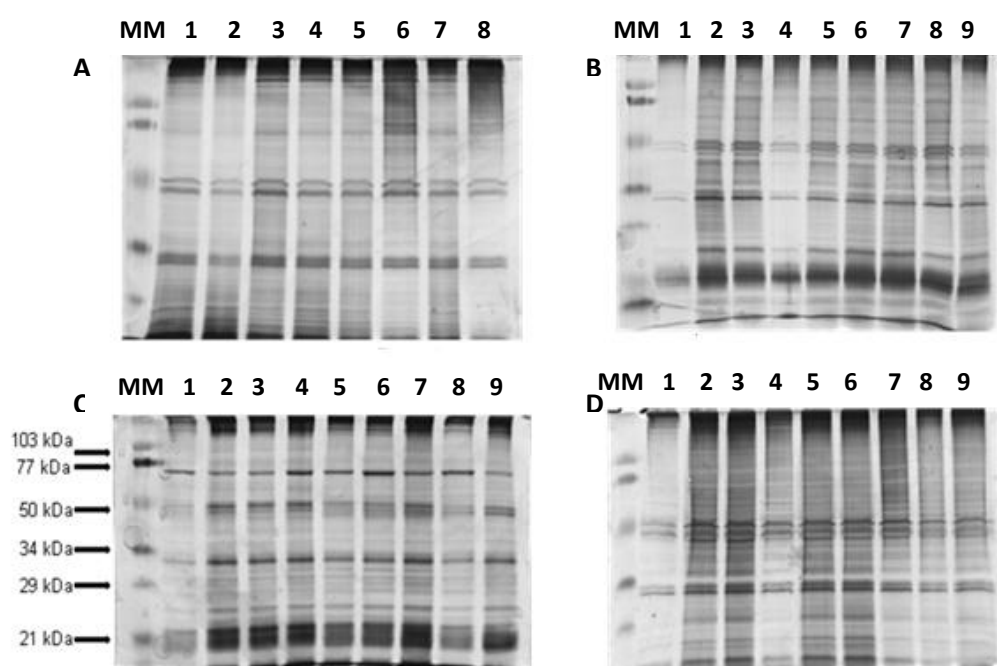


Figura 5.9 – Gel de poliacrilamida 12% revelado por prata dos extratos proteicos de *T. cruzi* de quatro cepas distintas: Dm28c (A), Y (B), CL-Brener (C) e 4167 (D). MM, marcador de massa molecular, com alíquotas de extratos proteicos em cada poço variando de 0,8 – 3ug em (A); 1,2 – 6,5 ug em (B); 0,8 – 4,5 ug em (C); 1,3 – 4,5 ug em (D). Os extratos proteicos foram produzidos a partir de células epimastigotas de cada cepa coletada em sua fase logarítmica.

5.6 - Análise por Espectrometria de Massas:

5.6.1 – Dados das análises de proteínas identificadas:

Para verificar a qualidade e aplicação do extrato TcS12, análises das quatro cepas de *T. cruzi* (Dm28c, Y, CL-Brener e 4167) foram realizadas por LCMS^E. Como ilustrado na Figura 5.13, o número total de proteínas identificadas nos extratos das quatro cepas foi 1153. Entretanto, o número de proteínas comuns foi 544, e não redundantes foram 609. O número de proteínas identificadas em cada cepa foi de 215 para 4167, 376 em Y, 299 em CL-Brener e 263 para Dm28c. Quando os dados de identificação de proteínas foram organizados de acordo com as classes de proteínas (*Kegg Orthology*), a distribuição das proteínas nos extratos resultou em perfis similares entre as cepas, enquanto para a cepa Y, trans-sialidase (TS) foi a classe de proteínas mais abundante (Figura 5.10).

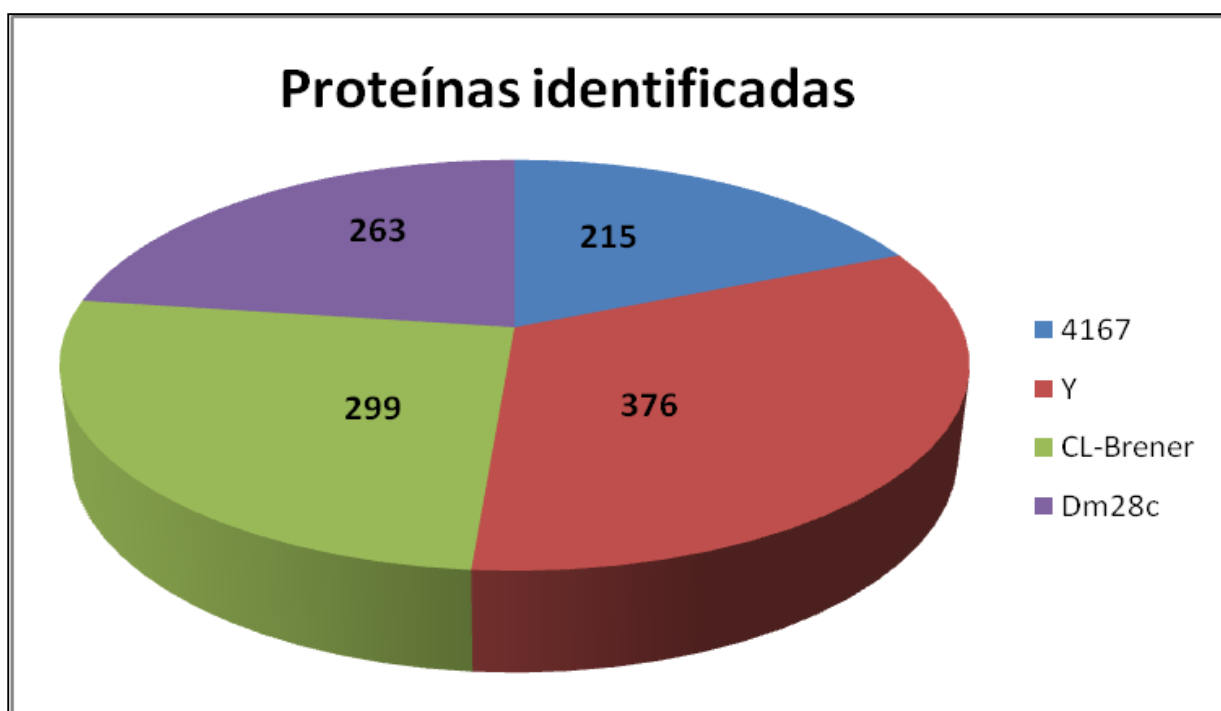


Figura 5.10 – Número de proteínas identificadas em cada cepa de *T. cruzi*.

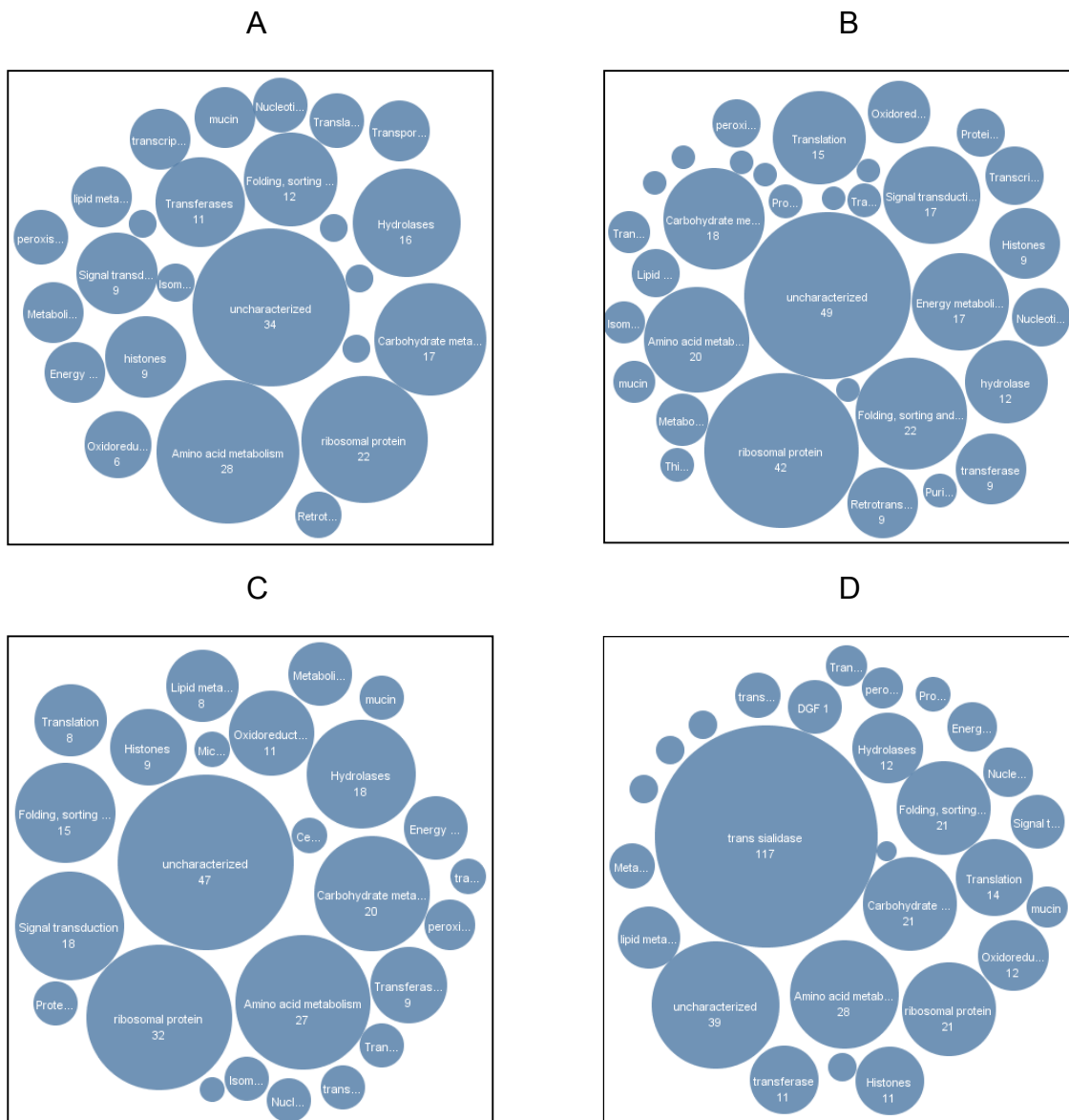


Figura 5.11 – Distribuição das classes de proteínas de acordo com a ortologia (Kegg) encontrada em cada cepa de *T. cruzi*. (A) 4167, (B) CL-Brener, (C) Dm28c, (D) cepa Y. O tamanho dos círculos ilustra a abundância das proteínas pertencentes à determinadas classes.

5.6.2 – Predição da Localização subcelular das proteínas:

A identificação das proteínas encontradas nos quatro extratos de *T. cruzi* foi realizada de acordo com o software Euk-mPLOC, a fim de avaliar a localização subcelular das proteínas e, conseqüentemente, a qualidade do extrato celular produzido pela metodologia desenvolvida neste trabalho (Figura 5.12). Os compartimentos celulares foram agrupados de acordo com a organização estrutural do *T. cruzi*. Conforme observado, o método de lise proposto neste trabalho foi capaz de extrair proteínas de vários tipos de organelas/ estruturas, especialmente do citoplasma

(Cy), do complexo mitocôndria-kinetoplasto (Ki/Mi), do núcleo (Nu), e da membrana celular, extracelular e superfície celular (CM/Ex/CS).

No entanto, um número menor de proteínas foi obtido do retículo endoplasmático (ER), vacúolo (Vac), outras organelas (Giorgi & de Lederkremer) e de elementos pertencentes ao citoesqueleto/flagelo (microtúbulos/Mict). O gráfico também mostra que o número total de proteínas correlacionadas à estrutura celular é maior que o número total de proteínas identificadas.

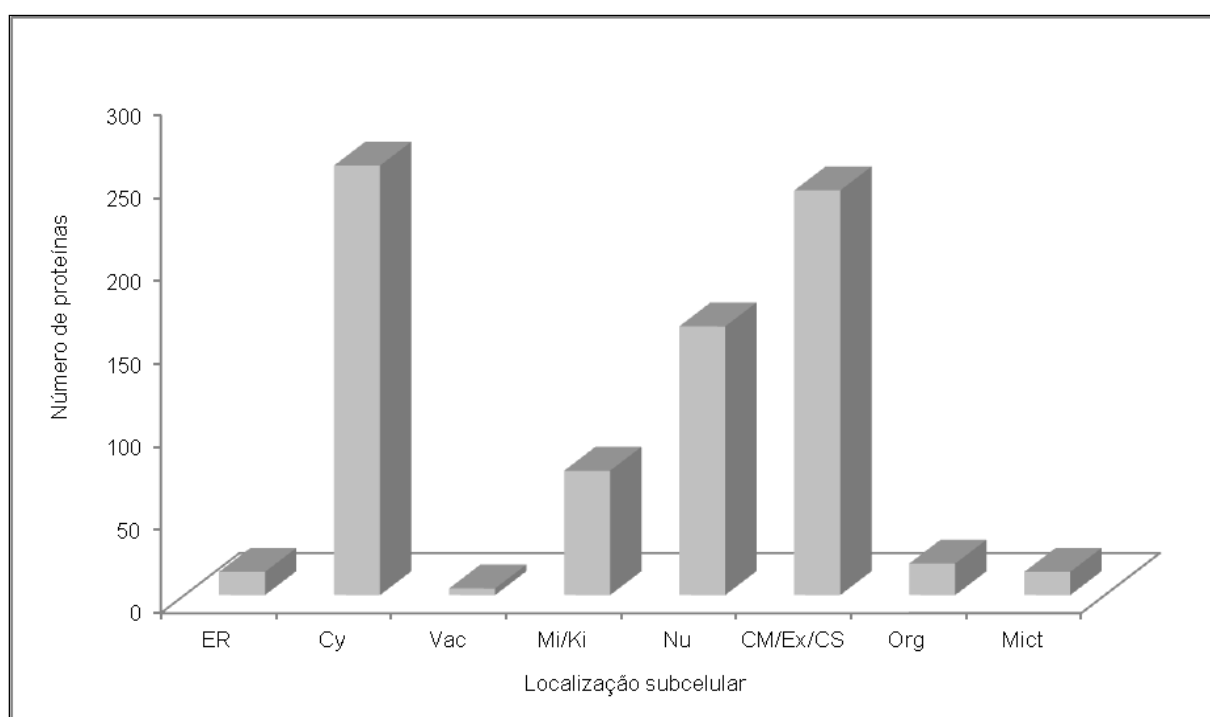


Figura 5.12 – Predição de localização subcelular das proteínas identificadas nos extratos das 4 cepas de *T. cruzi*. A distribuição está de acordo com o Euk-mPLoc software e baseado na estrutura organizacional de *T. cruzi*. ER, Retículo endoplasmático; Cy, citoplasma; Mi/Ki, complexo mitocôndria-kinetoplasto; Nu, núcleo; CM/Ex/CS, membrana celular e extracelular e superfície celular; Org, organelas; Mict, elementos pertencentes ao citoesqueleto/flagelo.

5.6.3 – Expressão de Proteínas:

Para analisar a expressão relativa das proteínas, os dados oriundos dos extratos TcS12 das cepas Y, Dm28c e 4167 foram analisados pelo algoritmo EXPRESSION^E e comparados com os dados da cepa referência CL-Brener. Encontramos 32 proteínas *up* e *down-expressed* significativamente diferentes quando comparamos a cepa 4167 com CL-Brener. Além disso, foram identificadas 60 proteínas exclusivas da 4167. Consideramos como proteínas únicas ou exclusivas, aquelas que foram detectadas em apenas uma das cepas (Figura 5.13).

Quando comparamos a quantificação relativa entre Dm28c e CL-Brener, os dados mostraram 51 e 92 proteínas *up* e *down-expressed*, respectivamente, sendo 90 únicas para a cepa Dm28c. E finalmente, a comparação relativa entre a cepa Y e CL-Brener, apresentou 73 proteínas *up-expressed*, 60 proteínas *down-expressed* e 209 proteínas únicas. Curiosamente, mais da metade das proteínas únicas corresponderam a trans-sialidases (117). Também observamos que nas comparações quantitativas, as cepas CL-Brener, Dm28c e 4167 demonstraram níveis reduzidos de proteínas de superfície celular, ou seja, trans-sialidases, mucinas e MASPs. No entanto, apenas em CL-Brener foi detectada a proteína de superfície gp63.

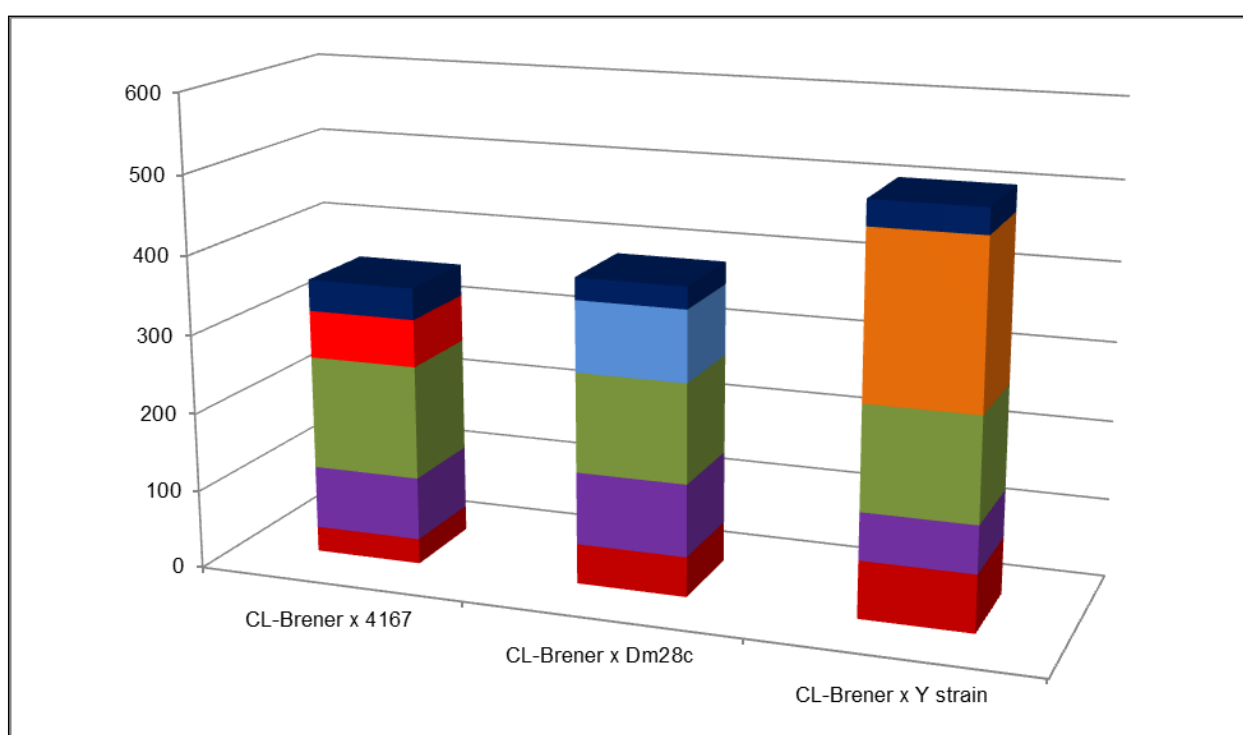


Figura 5.13 – Análise diferencial da expressão proteica das cepas de *T. cruzi* usando *Expression^E*. 4167 x CL-Brener; Dm28c x CL-Brener, Y x CL-Brener. (A) razão de expressão sem modificação (B) proteínas únicas em Y, (C) proteínas únicas em Dm28c (D) proteínas únicas em 4167 (E) proteínas únicas em CL-Brener (F) *Down-expressed* (G) *Up-expressed*. Reiterando que o termo único refere-se ao teste *T-student*.

O *software* *EXPRESSION^E* gerou três tabelas de quantificação relativa comparando-se as cepas Y, Dm28c e 4167 à cepa de referência CL-Brener (CL-Brener x Y, CL-Brener x Dm28c e CL-Brener x 4167). Essas tabelas são referentes a expressão de cada proteína identificada por *LCMS^E* totalizando 609 proteínas não redundantes.

Para facilitar a interpretação dos dados, decidiu-se reunir as proteínas de acordo com as classes as quais pertencem, classificadas de acordo com o *Gene Ontology* tendo como base o banco de dados *Kegg* (Kyoto Encyclopedia of Genes and

Genomes - www.genome.jp/kegg). Portanto, os dados de expressão relativa de proteínas foram sintetizados como mostrados nas Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5.

