

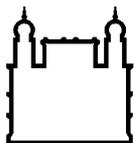
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO COMPARATIVO DOS PERFIS PROTEÔMICOS DE CEPAS  
SELVAGEM E APOSSIMBIÓTICA DE *Strigomonas culicis*

**ALINE DOS SANTOS GARCIA GOMES**

Rio de Janeiro  
Julho/2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***Aline dos Santos Garcia Gomes***

Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e apossimbiótica de  
*Strigomonas culicis*

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

**Orientador (es):** Dra. Claudia Masini d'Avila Levy  
Dr. Richard Hemmi Valente

**RIO DE JANEIRO**

Julho/2014

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

G633 Gomes, Aline dos Santos Garcia

Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e  
apossimbiótica de *Strigomonas culicis* / Aline dos Santos Garcia Gomes.  
– Rio de Janeiro, 2014.

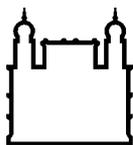
xvi, 213 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 102-125

1. Tripanossomatídeo. 2. Monoxênicos. 3. Proteômica. 4. *S. culicis*. I.  
Título.

CDD 614.533



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: ALINE DOS SANTOS GARCIA GOMES***

**Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e  
apossimbiótica de *Strigomonas culicis***

**ORIENTADOR (ES): Dra. Claudia Masini d'Avila Levy  
Dr. Richard Hemmi Valente**

**Aprovada em: 15/07/2014**

### **EXAMINADORES:**

**Dra. Leila de Mendonça Lima - Presidente (Fiocruz/RJ)**  
**Dra. Patrícia Cuervo Escobar (Fiocruz/RJ)**  
**Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau (UnB)**  
**Prof. Dr. José Batista de Jesus (UFSJ)**  
**Dr. Francisco Gomes Neto (Fiocruz/RJ)**

Rio de Janeiro, 15 de Julho de 2014.

**Dedico esta tese aos meus pais, que sempre me incentivaram a dar o melhor de mim em tudo que eu fizesse.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Lina e Paulo, por serem mais que mãe e pai, por serem incentivadores, torcedores e entusiastas das minhas conquistas.

Ao meu marido, José Miguel Machado, que me acompanha em minha jornada científica desde o início. Que me dá amor, apoio e auxílio cotidiano. Pelas longas jornadas que compartilhamos juntos em finais de semana no laboratório, pelo *design* de minhas apresentações, pelo amor ...

À sala sete e todos os alunos que passaram e que ainda estão lá, sem dúvida a convivência diária me trouxe mais que paciência, mas amigos e sensibilidade para lidar com cada indivíduo. Obrigada pelo carinho, pelas conversas, pelo café na copa, pelo cotidiano sempre tão agradável.

Às técnicas Viviane Tostes, Monique Nunes e Joelma Saldanha pela disponibilidade constante em me ajudar em infindáveis tripsinizações e *zip-tip*, pelo carinho que sempre demonstraram por mim, pela amizade.

À amiga Karina Rebelo, pela amizade fiel, pelas conversas científica e fiada, por fazer meus dias mais felizes.

Ao amigo e colaborador André Teixeira, pela disposição em me ajudar a qualquer momento, pelas discussões científicas, por me fazer rir.

À Jonas Perales, por me tratar sempre com carinho, por me fazer sentir a cada dia do meu doutorado como parte importante do grupo, por ter me recebido tão bem em seu laboratório.

À Ana Gisele, pelo carinho que sempre me tratou.

À Monique Trugilho, pela colaboração, na qual muitas vezes aprendemos juntas, por ouvir meus infindáveis questionamentos.

Ao laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, pela convivência agradável com todos, pelos almoços, pelas risadas, pelos debates.

Aos meus amigos de longa data, Danielle Mansur, Douglas Guedes, Jefferson Freitas e Tatiana Rodrigues, pela amizade, por entenderem minhas ausências, por me darem forças quando eu achava que tinha perdido. O que é a vida sem amigos?

À minha equipe de professores de microbiologia do IFRJ, que me apoiaram em dias que não pude dar aula por causa de experimentos a fazer, por me incentivarem no doutorado, por torcerem por mim, pelo carinho.

À Janaina Nascimento, coordenadora do Laboratório de Microbiologia do IFRJ, por sempre tentar montar o melhor horário para minhas aulas, levando sempre em consideração minha condição de aluna de doutorado.

Aos orientadores científicos que passaram pela minha vida: Marlene Benchimol, Maria Antonia Malajovich, Antônio Ferreira Pereira e Luciana Rangel. Por despertarem em mim o gosto pela pesquisa, por me ensinarem mais que protocolos, mas como ser ética e a importância de se fazer com qualidade o que se gosta.

À Claudia Masini, minha orientadora, por acreditar em mim, por me convidar a fazer parte de sua equipe, por acompanhar minha evolução apontando com gentileza todos os pontos necessários para melhorar. Pelo carinho e amizade que compartilhamos.

Ao Richard Valente, meu orientador, por acreditar em mim, me receber em seu laboratório com carinho, por me ensinar uma área completamente desconhecida e me fazer gostar desta área, pelo carinho e respeito com que sempre me tratou, por saber apontar meus erros, me ajudando a corrigi-los, mas também por enxergar minhas virtudes. Acho que posso dizer que ganhei um amigo e não só mais um orientador.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ pelo auxílio financeiro.

À Pós graduação em Biologia Celular e Molecular pelo auxílio financeiro.

***“Por vezes sentimos que o que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.***

**Madre Teresa de Calcutá**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e apossimbiótica de

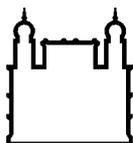
*Strigomonas culicis*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aline dos Santos Garcia Gomes

*Strigomonas culicis*, um tripanossomatídeo monoxênico, apresenta uma relação mutualística com uma bactéria em seu citoplasma. Esta pode ser removida por tratamento com antibiótico, sendo o cinetoplastídeo mantido em laboratório sob a forma de cepa apossimbiótica. Comparações entre as duas cepas fazem parte de uma estratégia interessante para o estudo da relação mantida pelos dois organismos. A ciência dirigida por descoberta, da qual a tecnologia proteômica faz parte, gera um volume de dados abrangente que pode posteriormente ser utilizado para retroalimentar projetos de ciência dirigida por hipótese. Desta forma, o estudo comparativo das duas cepas através da geração dos perfis bidimensionais, em distintas etapas do desenvolvimento celular, possibilitou a identificação de um número abrangente de proteínas diferencialmente abundantes entre as cepas, e entre as etapas do crescimento celular de cada cepa. As diferenças entre as cepas estão relacionadas tanto a alterações quantitativas quanto a proteínas exclusivas de cada condição analisada. Para a cepa selvagem uma maior modulação foi observada entre o meio e o fim de fase logarítmica, enquanto para a cepa apossimbiótica a modulação maior ocorre entre o início de fase log e a fase estacionária. Comparações entre as cepas indicam menores diferenças no início de fase logarítmica, sendo a maior porcentagem de spots diferenciais representada por aqueles que apresentam abundância diferencial estatisticamente significativa. Após as identificações proteicas três processos foram detalhados: expressão de peptidases, síntese de heme e interação parasito-hospedeiro. Uma calpaína foi identificada sendo modulada não apenas entre as etapas de crescimento celular, como também entre cepas. Neste sistema sua função poderia estar relacionada ao remodelamento do citoesqueleto. A enzima coproporfirinogênio oxidase foi identificada em ambas as cepas, com abundância superior em cepa selvagem, assim como a subunidade IV do complexo citocromo c oxidase, ambos com maior abundância em início de fase log, um indicativo de diferenças de requerimento de heme e/ou hemoproteínas, bem como de metabolismo energético diferenciado, pelo menos em etapas de início de crescimento, entre as cepas. Proteínas relacionadas ao flagelo também foram identificadas, e poderiam contribuir para a sustentação de um panorama multifatorial que proporcionaria uma maior capacidade de interação da cepa selvagem com seus hospedeiros. O grande volume de dados gerados será ainda utilizado para a identificação de redes metabólicas influenciadas pelo simbionte permitindo, futuramente, um entendimento amplo da relação simbiote-tripanosomatídeo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Comparative study of the proteomic profiles of wild and aposymbiotic strains of

*Strigomonas culicis*

### ABSTRACT

Ph.D. THESIS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

**Aline dos Santos Garcia Gomes**

*Strigomonas culicis*, a monoxenic trypanosomatid, shares a mutualistic relationship with a cytoplasmic bacterium. This bacterium can be removed by antibiotic treatment, and the kinetoplastid can be maintained in laboratory as an aposymbiotic strain. Comparisons between the strains are part of an interesting strategy to study the relationship maintained by both organisms. Discovery-driven science, which encompasses the proteomic technology, generates an in-depth data volume, which can be used to feedback hypothesis-driven projects. Therefore, the comparative study of the distinct strains through two-dimensional gel profiles, at different stages of development, enabled the identification of a large number of proteins differentially abundant between strains and among the cell growth stages for each one. The differences between the strains are related to both quantitative alterations and exclusive proteins of each analyzed condition. For the wild strain, major modulation was observed between the mid- and late log phases, while for the aposymbiotic strain, the major modulation occurred between early log and stationary phases. Comparisons between the strains indicate minor differences at the early log phase, being the major percentage of differential spots represented by those that present statistically significant differential abundance. After protein identification three processes were detailed: peptidases expression, heme synthesis and parasite-host interaction. A calpain was identified being modulated not only between the stages of cellular growth, but also between strains. This protein could be related to cytoskeleton remodeling. Coproporphyrinogen oxidase enzyme and subunit IV of the cytochrome c oxidase were identified in both strains, with overabundance in the wild strain. Both proteins presented higher abundance at the early log phase, which suggests differences in heme and/or heme proteins requirement, as well as a differential energetic metabolism between the strains, at least for the early stages of the growth. Flagellar-related proteins were also identified, which supports the idea of a multifactorial process that contributes to understand the better interaction capacity of the wild strain with its host. The vast amount of data obtained will be further utilized for the identification of metabolic networks influenced by the symbiont, hopefully allowing a broad understanding of the symbiotic-trypanosomatid relationship.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	A Família Trypanosomatidae.....	1
1.2	Tripanossomatídeos monoxênicos .....	6
1.3	Simbiose na Família Trypanosomatidae .....	9
1.3.1	<i>Strigomonas culicis</i> .....	15
1.4	Tecnologia proteômica .....	20
1.4.1	Eletroforese bidimensional (2DE) .....	24
1.4.2	Espectrometria de massas .....	27
1.4.2.1	MALDI-TOF/TOF .....	28
1.4.2.2	ESI-Orbitrap .....	29
1.5	Proteômica aplicada ao estudo de tripanossomatídeos.....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1	Objetivo geral.....	35
3.2	Objetivos específicos / metas .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1	Micro-organismos, condições de cultivo e determinação da curva de crescimento.....	36
4.2	Extração e precipitação de proteínas .....	36
4.3	Dosagem de proteínas .....	38
4.4	Eletroforese bidimensional .....	38
4.5	Revelação dos géis por Coomassie coloidal.....	39
4.6	Digitalização e análise de imagem.....	40
4.7	Análise estatística .....	40
4.8	Digestão trípica em gel de poliacrilamida e dessalinização.....	412
4.9	Espectrometria de massas .....	42
4.9.1	MALDI-TOF/TOF .....	42
4.9.2	ESI-LTQ/Orbitrap.....	43
4.9.3	Análise dos dados .....	44
4.9.3.1	Banco de dados .....	44

4.9.3.2	Busca de dados gerados por MALDI-TOF/TOF .....	44
4.9.3.3	Busca de dados gerados por ESI-Orbitrap.....	45
4.9.3.4	Critérios para identificação proteica .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
5.1	Estabelecimento de protocolo para extração de proteínas.....	46
5.2	Geração dos perfis 2DE das cepas WT e Apo de <i>Strigomonas</i> <i>culicis</i> .....	60
5.3	Análise comparativa dos perfis proteômicos bidimensionais .....	66
5.3.1	Comparações intracepas.....	70
5.3.2	Comparações intercepas.....	74
5.3.3	Proteínas identificadas .....	78
5.3.3.1	Expressão de peptidases .....	81
5.3.3.2	Biossíntese de heme .....	89
5.3.3.3	Interação tripanossomatídeo-hospedeiro .....	93
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>126</b>
9.1	Géis representativos das condições analisadas.....	126
9.2	Análise comparativa – mapa de <i>spots</i> DifEstat e DifExclusiv.....	134
9.2.1	Comparação intracepa.....	134
9.2.2	Comparação intercepas .....	142
9.3	Identificação de <i>spots</i> .....	155

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Diversidade morfológica na Família Trypanosomatidae.....	3
Figura 1.2 - Árvore filogenética dos tripanossomatídeos que albergam simbiosites. ....	8
Figura 1.3- Microscopia eletrônica de transmissão de <i>Angomonas desouzai</i> . ....	9
Figura 1.4 - Microscopia óptica e eletrônica de varredura da espécie <i>Strigomonas culicis</i> .....	16
Figura 1.5 - Abordagens proteômicas. ....	23
Figura 5.1 - Curvas de crescimento celular de <i>S. culicis</i> .....	47
Figura 5.2 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas da cepa WT de <i>S. culicis</i> .....	49
Figura 5.3 - Quantificação de proteínas após distintas metodologias de extração .....	51
Figura 5.4 - Perfil eletroforético bidimensional das diferentes metodologias de extração de proteínas após precipitação com TCA/Acetona .....	53
Figura 5.5 - Perfil eletroforético bidimensional das diferentes metodologias de extração de proteínas após precipitação com Etanol/Acetona .....	54
Figura 5.6 - Avaliação do rendimento proteico após diferentes metodologias de precipitação de proteínas da cepa WT de <i>S. culicis</i> .....	57
Figura 5.7 - Avaliação da massa proteica e gradiente de pH a serem utilizados em géis preparativos .....	58
Figura 5.8 - Perfil eletroforético bidimensional das proteínas extraídas da cepa WT de <i>S. culicis</i> em distintas etapas da fase log de crescimento celular.....	61
Figura 5.9 - Perfil eletroforético bidimensional das proteínas extraídas da cepa Apo de <i>S. culicis</i> em distintas etapas da fase log e da fase estacionária de crescimento celular. ....	62
Figura 5.10 - Géis bidimensionais referentes às replicatas biológicas de fim de fase exponencial de <i>S. culicis</i> .....	64
Figura 5.11 - Quantificação de <i>spots</i> em distintas etapas da fase log de crescimento celular da cepa WT (a) e das fases log e estacionária da cepa Apo (b) de <i>S.culicis</i> .....	65
Figura 5.12 - Análise de componentes principais das replicatas biológicas de cepas de <i>S. culicis</i> .....	67
Figura 5.13 - Abundância diferencial de <i>spots</i> em condições pareadas de <i>S. culicis</i> . ....	69
Figura 5.14 - Relação de <i>spots</i> diferenciais por estatística (difestat) e diferenciais por exclusividade (difexclusiv) na cepa WT de <i>S. culicis</i> .....	71
Figura 5.15 - Relação de <i>spots</i> diferenciais por estatística (difestat) e diferenciais por exclusividade (difexclusiv) na cepa Apo de <i>S. culicis</i> .....	72

Figura 5.16 - Relação de <i>spots</i> diferenciais por estatística (difestat) e diferenciais por exclusividade (difexclusiv) na comparação entre cepas WT e Apo de <i>S. culicis</i> . .....	75
Figura 5.17 - Pporcentagem relativa de <i>spots</i> diferenciais por estatística (difestat) e diferenciais por exclusividade (difexclusiv) na comparação entre cepas wt e apo de <i>S. culicis</i> .....	77
Figura 5.18 - Classificação das calpaínas-símile de tripanossomatídeos .....	84
Figura 5.19 - Identificação de domínios conservados de calpaínas-símile de tripanossomatídeos .....	86
Figura 5.20 - Via biossintética de heme .....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Classificação dos tripanossomatídeos que albergam simbiote.....	10
Tabela 5.1 - Número de spots observados em géis 2DE preparativos. ....	56
Tabela 5.2 - Número de <i>spots</i> observados em géis 2DE preparativos. Variação na massa proteica e no gradiente de pH utilizado.....	59
Tabela 5.3 - Relação entre número de <i>spots</i> DifEstat e quantidade de proteínas identificadas na comparação intracepa WT de <i>S. culicis</i> .....	78
Tabela 5.4 - Relação entre número de <i>spots</i> DifEstat e quantidade de proteínas identificadas na comparação intracepa Apo de <i>S. culicis</i> .....	79
Tabela 5.5 - Relação entre número de <i>spots</i> DifEstat e quantidade de proteínas identificadas na comparação intercepas WT e Apo de <i>S. culicis</i> .....	80

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2DE	<i>Two-dimensional electrophoresis</i> (eletroforese bidimensional)
2DE-MS	<i>Two-dimensional electrophoresis – Mass spectrometry</i> (eletroforese bidimensional com espectrometria de massas)
APO	Cepa aposimbótica
BSA	Bovine serum albumin (albumina bovina sérica)
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> (dissociação induzida por colisão)
CPOX	Coproporfirinogênio oxidase III
COLPROT	Coleção de protozoários
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
ECD	<i>Electron capture dissociation</i> (dissociação por captura de elétrons)
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionização por eletronebulização)
ETD	<i>Electron transfer dissociation</i> (dissociação por transferência de elétrons)
FDR	<i>False discovery rate</i> (taxa de falsa descoberta)
FT	Transformada de Fourier
gGAPDH	Gene codificador da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicosomal
gp63	Glicoproteína de 63 kDa
ICR	<i>Ion cyclotron resonance</i> (ressonância ciclotrônica de íons)
IT	<i>Ion trap</i> (Armadilha iônica tridimensional)
LC	<i>Liquid chromatography</i> (cromatografia líquida)
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography and mass spectrometry</i> (cromatografia líquida conjugada a espectrometria de massas em <i>tandem</i> )
LIMMA	<i>Linear models for microarray data</i> (modelos lineares para dados de microarranjos)
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i> (meio de infusão de fígado e triptose)
LT	<i>Linear trap</i> (armadilha iônica linear)
<i>m/z</i>	<i>Mass to charge ration</i> (razão entre massa e carga de um íon)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (dessorção/ionização a laser assistida por matriz)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometria de massas)

MS/MS	<i>Mas spectrometry/ Mas spectrometry</i> (espectrometria de massas em tandem)
NL	Não linear
Orbitrap	Armadilha orbital
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PFR1	<i>Paraflagellar rod protein 1</i> (proteína 1 da estrutura paraflagelar)
PFR2	<i>Paraflagellar rod protein 2</i> (proteína 2 da estrutura paraflagelar)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMF	Impressão digital de massas peptídicas ( <i>Peptide mass fingerprint</i> )
PPOX	Protoporfirinogênio oxidase
PSD	<i>Post source decay</i> (decaimento pós-fonte)
PSM	<i>Peptide spectrum match</i> (combinação entre peptídeo e espectro)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RNAr SSu	<i>Ribonucleic acid</i> small subunit (RNA da subunidade ribossomal menor)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> e (Dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> e - <i>polyacrilamye gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras)
SFB	Soro fetal bovino
SMP-1	<i>Small myristoylated protein 1</i> (proteína miristoilada pequena 1)
SMP-2	<i>Small myristoylated protein 2</i> (proteína miristoilada pequena 2)
sl RNA	<i>spliced leader ribonucleic acid</i> (região genômica do RNA da sequência líder)
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (ácido tricloroacético)
TOF	<i>Time of flight</i> (tempo de vôo)
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol
Vh	Volthora
WT	<i>Wild Type</i> (cepa selvagem)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Família Trypanosomatidae

Os flagelados da Classe Kinetoplastea compõem um grupo de micro-organismos que pode existir tanto na forma de vida livre quanto atuando como parasitas de vertebrados, invertebrados, incluindo diversos insetos, e até mesmo plantas (Wallace, 1966; Vickerman 1994; Podlipaev et al. 2004; Teixeira et al., 2011). Membros dessa classe são, tradicionalmente, divididos em duas ordens: Bodonida e Trypanosomatida (Lom 1976; Vickerman 1976). Membros da Ordem Bodonida apresentam dois flagelos e cinetoplasto grande, sendo subdivididos em duas famílias, Bodonidae e Cryptobiidae, enquanto os membros da Ordem Trypanosomatida apresentam flagelo único e cinetoplasto menor quando comparado aos primeiros, sendo todos os seus membros agrupados em uma única família, denominada Trypanosomatidae (Moreira et al., 2004).

A Família Trypanosomatidae é formada por parasitos que apresentam fenômenos moleculares característicos, tais como: variação antigênica, *trans-splicing* e edição de RNA mitocondrial. Sua morfologia também é idiossincrática sendo definida por uma organização nuclear incomum, presença de flagelo único, com corpo basal localizado próximo ao cinetoplasto (estrutura formada por uma rede fibrilar e compacta de DNA mitocondrial, composta por maxi e minicírculos), mitocôndria única e ramificada por todo o corpo celular do protozoário, além de organelas típicas. Os glicossomos, por exemplo, são organelas relacionadas aos peroxissomos e se caracterizam por reunir algumas enzimas da via glicolítica, o que aumenta a eficiência desta via bioquímica. A presença de uma rede de microtúbulos subpeliculares, localizada logo abaixo da membrana plasmática e conectada à sua face interna, colabora para a forma característica apresentada por esses parasitos (Simpson, 1972; Vickerman, 1994; Lukes et al., 2002; McGhee e Cosgrove, 1980; De Souza, 2008; Bernard e Rossignol, 2008).

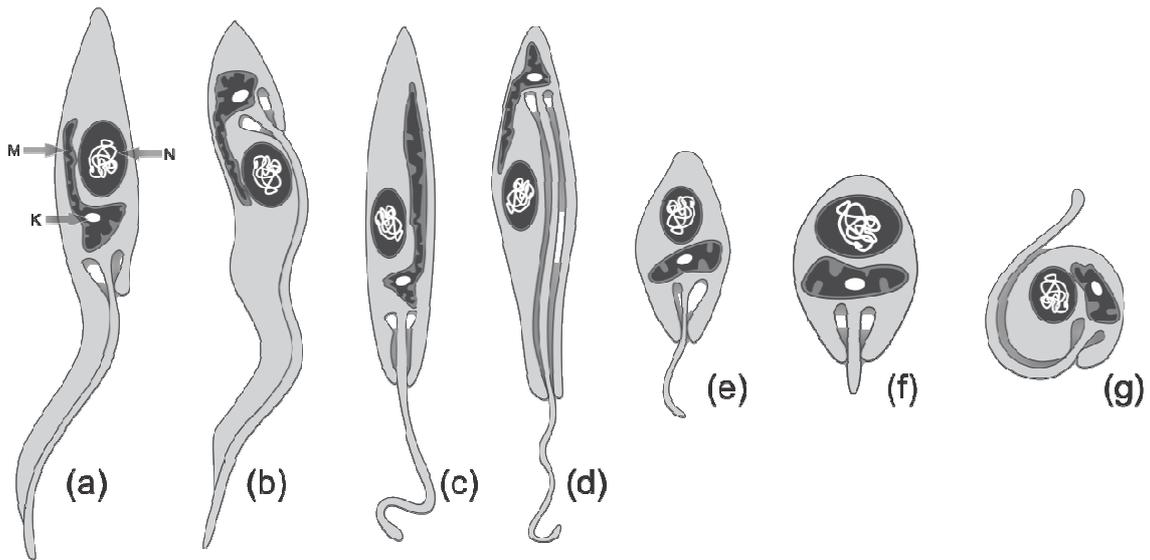
Os membros da Família Trypanosomatidae podem apresentar distintas morfologias durante seu ciclo de vida. Com o objetivo de definir terminologias para se referir às diferentes formas, Hoare e Wallace (1966) se basearam na forma celular, na posição relativa do cinetoplasto em relação ao núcleo e no ponto de

emersão do flagelo. Deste modo, sete morfotipos principais, apresentados na **Figura 1.1**, foram definidos. Morfotipos alongados e fusiformes foram denominados promastigotas, opistomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, enquanto que formas esféricas e arredondadas foram chamadas de amastigotas, coanomastigostas e esferomastigotas (Hoare 1964; Hoare e Wallace, 1966). Alterações morfológicas, dentro do mesmo gênero, podem ser induzidas por condições ambientais, cultivo *in vitro* e adição de drogas (Podlipaev 2001; Lopes et al., 1989; Momen 2001; Yurchenko et al., 2006). Apesar de existirem trabalhos correlacionando a morfogênese com o processo de patogenicidade ou capacidade de interação com células-alvo, as possíveis vantagens adaptativas decorrentes da variabilidade dentro de uma mesma espécie ainda são pouco conhecidas (De Jesus et al., 1993, Weller e Ghull, 2013).