Tabela 5.3 – Comparação de expressão entre as classes de proteínas encontradas em Dm28c e CL-Brener^a

	Metabolismo	Hidrolase	Enovelamento e degradação	TS e Mucina	Tradução e ribossomos	Transdução de Sinal e quinases	Retrotransposons	Oxidoredutase /peroxosomal
Únicas em Dm28c	19	5	4	5	13	3	0	4
Únicas em CL-Brener	12	7	11	4	30	14	8	1
<i>Up</i> em Dm28c	5	2	1	0	5	15	1	6
<i>Down</i> em Dm28c	31	9	10	0	12	3	0	3
Razão 1:1	7	2	0	0	7	0	0	1

^aProteínas *up-expressed*: valor de $1 \geq p \geq 0.95$; proteínas *down-expressed*: $p \leq 0.05$; e Razão 1:1 (ou expressão inalterada) : $0,05 < p < 0,95$, baseado no teste t-student

Tabela 5.4 – Comparação de expressão entre as classes de proteínas encontradas em CL-Brener e 4167^a

	Metabolismo	Hidrolase	Enovelamento e degradação	TS e Mucina	Tradução, ribossomos	Retrotransposons	Transdução de Sinal e quinases	Oxidoredutase/ peroxosomal
Únicas4167	15	3	0	6	5	2	1	2
Únicas CL-Brener	13	7	10	4	35	8	14	3
<i>Up</i> em CL-Brener	3	0	10	0	9	0	0	0
<i>Down</i> em CL-Brener	34	12	1	0	4	1	5	1
1:1 Razão	7	1	0	0	6	0	3	7

^a Proteínas *up-expressed*: valor de $1 \geq p \geq 0.95$; proteínas *down-expressed*: $p \leq 0.05$; e Razão 1:1 (ou expressão inalterada) : $0,05 < p < 0,95$, baseado no teste t-student

Tabela 5.5 – Comparação de expressão entre as classes de proteínas encontradas em Y e CL-Brener^a

	Metabolismo	Hidrolase	Enovelamento e degradação	TS e Mucina	Tradução, ribossomos	Retrotransposons	Transdução de Sinal e quinases	Oxidoredutase/ peroxosomal
Únicas em Y	20	3	8	121	11	0	2	5
Únicas em CL-Brener	11	11	9	4	29	9	13	0
<i>Up</i> em Y	19	1	6	0	8	0	2	8
<i>Down</i> em Y	19	0	7	0	4	0	3	0
1:1 Razão	6	0	0	0	0	0	3	3

^a Proteínas *up-expressed*: valor de $1 \geq p \geq 0.95$; proteínas *down-expressed*: $p \leq 0.05$; e Razão 1:1 (ou expressão inalterada) : $0,05 < p < 0,95$, baseado no teste t-student

Bloco 3 de Resultados: Comparação da única trans-sialidase encontrada no extrato TcS12 com as demais trans-sialidases presentes nos bancos de cDNA

A sequência da trans-sialidase encontrada no extrato TcS12 pela abordagem proteômica para a cepa CL-Brener, foi identificada no banco de dados disponível no UniProt com o número de acesso **Q4DGV8** e foi posteriormente rastreada no banco disponível no **NCBI (Tc00.1047053506975.90)**. A sequência relacionada a 5' UTR foi destacada e alinhada junto ao banco de cDNAs obtidos pelo sequenciamento da cepa CL-Brener no estágio epimastigota (com os iniciadores para trans-sialidase e mini-exon), a fim de identificarmos os sítios de *trans-splicing* para a tradução da trans-sialidase identificada pela espectrometria de massa. Verificamos que baseado na sequência genômica de referência (**Tc00.1047053506975.90**), o sítio de *trans-splicing* canônico (AG) foi localizado na posição 130 gerando uma 5' UTR para o gene de trans-sialidase de 206 pb como mostra a Figura 5.14.

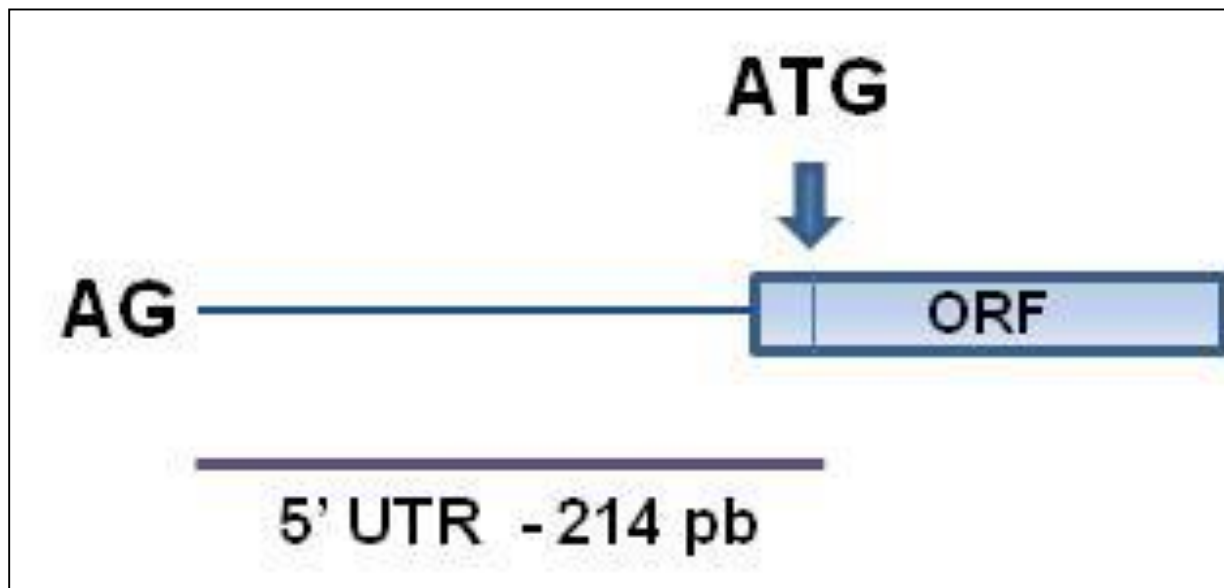


Figura 5.14 – Esquema representando a identificação da região 5' UTR no gene de trans-sialidase. Esta proteína foi identificada por espectrometria de massa.

Como houve a identificação com identidade acima de 92% apenas para uma das sequências no banco de epimastigotas, realizou-se nova análise entre a sequência identificada e as demais. Sendo assim, destacaram-se quatro UTR contidas no arquivo do alinhamento de cDNAs oriundas de epimastigotas (com o par de iniciadores ME e TcTS), com grau de identidade similar as suas sequências referências, a fim de compararmos o tamanho e a composição das mesmas (Figura 5.15).

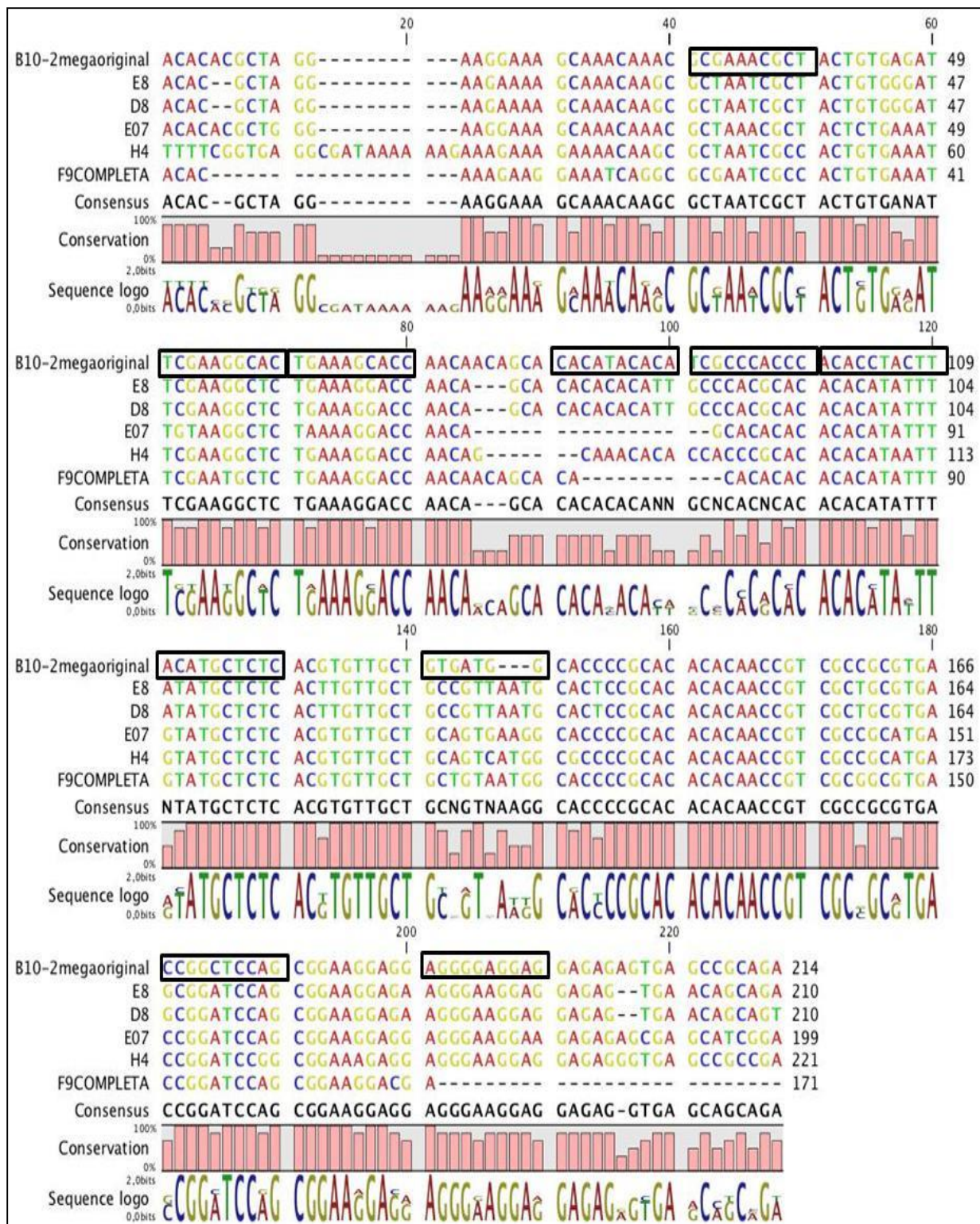


Figura 5.15 – Alinhamento das UTR (B10) de trans-sialidasas. Comparação da TS identificada no extrato TcS12 com as demais UTR de epimastigotas de CL-Brener encontradas no banco de dados de cDNA. Os tamanhos variaram de 199 a 221 pb.

Bloco 4 de Resultados:

5.7 – Síntese *in vitro* do RNA

A realização da síntese *in vitro* mostrou-se necessária devido a escolha da abordagem metodológica inicial. A priori, deveríamos analisar as diferenças na constituição das UTR com o uso de um gene repórter, sendo, portanto, altamente relevante a síntese do RNA acelular para a execução da técnica em sua totalidade.

No entanto, essa etapa revelou-se limitada para a geração de um RNA linear que fosse capaz de ser reconhecido em um extrato proteico. Houve uma grande demanda de tempo para a eliminação do plasmídeo usado como molde para a síntese, sendo isso um fator limitante para o desenvolvimento da técnica, pois o RNA sintético obtido apresentava resquícios de DNA interferindo em sua qualidade.

Após diversas alterações nos protocolos em vigência quanto ao uso da DNase e escolhas de uma metodologia adequada para a purificação do RNA *in vitro*, a síntese foi obtida com o uso de um plasmídeo contendo o gene da trans-sialidase. Aperfeiçoamos a técnica a partir de dois conjuntos diferentes de reações para síntese *in vitro* (Ribomax e T7, ambos pertencentes a empresa Promega®). Diferenças foram observadas em relação ao rendimento do RNA produzido por ambos os protocolos (670 ng/μL para o Ribomax e de 175 ng/μL para o T7) (Figura 5.16).

Os RNAs foram quantificados com o auxílio do equipamento NanoDrop™ (Thermo Scientific) após tratamento com DNase para eliminação do DNA plasmidial usado como molde, e submetidos a extração com Trizol (Invitrogen), objetivando purificação e concentração do material sintetizado. Para a certificação da completa eliminação do DNA-molde, realizou-se a técnica de RT-PCR com o uso de iniciadores para a região T7; para controle negativo da etapa de transcrição, foi utilizado uma alíquota de RNA sintético sem o acréscimo da transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen®), e como controle negativo da reação de PCR foram usados todos os reagentes menos o cDNA (Figura 5.17).

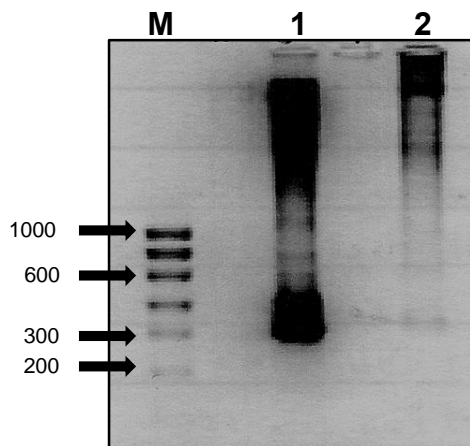


Figura 5.16 – Gel de agarose 2% corado com GelRed. Amostras de RNA sintético produzidos por Ribomax (1) e T7 (2) antes da purificação. O marcador (M) usado foi o RiboRuler™ Marker Low Range RNA Ladder (Thermo Scientific).

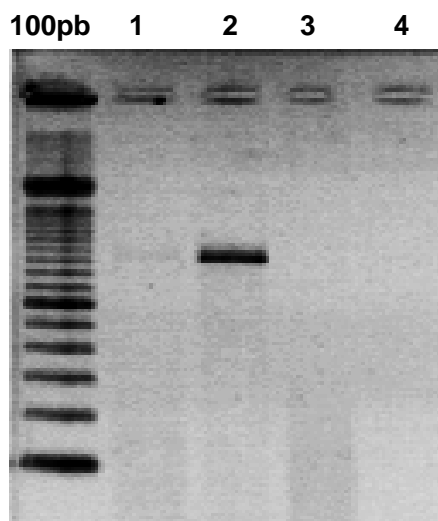


Figura 5.17 – Gel de agarose 1,5% corado com GelRed para a visualização do amplicon derivado de RT-PCR. (1) Amplicon proveniente de um RNA sintético menos concentrado do que o RNA sintético que favoreceu a amplificação visualizada no poço 2. (3) Controle negativo da transcrição reversa. (4) Controle negativo para a reação de PCR.

Após a síntese *in vitro* da molécula de RNA, tendo GFP (*Green Fluorescence Protein*) como gene repórter, e sua amplificação por RT-PCR, buscamos a identificação da tradução pela análise óptica através de um fotodocumentador (Figura 5.18).

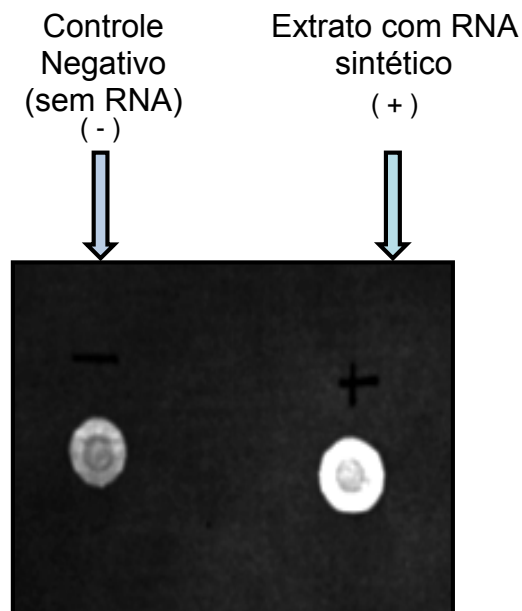


Figura 5.18 – Ensaio de fluorescência da GFP. Tentativa de detecção do sistema de tradução acelular pelo uso de fotodocumentador. A emissão da luz UV presente no equipamento promove a excitação da GFP levando a uma fluorescência.

Em seguida, ensaios para a quantificação da suposta GFP foram realizados (Figura 5.19). As bandas de menor peso molecular, de 19,4 a 49,5 kDa foram cortadas e analisadas por espectrometria de massa com o intuito de detectar a GFP expressa no sistema. No entanto, a identificação da proteína não foi possível.

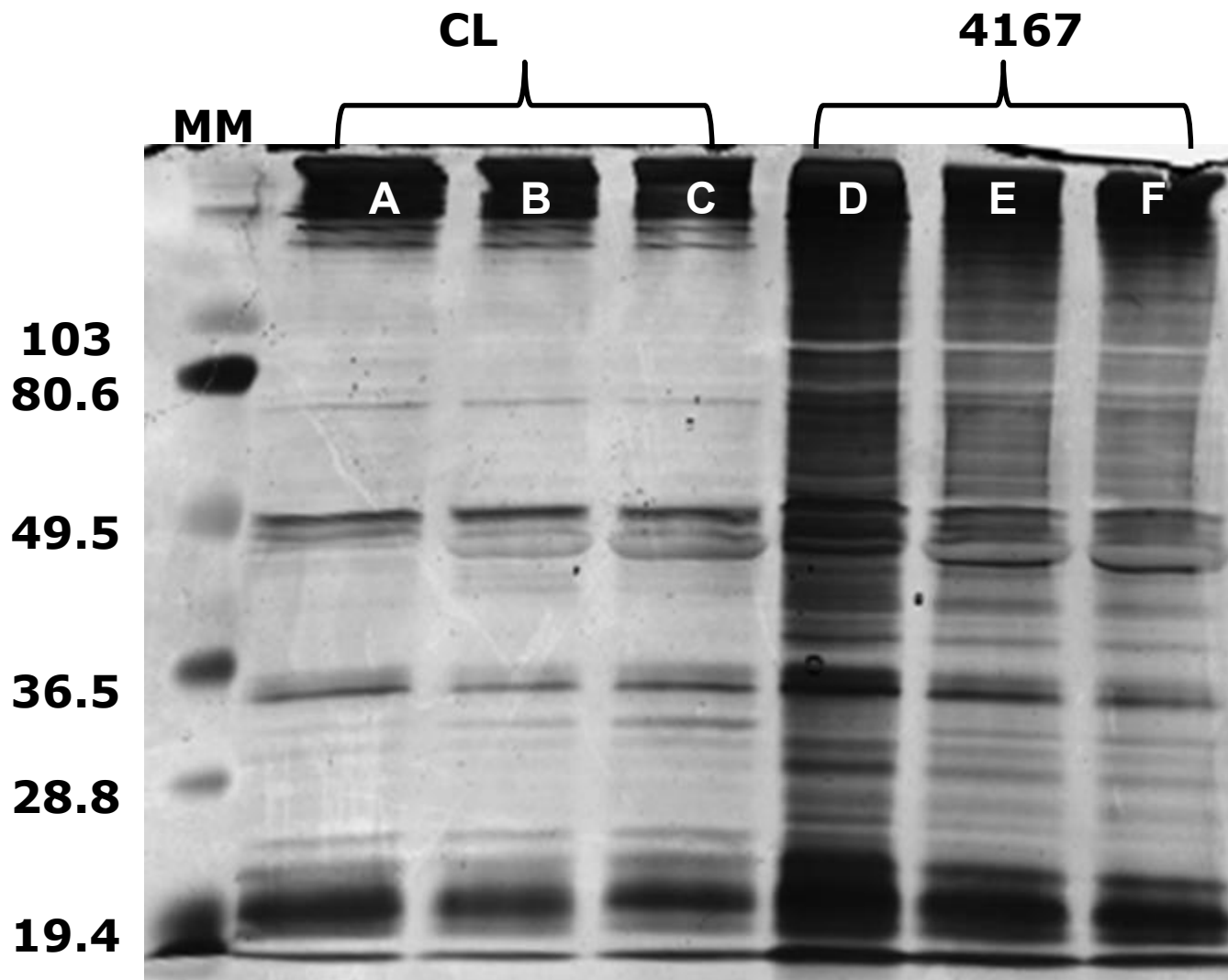


Figura 5.19 – Gel de SDS – PAGE 12 % corado com Comassie Blue G250. Tradução *in vitro* usando extratos proteicos de *T. cruzi* provenientes das cepas 4167 e CL-Brener. Em A, extrato bruto de CL-Brener; B, composto de tradução acelular com extrato de CL-Brener sem a presença de RNA sintético exógeno; C, composto de tradução acelular com extrato de CL-Brener e presença de RNA sintético, contendo GFP exógeno. O poço D contém extrato bruto de 4167; E, composto de tradução acelular com extrato de 4167 sem a presença de RNA sintético exógeno e F, composto de tradução acelular com extrato 4167 e presença de RNA sintético, contendo GFP exógeno.

Ademais do pGlow usado como molde para a síntese *in vitro*, outros plasmídeos contendo GFP foram usados nos ensaios de tradução acelular a fim de aprimorar o sistema e detectar as proteínas expressas no meio (Figura 5.20).