Protozoários desta Família podem adaptar seu metabolismo a uma grande variedade de substratos e quantidade de oxigênio, o que parece favorecer sua habilidade em instituir novos ciclos de vida, contanto que as condições comportamentais do hospedeiro permitam (McGhee e Cosgrove 1980). Desta forma, além da grande variabilidade de formas, esses flagelados podem apresentar dois estilos de vida distintos, parasitando um único hospedeiro invertebrado, o que caracteriza um ciclo de vida monoxênico; ou mais de um hospedeiro, alternando sua permanência em vertebrados e invertebrados, ou invertebrados e plantas, realizando um ciclo heteroxênico.

Dos 14 gêneros da Família Trypanosomatidae, dez apresentam ciclo monoxênico (*Angomonas*, *Strigomonas*, *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Sergeia*, *Wallaceina*, *Blechomonas* e *Paratrypanosoma*) e quatro são heteroxênicos (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Phytomonas* e *Endotrypanum*) (Teixeira et al., 2011; Flegontov et al., 2013; Votýpka et al., 2013).

Um interesse especial é reservado a espécies heteroxênicas, tendo em vista sua interferência na qualidade de vida dos seres humanos. Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* se destacam por serem responsáveis por doenças graves em humanos, reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde como “doenças humanas negligenciadas” (OMS, 2014). O gênero *Phytomonas* é reconhecido pela sua interferência no agronegócio.



**Figura 1.1 - Diversidade morfológica na Família Trypanosomatidae.**

Representação esquemática dos sete morfotipos principais encontrados na Família Trypanosomatidae: epimastigota (a), tripomastigota (b), promastigota (c), opisthomastigota (d), coanostigota (e), amastigota (f) e trypomastigota (g). O cinetoplasto (K), a mitocôndria (M) e o núcleo (N) estão indicados (por José Miguel Machado – [www.cariocaccia.com.br](http://www.cariocaccia.com.br)).

As doenças de importância para a saúde pública são: a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, doença do sono, causada pelo *Trypanosoma brucei*, e as Leishmanioses, causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania* (Chagas, 1909; Chagas, 1916; Barret et al. 2003; Stuart et al., 2008; Coura e Borges-Pereira, 2010; revisto por Bates, 2008; Welburn e Maudlin, 1999). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 450 milhões de pessoas, espalhadas pelo mundo, estão em risco de contrair estas doenças (OMS 2013).

Espécies do gênero *Phytomonas*, apesar de não apresentarem risco à saúde humana, despertam o interesse da comunidade científica devido a sua capacidade de interação parasítica com vegetais de interesse econômico, como tomate e coqueiro (revisto por Camargo, 1990).

Além disso, algumas espécies heteroxênicas não patogênicas ao homem vêm sendo utilizadas como plataformas de expressão de proteínas, caso da espécie *Leishmania tarentolae*. A expressão heteróloga de genes que geram proteínas com modificações pós-traducionais é geralmente realizada em células de mamíferos, porém nestes sistemas de expressão a eficiência do processo é baixa quando comparada à realizada em bactérias e leveduras. O uso de *L. tarentolae* permite a expressão de proteínas heterólogas tanto na forma secretada quanto na forma intracelular e, devido a sua natureza eucarionte, o sistema possibilita não apenas a inserção de modificações pós-traducionais, mas também o correto enovelamento proteico, garantindo a funcionalidade da proteína expressa (Kushnir et al., 2005; revisto por Basile e Peticca, 2009; Sugino e Niimi, 2012).

Uma questão importante dentro da Família é a taxonomia complexa e imprecisa de muitos indivíduos. No início do século 19, com a necessidade da classificação taxonômica desses protozoários, os primeiros parâmetros para definições taxonômicas foram observações de características morfológicas e estilo de vida, monoxênico ou heteroxênico. Com a virada do século, uma grande quantidade de tripanossomatídeos começou a ser descrita. Hoare e Wallace (1966) redefiniram os gêneros previamente descritos, se baseando em morfotipos específicos, no ciclo de vida, nos hospedeiros e nas manifestações clínicas causadas pelo parasito no hospedeiro vertebrado, quando este utilizava um ciclo heteroxênico. Como era de se esperar, observações de morfotipos no hospedeiro são insuficientes para uma classificação precisa, tendo em vista a grande variabilidade de morfotipos mesmo dentro de uma mesma espécie, sejam eles

naturais ou induzidos pelas metodologias de cultivo laboratorial (Podlipaev, 2000; Merzlyak et al., 2001).

Com o passar dos anos, as características morfológicas e bioquímicas, passaram a auxiliar na taxonomia, porém com o avanço da biologia molecular e possibilidade de sequenciamento de DNA em larga escala, a taxonomia de tripanossomatídeos está sob constante rediscussão. Os marcadores rotineiramente utilizados para reconstruções filogenéticas são: RNA da subunidade ribossomal menor (RNAr SSU), a região genômica do *spliced leader* RNA (sl RNA), o gene codificador da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicosomal (gGAPDH), dentre outros (Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001; Abreu et al., 2001; d'Avila-Levy et al., 2004; Miranda et al., 2004; Santos et al., 2005; Fernandes et al., 2001; Crain et al., 2002; Hamilton et al., 2004; Maslov et al., 2013; Votýpka et al., 2013).

Mesmo com a taxonomia molecular já tendo avançado bastante em comparação com a taxonomia proposta por Hoare e Wallace, diversas espécies estabelecidas e bem aceitas na literatura ainda necessitam de estudos mais aprofundados para sua correta posição taxonômica e compreensão da filogenia da Família. Por esta razão, novos marcadores moleculares se fazem necessários, para melhor identificação e discriminação de gêneros, sub-grupos e principalmente para as espécies de tripanossomatídeos monoxênicos. Um avanço na área é o apoio financeiro a projetos de pesquisa como, por exemplo, o projeto "Identificação Molecular de Parasitos e Vetores do Brasil" (<http://brbol.org/pt-br/content/brbol-brazilia-barcode-life-0>) o qual visa o estabelecimento de novos marcadores moleculares para melhor identificação de espécies já descritas, porém pouco estudadas, e depositadas em coleções institucionalizadas e curadas.

Devido à facilidade de cultivo dos tripanossomatídeos monoxênicos, recentemente este grupo tem ganhado maior atenção, principalmente devido a observações de similaridades moleculares e de processos biológicos com espécies heteroxênicas, o que favorece que estes sejam utilizados como modelo de estudos. Além disso, relatos de infecção em indivíduos imunocomprometidos e a taxonomia complexa e imprecisa, aplicada ao grupo, justificam o mapeamento e inferências evolutivas a partir de estudos filogenéticos, com o objetivo de ampliar os conhecimentos da biodiversidade da Família e permitir o entendimento de processos evolutivos dentro desta (Souza et al. 1974, 1980; Lopes et al. 1981; Dedet et al. 1995, Jiménez et al. 1996; Dedet e Pratlong, 2000; Momen 2001; Chicharro e Alvar,

2003; d'Avila-Levy et al. 2003, 2005a, 2006a; Elias et al. 2006; Nogueira de Melo et al. 2006; Yurchenko et al. 2006).

## 1.2 Tripanossomatídeos monoxênicos

Burnett (1851) foi um dos pioneiros no estudo de tripanossomatídeos de insetos, mas os primeiros gêneros, *Leptomonas* e *Herpetomonas*, só foram descritos em 1880 por William Saville-Kent. Os tripanossomatídeos monoxênicos foram denominados, por muitos anos, “tripanossomatídeos inferiores” devido a sua incapacidade de interação com hospedeiros mamíferos, e a crença de que, dentre os tripanossomatídeos, esses representavam o grupo mais primitivo da Família e por este motivo “menos evoluídos” (Vickerman, 1994; Simpson et al., 2006). Atualmente a hipótese de um ancestral capaz de infectar inicialmente insetos parece ser mais favorecida, uma vez que as árvores filogenéticas, geradas por múltiplas proteínas codificadas pelo núcleo, indicam que os gêneros *Leishmania* e *Phytomonas* estão agrupados dentro de um clado, que inicialmente era constituído por gêneros monoxênicos. Conjugado a este fato está a descoberta de um flebotomíneo fossilizado em âmbar datando de 220 milhões de anos, no interior do qual foi encontrada uma quantidade substancial de flagelados parecidos morfologicamente com *Leishmania*, além de células sanguíneas vermelhas nucleadas (Poinar e Poinar, 2004). Sendo assim, a justificativa mais plausível para a evolução do parasitismo dixênico, típico de tripanossomatídeos heteroxênicos, postularia que um ancestral de *Leishmania*, parasito de insetos que se alimentavam de sangue, teria sido injetado acidentalmente em um vertebrado durante um repasto sanguíneo e se adaptado ao novo ambiente apresentado (Flegontov et al., 2013).

Os tripanossomatídeos que realizam seu ciclo de vida exclusivamente em insetos constituem o maior segmento da Família, sendo encontrados, em sua grande maioria, em insetos das ordens Diptera e Hemiptera. Nesta interação, os parasitos não são patogênicos a seus hospedeiros, seu desenvolvimento ocorre no trato digestório e sua transmissão a outros insetos se dá por coprofagia e/ou predação (Hoare 1972; Wallace 1966; Camargo 1998). Aparentemente, o que facilitaria e aumentaria as chances de estabelecimento de novas interações parasito-

hospedeiro nesse grupo seria o baixo nível de especificidade e o alto nível de variabilidade genética e fisiológica desses flagelados, o que também proporcionaria maior possibilidade de infecções não específicas (Podlipaev e Bulat, 1998; Bulat et al., 1999; Podlipaev, 2000). Com isso, de certo modo, tais interações ocorreriam de uma forma ocasional, e por esse motivo uma mesma espécie é capaz de interagir com mais de uma espécie de inseto, e da mesma forma, um mesmo inseto pode ser colonizado por diversas espécies de tripanossomatídeos (Momen 2001, Podlipaev 2001).

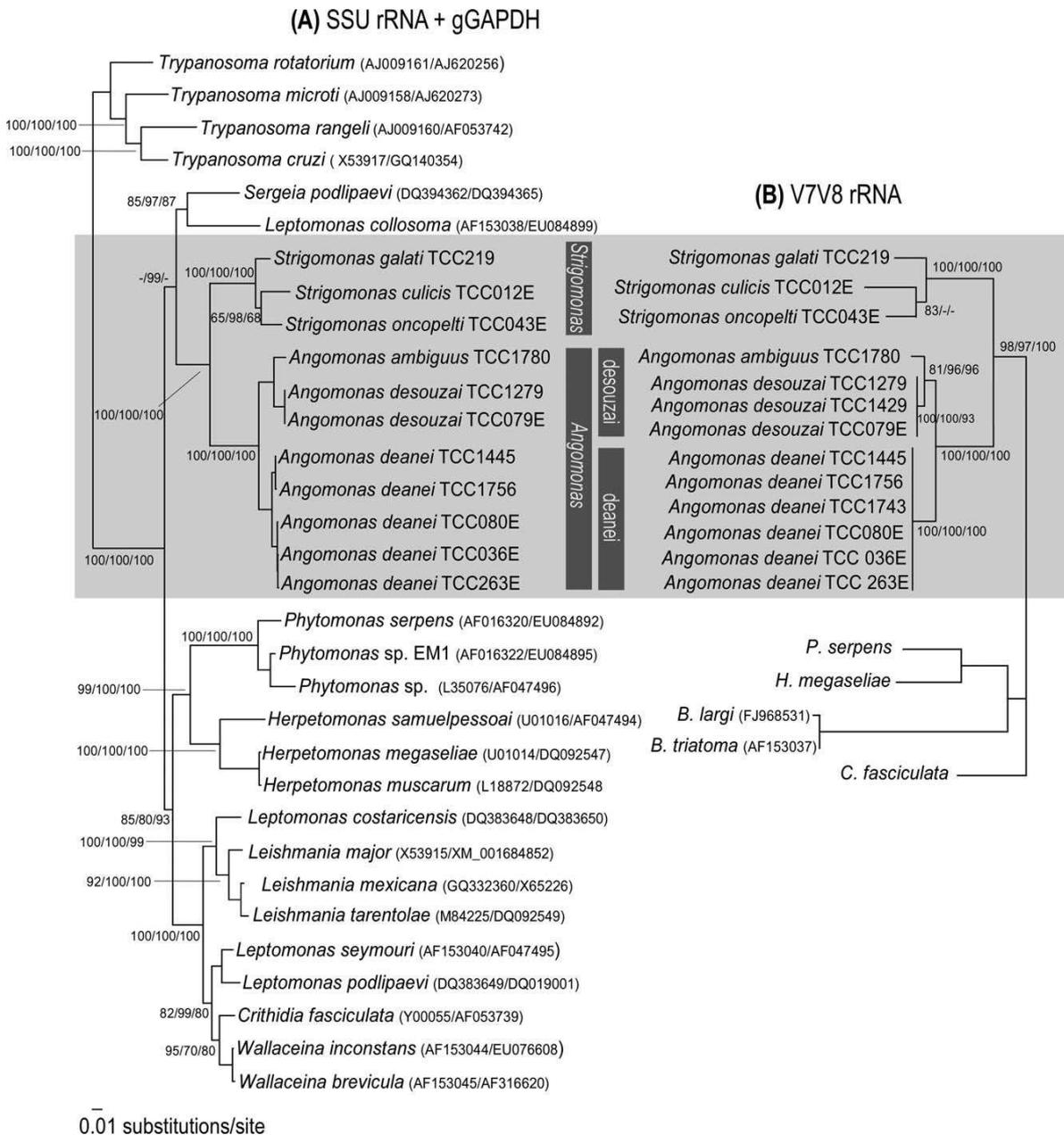
A segregação desses protozoários nas ordens de insetos é aleatória, e pouco se sabe acerca de sua real distribuição e especificidade. Em parte, a falta de informação está relacionada à grande diversidade de insetos na natureza, associada à falta de interesse em descrever seus parasitos. Podlipaev (2001) estimou que de mais de um milhão de espécies de insetos conhecidas, apenas 2.500 foram, até o momento, estudadas por parasitologistas. Dentro da ordem Hemiptera, das 23.000 espécies conhecidas, em menos de 600 foram feitas buscas prospectivas por flagelados (Teixeira et al., 2000). Sendo assim, a maior parte dos tripanossomatídeos monoxênicos ainda espera ser descoberta.

A maioria dos tripanossomatídeos descritos na literatura é encontrada em insetos, porém, contraditoriamente ao grande número de relatos, sua descrição não é válida para uso em pesquisa. Nestes relatos, muitas vezes pouco discriminatórios, faltam dados que permitam a comparação de parasitos isolados, ocorrendo até mesmo grandes dificuldades de correlação entre isolados descritos previamente e recém-descobertos (Podlipaev e Lobanov, 1996). As mais de 300 descrições de tripanossomatídeos contêm muitos sinônimos e organismos dúbios. Dessa forma, não mais que 40 isolados, obtidos de uma gama limitada de hospedeiros e localidades, foram bem caracterizados (Podlipaev, 1990; Podlipaev, 2000; Chandler e James, 2013; Votýpka et al., 2013; Týč et al., 2013).

Conjuntamente, esses fatos colaboram para a dificuldade de determinação de uma taxonomia eficiente da Família Trypanosomatidae. Estudos filogenéticos recentes propuseram novas organizações e surgimento de novos *clusters* e gêneros, como o caso do *cluster* dos tripanossomatídeos que albergam endossimbiontes e dos gêneros *Angomonas* e *Strigomonas* (**Figura 1.2**) (Teixeira et al., 2011).

Na árvore evolutiva da Família, os tripanossomatídeos de insetos compreendem a maior diversidade de espécies. Logo, quanto mais

tripanosomatídeos de insetos em estudo, melhor será a qualidade das árvores taxonômicas, possibilitando o surgimento de novos *clusters* e/ou linhagens.

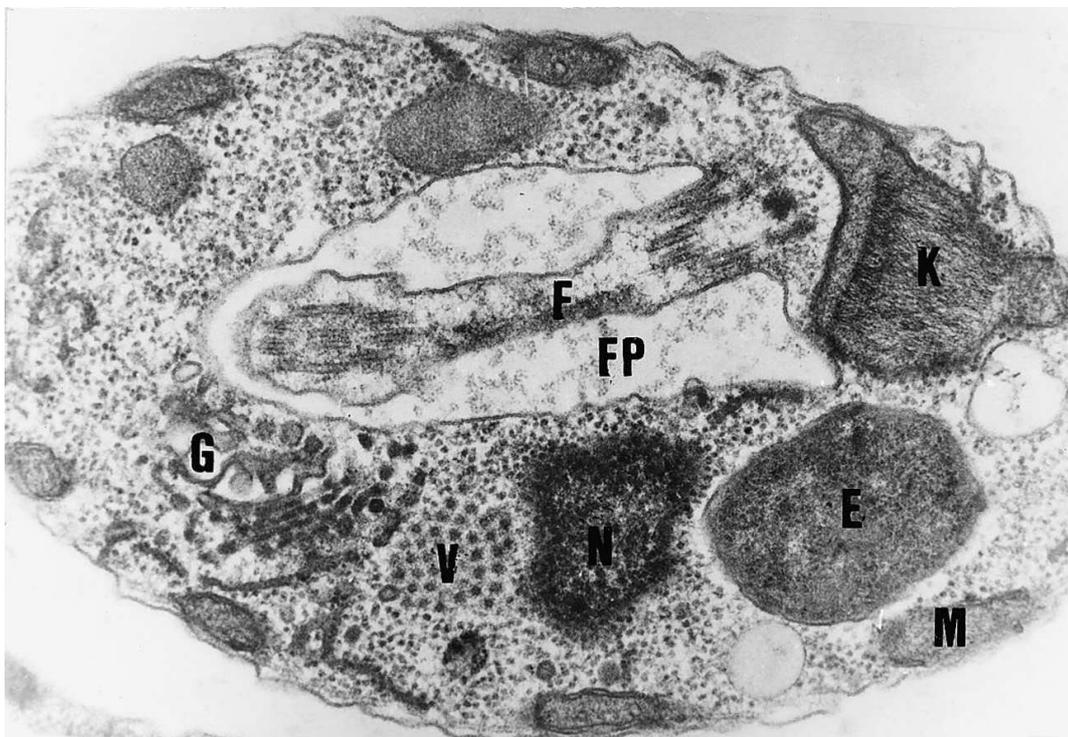


**Figura 1.2 - Árvore filogenética dos tripanosomatídeos que albergam simbioses.**

Filogenia inferida pela análise de máxima verossimilhança baseada nas sequências, conjuntas, dos (A) genes SSU rRNA e gGAPDH e (B) V7/V8, região do rRNA (Teixeira, *et al.* 2011).

### 1.3 Simbiose na Família Trypanosomatidae

Algumas espécies de tripanossomatídeos monoxênicos podem apresentar em seu citoplasma uma bactéria simbiótica, que se encontra em total integração com a fisiologia do protozoário (**Figura 1.3**). Este endossimbionte divide-se sincronicamente com o hospedeiro, nunca ultrapassando a proporção de uma ou duas bactérias por protozoário (Motta et al., 2004). As espécies de tripanossomatídeos isolados de hospedeiros invertebrados e que albergam endossimbiontes, identificadas até o ano de 2010, foram: *Crithidia desouzai*, *Crithidia oncopelti*, *Crithidia deanei*, *Herpetomonas roitmani* e *Blastocrithidia culicis* (de Souza & Motta, 1999).



**Figura 1.3 - Microscopia eletrônica de transmissão de *Angomonas desouzai*.**

Destaques para o flagelo (F), a bolsa flagelar (FP), o cinetoplasto (K), o Golgi (G), o núcleo (N), a mitocôndria (M), as partículas vírus-símiles (V) e um endossimbionte (E) (De Souza e Motta, 1999).

Recentemente, aliando taxonomia molecular aos métodos clássicos, Teixeira e colaboradores (2011) confirmaram uma nova classificação taxonômica para os tripanossomatídeos que albergam endossimbiontes (**Tabela 1.1**). Nesta classificação, as espécies estão alocadas em dois novos gêneros: *Strigomonas* e *Angomonas*. O primeiro gênero é formado por *Strigomonas culicis*, *Strigomonas oncopelti* e uma nova espécie, *Strigomonas galati*. Já no gênero *Angomonas* encontram-se as espécies *Angomonas deanei*, *Angomonas desouzai* e a nova espécie *Angomonas ambiguus*. Tendo em vista que o seqüenciamento de RNA de subunidade ribossomal menor (RNAr SSU) revelou 100% de identidade entre as espécies *Crithidia deanei* e *Herpetomonas roitmani*, ambas foram reclassificadas como *Angomonas deanei* (Teixeira et al., 2011) (**Tabela 1.1**).

**Tabela 1.1- Classificação dos tripanossomatídeos que albergam simbiote.**

Original		Atualizada	
Gênero	Espécie	Espécie	Gênero
<i>Herpetomonas</i>	<i>H. roitmani</i>	<i>A. deanei</i> <sup>a</sup>	<i>Angomonas</i>
<i>Crithidia</i>	<i>C. deanei</i>		
	<i>C. desouzai</i>	<i>A. desouzai</i>	
	-	<i>A. ambiguus</i> <sup>b</sup>	
<i>Blastocrithidia</i>	<i>C. oncopelti</i>	<i>S. oncopelti</i>	<i>Strigomonas</i>
	<i>B. culicis</i>	<i>S. culicis</i>	
	-	<i>S. galati</i> <sup>b</sup>	

a – As espécies *H. roitmani* e *C. deanei* foram reclassificadas como *A. deanei*; b – novas espécies.

Os endossimbiontes foram inicialmente descritos em *S. culicis* por Novey e colaboradores em 1907, como diplossomos. Em 1957, Newton e Horne também observaram a presença de estruturas similares em *S. oncopelti*, denominando-as de “corpos bipolares”. Observações posteriores comprovaram a presença de DNA, similar ao de bactérias, nestas estruturas. Isto levantou a hipótese de que tais “corpos” seriam na verdade bactérias que teriam entrado na célula em um determinado momento da evolução e se adaptado, vivendo em processo de simbiose com o hospedeiro (Marmur et al., 1963). A natureza bacteriana do simbionte foi corroborada posteriormente por experimentos realizados por Bruesk nos quais, após tratamento com o antibiótico cloranfenicol, tais tripanossomatídeos perdiam o simbionte, sendo estas cepas denominadas “curadas” ou apossimbióticas (Bruesk, 1967).