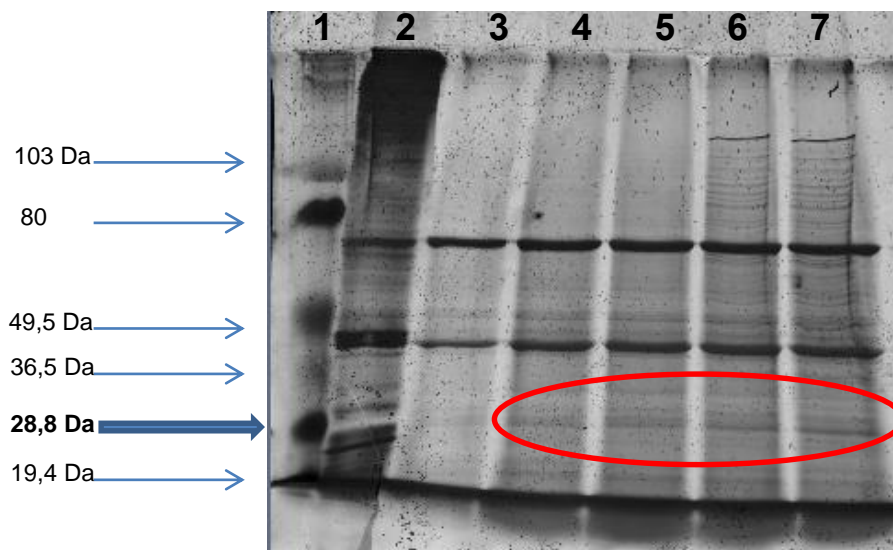


Figura 5.20 – Gel de poliacrilamida 12% para verificação da síntese *in vitro*. O poço 1 possui marcador de peso molecular (*Low Range*); 2, Extrato puro de CL-Brener; 3, composto de tradução sem RNA exógeno; 4, composto de tradução contendo 2 μ L de RNA sintético (pGlow – purificado com Trizol[®]); 5, composto de tradução contendo 4 μ L de RNA sintético (pGlow – purificado com Trizol[®]); 6, composto de tradução contendo 2 μ L de RNA sintético (pXG / GFP – purificado com LiCL) e o poço 7 composto de tradução contendo 4 μ L de RNA sintético (pXG / GFP – purificado com LiCL).

Com o intuito de averiguarmos a não eficiência do sistema de tradução, realizamos a síntese usando sistemas comerciais de gérmen de trigo e reticulócito de coelho. Em seguida, as amostras eram aplicadas em géis de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de *nylon* como mostra a Figura 5.21.

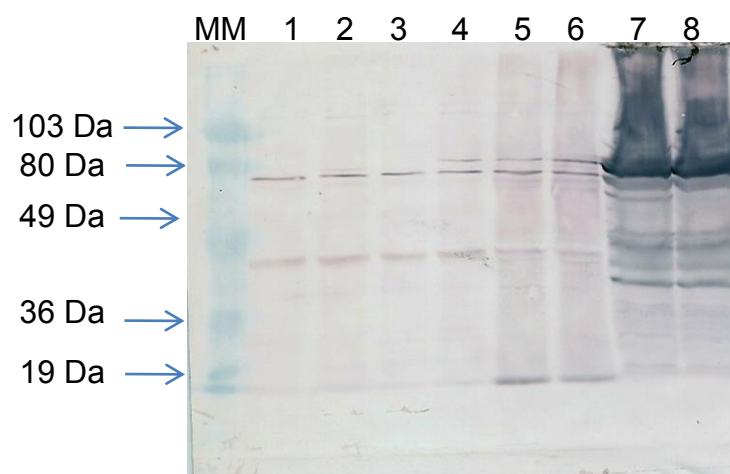


Figura 5.21 – Transferência em papel de *nylon*. Do poço 1 ao 6 o extrato usado junto ao composto de tradução foi o TcS12. Os poços 7 e 8 contêm o extrato comercial de gérmen de trigo. Os poços 1, 5 e 7 são os controles negativos da tradução: sem a presença de um mRNA exógeno; os demais poços apresentam mRNA sintetizado com pGlow (3, 6 e 8), pXG (poço 2) e pGem (poço 4). Nos poços 5 e 6 foram tratados com a enzima micrococcal nuclease para a eliminação dos mRNA endógenos. A coloração da membrana foi feita com o kit Transcend[®] (kit de revelação colorimétrico).

Embora os resultados obtidos não estivessem de acordo com o esperado, uma vez que o processo de tradução *in vitro* não respondeu prontamente a pergunta primordial desse trabalho, conseguimos otimizar a síntese de RNA linear para estudos posteriores visando o emprego da técnica referida.

5.8– Desenvolvimento de método para caracterização de cepas de *T. cruzi*

Inicialmente, um dos objetivos implícitos desse trabalho foi a elaboração de um extrato protéico acelular para a verificação da ocorrência de *trans-splicing* utilizando a própria maquinaria celular do *T. cruzi*. Como esse trabalho continha um viés de inovação metodológica, enviamos nossos resultados preliminares do extrato protéico para a GESTEC (Gestão Tecnológica da Fiocruz) objetivando um pedido de patente. No entanto, após alguns meses sob análise da GESTEC a resposta que obtivemos não foi satisfatória.

Dessa forma, resolvemos continuar nossos ensaios gerando os artigos anexados ao corpo dessa Tese. Além dos artigos em si, outra contribuição que esse trabalho gerou, foi uma nova abordagem metodológica facilmente exequível para as Coleções do Instituto Oswaldo Cruz, visto que poderia ser usado para tipagem das cepas de *T. cruzi* e, possivelmente também para as *Leishmanias*, certificando-se da identidade das cepas que estariam liberando aos usuários desses centros de referência. Com isso a técnica poderia ser empregada como um *fingerprinting* para cada cepa.

A Figura 5.18 mostra que cada cepa apresentou um perfil característico da distribuição de pesos moleculares e número de proteínas identificadas, estando bem definida a composição de proteínas expressas, tornando-se, portanto, um possível parâmetro de avaliação entre cepas, uma vez que estas poderiam ser classificadas de acordo com o seu perfil protéico. A Figura 5.19 evidencia a característica da

metodologia em identificar proteínas que são detectadas apenas em uma cepa, isto é, proteínas observadas exclusivamente em uma determinada cepa.

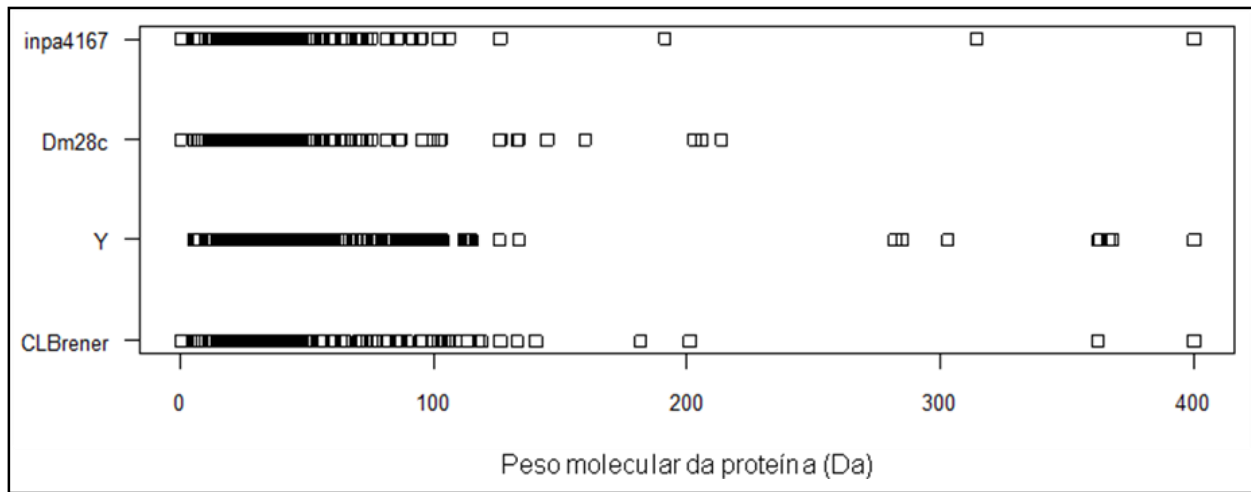


Figura 5.22 – Distribuição característica entre o peso molecular e o número de proteínas identificadas nas cepas de *T. cruzi* analisadas.

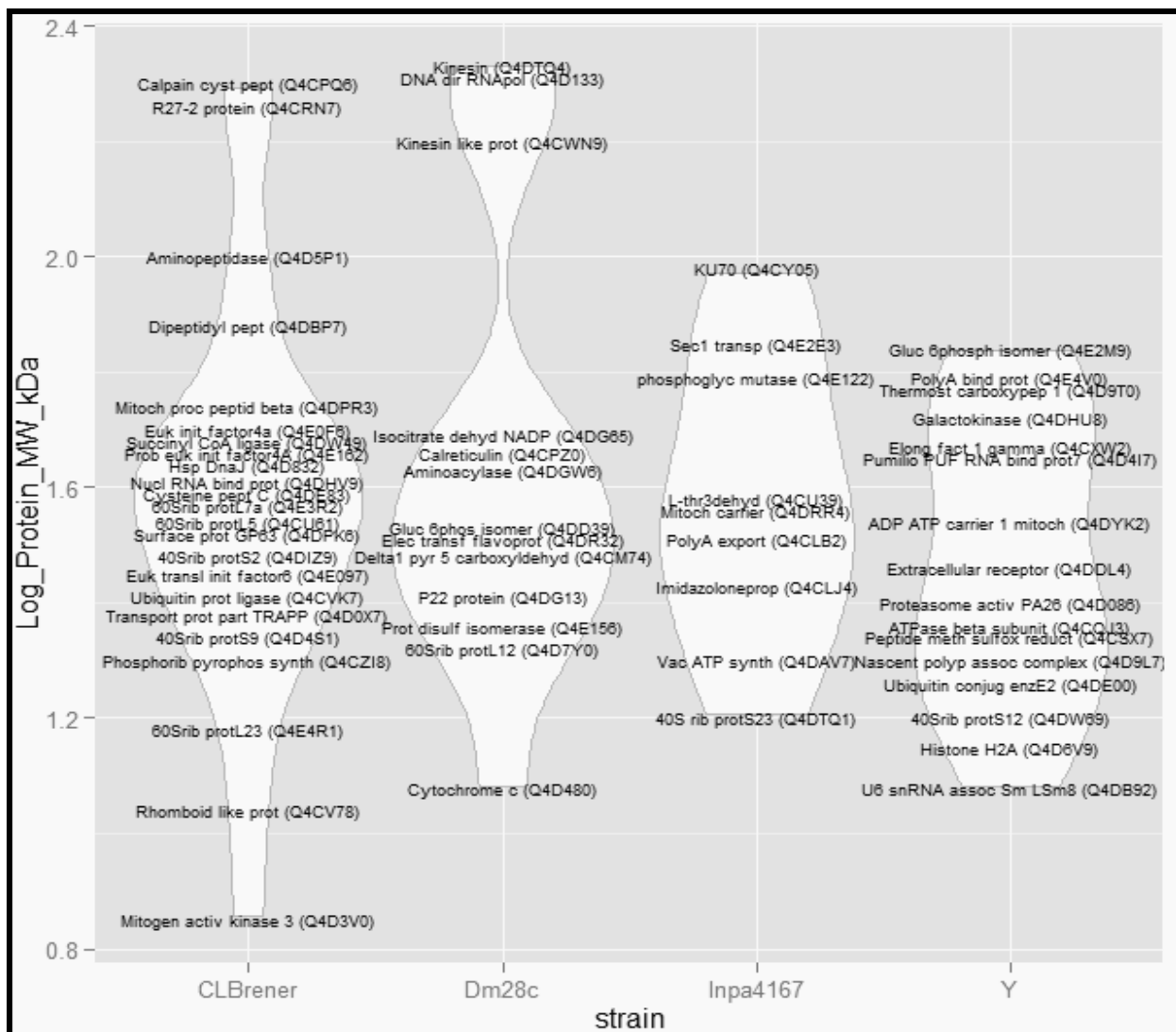


Figura 5.23 – Proteínas detectadas exclusivamente em cada cepa de *T. cruzi*. As proteínas foram agrupadas de acordo com o peso molecular, e a distribuição é visualizada no gráfico de violino. Número de acesso do UniProt estão indicados entre parênteses.

6. Discussão

Pelas suas características biológicas e moleculares, seu posicionamento na escala evolutiva dos eucariotos e, sobretudo, sua importância médica, o *T. cruzi* apresenta-se como um organismo que urge esforços para o mapeamento e elucidação do papel das UTR na atividade gênica, especialmente no que tange a regulação pós-transcricional. Logo, é de suma importância identificar e detalhar em quais segmentos adjacentes aos genes já identificados e anotados, as UTR estão localizadas, assim como sua caracterização referente a composição e tamanho.

Foi sob esse contexto que desenvolvemos o presente estudo e concentramos as análises nos genes de trans-sialidase (TS), devido a importância do papel desta proteína na invasão de células hospedeiras, além de ser uma das mais numerosas famílias multigênicas com cerca de 700 cópias (El-Sayed et al, 2005). A partir de informações previamente geradas sobre a localização e composição da 5'UTR do gene de TS em *T. cruzi*, investigamos experimentalmente um fenômeno típico dos organismos que efetuam a transcrição através do mecanismo de *trans-splicing*, ou seja, a existência de sítios múltiplos de *trans-splicing* gerando dois ou mais RNA mensageiros de um mesmo gene, os quais diferem por características particulares da 5'UTR. Isso pode resultar em uma maior diversidade ao organismo na atividade dos RNA mensageiros sem haver alteração na proteína codificada.

Neste trabalho, a partir das análises de seqüenciamento (Sanger) de vários genes de trans-sialidasas (e da região 5'UTR), foi possível mostrar a formação de grupos isolados para os dois estágios de *T. cruzi* em estudo: epimastigota e tripomastigota. Observamos que uma das seqüências referências (Tc00.1047053507085.30) era comum em ambos os estágios, apresentando o mesmo tamanho da 5'UTR; a diferença evidenciava-se na composição de nucleotídeos entre elas. A ocorrência de motivos específicos em cada um desses estágios pontuou particularidades não apenas relacionadas à forma evolutiva do parasito, mas, sobretudo, em relação as sequencias obtidas para um mesmo estágio. Talvez essas diferenças estejam em acordo com o processo observado na formação do *spliceossomo*, que por estar presente em todas as etapas de formação do mRNA

permite mudanças altamente dinâmicas, nas quais tanto o RNA quanto a composição de proteínas são alteradas (Gunzl, 2010).

O iniciador 5'UTRTCNA foi inicialmente usado para os ensaios envolvendo amplificação gênica por PCR, com o intuito de selecionar o maior número possível de cópias de TS. No entanto, após vários sequenciamentos – e provavelmente por limitações tecnológicas - verificamos que o número de cópias selecionadas foi apenas 16, entre as 450 cópias identificadas pelo sequenciamento do genoma. Se considerarmos os pseudogenes, esse número aumenta para mais de 800 cópias. Ao expandirmos as buscas dessas cópias de TS com o mesmo par de iniciadores, através de um aumento de clones selecionados e, por conseguinte, aumento de sequências obtidas, constatamos que além do número reduzido de cópias de TS, havia também inespecificidade. Outros genes estavam sendo selecionados, tais como os genes para carboxil – metil - transferase e proteínas glicosomais de membrana.

Modificamos, então, a estratégia experimental, e selecionamos outro iniciador para substituir o 5'UTRTCNA. Passamos a trabalhar com o 5'TcTS reverso, mantendo o iniciador para mini-exon (*forward*). Esse novo iniciador possui 11 nucleotídeos da ORF (*Open Reading Frame*) e seu emprego possibilitou a seleção de um número maior de cópias de TS de CL-Brener no estágio epimastigota. A cepa CL-Brener no estágio tripomastigota não encontra-se disponível na rotina de cultura de parasitos em nosso laboratório. Assim, não foi possível prosseguir com os ensaios empregando o iniciador 5'TcTS (reverso) para as formas tripomastigotas.

Mediante a formação dos blocos de TS selecionados, iniciamos o preparo do extrato proteico de *T. cruzi*, a fim de realizarmos a tradução acelular. Atualmente, há vários extratos disponíveis comercialmente, tais como o extrato de *E. coli*, reticulócito de coelho, gérmen de trigo e leveduras. No entanto, a possibilidade de se investigar os fenômenos acelulares usando um extrato de *T. cruzi* com o próprio conjunto de enzimas e proteínas do parasito, nos pareceu bastante instigante para um organismo repleto de peculiaridades. O extrato proteico que mais se aproxima filogeneticamente ao *T. cruzi*, tendo por finalidade a tradução, é o de *Leishmania tarentolae* presente nos estudos de Kovtun e colaboradores porém, não é comercializado (Kovtun et al, 2010).

Todavia, resolvemos desenvolver uma metodologia própria para produzir um extrato proteico a partir de células epimastigotas de CL-Brener visando gerar uma ferramenta capaz de elucidar questões relacionadas à expressão gênica em *T. cruzi*.

A primeira etapa foi a elaboração de um sistema de lise celular eficiente e que, ao mesmo tempo, mantivesse as estruturas celulares íntegras para que garantissem a tradução acelular, além de permitir a reprodutibilidade em ensaios futuros. Concebemos uma estratégia de lise celular baseada em metodologia previamente aplicada a *E. coli* (Kim et al, 2006). O extrato proteico a partir de *T. cruzi* foi, então, denominado TcS12. Inicialmente, as etapas de lise foram monitoradas subjetivamente por microscopia óptica.

Entretanto, para a comprovação da eficácia do sistema de lise e seu produto final, os dados foram submetidos a análise por citometria de fluxo. Os resultados provenientes de experimentos em triplicata comprovaram que ocorria lise em mais de 70% das células, evidenciando, assim, a solidez e reprodutibilidade da metodologia estabelecida.

A qualidade do extrato TcS12 em quatro cepas de *T. cruzi* de diferentes DTU (CL-Brener, Dm28c, 4167 e Y), foi demonstrada através dos ensaios por espectrometria de massas que permitiu a identificação e a quantificação de proteínas presentes no meio através da comparação de seus proteomas. Para tanto, usou-se a metodologia denominada MS^E – desenvolvida e patenteada pela Waters – que permite a quantificação relativa de proteínas por espectrometria de massas sem marcação isotópica de aminoácidos, ou seja, é uma técnica “label-free” (Zhu et al, 2010). Com esta nova abordagem, identificamos cerca de 1100 proteínas nas quatro cepas analisadas, distribuídas como proteínas de membrana, de organelas, nucleares e citosólicas.

A predição da localização subcelular ocorre devido ao fato de uma única proteína poder coexistir em duas ou mais localizações (estruturas) em uma célula. Além disso, algumas proteínas possuem características dinâmicas e são, portanto, capazes de se mover entre duas ou mais localizações subcelulares.

O estudo comparativo da expressão das proteínas das quatro cepas de *T. cruzi* revelou que algumas classes de proteínas, como as TS, estavam presentes em

quantidades reduzidas, com exceção da cepa Y. Observou-se um número reduzido - em média menor que três cópias de TS, além de outras proteínas de superfície de membrana – encontrado nas cepas CL-Brener, Dm28c e 4167, enquanto que mais de 100 TS foram identificadas na cepa Y. Isso poderia ser um artefato gerado durante a metodologia de lise celular e posterior preparo do extrato proteico, com a perda de material, provavelmente no precipitado de células. Em artigo publicado por Zhu e colaboradores, onde descrevem uma metodologia para o preparo de lisado de células de *T. cruzi* no estágio tripomastigota, os autores analisam juntamente, o sobrenadante e o *pellet*, identificando, portanto, 1.448 proteínas não redundantes, incluindo TS e mucinas (Zhu et al, 2010).

Esse resultado é bastante intrigante, pelo fato da cepa Y apresentar características metabólicas próximas a Dm28c. Deve-se salientar que esta diferença no padrão de distribuição das classes de proteínas não é algo espúrio resultante da metodologia de lise celular empregada nesse trabalho, pois como demonstrado anteriormente todas as etapas foram padronizadas e otimizadas. Esses perfis podem ser correlacionados com a característica intrínseca de cada cepa.

Optamos por repetir os experimentos de lise celular usando a nossa metodologia, e dessa vez, investigamos tanto o material proveniente do sobrenadante quanto do *pellet* de células epimastigotas da cepa CL-Brener, usada como referência de *T. cruzi*. O *pellet* resultante da lise celular foi ressuspenso e homogeneizado em 0,2 % do surfactante RapiGest™. Devido a composição do precipitado ser uma fração microssomal, constituída predominantemente por restos de membrana celular e organelas, contendo, portanto, proteínas hidrofóbicas, houve a necessidade de se aumentar a concentração final do surfactante para melhor solubilização.

A análise do sobrenadante (TcS12) identificou apenas uma única trans-sialidase, enquanto a mesma aplicada ao precipitado de células detectou quatro trans-sialidasas por LCMS/MS, entretanto de baixa confiabilidade estatística segundo o programa PLGS.

Esse resultado confirmou não só a reprodutibilidade da metodologia do sistema de lise celular estabelecido e da produção do extrato proteico desenvolvida nesse trabalho, como também descartou a hipótese de perda de material durante o

processamento da amostra. Além disso, foi demonstrado que a expressão da TS em epimastigotas da cepa CL-Brener foi provavelmente inferior ao que ocorre na cepa Y. Esses dados comprobatórios nos renderam uma publicação na revista **Analytical Biochemistry** e, posteriormente, a ilustração da capa da mesma (Silva Galdino et al, 2014).