Apesar de procedimentos para o isolamento do simbionte terem sido desenvolvidos, constatou-se que o mesmo só é capaz de sobreviver fora de seu hospedeiro por apenas algumas horas, demonstrando uma total integração e dependência do tripanossomatídeo (De Souza & Motta, 1999; Tuan e Chang, 1975; Novak et al., 1988). O sequenciamento da subunidade 16S RNAr de simbiontes isolados de *A. deanei* e *S. culicis* demonstrou alta similaridade, de ambos, com a bactéria *Bordetella bronchiseptica*, espécie pertencente à Família Alcaligenaceae da divisão das  $\beta$ -Proteobactérias. As espécies bacterianas isoladas de cada um dos parasitos foram denominadas *Candidatus Kinetoplastibacterium crithidii* e *Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii*, respectivamente. Dados moleculares indicam que o conteúdo genômico é altamente reduzido em ambos os simbiontes, indicando a perda de genes e/ou fenômenos de transferência ao núcleo do hospedeiro. Estes dados associados aos dados moleculares oriundos da análise de sequências de RNAr 16S e 18S dos endossimbiontes e seus hospedeiros protozoários, respectivamente, sugerem que um único evento evolutivo deu origem a todos os tripanossomatídeos que albergam simbionte, da mesma forma como ocorreu para a formação das mitocôndrias, envolvendo a aquisição de uma bactéria por um hospedeiro ancestral, e posterior co-evolução para diferentes espécies (Du et al, 1994a,b; Hollar et al., 1998; Teixeira et al, 2011; Motta et al, 2013).

É possível que esses simbiontes estejam em processo de evolução rumo a uma nova organela, capaz de fornecer fatores essenciais ao hospedeiro, como é o caso do ocorrido com a mitocôndria e os plastídeos (Margulis, 1981; Timmis et al.,

2004). Diversas evidências indicam para esta direção evolutiva, tais como: (1) a sincronia de divisão do parasito e da bactéria (2) a presença de uma parede celular reduzida e a não formação do anel Z durante a divisão do simbiote (Motta et al., 2004); (3) a presença de uma membrana dupla envolvendo o simbiote, como ocorre em bactérias, tendo como fosfolípidos majoritários a cardiolipina e a fosfatidilcolina, já descrita como principal componente de membrana em bactérias intracelulares obrigatórias (de Azevedo-Martins, 2007); (4) a identificação de porinas, canais aquosos, com estrutura e filogenia similares aos descritos para bactérias Gram-negativas, na membrana do endossimbiote (Andrade et al., 2007).

Tais evidências contribuem para a constatação de que o endossimbiote de tripanossomatídeos apresenta características de organela e de bactéria, representando um passo evolutivo intermediário de uma organela, tornando-o um interessante modelo para o estudo da evolução celular em tripanossomatídeos.

Em associações simbióticas obrigatórias, é natural que os dois organismos se beneficiem desta relação. O simbiote possui enzimas e precursores metabólitos que complementam vias de síntese essenciais do protozoário. Mas o inverso também ocorre, sendo o hospedeiro responsável por prover ao simbiote condições físico-químicas ideais e parte do ATP necessário para a sua manutenção (revisto por Motta 2010).

Dentre as vantagens conferidas ao protozoário, já foi demonstrado que espécies que contêm o endossimbiote apresentam um requerimento nutricional simples, não sendo necessária a adição de vitaminas e derivados de heme ao meio de cultura, enquanto cepas “curadas” são mais exigentes nutricionalmente. Os endossimbiontes contribuem com algumas vias bioquímicas, auxiliando a célula hospedeira a suprir carências nutricionais. O exemplo mais notável é a ineficácia dos tripanossomatídeos, em geral, de sintetizar o grupo tetrapirrol, necessitando da adição de heme, hematina ou hemoglobina em seu meio de cultivo, necessidade esta inexistente em espécies que albergam simbiotes, uma vez que o simbiote possui as enzimas necessárias para produção de precursores que complementam a rota biossintética de heme. Dados bioquímicos e moleculares confirmam que a biossíntese de heme é basicamente realizada pelo simbiote, sendo apenas as últimas três etapas realizadas pelo protozoário, o que indica que eventos de transferência lateral e perda de genes aconteceram no tripanossomatídeo (Alves et al., 2011; Motta et al., 2013).

O endossimbionte é capaz de suprir a célula hospedeira com cofatores enzimáticos, formas finais de vitaminas e aminoácidos e metabólitos intermediários aproveitáveis pelo tripanossomatídeo (revisto por Motta, 2010). De acordo com os dados genômicos gerados por Motta e colaboradores (2013) a bactéria sintetiza histidina, folato, riboflavina e coenzima A, não sendo necessária a adição de nenhuma destas substâncias ao meio de cultura, sugerindo, portanto, que as rotas biossintéticas destes metabólitos são funcionais.

A presença do endossimbionte também está associada a alterações ultraestruturais do hospedeiro, tal como a redução da estrutura paraflagelar. Apesar da complexidade proteica da estrutura flagelar, a estrutura paraflagelar é formada, majoritariamente, pela associação de duas proteínas, PFR1 e PFR2, sendo essa associação fundamental para o devido funcionamento do flagelo, afetando diretamente o processo de divisão celular (em tripanossomatídeos a reprodução celular por fissão binária é iniciada pelo flagelo), a movimentação do protozoário, e a sua capacidade de interagir com o hospedeiro (Gadelha et al., 2004). Apesar da essencialidade das funções previamente descritas, alguns parasitos, como espécies monoxênicas que albergam simbionte, apresentam a estrutura paraxial reduzida, porém sua capacidade motora e de adesão ao hospedeiro não é alterada (Holwill, 1965; Freymuller e Camargo, 1981; Fampa et al., 2003). No trabalho de Gadelha e colaboradores (2005) o grupo comprovou a existência de estrutura paraflagelar reduzida e limitada aos primeiros 2/3 do comprimento do flagelo de *A. deanei*, tendo sido identificada, nesta espécie, apenas a proteína PFR1, estando ausente a proteína PFR2. Aparentemente, mesmo não apresentando uma das duas principais proteínas, e do seu tamanho reduzido, a estrutura paraxial mantém sua função em parasitos que albergam simbionte.

Outras alterações estruturais observadas em tripanossomatídeos que albergam simbionte estão relacionadas ao cinetoplasto, à mitocôndria e à rede de microtúbulos subpeliculares. O cinetoplasto apresenta um arranjo menos condensado, a mitocôndria é mais ramificada e os microtúbulos subpeliculares estão ausentes nos pontos da membrana plasmática tocados pelos ramos mitocondriais (Freymuller e Camargo, 1981).

Os endossimbiontes induzem alterações bioquímicas como mudanças na composição dos carboidratos de superfície (Dwyer e Chang, 1976; Esteves, et al., 1982; Faria e Silva et al., 1994; d'Avila-Levy et al., 2005a), na carga de superfície

celular (Oda et al., 1984) e na secreção de enzimas proteolíticas (d'Avila-Levy et al., 2001; d'Avila-Levy et al., 2003; d'Avila-Levy et al., 2005b). Acredita-se que as diferenças nos componentes de superfície entre as cepas apossimbiótica e selvagem de uma mesma espécie de tripanossomatídeo possam ser influenciadas pelo endossimbionte (Dwyer e Chang, 1976; Esteves, et al., 1982; Faria e Silva et al., 1994; d'Avila-Levy et al., 2005a,b). Tais alterações influenciam diretamente a interação parasito-hospedeiro, já tendo sido demonstrado que tripanossomatídeos que possuem o endossimbionte interagem com maior eficácia com células de insetos. Além disso, apenas a cepa selvagem de *S. culicis* é capaz de colonizar *in vivo* o mosquito *Aedes aegypti*, o que reforça o caráter mutualístico desta relação (Correa-da-Silva et al., 2006).

Recentemente, a capacidade de cepas selvagens de *S. culicis* e *A. deanei* de infectar macrófagos e fibroblastos foi mais uma vez comprovada, mostrando que cepas com simbiote são mais infectivas que cepas apossimbióticas (Barreto-de-Souza et al., 2008; Matteoli et al., 2009). O mecanismo de ação detalhado para esse fenômeno ainda é desconhecido; porém, já é sabido que as peptidases gp63 e cruzipaina são expressas diferencialmente em cepas selvagem e curada de *S. culicis*, ocorrendo o mesmo, para gp63 nas cepas de *A. deanei* (d'Avila-Levy et al., 2008; d'Avila-Levy et al., 2006; d'Avila-Levy et al., 2005), o que ajudaria a explicar a maior capacidade das cepas selvagens em aderir a células epiteliais do intestino de *A. aegypti* (d'Avila-Levy et al., 2008; d'Avila-Levy et al., 2006) e de infectar fibroblastos (Matteoli et al., 2009). Porém nestes estudos a incapacidade de inibição por completo do processo de interação indica que outras proteínas devem atuar neste processo.

Ao que tudo indica, diferentes características de superfície celular, de cepas apossimbiótica e selvagem, poderiam colaborar para a habilidade da espécie em interagir e colonizar possíveis hospedeiros, como por exemplo, peptidases, carga e carboidratos de superfície (Dwyer e Chang, 1976; Esteves et al., 1982; Oda et al., 1984; d'Avila-Levy, 2005b).

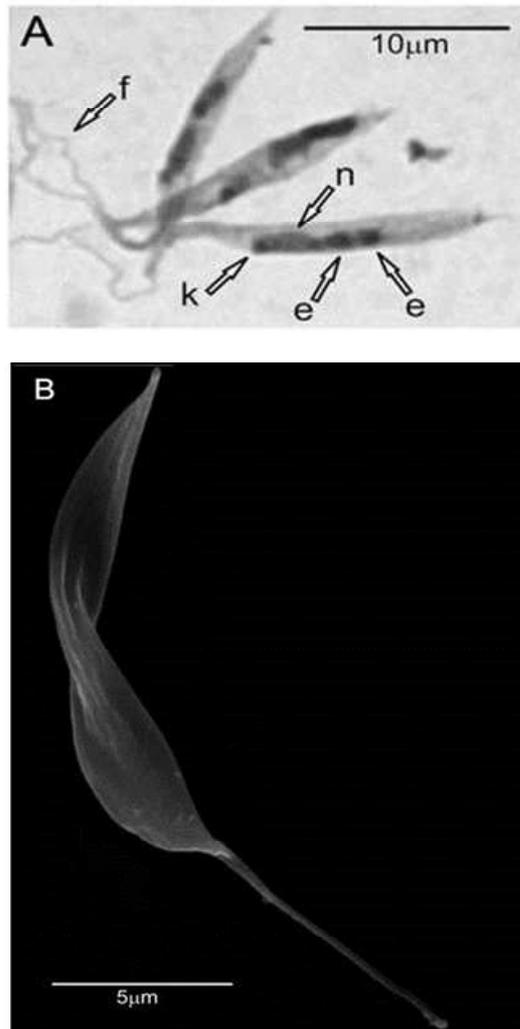
### 1.3.1 *Strigomonas culicis*

*S. culicis*, anteriormente denominada *Blastocrithidia culicis* (Teixeira et al. 2011; **Tabela 1.1**), é uma espécie de tripanossomatídeo monoxênico capaz de infectar insetos tanto da ordem Diptera quanto Hemiptera, sendo considerada uma espécie promíscua tendo em vista sua ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em insetos nas Américas e na Europa, e distintos hospedeiros, como, por exemplo, os mosquitos *Aedes vexans*, *Culex pipens*, *Mansonia richardii* e *Anopheles maculipennis* (Wallace, 1966; Maslov et al., 2013).

O gênero *Blastocrithidia* é formado por um grande número de espécies. Segundo Manzine e colaboradores (2006) mais de 30 espécies são reconhecidas e apresentam corpo celular com tamanho variando de 10 a 50  $\mu\text{m}$  e flagelos com 5 a 12  $\mu\text{m}$  de comprimento. Apesar da forma predominante ser a epimastigota, é possível encontrar grande diversidade de morfotipos em cultura, incluindo a forma tripomastigota (Souza, 1994).

Como mencionado previamente, a mudança de gênero é explicada por análises filogenéticas mais recentes, as quais posicionam os tripanossomatídeos que albergam endossimbiontes em um *cluster* único, subdividido em dois clados, *Angomonas* e *Strigomonas*, separando a espécie *S. culicis* de outras espécies do gênero *Blastocrithidia*. O mesmo ocorreu para espécies dos gêneros *Crithidia* e *Herpetomonas*, que albergam simbiossomas, evidenciando a polifilia desses gêneros (Teixeira et al., 2011).

O trabalho de Teixeira e colaboradores (2011) descreve detalhadamente as características do gênero *Strigomonas*, o qual passou a ser representado por três espécies: *S. culicis*, *S. oncolpelti* e *S. galati*. Microscopias óptica e eletrônica revelam grande polimorfismo em formas oriundas de cultura, as quais apresentam pequena membrana ondulante em *S. culicis*, sendo os tripanossomatídeos dessa espécie os mais alongados do gênero, apresentando média de  $19,3 \pm 2,82 \mu\text{m}$  para comprimento de corpo celular, e  $7,0 \pm 1,8 \mu\text{m}$  de flagelo livre. Com auxílio da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que parasitos desse gênero apresentam corpos celulares torcidos e com estriações em sua superfície e o flagelo frequentemente exibe uma lamela, localizada próxima ao ponto de emergência da bolsa flagelar (**Figura 1.4**).



**Figura 1.4 - Microscopia óptica e eletrônica de varredura da espécie *S. culicis*.**

Destaque para o endossimbionte indicado em A (microscopia óptica). Núcleo (n), cinetoplasto (k), endossimbionte (e) e flagelo (f) (Teixeira et al., 2011).

Características bioquímicas de *S. culicis* começaram a ser estudadas em 1967, porém estudos comparativos entre cepas apossimbiótica e selvagem foram iniciados em 1974 por Chang. Neste trabalho, comparações ultraestruturais foram realizadas após tratar a cepa selvagem com antibióticos, promovendo um processo de eliminação de seu endossimbionte e gerando, desta forma, a primeira cepa “curada” ou apossimbiótica. No ano seguinte, o mesmo autor em parceria com Tuan desenvolveu uma metodologia de isolamento do endossimbionte de *S. culicis* através de etapas de lise mediada por ação de complemento e centrifugações diferenciais (Tuan e Chang, 1975). Análises ultraestruturais revelaram uma mitocôndria com maior número de ramificações e pontos de interação com a membrana plasmática, local no qual ocorre ausência pontual da rede de microtúbulos subpeliculares, característica incomum aos tripanossomatídeos que não alberguem simbioses (Freytmüller e Camargo, 1981).

No início do século XXI, diversos estudos começaram a detalhar processos de interação desta espécie com hospedeiros invertebrados, rotas metabólicas compartilhadas entre o tripanossomatídeo e o simbiote, bem como o processo de divisão celular, o qual, como previamente descrito, ocorre em total sincronia entre os dois organismos.

Dentre os diversos trabalhos publicados visando comprovar a origem bacteriana do simbiote, Motta e colaboradores (2004) descreveram a identificação da proteína FtsZ em cepas selvagens de tripanossomatídeos que albergam simbioses e em seus simbioses isolados. FtsZ é uma proteína homóloga à tubulina de células eucarióticas, a qual possui função essencial no processo de divisão celular bacteriana. Durante o processo de divisão bacteriana a proteína FtsZ atua formando um anel no ponto onde futuramente estará localizado o septo de divisão, sendo um sítio de ancoragem de outras proteínas atuantes no processo. Brum e colaboradores (2014) descreveram detalhadamente o processo de divisão celular de *S. culicis*. Este processo é iniciado pela duplicação do corpo basal seguido do crescimento do flagelo, segregação do cinetoplasto e processo de segregação cromossomal. O simbiote de *S. culicis*, durante o processo de divisão do protozoário, sofre alterações de tamanho e forma, e apesar de ser possível observar facilmente, por microscopia confocal e eletrônica de transmissão, o desenvolvimento de uma constrição em seu corpo celular, o mesmo não apresenta a estrutura clássica de septo e anéis presentes em bactérias. Diferentemente da descrição

anterior para *A. deanei*, para a qual o simbiote apresenta forma de haltere, o simbiote de *S. culicis* apresenta forma mais alongada e seu posicionamento no interior do protozoário varia a cada etapa do ciclo de divisão, sendo necessário um contato íntimo com o núcleo para que ocorra sua divisão. Após a divisão do simbiote ocorre, aparentemente ao mesmo tempo, a divisão do cinetoplasto e do núcleo (Motta et al., 2010; Brum et al., 2014).

d'Avila-Levy (2005) e colaboradores compararam os perfis proteolíticos em gel de poliacrilamida de peptidases secretadas e associadas à membrana de cepas selvagem e apossimbiótica. Apesar de não ter sido observada alteração qualitativa foi possível observar um aumento na atividade proteolítica na cepa apossimbiótica. É interessante notar que apesar de *S. culicis* não ser classicamente patogênica a indivíduos humanos saudáveis e de estar filogeneticamente distante de *T. cruzi* e *Leishmania* sp., ela possui estruturas de superfície e características imunogênicas similares a estes tripanossomatídeos. Uma das características mais marcantes é a presença de homólogos de cruzipaina e gp63, fatores de virulência característicos de *T. cruzi* e *Leishmania*, respectivamente (d'Avila-Levy et al., 2005).

Além do aumento da atividade proteolítica, cepas apossimbiótica também apresentam maior exposição de resíduos de ácido siálico e menores índices de adesão a células intestinais explantadas de *Aedes aegypti*, o que sugere que a perda do simbiote interfere na modulação dessas moléculas, gerando uma superfície majoritariamente negativa, que interferiria na capacidade de adesão e interação com o epitélio intestinal do inseto hospedeiro (d'Avila-Levy et al., 2005b). Fampa e colaboradores (2003), avaliaram a capacidade de interação do par selvagem e curado de *S. culicis* com diferentes culturas de células intestinais de mosquitos e flebotomíneos. Neste trabalho, dentre os monoxênicos analisados o que apresentou maiores índices de associação com as células foi *S. culicis*, sendo capaz de interagir com células de *Anopheles gambiae*, *Lutzomia longipalpis* e *Anopheles albopictus*. Diferenças marcantes nos índices de adesão foram observadas ao comparar cepa apossimbiótica e selvagem, havendo uma redução de 55% na capacidade de adesão da cepa curada, sendo os mesmos resultados corroborados em ensaios com intestinos explantados. Além da capacidade de interação, após processo de alimentação dos insetos com solução açucarada contendo *S. culicis*, os autores constataram aumento no número celular no decorrer dos dias pós-infecção, considerando este um processo de colonização do intestino pela cepa selvagem,

enquanto rapidamente, em um período de 24 horas, se abolia a cepa apossimbiótica do intestino (Correa-da-Silva, et al. 2006).

Apesar de ainda não existir uma descrição do ciclo de vida da espécie *S. culicis* em mosquitos, em sua interação com a espécie *A. aegypti* já foi demonstrada que após a infecção ocorre colonização do trato digestivo, invasão do epitélio intestinal e posterior detecção dos protozoários na hemolinfa. Apesar de *in vitro* ser possível a adesão às glândulas salivares, ainda não se sabe se *in vivo* indivíduos que alcançam a hemolinfa seriam capazes de infectar as glândulas salivares do mosquito, o que permitiria, possivelmente, sua transmissão para um hospedeiro vertebrado (Corrêa-da-Silva et al., 2006; Nascimento et al., 2010).

Ainda explorando o contexto de interação com hospedeiros invertebrados, a atividade ecto-fosfatásica foi recentemente inferida como mais uma das variáveis que poderia explicar as diferentes capacidades de interação e colonização das cepas de *S. culicis*. O trabalho recentemente publicado por Catta-Preta e colaboradores (2013) relata o efeito do simbiote na atividade ecto-fosfatásica do tripanossomatídeo, indicando que sua presença aumenta essa atividade. Apesar de ainda não existir um papel biológico classicamente definido para essas enzimas em protozoários, o trabalho aponta um papel fundamental no processo de interação com a célula hospedeira, no qual após inibir a atividade no tripanossomatídeo, este se torna incapaz de aderir ao epitélio, configurando, desta forma, uma função essencial das fosfotirosina fosfatases na interação *S. culicis* - *A. aegypti*. O grupo discute duas hipóteses, não excludentes, de trabalho para explicar o mecanismo de ação do fenômeno observado: (1) a remoção dos grupamentos fosfato, com consequente atenuação da repulsão eletrostática entre as células e/ou indução de mudanças conformacionais de superfície, resultaria em exposição de sítios de adesão adicionais; (2) a atuação da própria enzima como entidade ligadora, promoveria diretamente a interação e ligação das duas células.

Recentemente o genoma de *S. culicis* e de seu simbiote, bem como o conteúdo proteico predito, foi identificado por Motta e colaboradores (2013). O grupo identificou a presença de 12.157 e 769 quadros de leitura, respectivamente nos genomas de *S. culicis* e de sua bactéria simbiote.

As principais diferenças gênicas observadas no genoma de *S. culicis*, quando comparada a *L. major*, estão relacionadas a genes que codificam proteínas de citoesqueleto, cinetoplasto e estrutura paraflagelar, enquanto que as funções

constitutivas se mostraram conservadas. Um grande número de genes para calpaínas símile citosólicas e gp63 de superfície foi identificado, sendo observado um baixo número de genes associados a cisteíno peptidases de compartimentos celulares, o que poderia estar relacionado à adaptação à presença do simbiote. O genoma do simbiote indicou a presença de enzimas que complementam rotas biossintéticas de aminoácidos, lipídeos e purinas/pirimidinas (Motta et al., 2013).

#### 1.4 Tecnologia proteômica

O termo proteoma foi inicialmente apresentado à comunidade científica em 1994 por Marc Wilkins durante uma conferência, porém o primeiro artigo a utilizar o termo só foi publicado em 1995 (Wasinger et al., 1995). Naquele momento o termo era utilizado para descrever todo o conteúdo de proteínas expresso por uma célula, ou todo o equivalente de um genoma, sendo atualmente estendido para proteínas que sofrem *splicing* alternativo e proteínas modificadas pós-traducionalmente, sintetizadas por tipos celulares específicos, tecidos ou até mesmo estágios de desenvolvimento (Twyman, 2014).

O proteoma, por definição, é dinâmico, tendo em vista a grande variabilidade que o conjunto de proteínas de uma célula sofre quando esta é submetida a diferentes estímulos, como condições nutricionais, ambientais e de estresse, e que as proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais, translocações dentro da célula, ter sua síntese alterada, e até mesmo sofrer degradação. A determinação do proteoma de uma célula representa o reflexo do momento no qual o estudo foi realizado, sob condições experimentais previamente determinadas (Graves e Haystead, 2002).

O sequenciamento em larga escala do DNA de diversas espécies, e a publicação de genomas completos, promoveu uma mudança drástica nas pesquisas biológicas. O que antes era feito utilizando um foco reducionista, no qual a única maneira de estudar um sistema biológico era subdividindo este em seus componentes, para posteriormente analisá-los individualmente, deduzindo sua participação no sistema e inferindo como este funcionava, foi se transformando aos poucos no que hoje conhecemos como biologia de sistemas. No estudo de proteínas, abordagens direcionadas eram, e ainda são, muito utilizadas para

quantificar a abundância e localizar proteínas de interesse, sendo as técnicas de *Western blot* e microscopia as mais amplamente utilizadas, quando disponíveis anticorpos ou versões marcadas da proteína alvo (Walther e Mann, 2010; Twyman, 2014).