Após a constatação da qualidade do extrato elaborado TcS12, ampliamos nossa abordagem através da espectrometria de massas (LCMS/MS) com o uso do extrato protéico (TcS12) de CL-Brener (selecionada por conter seu genoma anotado publicamente), objetivando a verificação da influência da região 5'UTR sobre a tradução de trans-sialidases, identificando-as e comparando-as junto aos bancos de dados de cDNA (ou RNA) construídos durante esse trabalho.

Após a realização dos ensaios pela espectrometria e a identificação de uma trans-sialidase no extrato proteico TcS12 de CL-Brener, buscamos, por alinhamento de sequências e rastreamento do número de acesso no *genbank*, a sequência correspondente em nossos arquivos de cDNAs. Em seguida, identificamos a região 5'UTR da sequência, o que nos permitiu mapear os sítios de *trans-splicing*.

As referências encontradas para os cDNAs, tanto de epimastigotas quanto tripomastigotas, apresentaram os mesmos tamanhos de 5'UTR, com 90 a 95% de identidade de nucleotídeos. Embora fosse esperado 100% de identidade, e desconsiderando-se erros de sequenciamento ou mesmo amplificação, podemos inferir que, no caso descrito acima, há a possibilidade de existência de duas isoformas de trans-sialidase no genoma, sendo que uma difere da outra pela variação da localização do ATG. Vale à pena ressaltar que esse resultado refere-se apenas a um grupo de trans-sialidase; uma vez que o número de cópias dessa família é bastante abrangente (com mais de 450 cópias), o potencial para isoformas diferenciadas torna-se grande. Os resultados ainda apontaram que embora o tamanho da região 5'UTR não seja determinante, há motivos, como as regiões ricas em CA, ou GA, que contribuiriam, de alguma forma, para a expressão diferenciada entre os estágios epimastigota e tripomastigota, bem como as diferenças apresentadas dentro do próprio estágio. Interessantemente, a quantidade de mRNA detectado tanto pela abordagem por Sanger (167 cópias para o estágio epimastigota) quanto pelo 454 Junior (cerca de 300

cópias transcritas no estágio epimastigota) foi superior a quantidade de TS traduzidas e identificadas no extrato TcS12 de CL-Brener, o que nos leva a conjecturar que, ou grande parte dos mRNA não são traduzidos, ou são traduzidos e degradados rapidamente.

Em estudos prévios, Pasion e colaboradores (Pasion et al, 1996) evidenciaram que, frequentemente, os genes de tripanossomatídeos possuem múltiplos sítios aceptores de *trans-splicing* para o mini-exon nas moléculas precursoras de mRNA maduro. A extensão da região 5'UTR dependerá da escolha do sítio aceptor de *trans-splicing* a ser usado. Deleções que removam um sítio aceptor podem forçar a utilização de um sítio alternativo, afetando, dessa forma, o tamanho e a sequência da 5'UTR.

Através de experimentos com o gene da topoisomerase na região 5'UTR, comprovou-se a regulação negativa das moléculas de mRNA, destacando que a perda de determinados elementos localizados na 5'UTR resultaria em aumento na expressão dos transcritos para esse gene, e, concomitantemente, na sua redução ao nível do ciclo celular. Ou seja, a perda de certos elementos que poderiam reprimir sítios de *trans-splicing* no transcrito, levariam ao acúmulo de mRNA maduro em determinadas fases do ciclo celular (Pasion et al, 1996).

Os estudos de Vogel e Marcotte (Vogel & Marcotte, 2012) mostraram que proteínas envolvidas na organização da cromatina e regulação transcricional tendem a ser rapidamente degradadas. A regulação em proteínas abundantes espelha, portanto, funções biológicas específicas, ou seja, proteínas regulatórias podem ser produzidas e degradadas muito rapidamente ao reagirem aos estímulos, enquanto as proteínas estruturais e constitutivas (*housekeepings*) podem ter uma meia-vida mais longa. Além disso, a regulação dos transcritos abundantes poderia atuar como sistema controlador “liga” e “desliga” de acordo com o gene e definindo a quantidade de proteína a ser liberada (Vogel & Marcotte, 2012).

Contudo, a baixa expressão de proteínas de superfície na maioria das formas de epimastigotas detectadas em nossos estudos, está em acordo com o trabalho proteômico publicado previamente por Queiroz e colaboradores (Queiroz et al, 2013). Essa classe de proteínas está relacionada com mecanismos de invasão celular em tripomastigota, e em epimastigotas desempenha o papel de adesão do protozoário nas

paredes do tubo digestivo do redúvdeo. No trabalho de Atwood (Atwood et al, 2005) há relato de identificação para poucas trans-sialidases em tripomastigotas e nenhuma mucina ou MASP, ou mesmo trans-sialidase em epimastigotas. Esses trabalhos usaram metodologias distintas de preparação de extrato proteico, sendo que pelo método proposto em nosso estudo, com o uso de células de epimastigotas, detectamos a presença de proteínas de superfície de membrana, como gp63, que foi detectada apenas em CL-Brener e TS encontrada especialmente na cepa Y, ratificando, assim, a eficiência e a sensibilidade da metodologia.

Dentre as classes de proteínas descritas nas tabelas de expressão apresentadas nos resultados, retrotransposons são especialmente expressos em CL-Brener. Os retrotransposons foram caracterizados como família multigênica em *T. brucei*, e sequências repetidas, homólogas, foram encontradas como sequências de proteínas codificantes em *T. cruzi* (Bringaud et al, 2002). Em nossos estudos, os retrotransposons foram observados em baixos níveis de expressão em 4167 e Dm28c em relação a CL-Brener, enquanto que em Y estavam ausentes. Esses achados sugerem que sob a forma epimastigota, esses elementos móveis poderiam não estar ativos em Y. Vale a pena ressaltar que alguns tipos de elementos móveis tem sido relacionados como espécie específicos ou restritos a algumas espécies relacionadas, tais como *Leishmania major* e *Leishmania donovani* (Souza et al, 2007).

No entanto, tal comportamento entre as cepas se modifica quando se compara os níveis de expressão entre as proteínas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos, carboidratos e lipídeos. Sabe-se que as formas replicativas de *T. cruzi* usam, preferencialmente, o carbono como fonte de energia oriundo da glicose e dos aminoácidos (Barrett et al, 2012). As cepas Dm28c, Y e CL-Brener apresentaram um número similar de proteínas únicas (Tabelas 4.2 – 4.4). Não obstante, os níveis de expressão dessa classe de proteínas foram aumentados em 4167, comparada a CL-Brener. Isto poderia ser um reflexo da grande atividade replicativa da cepa 4167 (ou ao seu comportamento durante o crescimento), demonstrado em cultura axênica de 4167 quando comparada com a CL-Brener.

Essas distinções observadas no perfil proteômico quantitativo de cada cepa fornecem informações que poderiam ser usadas como uma “impressão digital” de expressão proteica, e, portanto, uma ferramenta complementar no auxílio da caracterização fenotípica das cepas de *T. cruzi*.

Algumas análises pelos marcadores moleculares e bioquímicos atuais podem não classificar conclusivamente o grupo o qual a cepa pertença. Sendo assim, uma das contribuições do nosso estudo foi conceber uma metodologia simples, de fácil execução e reprodutível que poderia ser rotineiramente empregada nos laboratórios das Coleções do Instituto Oswaldo Cruz visando, em casos de dúvidas técnicas, a certificação da cepa em manipulação.

Uma das vantagens da abordagem metodológica apresentada aqui é a execução de um protocolo com etapas simplificadas e baixo custo relativo dos equipamentos usados durante o preparo do extrato TcS12, evitando-se ultra centrífugas ou *probe ultrasonicator*. Além disso, as soluções e detergente utilizados no preparo da amostra são compatíveis com a análise por LCMS, e não interferem na qualidade dos resultados.

Metodologias combinadas à espectrometria de massas já são extensivamente usadas para se classificar microrganismos e bactérias (van Veen et al, 2010; Freiwald & Sauer, 2009), porém ainda não há descrições publicadas referentes a tripanossomatídeos.

Vale ressaltar que a abordagem metodológica desenvolvida neste trabalho de tese foi submetida a processo de patente. A primeira etapa culminou no envio de um direcionamento de estudo ao NIT-IOC (Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Oswaldo Cruz) intitulado de: *Método de Lise de Células de Trypanosoma cruzi para geração de extrato com atividade de síntese proteica*. Houve uma avaliação prévia da proposta antes de sua submissão para a segunda etapa: reuniões na GESTEC e posterior pesquisa do tema a fim de se averiguar a novidade de invenção e impacto sobre o tema proposto. A resposta dessa pesquisa não foi conclusiva a ponto de prosseguirmos com os esforços em busca da patente. Relataram-nos da existência de muitos métodos de lise disponíveis e já publicados, embora não fossem iguais ao que

estávamos propondo. Não nos foi dada muita certeza sobre o interesse da instituição no prosseguimento do pedido de patente.

A partir de então, resolvemos continuar nossos ensaios experimentais baseados na abordagem metodológica desenvolvida, adequando-a para publicações pertinentes a essa área. Cogitou-se a possibilidade do emprego efetivo da técnica, não apenas para os laboratórios de pesquisa, mas principalmente para ser empregada nos laboratórios de Coleções, onde a necessidade de certificação das cepas é essencial tanto pela alta demanda externa como pela rotina de manipulação das mesmas.

Além disso, acreditamos que a metodologia proposta neste trabalho possibilitará a continuidade de estudos futuros de tradução acelular, proporcionando uma análise mais abrangente dos ensaios relacionados a expressão gênica de *T. cruzi* usando a própria maquinaria do organismo.

O estudo do perfil proteômico por espectrometria de massas possibilitaria uma alternativa viável na certificação de cepas e isolados de *T. cruzi*. Para tanto, poderemos estabelecer protocolos para determinação de características específicas de cada cepa. Por exemplo, a presença dominante de trans-sialidase detectada na cepa Y, poderia ser adotada como característica única para tipagem de cepas.

Assim, como desdobramento imediato deste trabalho, será apresentado às coleções do IOC, a possibilidade do emprego da metodologia desenvolvida para a tipagem celular dos tripanossomatídeos, usando-a como uma ferramenta de identificação para auxiliar na certificação das cepas. Além das duas publicações geradas como produtos diretos desse trabalho, a primeira aceita na revista *Analytical Biochemistry* e a segunda em processo de análise na *Experimental Parasitology*, outro manuscrito será elaborado com as informações obtidas pelos alinhamentos (Sanger e 454 Junior), tornando esses resultados públicos.

7. Conclusões

- ✓ A análise do extrato TcS12 por espectrometria de massa mostrou que as cepas de *T. cruzi* envolvidas nesse estudo apresentam perfis proteicos diferenciados.
- ✓ Observou-se que a quantidade de trans-sialidase detectada no extrato proteico da cepa Y foi elevada em relação as demais; esse fato talvez esteja relacionado com a maior capacidade de colonização dessa cepa no intestino do hospedeiro invertebrado.
- ✓ O tamanho da região 5'UTR provavelmente não interfere sobre a tradução de trans-sialidasas. Contudo, a presença de determinados blocos composicionais de nucleotídeos presentes nessas regiões parece exercer influência na tradução.
- ✓ O número de cópias de mRNA correspondente a trans-sialidasas foi superior ao número de proteínas detectadas no extrato TcS12. Sugerindo, portanto, que há algum mecanismo de regulação da síntese dessas proteínas, ou então, há um processo de “*turnover*” de trans-sialidasas.
- ✓ A não observação de síntese proteica do gene repórter no extrato acelular, possivelmente foi devida a uma limitação técnica inicial referente a qualidade insuficiente do mRNA produzido *in vitro*.

8. Perspectivas

- ✓ Aplicação da metodologia desenvolvida neste estudo para identificação de outras cepas de *T. cruzi*. Pretende-se promover encontros com os responsáveis pelas coleções oficiais de tripanossomatídeos do IOC sobre a possibilidade de transferência de tecnologia visando contribuição institucional efetiva.
- ✓ Aprimoramento da técnica de síntese acelular visando a tradução *in vitro* de proteínas a partir do extrato elaborado, TcS12, com o intuito de elucidar os mecanismos intrínsecos relacionados com a 5' UTR.
- ✓ Aprofundar os estudos de caracterização dos genes de trans-sialidases com a cepa Y.

9. Bibliografia

Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**: 198-207

Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF, Bourguignon SC, de Souza W, Azambuja P, Gonzalez MS (2007) Trypanosoma cruzi: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of Rhodnius prolixus. *Experimental parasitology* **116**: 44-52

Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferriolli Filho F, Luquetti AO (1992) Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **86**: 624-626

Araujo PR, Teixeira SM (2011) Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in Trypanosoma cruzi: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**: 257-266

Atwood JA, 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL (2005) The Trypanosoma cruzi proteome. *Science* **309**: 473-476

Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* **69**: 3613-3634

Barretto MP (1964) [Reservoirs of Trypanosoma cruzi in the Americas]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* **16**: 527-552

Brandao A (2006) The untranslated regions of genes from Trypanosoma cruzi: perspectives for functional characterization of strains and isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101**: 775-777

Brandao A, Jiang T (2009) The composition of untranslated regions in Trypanosoma cruzi genes. *Parasitol Int* **58**: 215-219

Brandao A, Samudio F, Fernandes O, Calzada JE, Sousa OE (2008) Genotyping of Panamanian Trypanosoma cruzi stocks using the calmodulin 3'UTR polymorphisms. *Parasitol Res* **102**: 523-526

Braz LM, Amato Neto V, Okay TS (2008) Reactivation of Trypanosoma cruzi infection in immunosuppressed patients: contributions for the laboratorial diagnosis standardization. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **50**: 65-66

Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, Hartung R, Muller A, Contreras R, Beverley SM, Alexandrov K (2002) Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr Purif* **25**: 209-218

Briones MR, Egima CM, Schenkman S (1995) Trypanosoma cruzi trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms. *Mol Biochem Parasitol* **70**: 9-17

Bringaud F, Biteau N, Melville SE, Hez S, El-Sayed NM, Leech V, Berriman M, Hall N, Donelson JE, Baltz T (2002) A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with polymorphic subtelomeric regions of Trypanosoma brucei. *Eukaryotic cell* **1**: 137-151

Burleigh BA (2005) Host cell signaling and Trypanosoma cruzi invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci STKE* **2005**: pe36

Carvalho ST, Sola-Penna M, Oliveira IA, Pita S, Goncalves AS, Neves BC, Sousa FR, Freire-de-Lima L, Kurogochi M, Hinou H, Nishimura S, Mendonca-Previato L, Previato JO, Todeschini AR (2010) A new class of mechanism-based inhibitors for Trypanosoma cruzi trans-sialidase and their influence on parasite virulence. *Glycobiology* **20**: 1034-1045

Castro DP, Seabra SH, Garcia ES, de Souza W, Azambuja P (2007) Trypanosoma cruzi: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by Serratia marcescens. *Experimental parasitology* **117**: 201-207

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

Chagas C (1909) Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1**: 159 - 218

Chaves LB, Briones MR, Schenkman S (1993) Trans-sialidase from Trypanosoma cruzi epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **61**: 97-106

Colli W (1993) Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan Trypanosoma cruzi. *FASEB J* **7**: 1257-1264

Colli W, Alves MJ (1999) Relevant glycoconjugates on the surface of Trypanosoma cruzi. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**: 37-49

Coura JR (2009) Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**: 549-554

Coura JR, Dias JC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**: 31-40

Coura JRea (2007) Uma visão sistêmica da endemia chagásica. *Org Panam Salud y Fundación Mundo Sano, Buenos Aires*,: 23-35

Cribb P, Esteban L, Trochine A, Girardini J, Serra E (2010) Trypanosoma cruzi TBP shows preference for C/G-rich DNA sequences in vitro. *Experimental parasitology* **124**: 346-349

Cribb P, Serra E (2009) One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the Trypanosoma cruzi spliced leader RNA gene promoter binding complex. *Int J Parasitol* **39**: 525-532

Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Zhang MQ (2000) CART classification of human 5' UTR sequences. *Genome Res* **10**: 1807-1816

da Silva BA, Sodre CL, Souza-Goncalves AL, Aor AC, Kneipp LF, Fonseca BB, Rozental S, Romanos MT, Sola-Penna M, Perales J, Kalume DE, dos Santos AL (2012) Proteomic analysis of the secretions of Pseudallescheria boydii, a human fungal pathogen with unknown genome. *Journal of proteome research* **11**: 172-188

Dc-Rubin SS, Schenkman S (2012) T rypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. *Cell Microbiol* **14**: 1522-1530

De Gaudenzi JG, D'Orso I, Frasch AC (2003) RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in Trypanosoma cruzi form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *The Journal of biological chemistry* **278**: 18884-18894

de Souza W (2008) An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* **14**: 822-838

de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES (2010) Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology* **2010**

Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G (1956) Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* **14**: 1035-1060

Dias J (1984) Acute Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **79**: 85-91

Dias JCP (1995) Natural history of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* **65**: 359 - 366

Dias JCPC, J.R (1997) *Epidemiologia. Clínica e terapêutica da doença de Chagas*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro: 33-66

Dvorak JA (1984) The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biochem* **24**: 357-371

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

Erdmann H, Steeg C, Koch-Nolte F, Fleischer B, Jacobs T (2009) Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cell Microbiol* **11**: 1600-1611

Frasch AC (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* **16**: 282-286

Freitas LM, dos Santos SL, Rodrigues-Luiz GF, Mendes TA, Rodrigues TS, Gazzinelli RT, Teixeira SM, Fujiwara RT, Bartholomeu DC (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PloS one* **6**: e25914

Freiwald A, Sauer S (2009) Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc* **4**: 732-742

Fritsche C, Sitz M, Wolf M, Pohl HD (2008) Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. *J Basic Microbiol* **48**: 488-495

Garcia ES, Azambuja P (1991) Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* **7**: 240-244

Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P (2007) Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol* **53**: 11-21

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ (2010) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* **115**: 22-27

Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, Dorschel CA, Li GZ, Gorenstein MV, Bateman RH, Langridge JI (2009) The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* **9**: 1683-1695

Giorgi ME, de Lederkremer RM (2011) Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydr Res* **346**: 1389-1393

Gunzl A (2010) The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? *Eukaryotic cell* **9**: 1159-1170

Kovtun O, Mureev S, Johnston W, Alexandrov K (2010) Towards the construction of expressed proteomes using a *Leishmania tarentolae* based cell-free expression system. *PLoS One* **5**: e14388

McIntosh AB, Hudan S, Metelko CJ, de Souza RT, Charity RJ, Sobotka LG, Lynch WG, Tsang MB (2007) Tidal effects and the proximity decay of nuclei. *Phys Rev Lett* **99**: 132701

He M, Wang MW (2007) Arraying proteins by cell-free synthesis. *Biomol Eng* **24**: 375-380

Henriksson J, Aslund L, Macina RA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ, Frasch AC, Pettersson U (1990) Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **42**: 213-223

Hotez PJ, Molyneux DH, Stillwaggon E, Bentwich Z, Kumaresan J (2006) Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. *Lancet* **368**: 1865-1866

Joiner K, Sher A, Gaither T, Hammer C (1986) Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6593-6597

Kang SH, Oh TJ, Kim RG, Kang TJ, Hwang SH, Lee EY, Choi CY (2000) An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. *J Microbiol Methods* **43**: 91-96

Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**: 2299-2301

Katzen F, Chang G, Kudlicki W (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* **23**: 150-156

Kim TW, Keum JW, Oh IS, Choi CY, Park CG, Kim DM (2006) Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *J Biotechnol* **126**: 554-561

Kochetov AV, Ischenko IV, Vorobiev DG, Kel AE, Babenko VN, Kisselev LL, Kolchanov NA (1998) Eukaryotic mRNAs encoding abundant and scarce proteins are statistically dissimilar in many structural features. *FEBS Lett* **440**: 351-355

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* **9**: 299-306

Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorenstein MV, Geromanos SJ (2009) Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* **9**: 1696-1719

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic cell* **2**: 830-840

Liang XH, Hury A, Hoze E, Uliel S, Myslyuk I, Apatoff A, Unger R, Michaeli S (2007) Genome-wide analysis of C/D and H/ACA-like small nucleolar RNAs in *Leishmania major* indicates conservation among trypanosomatids in the repertoire and in their rRNA targets. *Eukaryotic cell* **6**: 361-377

Liang XH, Liu Q, Liu L, Tschudi C, Michaeli S (2006) Analysis of spliceosomal complexes in *Trypanosoma brucei* and silencing of two splicing factors Prp31 and Prp43. *Mol Biochem Parasitol* **145**: 29-39

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD (2004) *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **99**: 1-12

Macina RA, Affranchino JL, Pollevick GD, Jazin EE, Frasch AC (1989) Variable number of repeat units in genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *FEBS Lett* **257**: 365-368

Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano MA, Juliano L, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *The Journal of biological chemistry* **276**: 19382-19389

Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* **11**: 1291-1299

Monnerat S, Martinez-Calvillo S, Worthey E, Myler PJ, Stuart KD, Fasel N (2004) Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **134**: 233-243

Murad A, Souza G, Garcia J, Rech E (2011) Characterisation and quantitation expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nanoUPLC mass spectrometry. *Protocol Exchange* **1**: 1

Mureev S, Kovtun O, Nguyen UT, Alexandrov K (2009) Species-independent translational leaders facilitate cell-free expression. *Nat Biotechnol* **27**: 747-752

Nakano H, Yamane T (1998) Cell-free protein synthesis systems. *Biotechnol Adv* **16**: 367-384

Neres J, Bryce RA, Douglas KT (2008) Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. *Drug Discov Today* **13**: 110-117

Niculae A, Bayer P, Cirstea I, Bergbrede T, Pietrucha R, Gruen M, Breitling R, Alexandrov K (2006) Isotopic labeling of recombinant proteins expressed in the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr Purif* **48**: 167-172

Ohuchi S, Nakano H, Yamane T (1998) In vitro method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation. *Nucleic Acids Res* **26**: 4339-4346

Oppezzo P, Obal G, Baraibar MA, Pritsch O, Alzari PM, Buschiazzi A (2011) Crystal structure of an enzymatically inactive trans-sialidase-like lectin from *Trypanosoma cruzi*: the carbohydrate binding mechanism involves residual sialidase activity. *Biochim Biophys Acta* **1814**: 1154-1161

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

Pereira ME, Mejia JS, Ortega-Barria E, Matzilevich D, Prioli RP (1991) The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. *J Exp Med* **174**: 179-191

Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* **276**: 73-81

Pinto AY, Ferreira AG, Jr., Valente Vda C, Harada GS, Valente SA (2009) Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica* **25**: 77-83

Pollevick GD, Di Noia JM, Salto ML, Lima C, Leguizamon MS, de Lederkremer RM, Frasch AC (2000) Trypanosoma cruzi surface mucins with exposed variant epitopes. *The Journal of biological chemistry* **275**: 27671-27680

Pratt JM (1984) *Transcription and Translation*, Vol. 179.