No entanto, a informação dos componentes gênicos de um organismo por si só não é capaz de explicar todas as variações fenotípicas observadas. O estudo da expressão das proteínas através da análise de RNA mensageiros (transcriptômica) apesar de promissor, uma vez que revela o padrão predito de expressão de proteínas, nem sempre traduz correlações diretas entre o conteúdo de RNAm e os níveis de proteínas efetivamente expressas, uma vez que esses níveis são determinados por processos pós-traducionais complexos, podendo ser alterados a qualquer momento (Anderson e Seilhamer, 1997; Abbott, 1999; Gygi et al., 1999; Walther e Mann, 2010; Cox e Mann, 2011;).

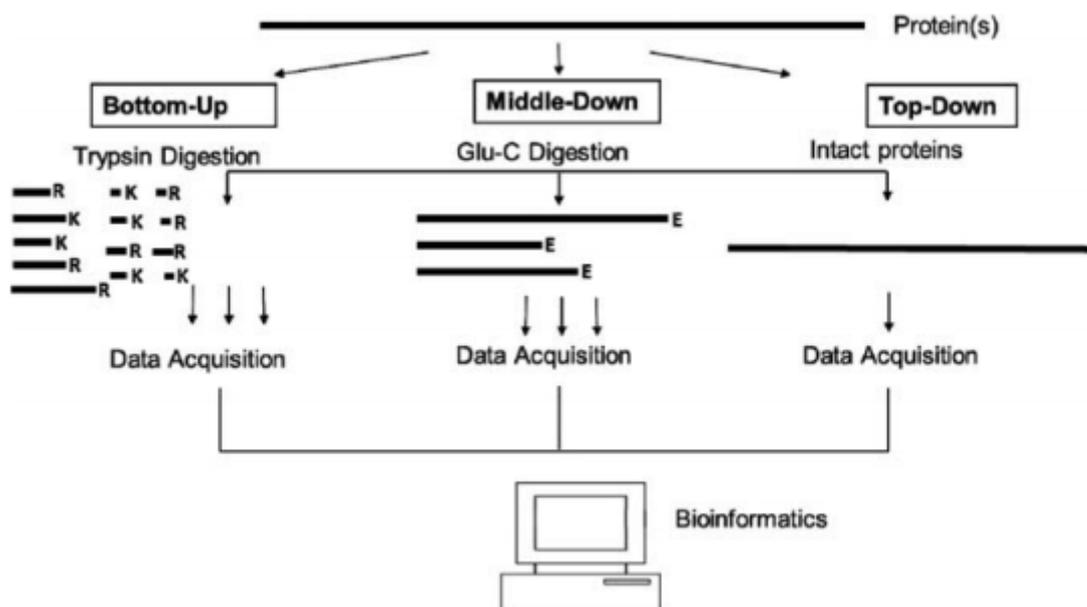
A proteômica apareceu como uma fonte rica em informações, quando comparada à genômica, uma vez que as proteínas estão envolvidas na maioria das atividades biológicas e apresentam propriedades diversas, favorecendo o entendimento de um sistema. Desse modo, o estudo de proteínas que, na era pré-genômica, era reduzido a poucas por projeto, sendo suas identificações baseadas em sequenciamento pelo método de degradação de Edman, passou a ser realizado em larga escala na era pós-genômica, o que alavancou a proteômica (Wilkins et al., 1995; Graves e Haystead, 2002; Patterson e Aebersold, 2003).

Idealmente, a proteômica permite o estudo simultâneo de todas as proteínas em uma unidade biológica, sendo possível descrever cada proteína que compõe um sistema (proteômica descritiva), determinar a abundância de proteínas (proteômica quantitativa), variações dependentes do genoma (proteômica de populações), modificações induzidas pelo ambiente ou pelo desenvolvimento celular (proteômica diferencial ou comparativa), modificações pós-traducionais e interações com outras proteínas, sendo possível, até mesmo, prever suas funções biológicas (Fields, 2001; Zhu et al., 2003; revisto por Valledor e Jorrín, 2011).

As abordagens “ômicas” fazem parte da chamada “ciência dirigida por descoberta”, a qual é baseada na investigação do sistema biológico, ou de seus processos, pela enumeração dos elementos do sistema, não sendo dependente de hipóteses ou do conhecimento da funcionalidade do sistema. Assim sendo, o objetivo da tecnologia proteômica é obter uma visão global e integrada da biologia

celular, estudando todas as proteínas de uma célula ao invés de analisá-las uma de cada vez (Graves e Haystead, 2002).

Dessa forma, estudos proteômicos podem utilizar três abordagens para a identificação de proteínas em uma amostra: *bottom-up*, *middle-down* e *top-down* (revisto por Han et al., 2008; revisto por Bruce et al., 2013). Na abordagem mais utilizada, *bottom-up*, um extrato bruto ou frações de uma amostra, são submetidos a processo de clivagem enzimática, seguido de sequenciamento dos peptídeos gerados por espectrometria de massas (MS). Na abordagem *top-down*, uma tecnologia ainda em desenvolvimento, a amostra de proteínas é submetida diretamente à análise por MS, ocorrendo, inicialmente, a determinação da massa molecular da proteína de interesse, ou de cada um dos componentes da amostra biológica, seguida de etapas de fragmentação da proteína. Quando não é possível o uso desta abordagem, utiliza-se a abordagem *middle-down*, na qual as proteínas são clivadas enzimaticamente em peptídeos maiores e depois identificadas por MS (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5 - Abordagens proteômicas.**

A identificação de uma proteína por espectrometria de massas pode ser realizada após clivagem enzimática, utilizando abordagem *bottom-up* e *middle-down*, ou, na ausência de clivagem, como ocorre na *top-down*. Na abordagem *bottom-up* as proteínas são clivadas por ação da tripsina (protease mais utilizada nesta abordagem), gerando peptídeos pequenos. Na abordagem *middle-up* enzimas específicas são utilizadas (como Gluc-C), gerando peptídeos maiores.

A identificação automatizada de proteínas pode ser realizada por ao menos duas abordagens. A primeira metodologia se baseia no conceito de que para cada proteína, podemos criar um mapa de massas, ou uma digital de massas de peptídeos (PMF – *peptide mass fingerprint*). Dessa forma, proteínas que apresentem distintos conjuntos de aminoácidos em sua sequência irão, após ação de uma peptidase, gerar grupos de peptídeos com massas específicas, como uma digital. Estas massas são então comparadas às massas teóricas de peptídeos gerados pela digestão *in silico* das proteínas de um banco de dados com a mesma peptidase usada experimentalmente (Aebersold e Goodlett, 2001; Aebersold e Mann, 2003; Thiede et al., 2005). Entretanto, a metodologia mais utilizada, denominada *peptide-spectrum match* (PSM), compara espectros MS/MS não interpretados com espectros teóricos gerados a partir da sequência de peptídeos, oriundos de um banco de dados de proteínas. Este método foi inicialmente utilizado por John Yates e Jimmy Eng, desenvolvedores do programa Sequest. Atualmente, diversos algoritmos são capazes de fazer essa comparação. O algoritmo Mascot faz uso dessa metodologia para identificação de proteínas, no qual ocorre a sobreposição dos espectros obtidos com espectros teóricos, utilizando *scores* para classificar os pareamentos encontrados (Eng e Yates, 1994; Perkins et al., 1999; Craig e Beavis, 2004; Sadygov et al., 2004; revisto por Cottrel, 2011, revisto por Junqueira e Carvalho, 2012).

#### 1.4.1 Eletroforese bidimensional (2DE)

Estudos proteômicos que possuem como objetivo determinar o perfil de proteínas de uma amostra complexa, necessitam de metodologias que permitam a redução da sua complexidade, permitindo, desta forma, a separação, detecção e identificação do máximo de proteínas possíveis. Nesse contexto, a eletroforese bidimensional (2DE) foi inicialmente descrita por O'Farrel e Klose em 1975, e mesmo antes do termo proteoma existir, permitiu o início da formação de bancos de dados de proteínas de *Escherichia coli* e camundongo (Klose, 1975; O'Farrel, 1975). A possibilidade de analisar as proteínas de interesse oriundas de um gel bidimensional foi um avanço crucial dentro das análises proteômicas. Nessa metodologia, misturas complexas de proteínas são fracionadas baseadas em dois parâmetros físico-químicos ortogonais: ponto isoelétrico e volume molecular (“tamanho”). Na focalização isoelétrica, primeira etapa da eletroforese bidimensional, as proteínas

são separadas em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente de pH, e migram até atingirem uma posição estacionária, seu ponto isoelétrico. Em seguida, na maioria das abordagens de 2DE, as proteínas são desnaturadas, têm suas pontes dissulfeto reduzidas e as cisteínas alquiladas. O próximo passo é a separação por eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE), como descrita por Laemmli (1970). A combinação das duas dimensões aumenta o poder resolutivo da SDS-PAGE convencional, possibilitando até mesmo a visualização de modificações pós-traducionais, uma vez que tais modificações podem ocasionar alterações na carga e na massa de uma proteína. Em uma SDS-PAGE, um número limitado de bandas pode ser visualizado, ocorrendo, em muitos casos, sobreposição devido à proximidade das massas moleculares relativas de cada proteína que compõe a amostra. Em contrapartida, na 2DE, com a combinação dos dois processos previamente citados, é possível separar até 5.000 proteínas em um único gel (Anderson e Anderson, 1996; Görg et al., 2004, revisto por Rogowska-Wrzesinska et al., 2013).

Ao longo dos anos, a técnica sofreu modificações visando aumentar sua reprodutibilidade. Uma importante modificação foi o desenvolvimento dos géis em forma de tiras contendo gradientes de pH imobilizados (IPG – *immobilized pH gradient*) (Bjellqvist et al., 1982; Görg et al., 1985; Görg et al., 2000; Görg et al., 2009) a partir da co-polimerização da acrilamida com anfólitos, que possuem grupos tamponantes ácidos e básicos (Immobiline™), conjugado aos aperfeiçoamentos das metodologias de preparação de amostras, que constituem: melhoramentos no processo de extração, precipitação da amostra para aumentar a concentração dos seus componentes e eliminação de interferentes, e melhor solubilização das proteínas (Damerval et al., 1986; Rabilloud et al., 1997, Herbert 1999; Rabilloud e Lelong, 2011).

Após a separação eletroforética, os géis são submetidos a etapas de coloração, para visualização das proteínas, a fim de observar o resultado obtido. Diversas metodologias de coloração podem ser utilizadas, e a escolha da metodologia deve ser adequada ao propósito do estudo. A detecção de proteínas pode ser realizada por: corantes orgânicos, coloração por prata e corantes fluorescentes (Candiano et al., 2004; Morrissey, 1981; revisto por Miller et al, 2006; revisto por Rabilloud e Lelong, 2011). As cadeias polipeptídicas são visualizadas como manchas arredondadas (*spots*), podendo ser posteriormente excisadas,

digeridas com auxílio de uma peptidase, e submetidas à identificação por espectrometria de massas. A observação de mapas de proteínas pode refletir mudanças de expressão proteica, presença de isoformas e modificações pós-traducionais, somadas às informações de ponto isoelétrico e massa molecular das proteínas visualizadas. Com a comparação de mapas é possível realizar estudos quantitativos, permitindo a identificação de proteínas diferencialmente abundantes (Görg et al., 2004, revisto por Rogowska-Wrzesinska et al., 2013).

A combinação da eletroforese bidimensional à espectrometria de massas (2DE-MS ou 2DE-MS/MS) pode ser considerada como efetiva para análise de proteomas globais, baseada em sua habilidade para quantificar e identificar milhares de proteínas em um único gel. Porém, já é sabido que classes específicas de proteínas estão sempre ausentes, ou pobremente representadas nos géis. Como exemplos clássicos estão as proteínas nos extremos de pI e de massa molecular, bem como proteínas de membrana (devido ao seu baixo rendimento de extração nas condições químicas utilizadas compatíveis com a focalização isoelétrica). Uma alternativa a essa limitação da metodologia pode ser o uso do fracionamento de amostras biológicas complexas pela cromatografia líquida, seguida da identificação das frações por espectrometria de massas (LC-MS/MS) (Aebersold e Goodlett, 2001).