Previato JO, Andrade AF, Pessolani MC, Mendonca-Previato L (1985) Incorporation of sialic acid into Trypanosoma cruzi macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol Biochem Parasitol* **16**: 85-96

Queiroz RM, Charneau S, Motta FN, Santana JM, Roepstorff P, Ricart CA (2013) Comprehensive proteomic analysis of Trypanosoma cruzi epimastigote cell surface proteins by two complementary methods. *Journal of proteome research* **12**: 3255-3263

Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA (2010) Chagas disease. *Lancet* **375**: 1388-1402

Revollo S, Oury B, Laurent JP, Barnabe C, Quesney V, Carriere V, Noel S, Tibayrenc M (1998) Trypanosoma cruzi: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Experimental parasitology* **89**: 30-39

Ribeirao M, Pereira-Chioccola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM (2000) Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase. *Parasite Immunol* **22**: 49-53

Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S (2006) Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol* **8**: 1888-1898

Rungpragayphan S, Nakano H, Yamane T (2003) PCR-linked in vitro expression: a novel system for high-throughput construction and screening of protein libraries. *FEBS Lett* **540**: 147-150

Santos Lda S, Torres RM, Machado-de-Assis GF, Bahia MT, Martins HR, Teixeira-Carvalho A, Coelho-Dos-Reis JG, Albajar-Vinas P, Martins-Filho OA, Lana M (2012) In-house ELISA method to analyze anti-Trypanosoma cruzi IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc Bras Med Trop* **45**: 35-44

Schenkman S, Eichinger D (1993) Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today* **9**: 218-222

Schenkman S, Eichinger D, Pereira ME, Nussenzweig V (1994) Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol* **48**: 499-523

Schilling B, Rardin MJ, MacLean BX, Zawadzka AM, Frewen BE, Cusack MP, Sorensen DJ, Bereman MS, Jing E, Wu CC, Verdin E, Kahn CR, Maccoss MJ, Gibson BW (2012) Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**: 202-214

Schmunis GA (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**: 75-85

Silva JC, Denny R, Dorschel C, Gorenstein MV, Li GZ, Richardson K, Wall D, Geromanos SJ (2006a) Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the Escherichia coli proteome: a sweet tale. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**: 589-607

Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, McKenna T, Nold MJ, Richardson K, Young P, Geromanos S (2005) Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem* **77**: 2187-2200

Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ (2006b) Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**: 144-156

Silva Galdino T, Menna-Barreto RF, Britto C, Samudio F, Brandao A, Kalume DE (2014) Cell disruption using a different methodology for proteomics analysis of Trypanosoma cruzi strains. *Anal Biochem* **448**: 1-8

Souza RT, Santos MR, Lima FM, El-Sayed NM, Myler PJ, Ruiz JC, da Silveira JF (2007) New Trypanosoma cruzi repeated element that shows site specificity for insertion. *Eukaryot Cell* **6**: 1228-1238

Teixeira SM, daRocha WD (2003) Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* **2**: 148-158

Torizawa T, Shimizu M, Taoka M, Miyano H, Kainosho M (2004) Efficient production of isotopically labeled proteins by cell-free synthesis: a practical protocol. *J Biomol NMR* **30**: 311-325

Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamon MS, Campetella O (2005) The trans-sialidase from Trypanosoma cruzi induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun* **73**: 201-207

van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ (2010) High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* **48**: 900-907

Verdun RE, Di Paolo N, Urmenyi TP, Rondinelli E, Frasch AC, Sanchez DO (1998) Gene discovery through expressed sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **66**: 5393-5398

Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **13**: 227-232

Warren LG (1960) Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J Parasitol* **46**: 529-539

Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL (2009) Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics* **10**: 255

WHO (2002) WHO/CONRAD technical consultation on nonoxynol-9, World Health Organization, Geneva, 9-10 October 2001: summary report. *Reprod Health Matters* **10**: 175-181

Yoshida N (1983) Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **40**: 836-839

Yoshida N (2009) Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**: 101-107

Zamecnik PC, Keller EB (1954) Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins. *The Journal of biological chemistry* **209**: 337-354

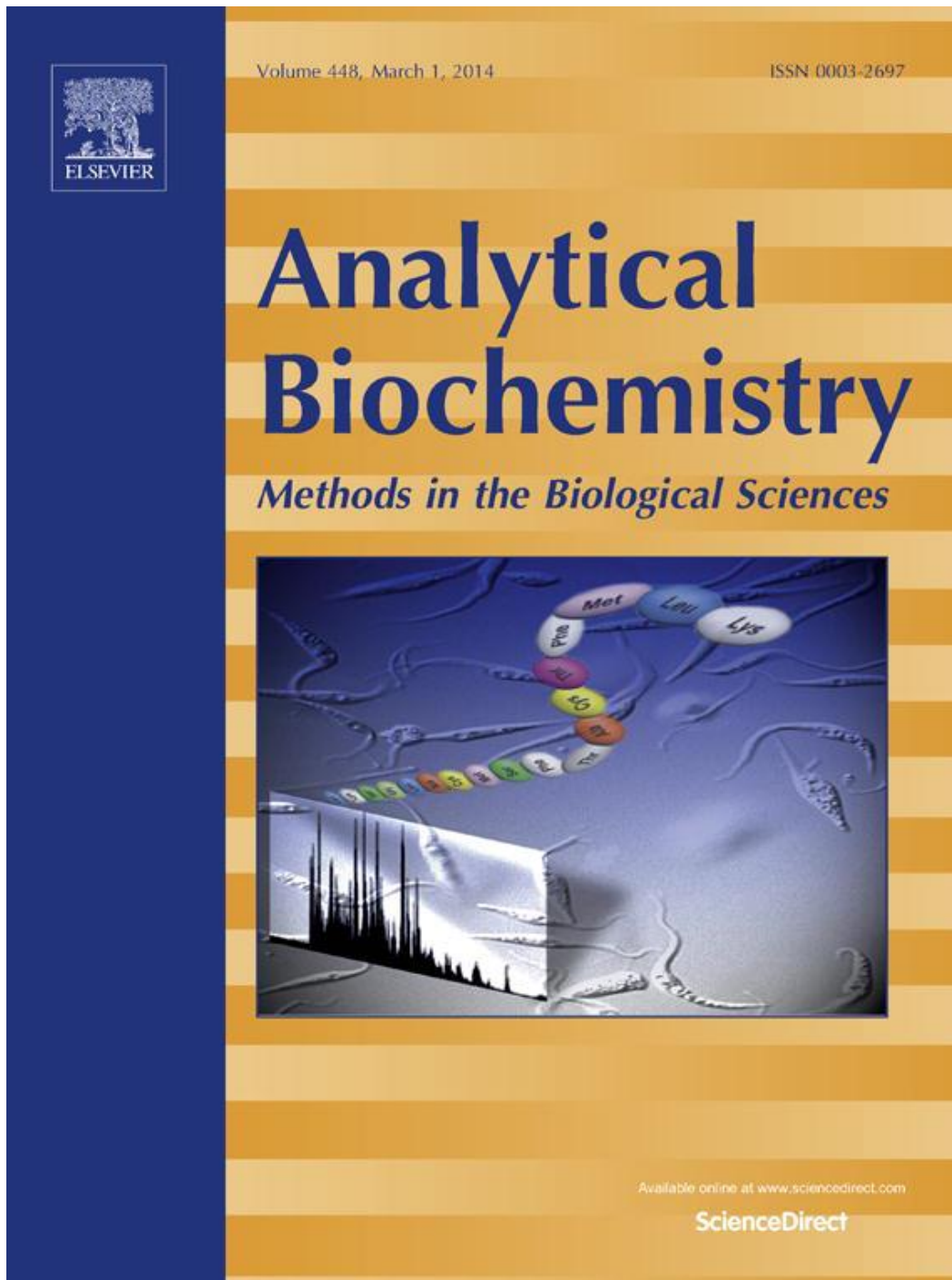
Zingales B, Carniol C, de Lederkremer RM, Colli W (1987) Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **26**: 135-144

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* **12**: 240-253

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR (1999) Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**: 159-164

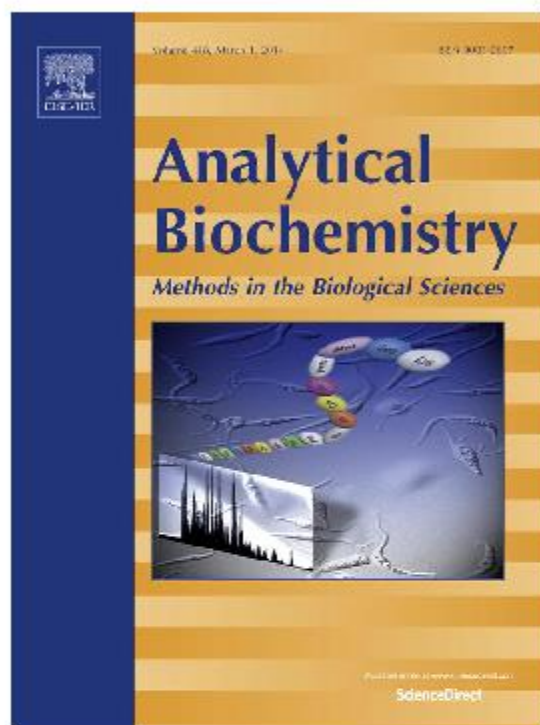
Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG (2009) A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**: 1051-1054

Zhu W, Smith JW, Huang CM (2010) Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**: 840518



Os editores selecionaram entre vários *autores* a ilustração referente ao artigo para ser estampada na capa da edição de março da Revista Analytical Biochemistry 448 (2014).

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Cell disruption using a different methodology for proteomics analysis of *Trypanosoma cruzi* strains



Tainah Silva Galdino^a, Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto^b, Constança Britto^c, Franklyn Samudio^{a,d}, Adeilton Brandão^a, Dário Eluan Kalume^{a,*}

^a Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 21040-360 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 21040-360 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 21040-360 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Laboratório de Parasitologia, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudos de Saúde (ICGEG), 0816-02593, Panama

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2013

Received in revised form 28 October 2013

Accepted 7 November 2013

Available online 27 November 2013

Keywords:

Hypotonic lysis buffer

Water bath sonication

Mass spectrometry

Trypanosoma cruzi

Flow cytometry

Proteomics

ABSTRACT

We have developed a cell disruption method to produce a protein extract using *Trypanosoma cruzi* cells based on a straightforward hypotonic lysis protocol. The procedure consists of three steps: incubation of the cells in a hypotonic lysis buffer, sonication in a water bath, and centrifugation. The final protein extract was designated TcSI 2. The stages of cell disruption at different incubation times were monitored by differential interference contrast microscopy. After 30 min of incubation in lysis buffer at 4 °C, the *T. cruzi* epimastigote forms changed from slender to round-shaped parasites. Nevertheless, cell disruption took place following sonication of the sample for 30 min. The efficiency of the methodology was also validated by flow cytometry, which resulted in 72% of propidium iodide (PI)-labeled cells. To estimate the protein extraction yield and the differential protein expression, the proteomics profile of four *T. cruzi* strains (CL-Brener, Dm28c, Y, and 4167) were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMS/MS) on a SYNAPT HDMS system using the label-free MS² approach. ProteinLynx Global Server (version 2.5) with Expression[®] analysis identified a total of 1153 proteins and revealed 428 differentially expressed proteins among the strains. Gene ontology analysis showed that not only cytosolic proteins but also nuclear and organellar ones were present in the extract.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease infecting 16 to 18 million people distributed around the world (<http://www.who.org>). The parasite presents a complex life cycle involving vertebrate reservoirs and invertebrate hosts [1].

To elucidate the mechanisms responsible for the development of Chagas disease, further studies on *T. cruzi* protein expression level are necessary. Several types and procedures of protein extraction have been developed to obtain the most efficient yield for a specific group of proteins, a cell lysate, tissue homogenization, a subcellular organelle, or even a whole organism.

Currently, the majority of protocols to carry out protein extraction to investigate mammalian or plant cells, tissues, bacteria, fungi, and especially (in this study) the protozoan parasite *T. cruzi* basically involve two categories: physical and chemical disruption methods [2]. Sample preparation methodologies such as liquid homogenization are one of the most widely used in small volumes and cell cultures. The cell suspension is poured into a glass cylinder and is disrupted by motorized or manual force using a plunger through a narrow space under high pressure [3]. On the other

hand, physical methods such as disruption using ultrasonic vibration can be an option to lyse a cell suspension or toward a cell wall-containing organism. High-frequency sound waves are formed by a vibrating probe immersed in the cell suspension or in lysis buffer, generating mechanical energy. By its turn, it produces bubbles that implode and cause vibration between sample molecules, leading to disruption of the cells [4]. Strategies involving two or more cell disruption methodologies are often combined with sonication-based techniques. Although it is very effective for disrupting mammalian tissues, prokaryotes, and even yeast cells, high-frequency sound causes excessive heating and protein degradation may occur. Mild disruption protocols that involve freeze-thaw cycles can be an alternative. They involve freezing cell suspension in liquid nitrogen, followed by thawing the sample at higher or room temperatures [5].

Another type of association of methodologies employed to fragment the cell wall, in general, is the manual grinding of the frozen tissue in liquid nitrogen using a mortar and pestle combined with the use of hypotonic buffer and glass beads. However, this consists of excessive sample manipulation and can lead to low yields of protein extracted and even contamination [2].

* Corresponding author. Fax: +55 21 2562 1432.

E-mail address: kalume@ioc.fiocruz.br (D.E. Kalume).

The detergent-based method has become a favorite procedure and is an easier alternative to physical disruption because it has a straight effect on the lipid bilayer of the cell membrane. Moreover, this technique does not require much labor and also assists with biomolecule solubilization. However, if the sample is to be analyzed by mass spectrometry, a great variety of surfactants is incompatible and its depletion can be troublesome [6–8].

Methods that employ gentle techniques to obtain a proper protein extract for cell-free systems to perform *in vitro* protein synthesis have been considered an attractive methodology. Cell-free systems have been used to study the molecular mechanism related to posttranslational regulation in gene expression [9]. The pioneering work by Hoagland and coworkers showed that the translation machinery originating from cell extracts could be used in *in vitro* protein synthesis [10]. The protocol established by Pratt in 1984 is used as the “gold standard” for preparing cell-free systems from *Escherichia coli* cells (S30 extract) [11]. Based on Pratt's methodology, Kim and coworkers developed a more straightforward method of preparing cell extracts from *E. coli* strain BL21 without the use of high-speed centrifugation and with less sample manipulation (S12 extract) [12]. Finally, selection of the cell disruption methodology depends on the downstream analysis to be performed, which is essential for gathering accurate results.

In the current work, we improved a methodology based on the S12 extract protocol, which we named the TcS12 protein extract, using hypotonic lysis combined with water bath sonication. It allowed us to produce a cell lysate and a protein extract from four *T. cruzi* strains: CL-Brener (TcVI), Dm28c (TcI), Y (TcII), and 4167 (TcIV). All cells were investigated during the epimastigote stage. To prove the effectiveness of the method and to show that the parasites are thoroughly disrupted, flow cytometry analysis experiments were performed. We also demonstrated that our improved technology can be used in a comparative proteomics study on the aforementioned strains. We identified proteins located in cytosol, organelles, and even the nucleus of cells. Thus, it clearly indicates that all of those cell compartments are broken apart and their proteins are present in the extract. Furthermore, this methodology can give us support to understand the protein profile of different strains and attempt to correlate it to the process of infectivity and interaction mechanism between *T. cruzi* and host cells.

Materials and methods

Materials

The *T. cruzi* strains were kindly provided by the Protozoa Collection (Coleção de Protozoários, <http://colprot.fiocruz.br>) from the Oswaldo Cruz Foundation. Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, minimum 99.5% pure grade), potassium hydroxide (puriss. plus grade), saponin (molecular biology grade), ammonium bicarbonate (ReagentPlus, >99.0%), iodoacetamide (IAA, BioUltra), and ammonium formate (liquid chromatography mass spectrometry [LCMS] grade, 99% pure) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile (LCMS grade) and formic acid (high-performance liquid chromatography [HPLC] grade, 96% pure) were obtained from TediaBrasil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Dithiothreitol (DTT, ultra pure) was obtained from Gibco/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Trypsin (porcine, sequencing grade

modified) was obtained from Promega (Madison, WI, USA). Trifluoroacetic acid (HPLC/Spectro grade) was purchased from Pierce (Rockford, IL, USA). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Preparation of cell lysate and *T. cruzi* TcS12 protein extract

Epimastigote forms of CL-Brener, Dm28c, Y, and 4167 strains were axenically cultured in Warren's modified medium (brain-heart infusion) [13] (Difco-BD, Sparks, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) at 28 °C. The four parasite strains were initially grown simultaneously until they reached the mid-logarithmic phase according to each strain growth curve profile—Dm28c and Y strains on the 7th day of growth, CL-Brener on the 9th day of growth, and 4167 on the 4th day of growth. The epimastigotes were evaluated in a Neubauer chamber, and the cell suspension was split at a cellular density of 10^7 parasites/ml. Afterward, the *T. cruzi* cells were harvested, followed by centrifugation at 800 RCF for 10 min at 4 °C, and washed three times with 20 mM phosphate buffer, 2.7 mM KCl, and 137 mM NaCl (pH 7.4) (phosphate-buffered saline, PBS). For the cell disruption experiments, cell pellet aliquots were resuspended in 200 μ l of hypotonic buffer (20 mM Hepes-KOH [pH 7.6] and 2 mM DTT) and incubated on ice for 30 min. Here, the samples underwent water bath sonication (model USC-750A, Unique, Sao Paulo, SP, Brazil) with a frequency at 25 kHz for 30 min in order to thoroughly disrupt the cells. The cell lysate was centrifuged at 12,000 RCF for 10 min at 4 °C, and the supernatant was collected (TcS12 protein extract). The total protein concentration was quantified using a Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). All assays were performed according to the manufacturer's manual.

The samples were stored at -80°C until use. All biological experiments were performed in three replicates.

The overall schematic procedure of the TcS12 protein extract methodology is illustrated in Fig. 1.

Flow cytometry analysis

For quantification of *T. cruzi* cell membrane permeability, 200- μ l aliquots of epimastigote cell suspension (10^7 cells/ml) were incubated in the hypotonic lysis buffer for 0, 10, 20, and 30 min at 4 °C. Following each period of incubation, the parasites were labeled with 6 μ l of 30 μ g/ml propidium iodide (PI) solution (Sigma-Aldrich) and immediately analyzed on a flow cytometer. Positive lysis control was obtained by treating the parasites with 0.01% (w/v) saponin for 15 min at 4 °C, followed by labeling with PI solution as described above. The same labeling procedure was performed for analysis of the lysis efficiency of the water bath sonication. Subsequent to a 30-min incubation time on hypotonic buffer at 4 °C, the cell suspension was placed in a water bath sonicator for 10, 20, and 30 min, followed by labeling with PI solution as described above. All experiments were performed three times independently.

Data acquisition and data analysis were performed using a FAC-SCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with Cell Quest software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Jose, CA, USA). In total, 10,000 events were acquired in the region previously established as that corresponding to typical epimastigotes.

DIC microscopy analysis

To analyze the efficiency of the protein extraction protocol, lysis kinetics was monitored and recorded using the differential interference contrast (DIC) microscopy technique. Epimastigote cells

¹ Abbreviations used: IAA, iodoacetamide; LCMS, liquid chromatography mass spectrometry; HPLC, high-performance liquid chromatography; DTT, dithiothreitol; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; LCMS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; DIC, differential interference contrast; TOF, time-of-flight; SCX, strong cation-exchange; PLGS, ProteinLynx Global Server; CV, coefficient of variation; TS, trans-sialidase; RNS, retrotransposome hot spot.

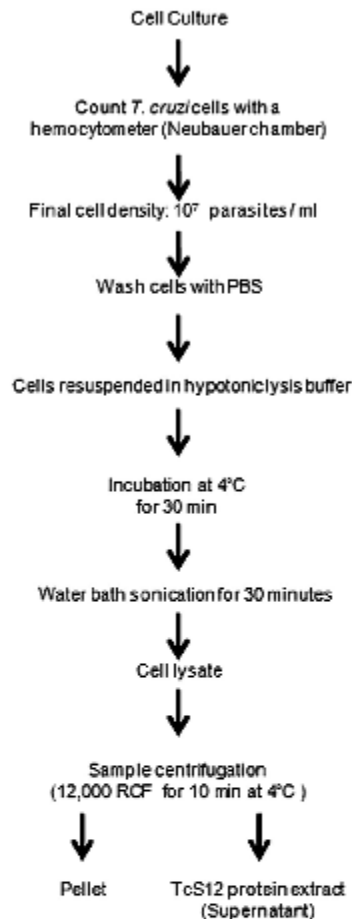


Fig. 1. Schematic flowchart of the methodology.

(10^7 cells/ml) were incubated in the hypotonic solution for 0, 10, 20, and 30 min at 4 °C, and images of the cell suspension were recorded. After a subsequent 30-min incubation time in the lysis buffer, the cell suspension was placed in a water bath sonicator for 10, 20, and 30 min. An aliquot of fresh parasite slides from all conditions was immediately prepared and analyzed with a Zeiss AxioObserver M1 microscope (Oberkochen, Germany).

Enzymatic digestion of the TcS12 protein extract

Before starting the digestion procedure, the TcS12 protein extract previously resuspended in hypotonic buffer was exchanged to 100 mM NH_4HCO_3 (pH 8.0) (AmBic) using a 3-kDa cutoff Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore, Tullagreen, Cork, UK). The sample was washed out four times with approximately 400 μl of 100 mM AmBic, and the retained protein solution was finally diluted with the same buffer to 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ protein concentration.

For trypsin digestion, the procedure was performed according to Murad and coworkers [14]. Each sample (100 μl) was mixed with 100 μl of 0.2% (w/v) RapiGest SF Surfactant solution (Waters,

Milford, MA, USA) in 100 mM AmBic to a final concentration of 0.1% (w/v). All solutions were incubated for 15 min at 80 °C under agitation (900 rpm). Afterward, DTT was added to each protein extract to a final concentration of 5 mM and incubated for 30 min at 60 °C under agitation (900 rpm).

The assays were allowed to cool at room temperature. Then, 6 μl of 500 mM IAA was added to the protein mixture solution, followed by incubation in the dark for 30 min at room temperature. For the digestion, a stock trypsin solution (Promega) was prepared in 100 mM AmBic (400 ng/ μl) and aliquots of the enzyme were added in a 1:50 ratio (w/w, enzyme/substrate). The reaction was performed in a thermoblock overnight at 37 °C under agitation (900 rpm). The solutions were acidified with 5 μl of 20% (v/v) trifluoroacetic acid and incubated for 90 min at 37 °C in order to thoroughly precipitate the RapiGest surfactant. The peptide mixture solutions were then centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 6 °C. The supernatants were transferred to a new vial, followed by drying down in a vacuum centrifuge. All samples were stored at -20 °C.

MS analysis

Before analysis on a two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMS/MS) instrument, all samples were resuspended in 100 μl of anion exchange loading buffer (5 mM ammonium formate and 5% acetonitrile, pH 3.2) to a final peptide concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

The peptide mixture was analyzed using a SYNAPT G1 HDMS system (Waters, Manchester, UK), and mass spectra were acquired in positive ion time-of-flight (TOF) V-mode. The TOF analyzer was calibrated with the MS/MS fragment ions of [Glu1]-fibrinopeptide B (Sigma-Aldrich) (GFP, 100 fmol/ μl in 50:50:1, methanol/ H_2O /acetic acid) from m/z 50 to 2000. The GFP double-charged precursor ion m/z 785.8426 was used as lock mass correction for accurate MS post-acquisition measurements. During each LCMS/MS run, the reference sprayer (GFP) was injected once every 30 s.

For quantitative proteomics analysis, nanoLCMS² acquisition mode was performed. The mass spectra were acquired alternating low and high collision energy, so that the acquisition time in each mode was 0.8 s with a 0.02-s interscan delay time. In the low-energy MS mode data were collected at a constant collision energy of 4 eV, whereas in the high-energy MS mode the collision energy ramped from 15 to 55 eV.

The digested peptide mixture from each sample was loaded three times (three replicates) onto a Waters nanoACQUITY UPLC system coupled to the SYNAPT G1 HDMS system. The chromatography setup was based on the method by Liu and coworkers with some modifications [15]. It consisted of an online two-dimensional nano-scale LC instrument that included a prepacked 180- μm \times 20-mm strong cation-exchange (SCX) column (nanoACQUITY UPLC SCX trap column, Waters, Milford, MA, USA) used for the first dimension in conjunction with a trap column (180 μm \times 20 mm) packed with 5 μm Symmetry C18 material (Waters) and a nanoACQUITY BBH130 C18 reversed-phase analytical column (1.7 μm , 75 μm \times 150 mm) (Waters) as the second dimension. An isocratic pump (called the auxiliary pump, ASM) allowed the SCX column to be equilibrated with loading buffer and performed the step gradient runs by loading typically 9 μl of "salt plugs" onto the SCX columns. The plug solutions contained both salt (ammonium formate) and organic solvent (acetonitrile) in varied concentrations. The eight fractions were prepared from a 1-M ammonium formate stock solution (pH 3.2) and acetonitrile according to the following: three salt plug buffers (50, 100, and 150 mM ammonium formate) containing 5% acetonitrile, four 200-mM ammonium formate buffers with 5, 10, 20, and 30% acetonitrile, and a FLUSH solution (350 mM ammonium formate and 50% acetonitrile). Following

the injection of salt plugs (at a 5- μ l/min flow rate for 10 min), the released peptides from the SCX column were captured on the C18 trap column. By its turn, the eluted peptides from the trap column were separated on the reversed-phase analytical column using a linear gradient of 0.1% formic acid in water (mobile phase A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (mobile phase B) for 60 min performed by the binary pump (BSM). The gradient consisted of 5 min in 95% A and 5% B, followed by 5 to 25 min in 60% A and 40% B, 25 to 30 min in 15% A and 85% B, 30 to 40 min in 15% A and 85% B, and 40 to 42.5 min in 95% A and 5% B, and then reequilibration of the column (95% A and 5% B) from 42.5 to 60 min at a flow rate of 300 nl/min.

Bioinformatics analysis of the mass spectra data and protein quantification

The LCMS² raw data from each replicate sample were processed by the ProteinLynx Global Server (PLGS) version 2.5 software platform (Waters, Manchester, UK) with Expression² informatics version 2.5. The protein identification was carried out by the embedded IDENTITY² algorithm, and searches were made against the *T. cruzi* (CL-Brener) complete proteome database from UniProtKB (release 2013_06) containing reviewed annotations. The database searching parameters were one missed cleavage by trypsin, carbamidomethyl (C) as fixed modifications, and acetyl N-terminal and methionine oxidation as variable modifications. The precursor and fragment ion mass error tolerances were adjusted to 10 and 20 ppm, respectively (default values) [16,17]. The criteria used for a positive protein match were at least three fragment ions per peptide, seven fragment ions per protein, and at least one peptide per protein hit. A false-positive discovery rate was allowed up to 4%. The exact mass retention time (EMRT) clusters were generated as described previously [18] and used for the label-free protein quantification method based on peak intensity. The summed intensity of the top three most intense precursor ions (top3Sum) from the corresponding protein is proportional to its molar amount. Therefore, this linear correlation was used to calculate the quantity of proteins in a complex mixture sample [19,20]. Final protein output tables from all replicates generated by the ion accounting algorithm integrated in PLGS were merged by the in-house software MassPivot version 2.2.3 [21], which allowed the assessment of the top3Sum average, top3Sum CV (coefficient of variation), and plotting the dynamic range of the experiments. The Expression² algorithm tool estimated the protein relative quantification ratio between the data from CL-Brener TcS12 protein extraction (used as reference or control) and the other three strains (Y, Dm28c, and 4167). The parameter used for normalization included a chosen (constitutive) protein presented in all replicate sets and that showed a CV less than 10% relative to the top3Sum average.

Classification of proteins according to the cell compartment

The identified proteins were analyzed by the Euk-mPloc 2.0 bioinformatics tool [22,23], a package of web servers for predicting the subcellular localization of the proteins found in the TcS12 extracts from all four strains.

Results and discussion

Cell disruption validated by DIC microscopy and flow cytometry

There are a great number of available approaches used to produce cell lysates and eventually generate a protein extract. However, depending on both steps and reagents employed in the

technique, there may be intervening in the MS analysis, especially in the case of LCMS, and consequently in the proteomics data. Here, we attempt to lessen sample manipulation that could result in loss of proteins. For instance, treatments, including protein precipitation and chromatography used to remove potential contaminants (e.g., polyethylene glycol, PEG), and detergents—incompatible with MS analysis—can be troublesome [24,25]. Moreover, we also establish a strategy that could be effective at extracting proteins from cellular compartments such as nuclei, vacuoles, membrane proteins, and organelles.

The aim to develop a cell disruption methodology was to generate a protein extract from *T. cruzi* based on the modified methodology designated S12 that was previously reported by Kim and coworkers for studying proteins from bacteria [12]. Therefore, we adapted this cell disruption process to the *T. cruzi* parasite in order to investigate and compare the proteome of four different strains. In our work, CL-Brener is the reference strain because it was selected in the *T. cruzi* genome project with the aim to completely sequence its genome. Furthermore, extensive characterization of biological, parasitological, and biochemical aspects of this organism has been investigated experimentally [26–28]. The 4167 strain was chosen for the proteomics analysis because it represents a distinct phylogenetic lineage that is classified in an opposite extreme to CL-Brener according to genetic, molecular, and immunological available markers [29]. Therefore, it could reflect an opposite biological behavior in culture as compared with CL-Brener. For instance, CL-Brener presents a slower growth rate compared with the 4167 strain, which reaches the logarithmic phase at the 4th day [30]. On the other hand, the Dm28c and Y strains show intermediate features; that is, the growth pattern of epimastigote forms display the logarithmic phase in 7 days, whereas CL-Brener reaches at the 9th day. This finding is in agreement with the various axenic cultures performed in our laboratory during this study (A. Brandao, personal communication).

Fig. 1 describes the workflow that resulted in the TcS12 protein extract. Initially, we used CL-Brener to evaluate the cellular lysis process that was monitored by means of fresh parasite slides investigated under phase contrast microscopy (T. Silva Galdino, unpublished work). Thus, this expectation was corroborated by both flow cytometric (Fig. 2) and DIC (Fig. 3) microscopy analyses.

Flow cytometry assays shows that the loss of plasma membrane integrity was approximately 8% at 0 min of incubation of the epimastigote cell suspension in chilled hypotonic lysis buffer (Fig. 2). At this condition, it is also observed that the majority of *T. cruzi* epimastigote forms of CL-Brener still maintain great motility and intact morphology (slender-shaped cell) (Fig. 3A). By increasing the incubation time in hypotonic lysis buffer to 30 min, the membrane permeability was approximately 16%, in accordance with DIC microscopy analysis that showed atypical cells presenting altered round/oval-shaped morphology without clearly visible flagellum (Fig. 3B–D). At this stage, there is no thorough cell lysis observed yet.

However, the combination of a 30-min incubation in chilled hypotonic lysis buffer with water bath sonication for 10 and 20 min leads to the beginning of cell disruption, as illustrated in Fig. 3E and F, respectively. Finally, an increased amount of cell debris is achieved when the epimastigotes are incubated in water bath sonication for 30 min (Fig. 3G). This finding was corroborated by flow cytometry analysis, which presented an increase in PI labeling (72% of the cells positive) (Fig. 2). It corresponds to a 9-fold augment of permeability of the membrane related to the control (0 min in lysis buffer). It should be pointed out that the positive lysis control test resulted in approximately 56% of PI+ parasites (Fig. 2). The entire lysis process was recorded in order to confirm the modifications in the cell morphology (see Supplementary Video S1 in the supplementary material).

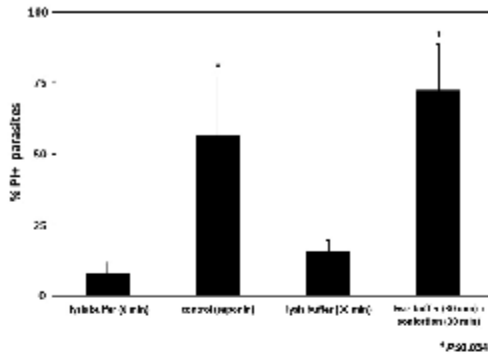


Fig. 2. Flow cytometry analysis of CL-Brener cell membrane permeability. Non-fixed epimastigotes incubated with the hypotonic solution in the absence or presence of the sonication process were labeled with PI. Asterisks indicate significant differences in relation to control group ($P < 0.05$). Bars represent means \pm standard errors, and similar results were obtained with preparations from different experiments.

MS and data analysis of the identified proteins

To assess the quality and application of the TcS12 protein extract, proteomics analysis from four different *T. cruzi* strains (Dm28c, CL-Brener, Y, and 4167) was performed by LCMS^E. As illustrated in Fig. 4, the total number of identified proteins was 1153 in all TcS12 protein extracts of the strains. However, the number of common proteins was 544 and the number of non-redundant ones was 609. When we organize the data according to the class of proteins, the TcS12 from CL-Brener, Dm28c, and 4167 presented a similar profile related to the distribution of protein abundance, whereas in the Y strain trans-sialidase (TS) was the most “abundant” class of proteins (A. Brandao, personal communication). Interestingly, this outcome is intriguing because the Y strain presents phylogenetic features close to Dm28c. It should be pointed out that this difference in the class of protein distribution pattern is not likely a spurious observation derived from the cell disruption methodology. Instead, such profiles could be correlated to the intrinsic characteristics of each strain.

Prediction of the subcellular localization of proteins

The identified proteins found in the TcS12 of all four *T. cruzi* strains were analyzed according to Euk-mPLoc software in order to evaluate the subcellular localization of proteins (Fig. 5). The cellular compartments were grouped based on the structural organization of the protozoan described previously [31,32]. As we observed, the cell lysis method enabled the extraction of proteins from various types of structures/organelles, especially cytoplasm, kinetoplast-mitochondrion complex, nucleus, and cell membrane, extracellular, and cell surface. However, a smaller number of proteins was extracted from the endoplasmic reticulum, vacuole, other organelles, and cytoskeleton/flagellum elements (microtubules). Fig. 5 also shows that the total number of proteins correlated to a cellular structure is greater than the total number of identified proteins. This is due to the fact that a single protein can coexist at two or multiple different locations in a cell. Besides, some proteins present a dynamic feature and are able to move between two or more subcellular locations [22].

We also found 11 proteins that were unable to be matched to a cellular location. Those proteins were identified as dispersed gene family protein 1 (DGF-1) and 14-3-3 protein. The former belongs to

the pectin lyase-like superfamily and is related to polysaccharide hydrolysis, whereas the latter contains the 14-3-3 domain that binds proteins containing phosphothreonine or phosphoserine motifs. However, no data on the location are available.

Quantification of the proteins by label-free LCMS^E

To perform the protein relative expression, the data from TcS12 protein extracts of Y, Dm28c, and 4167 were analyzed by the EXPRESSION^E algorithm and each one was compared with the data from the CL-Brener reference strain. We found 32 up-expressed proteins and 80 down-expressed proteins at a significantly different level in 4167 versus CL-Brener. Moreover, 60 proteins were detected only in 4167 or considered as unique (Fig. 6). In this work, a given protein was considered as unique if it was detected in only one of the strains. When we compared the relative protein quantification between Dm28c and CL-Brener, the data showed 51 and 92 up- and down-expressed proteins, respectively. We detected 90 as unique proteins in Dm28c. Finally, we observed that 73 proteins were up-expressed in the Y strain, whereas 60 proteins were shown to be down-expressed. The Y strain presented 209 unique proteins. Curiously, more than half of the total unique proteins (117) corresponded to TS, a type of surface protein.

This class of protein, which includes TS, mucins, MASP, and the GP protein family, is related to the cellular invasion mechanisms of the tripomastigotes in the vertebrate cells. In epimastigotes, it is involved in the adhesion of the protozoan to the insect host midgut [33,34]. The relative proteomics expression outcome, as shown in Supplementary Tables S1, S2, and S3 (see supplementary material), confirmed that, unlike CL-Brener, Dm28c, and 4167, the Y strain remarkably expressed higher levels of TS. In epimastigotes, a low expression profile of TS proteins has been reported previously [35,36]. Queiroz and coworkers developed a strategy to investigate cell surface proteins in epimastigotes from the Berenice strain and identified few TSs [35]. Likewise, Atwood and coworkers detected no TS proteins in one of the first works on proteome analysis of all cell forms of *T. cruzi* [36]. It should be pointed out that both of these studies used two distinct sample preparation methodologies from the one described in our work. Here, we were able to detect not only mucins and gp63 (as identified in CL-Brener only) but also TSs found in the TcS12 protein extracts, particularly in the Y strain. Therefore, it corroborates the efficiency of our methodology proposed in this work.

When comparing the data from all three expression tables (Supplementary Table S1, S2, and S3), we observed that proteins corresponding to retroelements (retrotransposome hot spot, RHS) are especially expressed in CL-Brener. Retrotransposomes were characterized as a multigene family in *Trypanosoma brucei*, and homologous repeated sequences were also found as coding protein sequences in *T. cruzi* [37,38]. In our study, RHS proteins were found in low levels in the 4167 and Dm28c strains, whereas they were absent in the Y strain. This finding could suggest that those RHSs are not active in the Y strain in the epimastigote forms. It is worth noting that some types of mobile genetic elements have been found as entirely species specific or even restricted to closely related species such as *Leishmania major* and *Leishmania donovani* [39–41]. Although the Y strain is closely related to Dm28c but not to 4167, all three strains seem to have few or no common mobile elements compared with the reference strain CL-Brener.

This protein expression distribution was not observed when we analyzed the classes of proteins related to metabolism. It is known that the replicative form of *T. cruzi* uses preferentially carbon as an energy source derived from glucose and amino acids [42,43]. The expression levels of proteins involved in the metabolism of amino acids, carbohydrates, and lipids presented similar numbers of unique proteins in Dm28c, Y, and CL-Brener (Supplementary Tables

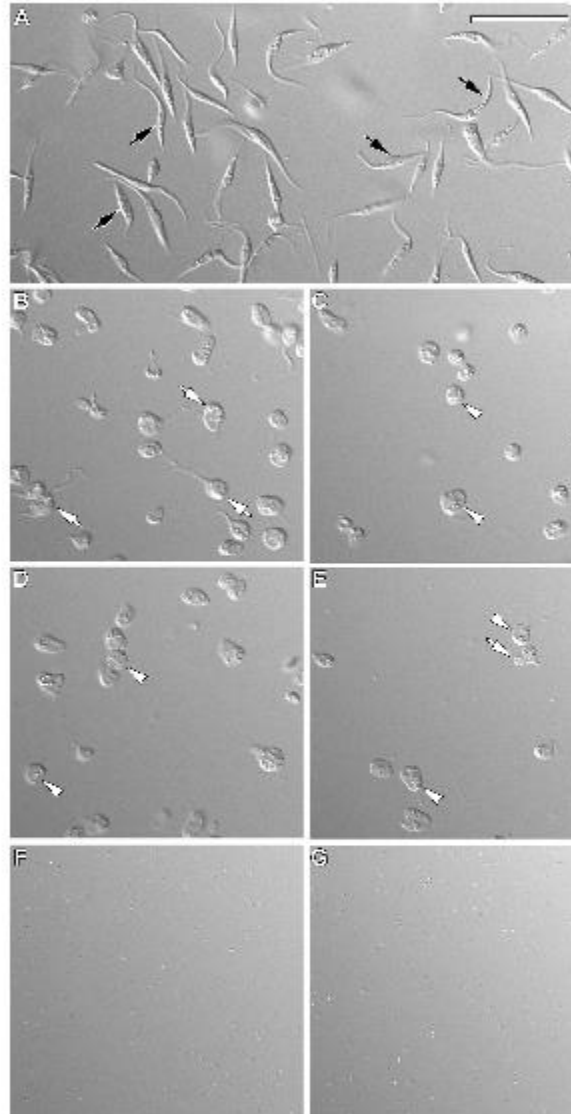


Fig. 3. DIC microscopy analysis of CL-Brener epimastigotes under hypotonic stress. (A) Control parasites showing typical elongated morphology (black arrows). (B–D) Epimastigotes incubated in hypotonic solution for 10 min (B), 20 min (C), and 30 min (D) presented a remarkable body retraction (white arrows), culminating in a rounded morphological aspect with loss of the flagella (white arrowheads). (E–G) The incubation of the parasites in the hypotonic solution associated with a sonication process for 10 min (E), 20 min (F), and 30 min (G) led to a decrease in the number of epimastigotes observed and the appearance of a similar phenotype that was detected after the addition of only lysis buffer. After 20 min, no more protozoa could be observed. Bar = 20 μ m.

S2 and S3). Nevertheless, the protein expression levels of 4167 compared with CL-Brener showed that proteins correlated to metabolism were increased in 4167 (Supplementary Table S1). This finding could reflect the higher replicative activity (or growth

behavior) demonstrated by the 4167 strain in axenic culture compared with CL-Brener [30].

Overall, the results presented in the supplementary tables show that the quantitative proteomics profile of each strain imparts

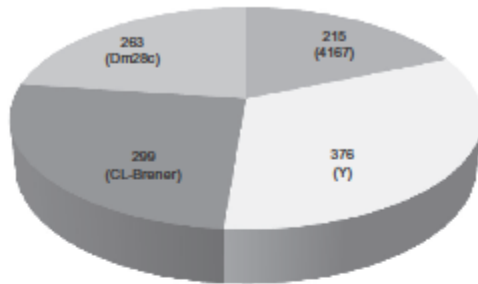


Fig. 4. Number of proteins identified in each *T. cruzi* strain.

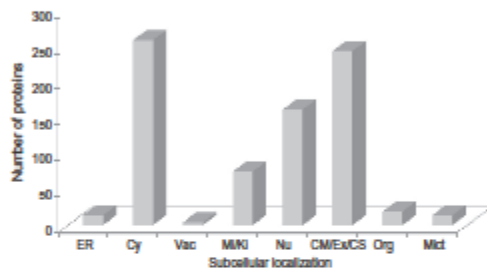


Fig. 5. Prediction of subcellular location sites of the identified proteins in all four *T. cruzi* strains. The distribution is in accordance with the Bak-mPLoc software and with the structural organization of *T. cruzi*. ER, endoplasmic reticulum; Cy, cytoplasm; Vac, vacuole; MKG, kinetoplast-mitochondrion complex; Nu, nucleus; CM/Ex/CS, cell membrane, extracellular, and cell surface; Org, organelles; Mict, cytoskeleton/flagellum elements (microtubules).

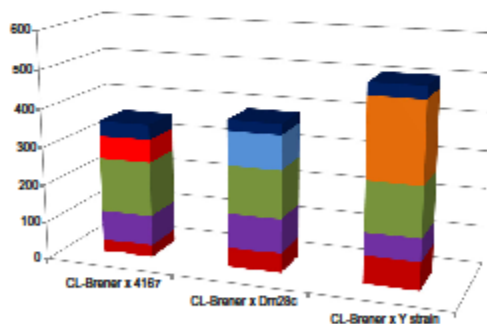


Fig. 6. Differential protein expression analyses of the *T. cruzi* strains using ExpressionS: 4176 × CL-Brener, Dm28c × CL-Brener, and Y strain × CL-Brener. Dark blue: non-modified expression ratio; orange: Y unique proteins; light blue: Dm28c unique proteins; red: 4167 unique proteins; light green: CL-Brener unique proteins; purple: down-expressed; dark red: up-expressed. Data labeled as non-modified indicate no significantly different expression levels. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

information that can be used as a unique expression “fingerprint.” Therefore, it is a potential tool to assist in the phenotype characterization of *T. cruzi* strains.

Conclusion

In this work, the methodology developed was able to disrupt *T. cruzi* cells and yielded a protein extract that we designated TcS12. First, the cell disruption was empirically monitored by optical microscopy and further confirmed by flow cytometry. The complete lysis process was recorded in order to verify and corroborate the changes in the cellular morphology that end up in disruption. The incubation of epimastigote cells exclusively in hypotonic buffer produced modification in the cell shape, but no disruption occurred. The epimastigote forms still kept their motility and appeared intact. However, the use of a water bath sonicator led the cells to thorough disruption. By all means, the efficiency of our methodology to produce the TcS12 protein extract was proved by MS experiments. In this study, we used label-free protein quantification methodology (LCMS²) to compare the TcS12 from four *T. cruzi* strains. This approach is becoming a staple in proteomics investigations because it is an accurate tool that allows the expression analysis of proteins in a sample. The LCMS² results not only identified proteins that are from different cell compartments but also allowed the study of protein expression involved in a myriad of protein classes such as metabolism, retrotransposome, folding, translation, and parasite–host interaction (TS). Finally, we postulate that the quality of the TcS12 protein extract yield could make it possible to perform further studies, such as a cell-free translation system using *T. cruzi* as a model, because it employs mild chemical processes and avoids surfactants that could damage the essential cellular structure for protein synthesis.

Acknowledgments

We are grateful to the Mass Spectrometry and Proteomics Unit (UEMP) core facility at the Rio de Janeiro Federal University run by Russolina B. Zingali for support in the use of the SYNAPT HDMS system and bioinformatics analyses. The authors are also grateful to UEMP technicians Augusto Vieira and Ana Lucia de Oliveira Carvalho for fruitful discussions and assistance in operating the SYNAPT HDMS system. We are in debt to Andre M. Murad (Brazilian Agricultural Research Corporation, EMBRAPA) for providing us with the in-house MassPivot software. Finally, this work was supported by PROEP/IOC-Fiocruz/CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/110.594/2012 and CNE E-26/102.775/2012). C. Brito is a research fellow of CNPq.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.010>.

References

- [1] W. de Souza, T.M. de Carvalho, E.S. Ramirez, Review on Trypanosoma cruzi–host cell interaction, *Int. J. Cell Biol.* 2010(2010).
- [2] R.B. Brown, J. Aufer, Current techniques for single-cell lysis, *J. R. Soc. Interface* 5 (Suppl. 2) (2008) S131–S138.
- [3] Introduction to protein extraction, in: T.S. Pezce (Ed.), *Cell Lysis Technical Handbook*, The o Fisher Scientific, USA, 2009.
- [4] S. Bhaduri, P.H. Demchick, Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies, *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1983) 941–943.
- [5] R.H. Johnson, M.H. Hecht, Recombinant proteins can be isolated from *E. coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing, *Biotechnology* 12 (1994) 1357–1360.
- [6] Y.G. Yeung, E. Nieves, R.H. Angeletti, E.R. Stanley, Removal of detergents from protein digests for mass spectrometry analysis, *Anal. Biochem.* 382 (2008) 135–137.

- [17] E.I. Chen, D. McClatchy, S.K. Park, J.R. Yates 3rd, Comparisons of mass spectrometry compatible surfactants for global analysis of the mammalian brain proteome, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8694–8701.
- [18] E.I. Chen, D. Codoria, J.L. Norris, J.R. Yates 3rd, Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2529–2538.
- [19] P.C. Zamecnik, E.B. Keller, Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins, *J. Biol. Chem.* 209 (1954) 337–354.
- [20] M.B. Hoagland, M.L. Stephenson, J.F. Scott, L.L. Hecht, P.C. Zamecnik, A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 231 (1958) 241–257.
- [21] J.M. Pratt, Coupled transcription–translation in prokaryotic cell-free systems, in: B.D. Hames, S.J. Higgins (Eds.), *Transcription and Translation: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK, 1984, pp. 179–209.
- [22] T.W. Kim, J.W. Kwon, I.S. Oh, C.Y. Choi, C.G. Park, D.M. Kim, Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system, *J. Biotechnol.* 126 (2006) 554–561.
- [23] L.G. Warren, Metabolism of *Schistosoma cruzi* Chagas: I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate, *J. Parasitol.* 46 (1960) 529–539.
- [24] A. Murad, C. Souza, J. Garcia, E. Rech, Characterisation and quantification expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nanoEPLC mass spectrometry, *Protoc. Exchange* 1 (2011) 1.
- [25] H. Liu, J.W. Finch, J.A. Luongo, G.Z. Li, J.C. Gebler, Development of an online two-dimensional nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry method for improved chromatographic performance and hydrophobic peptide recovery, *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 43–51.
- [26] W. Zhu, J.W. Smith, C.M. Huang, Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010) 840518.
- [27] G.Z. Li, J.P. Visser, J.C. Silva, D. Golick, M.V. Gorenstein, S.J. Geromanos, Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures, *Proteomics* 9 (2009) 1696–1719.
- [28] J.C. Silva, R. Denny, C.A. Dorschel, M. Gorenstein, I.J. Kass, G.Z. Li, T. McKenna, M.J. Nold, K. Richardson, P. Young, S. Geromanos, Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2187–2200.
- [29] J.C. Silva, M.V. Gorenstein, G.Z. Li, J.P. Visser, S.J. Geromanos, Absolute quantification of proteins by LCMS²: a virtue of parallel MS acquisition, *Mol. Cell. Proteomics* 5 (2006) 144–156.
- [30] J.C. Silva, R. Denny, C. Dorschel, M.V. Gorenstein, G.Z. Li, K. Richardson, D. Wall, S.J. Geromanos, Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale, *Mol. Cell. Proteomics* 5 (2006) 589–607.
- [31] A.M. Murad, E.I. Rech, NanoEPLC–MS² proteomic data assessment of soybean seeds using the UniProt database, *BMC Biotechnol.* 12 (2012) 82.
- [32] K.C. Chou, H.B. Shen, A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0, *PLoS One* 5 (2010) e9931.
- [33] K.C. Chou, H.B. Shen, Euk-mPLoc: a fusion classifier for large-scale eukaryotic protein subcellular location prediction by incorporating multiple sites, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 1728–1734.
- [34] B.D. Keller, J. Su, A.B. Young, R.M. Whitall, Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 71–81.
- [35] K. Hodge, S.T. Hove, L. Hutton, A.I. Lamond, Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC–MS/MS, *J. Proteomics* 88 (2013) 92–103.
- [36] N.M. El-Sayed, P.J. Myler, D.C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.N. Tran, E. Ghedin, E.A. Worthing, A.L. Delcher, G. Blandin, et al., The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science* 309 (2005) 409–415.
- [37] B. Zingales, M.E. Pereira, R.P. Oliveira, K.A. Almeida, E.S. Umezawa, R.P. Souto, N. Vargas, M.I. Cano, J.F. da Silveira, N.S. Nehme, C.M. Morel, Z. Brenes, A. Macedo, *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener, *Acta Trop.* 68 (1997) 159–173.
- [38] S. Brisse, C. Barnabe, A.I. Banuls, I. Sidibe, S. Noel, M. Tibayrenc, A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiplexed random amplified polymorphic DNA fingerprinting, *Mol. Biochem. Parasitol.* 92 (1998) 253–263.
- [39] B. Zingales, S.G. Andrade, M.R. Briones, D.A. Campbell, E. Chialif, O. Fernandes, F. Gubli, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, M.A. Miles, A.J. Romanha, N.R. Stum, M. Tibayrenc, A.G. Schijman, A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends Tc1 to TcVI, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (2009) 1051–1054.
- [40] S.A. Kilbuchi, C.L. Sodre, D.E. Kalume, C.G. Bias, A.L. Santos, M. de Nazare Sorin, M. Meuser, A. Chapeaurouge, J. Perales, O. Fernandes, Proteomic analysis of two *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 strains, *Exp. Parasitol.* 126 (2010) 540–551.
- [41] W. Souza, Structural organization of *Trypanosoma cruzi*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (Suppl 1) (2009) 89–100.
- [42] W. Souza, Electron microscopy of trypanosomes—a historical view, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (2008) 313–325.
- [43] P. Azambuja, N.A. Ratcliffe, E.S. Garcia, Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*, *An. Acad. Bras. Cienc.* 77 (2005) 397–404.
- [44] W. Coll, M.J. Alves, Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1) (1999) 37–49.
- [45] R.M. Queiroz, S. Chameau, F.N. Motta, J.M. Santana, P. Roepstorff, C.A. Ricart, Comprehensive proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastote cell surface proteins by two complementary methods, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 3255–3263.
- [46] J.A. Atwood 3rd, D.B. Weatherly, T.A. Minning, B. Bundy, C. Cavola, F.R. Oppenheimer, R. Ofanda, R.L. Tarleton, The *Trypanosoma cruzi* proteome, *Science* 309 (2005) 473–476.
- [47] F. Bringaud, N. Bileau, S.E. Melville, S. Herz, N.M. El-Sayed, V. Leech, M. Berriman, N. Hall, J.E. Donelson, T. Bakiz, A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with polymorphic subtelomeric regions of *Trypanosoma brucei*, *Eukaryot. Cell* 1 (2002) 137–151.
- [48] R.T. Souza, M.R. Santos, F.M. Lima, N.M. El-Sayed, P.J. Myler, J.C. Ruiz, J.F. da Silveira, New *Trypanosoma cruzi* repeated element that shows site specificity for insertion, *Eukaryot. Cell* 6 (2007) 1228–1238.
- [49] M.K. Howard, J.M. Kelly, R.P. Lane, M.A. Miles, A sensitive repetitive DNA probe that is specific to the *Leishmania donovani* complex and its use as an epidemiological and diagnostic reagent, *Mol. Biochem. Parasitol.* 44 (1991) 63–72.
- [50] S.M. Sunkin, P. Kiser, P.J. Myler, K. Stuart, The size difference between *Leishmania major* Friedlin chromosome one homologues is localized to subtelomeric repeats at one chromosomal end, *Mol. Biochem. Parasitol.* 109 (2000) 1–15.
- [51] B. Wickstead, K. Brisfield, K. Gull, Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2003) 360–375.
- [52] S. Besteiro, M.P. Barrett, L. Riviere, F. Bringaud, Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux, *Trends Parasitol.* 21 (2005) 185–191.
- [53] A.C. Teles, J.J. van Hellemond, Surprising variety in energy metabolism within *Trypanosomatidae*, *Trends Parasitol.* 25 (2009) 482–490.

Cover Letter

Rio de Janeiro, October 9th, 2013.

Dear Dr. Anton Aebischer
Editor-in-Chief,
Experimental Parasitology

I am submitting to *Experimental Parasitology* the manuscript entitled "*Characterizing Trypanosoma cruzi strains through the molecular weight distribution of proteins identified by a mass spectrometry based method*", authored by Tainah Silva Galdino, Dario E. Kalume, Constança Britto and Adeilton Brandao (corresponding author: abrandao@fiocruz.br), researchers at Instituto Oswaldo Cruz-Rio de Janeiro, Brazil.

The manuscript, which is submitted under the "Research Brief" format, describes a procedure based on a simplified protein extraction protocol and liquid chromatography mass spectrometry to get the overall protein composition of four *T. cruzi* strains. The LC-MS information is used in a graphical distribution of protein molecular weight to characterize the strains.

We evaluate that this procedure might be useful for the Reference Laboratories and researchers dealing with the problem of trypanosomatids strain characterization using non DNA based methods.

I ensure that all authors have approved this version of the manuscript and that it is not under consideration for publication elsewhere.

To review the manuscript I suggest the following researchers:

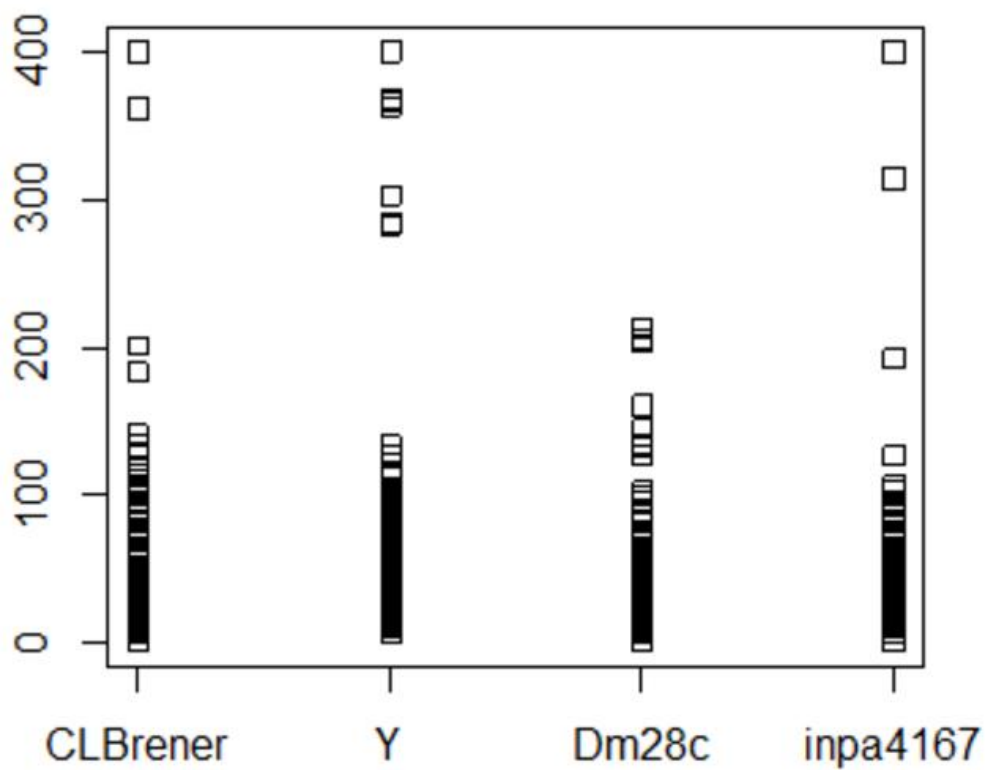
Dr. José Franco da Silveira - Unifesp-Brazil, jose.franco@unifesp.br

Dr. Paulo Cotrim - Univ. Sao Paulo-Brazil, pccotrim@usp.br

Dr. Maria Dolores Bargues, Univ Valencia - Spain, M.D.Bargues@uv.es

Sincerely yours,

Adeilton Brandão, D.Sc.



*Research Highlights

Highlights

A simple extraction protocol and LCMS allows the mass sorting of *T. cruzi* proteins

T. cruzi strains can be distinguished by the distribution of protein molecular mass

The proposed method generates a set of uniquely detected proteins for each strain

Characterizing *Trypanosoma cruzi* strains through the molecular weight distribution of proteins identified by a mass spectrometry based method.

Tainah Silva Galdino 1, Dário Eluan Kalume 1, Constança Britto 2, Adeilton Brandão*1

1- Laboratorio Interdisciplinar de Pesquisas Médicas

2- Laboratorio de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas

Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz

Av. Brasil, 4.365 - Rio de Janeiro - Brasil

*Corresponding author: abrandao@fiocruz.br

Tel.: 55 21 2562 1038

Abstract

We have used a simplified protein extraction protocol followed by mass spectrometry analysis to get a protein profile of four *Trypanosoma cruzi* strains. We show that the distribution of protein molecular weight and the presence of particular proteins provide a distinctive feature for the analyzed strains.

Key words

mass spectrometry; characterization; *T. cruzi* strain; protein extraction; proteomic profile

1. Introduction

Methods to characterize *Trypanosoma cruzi* strains have relied on PCR amplification of a specific DNA fragment, and to allocate a strain into one of the six discrete typing units (DTU) a combination of markers should be used (Zingales et al., 2009). In complement to nucleic acid markers, other works have reported on the protein composition of the *T. cruzi* developmental stages as well as on strains proteomic diversity (Magalhães et al., 2008; Cordero et al., 2009; Kikuchi et al., 2010; Telleria et al., 2010). These methods however deal with the different protein profile for developmental stages in one particular strain, and the methodology used was a rather cumbersome. In search of non-DNA based methods to support phenotypic analysis, we describe here an electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) procedure to characterize *T. cruzi* strains. The method for protein extraction, which is based on *E. coli* S12 extract (Kim et al., 2006), was developed for Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS) by Galdino et al., 2013 (unpublished results).

2. Materials and Methods

2.1. *T. cruzi* cultivation

The strains CL Brener, Y, Dm28c and INPA4167 were cultivated in Brain Heart Infusion medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 28 °C. At cell density of 10E8 cells/mL they were harvested by centrifugation at 800 RCF for 10 minutes at 4 °C, washed with PBS, and resuspended in 200 µL of hypotonic buffer Hepes-KOH 20 mM pH 7.6, DTT 2 mM.

2.2. Lysis and enzymatic digestion of the protein extract

Cells were incubated on ice for 30 minutes, followed by a water bath sonication for 30 minutes. The lysate was centrifuged at 12,000 RCF for 10 minutes at 4 °C and the supernatant was transferred to a fresh tube. The total protein was quantified using the Bradford Protein Assay kit (Bio-Rad) and next the hypotonic buffer was exchanged to 100 mM NH₄HCO₃ pH 8.0 using a 3 kDa cutoff Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore). The sample was washed out 4 times with 400 µL of 100 mM NH₄HCO₃ pH 8.0 and the retained solution was diluted with the same buffer to a final concentration of 1 µg/µL. An aliquot of 100 µL of each sample was mixed with 100 µL of 0.2% (w/v) of RapiGest™ SF (Waters, USA) in 100 mM NH₄HCO₃ pH 8.0 to a final concentration of 0.1% (w/v). All solutions were incubated for 15 minutes at 80 °C under agitation (900 rpm). Dithiothreitol was added to a final concentration of 5 mM and incubated for 30 minutes at 60 °C under agitation (900 rpm). After cooling to 25 °C, 6 µL of 500 mM iodoacetamide was added to the protein mixture, followed by incubation in the dark for 30 minutes at 25 °C. For the trypsin digestion, a stock trypsin solution (Promega) was prepared in 100 mM NH₄HCO₃ pH 8.0 (400 ng/µL) and the enzyme was added in a 1:50 ratio. The reaction was carried out overnight at 37 °C under agitation (900 rpm). Next, 5 µL of 20% trifluoroacetic acid (v/v) were added and the solution was incubated for 90 minutes at 37 °C and centrifuged at 14,000 rpm for 30 minutes at 6 °C. Supernatants were transferred to a fresh tube and dried in a vacuum centrifuge and resuspended in 100 µL 5 mM ammonium formate, 5% acetonitrile to a final peptide concentration of 1 µg/µL.

2.3 Liquid Chromatography Mass spectrometry and data analysis

The peptides were analyzed using a SYNAPT™ G1 HDMS™ System (Waters, UK) in label-free LCMS^E mode and the obtained mass spectra were searched against the *T. cruzi* CL Brener proteome database from UniProtKB (release 2013_06). Graphics were created

with strip chart function and ggplot2 package from R software (<http://www.r-project.org/>).

3. Results and discussion

While mass spectrometry pattern has long been used to characterize bacteria (Holland et al., 1996) it has not been extensively utilized in trypanosomatids characterization. This might be due to both the complexity of eukaryotic protein expression and the difficulty to generate tractable output for applications like strain characterization. The strains analyzed here exhibit different growth rate, reaching the desired cell density (10^8 cells/mL) in 4 to 9 days. Under the conditions used by our laboratory the relative doubling time is as follows: INPA4167 > Dm28c > Y > CL Brener. The last three strains differ in infectivity of bloodstream stage, growth in axenic medium and ability to reproduce in invertebrate hosts (Bertelli & Brener, 1980; Mello et al., 1996). The strain INPA4167 was isolated from sylvatic triatomine in the Amazon region and was genotyped as *T. cruzi* IV (formerly Z3, Fernandes et al., 2001). We exploited these features to determine whether the protein expression observed by LCMS^E would be typical for *T. cruzi* strains. The strip chart of figure 1 shows that each strain displays a characteristic distribution of molecular weight and number of identified proteins. This can be read as a difference in both the number of expressed proteins and their composition. Another useful feature of the method is the identification of proteins that are detected only in one strain, *i. e.*, proteins exclusively detected in each strain (figure 2). The observed differences in protein composition is influenced by the reference genome used for identification of the obtained spectra, in this case the CL Brener genome. As these strains present polymorphisms in their genomes, it is expected that the expressed proteins will display the corresponding amino-acids alterations (if any), which results in differential detection by the method described here. Taking into account that all steps for the cell disruption was standardized and the amount of cells used to produce the extract from each strain was the same and were collected at the logarithmic phase, we can alternatively attribute the differential detection of proteins listed in the table to peculiar patterns of expression. This varying degree of gene expression has already been noted among *T. cruzi* strains (Fampa et al., 2008; Kikuchi et al., 2010). Assuming that CL Brener clone is the closest to what a reference strain should be for *T. cruzi* (it was chosen for genome sequencing and was extensively characterized) (El-Sayed et al., 2005), the analysis we presented here is a manageable alternative for the characterization of *T. cruzi* strains. Additionally, the differential detection by LCMS provides a tool to ascribe to strains a set of exclusively detected proteins. The main goal here was to survey the overall protein composition from *T. cruzi* and it should not be viewed as a tool

to exhaustively describe the whole set of proteins from each strain. In other words, we set up an experimental protocol to extract a group of proteins, get their peptide composition and match them to the annotated set of genes in the public *T. cruzi* genome sequence. We think this methodology might be useful to reference laboratories working with the typing of *T. cruzi* strains as well as the researchers interested in certify they are using the correct strain in their experiments.

4. Acknowledgments

We are in debt to Professor Russolina B. Zingali and technicians Augusto Vieira and Ana Lucia de Oliveira Carvalho for the support in the use of Synapt HDMS mass spectrometer and bioinformatics analysis at the Mass Spectrometry and Proteomics Unity at Universidade Federal do Rio de Janeiro. This work was supported by PROEP/IOC-Fiocruz/CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/110.594/2012 and CNE E-26/102.775/2012). C. Britto is a research fellow of CNPq.

5. References

- Bertelli, M.S., Brener, Z., 1980. Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 66, 992–997.
- Cordero, E.M., Nakayasu, E.S., Gentil, L.G., Yoshida, N., Almeida, I.C., da Silveira, J.F., 2009. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Proteome Res.* 8, 3642–3652.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., et al., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409–415.
- Fampa, P., Lisboa, C.V., Jansen, A.M., Santos, A.L.S., Ramirez, M.I., 2008. Protease expression analysis in recently field-isolated strains of *Trypanosoma cruzi*: a heterogeneous profile of cysteine protease activities between TC I and TC II major phylogenetic groups. *Parasitology* 135, 1093–1100.
- Fernandes, O., Santos, S.S., Cupolillo, E., Mendonça, B., Derre, R., Junqueira, A.C., Santos, L.C., Sturm, N.R., Naiff, R.D., Barret, T.V., Campbell, D.A., Coura, J.R., 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*

95, 97–99.

Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, J.O., Jr, 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1227–1232.

Kikuchi, S.A., Sodré, C.L., Kalume, D.E., Elias, C.G.R., Santos, A.L.S., de Nazaré Soeiro, M., Meuser, M., Chapeaurouge, A., Perales, J., Fernandes, O., 2010. Proteomic analysis of two *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 strains. *Exp. Parasitol.* 126, 540–551.

Kim, T.-W., Keum, J.-W., Oh, I.-S., Choi, C.-Y., Park, C.-G., Kim, D.-M., 2006. Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *J. Biotechnol.* 126, 554–561.

Magalhães, A.D., Chameau, S., Paba, J., Guércio, R.A.P., Teixeira, A.R.L., Santana, J.M., Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., 2008. *Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. *Proteome Sci* 6, 24.

Mello, C.B., Azambuja, P., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., 1996. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 82, 112–121.

Telleria, J., Biron, D.G., Brizard, J.-P., Demetree, E., Séveno, M., Bamabé, C., Ayala, F.J., Tibayrenc, M., 2010. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20411–20416.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054.

Figure legends

[Click here to view linked References](#)

Figure Legend

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

Distribution of the identified protein molecular weight in *T. cruzi* strains. The number of proteins below 100 kDa was even among all four strains. However the protein molecular mass range for Dm28c presented a different distribution profile compared to CL Brener, INPA4167 and Y strains.

Figure 2

Proteins exclusively detected in each strain after similarity search to *T. cruzi* CL Brener annotated genome. Proteins are sorted according to molecular weight and distribution is visualized as violin plot. UniProt accession numbers are indicated in brackets.

Figure1
[Click here to download high resolution image](#)

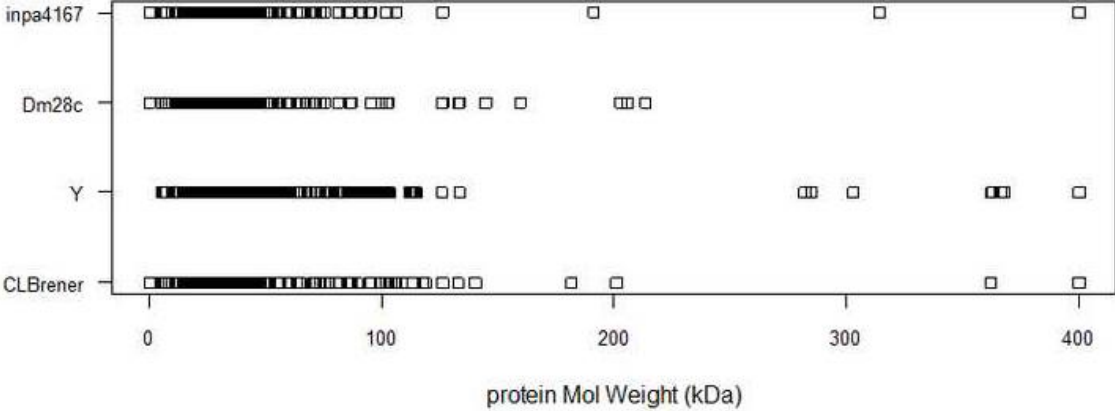
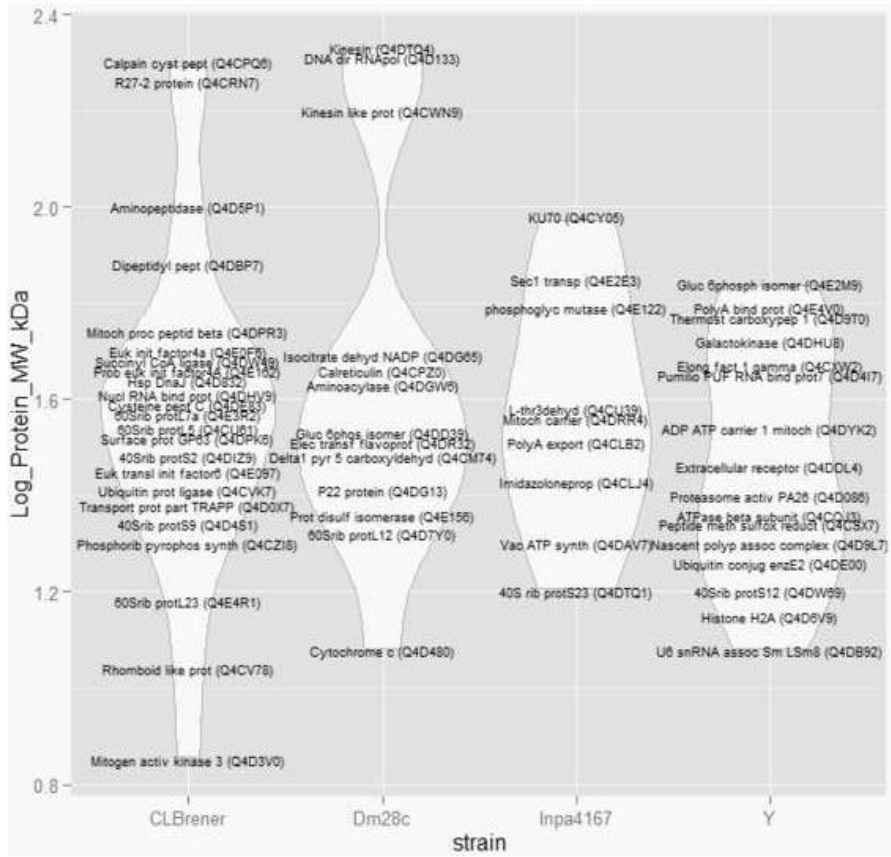


Figure2
[Click here to download high resolution image](#)



11. Apêndice

9.1 – Soluções:

I - PBS 1 X (Phosphate Buffered Saline) - Sigma Aldrich®

8,0 g de NaCl (137 mM)

0,2 g de KCL (2.7 mM)

1,44 g de Na₂HPO₄ (10 mM)

0,24 g de KH₂PO₄ (1,8 mM)

Dissolver em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH para 7,4 com HCL. Completar com água até 1L.

II - Solução de Lise Hipotônica (Lise Celular):

Esse protocolo foi desenvolvido de acordo com Murew *et AL*, 2009. O HEPES-KOH utilizado deverá estar na concentração de 20 mM.

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

$$100 \text{ mM}.V_1 = 20 \text{ mM} . 20 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL de HEPES-KOH de } 100 \text{ mM} + 40 \text{ } \mu\text{L de DTT } 2 \text{ mM}$$

- Adicionar parte do volume de água
- Conferir o pH
- Completar com o restante de água até 20 mL

III- Meio LB (Luria-Bertani) - HIMEDIA® :

III.a – Meio LB Líquido

- ✓ Caseína enzimática hidrolisada (10 g/L)

- ✓ Extrato de levedura (5 g/L)
- ✓ Cloridrato de sódio (10 g/L)

III.b – Meio LB Sólido

- ✓ Caseína enzimática hidrolisada (10 g/L)
- ✓ Extrato de levedura (5 g/L)
- ✓ Cloridrato de sódio (10 g/L)
- ✓ Agar (20 g/L) - HIMEDIA®

IV – Meio BHI (*Brain Heart Infusion*) – Warren modificado

- ✓ 37 g de BHI
- ✓ Água para completar 1 L
- ✓ Autoclavar

V – Tampão Tris – EDTA (TE) – Sigma Aldrich®

- ✓ 10 mM de Tris (pH 8,0)
- ✓ 1 mM de EDTA

VI – Tampão TBE 10X (Tris – Borato / EDTA) - Sigma Aldrich®

- ✓ Tris base (89 mM) – 108 g
- ✓ Ácido Bórico (89 mM) – 55 g
- ✓ EDTA (2 mM) – 9,3 g
- ✓ Água destilada até completar o volume para 1L.

VII – Meio *Terrific Broth* (Sigma Aldrich®)

- ✓ 12 g de Extrato de Levedura
- ✓ 6 g de Triptona

- ✓ 2 mL de glicerol (antes de manipulá-lo, deixa-lo por 1h a 37°C)
- ✓ q.s.p. 450 mL de água. Autoclavar.
- ✓ Em seguida, adicionar (dentro da cabine de segurança biológica) 50 mL de solução filtrada de: 0,17 M de KH_2PO_4 e 0,72 M de K_2HPO_4

VIII – Bis – Acrilamida 40% (Bio-Rad®)

- ✓ 380 g de acrilamida
- ✓ 200 g de Bis-metil
- ✓ Adicionar 600 mL de água destilada e incubar a 37°C até que fique completamente homogeneizado. Medir o pH (o pH deverá ser igual a 7.0) . Após a medição do pH, avolumar para 1L. Em seguida, filtrar a solução (0,45 µM).

IX - Soluções para *midprep* (Sigma Aldrich®):

XI a – Solução de Lise Alcalina I (GTE)

- ✓ Glicose (50 mM)
- ✓ Tris-HCL (25 mM; pH 8,0)
- ✓ EDTA (10 mM; pH 8,0)

IX b – Solução de Lise Alcalina II (SDS – NaOH)

Deve ser preparado do no momento do uso.

- ✓ 0,2 N de hidróxido de sódio (NaOH)
- ✓ 1 % de SDS

XI c – Solução de Lise Alcalina III (Ácido Acético Glacial 3M)

- ✓ 60 mL de acetato de potássio 5M
- ✓ 11,5 mL de ácido acético glacial
- ✓ 28,5 mL de água

9.2 – Protocolos:

I - Preparo de Células Eletrocompetentes (One Shot TOP 10 Electrocompetent *E. coli*)

1 – Dois tubos de células eletrocompetentes da Invitrogen® descongeladas a 4°C são transferidas para outros dois frascos contendo 100 mL e 5 mL de meio LB. Crescimento das células a 37°C por 18h.

2 – Reserva-se 10 µL da garrafa menor, contendo 5 mL, e adiciona-se a uma placa de Petri sem ampicilina afim de realizar um estoque (que deverá ser armazenado a 4°C e estará viável por até 3 meses).

3 – Retira-se 1 mL da garrafa contendo maior volume e o transfere para outra garrafa de cultura contendo 499 mL de meio LB. Segue-se incubando a 37°C até atingir uma OD de 0,5 (cerca de 3h).

4 – Após atingir OD de 0,5, todo o volume de 500 mL será centrifugado a 4°C, a 4.000 RCF, por 10 minutos.

5 – Após o descarte do sobrenadante, o sedimento produzido pela centrifugação deverá ser submetido a três processos de lavagens:

5.1 - Solução gelada de água e 10% de glicerol para um volume final de 100 mL;

5.2 – Solução gelada de água e 10% de glicerol para um volume final de 25 mL;

5.3 – Solução gelada de água e 10% de glicerol para um volume final de 10 mL.

6 – O sedimento deverá ser ressuscitado em 2 mL da solução, igualmente gelada, gelada final formada por água e 10% de glicerol.

7 – Alíquotas de 50 µL serão estocadas a - 80°C.

II – Extração de Plasmídeo (*midprep – preparo in house*):

1 - Seleção das colônias;

2 Crescimento das colônias selecionadas entre 10 a 15 mL de meio *LB* ou *Terrific Broth* (ambos contendo 100 µg / mL de ampicilina) - 37°C por 18h sob 200 *rpm* de agitação;

- 3 Centrifugação em 4.000 *rpm*, a 4°C por 10 minutos;
- 4 Descarte do sobrenadante. Acréscimo de 200 µL da solução de lise alcalina 1 (GTE); homogeneizar com o uso do vórtex; transferir o sobrenadante para um microtubo de 2,0 mL;
- 5 Acrescentar 400 µL da solução de lise alcalina 2 (SDS – NaOH). Verter o tubo por 8 vezes (manter os microtubos à 4°C durante a manipulação).
- 6 Adicionar 300 µL da solução de lise alcalina 3 (Ácido Acético Glacial 3M) de *midprep*. Incubar a 4°C por 5 minutos.
- 7 Centrifugar a 14.000 *rpm*, a 4°C por 5 minutos.
- 8 Transferência do sobrenadante para outro microtubo limpo de 1,5 mL. Adicionar 2 µL de RNase A e incubar a 37°C por 20 minutos.
- 9 Adicionar o mesmo volume de clorofórmio, verter o tubo (8 vezes) e incubar a 4°C por 15 minutos. Centrifugar a 14.000 *rpm*, a 4°C por 5 minutos. Transferência do sobrenadante para microtubo limpo.
- 10 Adição de fenol clorofórmio álcool isoamílico - mesmo volume do sobrenadante transferido. Verter o tubo 8 vezes. Incubar a 4°C por 15 minutos. Centrifugar a 14.000 *rpm*, a 4°C por 5 minutos.
- 11 Lavar o *pellet* com 600 µL de álcool 70% (frio). Centrifugar a 14.000 *rpm* a 4°C, por 5 minutos.
- 12 Ressuspender em 30 - 40 µL de água ultra-pura.

III – Procedimento Para Digestão por Tripsina e Preparo das Amostras para LC-MS

- 1 – Quantificação da amostra. Identificação da concentração e da massa do material a ser tripsinizado.
- 2 - Preparo dos microtubos a serem utilizados no procedimento realizando lavagens com 1000 µL com acetonitrila (CH₃CN) – HPLC (Sigma Aldrich®) por 3 vezes.
- 3 – Troca de tampão: Adicionar a amostra 450 µL de bicarbonato de amônio (NH₄HCOO₃). Centrifugar a 6°C, 14.000 *g*, por 15 minutos. Repetir a operação por mais duas vezes acrescentando 300 µL de NH₄HCOO₃ a cada centrifugação.

- 4 – Após a terceira lavagem, o filtro com o material retido deverá ser posto de cabeça para baixo dentro de um *amicon* e centrifugado a 1.000 *g* por dois minutos. Em seguida, o retido deverá ser transferido para um microtubo previamente preparado.
- 5 – Adição de *RapiGest*: Diluição de *RapiGest*TM (Waters[®]) em 500 μ L de NH_4HCO_3 , obtendo uma concentração inicial de 0,2%. Acréscimo de 0,1 % (100 μ L) de *RapiGest*. Incubação a 80°C, por 15 minutos, sob 900 *rpm* de agitação.
- 6 – Adição de DTT (Ditiotreitol) (Gibco BRL/Life Technologies[®]): DTT a concentração final de 5 mM. Incubar por 30 minutos, a 60°C, sob 900 *rpm* de agitação.
- 7 – Acréscimo de Iodoacetamida (IAA) (Sigma-Aldrich[®]): Acrescentar 15 Mm de IAA e deixar incubando por 30 minutos no escuro.
- 8 – A Tripsina (Promega[®]) deverá ser dissolvida em NH_4HCO_3 0,1M (1:50). Em seguida, a quantidade de tripsina a ser adicionada estará de acordo com a massa da amostra obedecendo a relação (1:50). Incubação a 37°C, por 18h, sob 900 *rpm* de agitação.
- 9 – Após o período de incubação, o ácido trifluoro acético (TFA) (Pierce[®]) 0,5% deverá ser adicionado a amostra. O pH deverá estar abaixo de 3. Incubação a 37°C, por 90 minutos e 1000 *rpm* de agitação.
- 10 – Centrifugar a 6°C, a 10.000 *g*, por 30 minutos.
- 11 – Transferência para um novo microtubo previamente lavado com acetonitrila.
- 12 – Secar o material em centrífuga a vácuo (modo Vaq – AQ) entre 1 – 2h.