Apesar das limitações, a técnica se provou extremamente robusta, sendo facilmente reproduzida. Atualmente, o principal problema relacionado a 2DE é a quantidade de amostra necessária, conjugado a este fato os principais fatores que influenciam a reprodutibilidade estão relacionados a etapas prévias a 2DE, como obtenção da amostra, extração e precipitação de proteínas, bem como etapas posteriores, como revelação dos géis e análise de imagem. Sem dúvida a 2DE promove uma boa separação das proteínas em uma amostra complexa, concentrando as proteínas de interesse em *spots*, reduzindo o número de possíveis proteínas a serem identificadas por cada *spot* analisado. Sendo assim, ainda hoje, em laboratórios que dominam a técnica, os géis bidimensionais são de fácil manipulação e possuem um baixo custo relativo, o que justifica seu uso em análises rotineiras, fazendo da técnica uma das preferidas em estudos de proteômica comparativa (revisto por Rabilloud et al., 2010; revisto por Valledor e Jorrín, 2011).

#### 1.4.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas surgiu no início do século XX, porém, apenas na última década tornou-se uma importante técnica para análise de biomoléculas como proteínas, peptídeos, carboidratos e lipídeos (Hager, 2004). De maneira geral, um espectrômetro de massas é capaz de determinar a razão entre massa e carga ( $m/z$ ) de uma molécula ionizada, ou de seus componentes, em fase gasosa. Para isto se faz necessário a ionização da molécula de interesse e sua conversão a gás. Apesar de ser uma técnica centenária, sua aplicação proteômica só foi iniciada a partir do desenvolvimento de técnicas de ionização brandas, no final da década de 1980, por John Fenn [eletrospray (ESI)]; (Fenn et al., 1989) e por Karas, Hillenkamp e Tanaka [dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI)] (Karas et al., 1987). Com estas técnicas se tornou possível não apenas a conversão de moléculas grandes e polares (como as proteínas) à fase gasosa sem que ocorresse fragmentação ou decomposição da amostra mas, também, a utilização de quantidades mínimas de peptídeos ou proteínas. Com o desenvolvimento dessas técnicas foi possível determinar com acurácia a massa molecular e analisar a sequência de peptídeos em quantidades subpicomolares (revisto por Cañas et al., 2006).

Um espectrômetro é composto por uma fonte de íons, um analisador de massas e um detector. Para a análise, as amostras são inicialmente ionizadas em sua forma líquida, no caso de ionizações por ESI ou em fase sólida no caso de ionizações por MALDI, seguido de desolvatação (ESI) ou dessorção (MALDI) e transferência dos íons para a fase gasosa. Esse processo de ionização é essencial, uma vez que o espectrômetro só é capaz de analisar espécies carregadas. Os íons em fase gasosa são introduzidos no analisador de massas, componente principal do espectrômetro. Um campo elétrico ou magnético deve ser formado para que possa ocorrer a separação dos íons, sendo capaz de influenciar sua trajetória espacial, velocidade e/ou direção. Desta forma, o efeito de um campo magnético ou elétrico sobre o movimento de um íon é inversamente proporcional à massa ( $m$ ) do íon e diretamente proporcional à sua carga ( $z$ ), com isso o espectro de massas formado corresponderá à abundância do íon *versus* sua  $m/z$ . O analisador de massas é o componente que determina a precisão e a acurácia de um espectrômetro de massas. Em estudos proteômicos, podemos destacar cinco tipos de analisadores de massas: quadropolo (Q), armadilha iônica tridimensional (IT) ou linear (LT), tempo de

voo (TOF), ressonância ciclotrônica de íons (ICR) e armadilha orbital (Orbitrap), estes dois últimos fazendo uso da transformada de Fourier (FT). A maioria dos instrumentos em uso é híbrida, ou seja, composta por ao menos dois analisadores, com objetivo de aproveitar as distintas capacidades de cada um deles, como por exemplo: Q-TOF, TOF-TOF, LTq-ICR/FT e LTq-Orbitrap/FT (revisto por Cañas et al., 2006; revisto por Han et al., 2008).

#### 1.4.2.1 MALDI-TOF/TOF

Karas, em 1988, descreveu pela primeira vez o uso de dessorção/ionização a laser assistida por matriz. Nesse tipo de ionização os peptídeos são misturados a uma matriz (ácido orgânico que absorve na região do ultravioleta do espectro de luz) e a mistura depositada na superfície de uma placa. Devido ao excesso de matriz adicionado à amostra, após a evaporação do solvente, ocorre um processo de cristalização da matriz contendo os peptídeos. A placa é então introduzida no espectrômetro de massas e a amostra bombardeada com pulsos de luz laser (cujo comprimento de onda está na faixa do ultravioleta). A maior parte da luz é absorvida pela matriz, a qual transfere uma parcela dessa energia aos peptídeos de forma branda, causando a sublimação do peptídeo e da matriz, gerando os íons, em fase gasosa, que serão separados pelo analisador de massas e posteriormente detectados individualmente, em condições ideais (Karas e Hillenkamp, 1988; Forner et al., 2007; Zenobi e Knochenmuss, 1998).

O analisador de massas comumente utilizado em conjunto com a ionização do tipo MALDI é o TOF. Analisadores do tipo TOF podem ser utilizados sozinhos ou em *tandem* (MS/MS), configurando um equipamento do tipo MALDI-TOF/TOF, capaz de gerar espectros de massas que possibilitam o sequenciamento de peptídeos. Esse analisador é formado basicamente por um tubo de voo sob alto vácuo. Íons acelerados percorrem o tubo com velocidades distintas de modo inversamente proporcional à sua massa; com isto íons menores alcançam o detector antes de íons maiores (revisto por Cañas et al., 2006).

Quando dois analisadores TOF são utilizados em *tandem* a função do primeiro é determinar a massa do peptídeo intacto, gerado pelo processo de

clivagem enzimática, o qual pode ser posteriormente fragmentado sendo os íons-fragmento analisados no segundo TOF.

A fragmentação dos íons pode ocorrer de duas formas distintas: fragmentação por colisão com gás inerte, também denominada dissociação induzida por colisão (CID). Neste tipo de reação, peptídeos em fase gasosa sofrem múltiplas colisões com átomos de gás raro, promovendo fragmentação peptídica na ligação C-N e gerando íons-fragmento do tipo b (série N-terminal de íons oriundos da fragmentação do peptídeo) e y (série C-terminal de íons). Devido ao aquecimento lento são comuns a fragmentação interna e as perdas neutras de água, amônia e modificações pós-traducionais lábeis, além da geração de espectros com limitada informação de sequência. Um segundo tipo de fragmentação, mais suave, ocorre por quebra de ligações peptídicas sem a necessidade de colisão, utilizando apenas a energia acumulada nos íons durante o processo de ionização por MALDI, denominada *post source decay* (PSD).

Devido à simplicidade de uso do MALDI-TOF/TOF, conjugada a sua acurácia (10-20 ppm), alta sensibilidade (sub-femtomol) e rapidez de análise, este equipamento é geralmente a primeira abordagem utilizada na identificação de centenas de amostras oriundas de *spots* gerados por 2DE.

Para aquelas amostras que não são identificadas nesta primeira análise, uma nova análise espectrométrica pode ser realizada com técnicas mais sofisticadas, tais como nanocromatografia com nanoeletrospray acoplado a um LTq-Orbitrap.

#### 1.4.2.2 ESI-Orbitrap

O analisador de massas Orbitrap começou a ser utilizado em estudos proteômicos em 2005 (Hu et al., 2005), tendo sido desenvolvido em 1999 por Makarov (Makarov et al., 2000). Neste analisador os íons iniciam uma trajetória orbital de oscilações harmônicas ao longo de um eletrodo axial. A frequência de oscilação axial (proporcional a  $m/z$ ) é detectada e transformada em um espectro através da transformada de Fourier (Makarov et al., 2000).

O nano ESI-LTq/Orbitrap é um instrumento que consiste em uma fonte de ionização ESI acoplada ao analisador híbrido LTq/Orbitrap. Neste método, a amostra em solução é inicialmente bombeada através de uma coluna cromatográfica

até alcançar uma ponta estreita, próxima à entrada do analisador, sendo dispersa eletrostaticamente em gotículas micrométricas que evaporam rapidamente, preservando a carga nos analitos (Mann et al., 2001). O uso da ionização por ESI acoplada ao Orbitrap permitiu a geração de um poder resolutivo de massas superior a 150.000 e acurácia a 2 ppm, reduzindo significativamente falsas identificações de peptídeos em estudos *bottom-up* (revisado por Liu et al., 2007; revisado por Han et al., 2008; revisado por Perry et al., 2008, revisado por Zubarev e Makarov, 2013).

Uma forma comum de análise, envolve a determinação das massas dos íons precursores em alta resolução (Orbitrap) seguido de sua fragmentação por CID no LTq e análise dos íons-fragmento neste último analisador. O LTq inicialmente mantém os fragmentos presos em uma trajetória helicoidal estável aplicando uma corrente direta e uma corrente alternada (rádio-frequência). O aumento gradativo da amplitude da rádio-frequência induz, seletivamente, a instabilidade dos íons. Esta instabilidade é relacionada à relação  $m/z$  do fragmento (Aebersold e Mann, 2003; Dommon e Aebersold, 2006). A vantagem desse instrumento híbrido é a junção da alta resolução e acurácia do Orbitrap com a velocidade e sensibilidade do LTq, ideal para o estudo de misturas complexas (Yates et al, 2009).

## 1.5 Proteômica aplicada ao estudo de tripanossomatídeos

Após a publicação do genoma dos tripanossomatídeos de importância médica, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, na forma do banco de dados TritrypDB, ocorreu um aumento no número de trabalhos científicos que abordam proteômica de parasitos. Os trabalhos de parasitologia que fazem uso de ferramentas proteômicas visam identificar (i) a funcionalidade de proteínas hipotéticas; (ii) novas moléculas que sirvam como biomarcadores; (iii) alvos potenciais para novas drogas e vacinas e (iv) mecanismos específicos relacionados à biologia dos tripanossomatídeos (Cuervo et al, 2010).

Muitos estudos proteômicos têm sido realizados na esfera dos tripanossomatídeos heteroxênicos mas, até o momento, nenhuma abordagem fazendo uso de tripanossomatídeos monoxênicos foi realizada, provavelmente devido à inexistência, já superada, do genoma desses tripanossomatídeos (Motta et al., 2013). O primeiro proteoma de tripanossomatídeos a ser publicado foi o de *T.*

*cruzi* (cepa Berenice) (Paba et al., 2004) antes mesmo da anotação completa do genoma. Neste trabalho foi realizado um proteoma comparativo entre os estágios tripomastigota, epimastigota e amastigota utilizando 2DE conjugada a MALDI TOF/TOF. Naquele momento apenas 19 proteínas foram identificadas como sendo diferencialmente abundantes.

Posteriormente, no mesmo ano e na mesma revista em que foi publicado o genoma de *T. cruzi*, Atwood e colaboradores realizaram um estudo proteômico comparativo entre os quatro estágios do ciclo de vida do parasito da cepa Brasil, utilizando pela primeira vez, uma abordagem livre de gel (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas). O grupo encontrou um total de 2.784 proteínas, sendo 838 presentes em todos os estágios de desenvolvimento. Os principais grupos de proteínas identificadas foram de superfície e associadas à biossíntese/degradação de polipeptídeos (Atwood et al, 2005). Este trabalho, apesar de comparar estágios do ciclo de vida, não foi capaz de identificar as proteínas relacionadas ao processo de metaciclogênese por utilizar parasitos completamente diferenciados.

Um estudo proteômico do processo de metaciclogênese da cepa Dm28c, utilizando MALDI-TOF, identificou 43 proteínas diferencialmente abundantes, das quais a maioria estava relacionada ao metabolismo celular (Parodi-Talice et al., 2007). Porém, foi o trabalho de Godoy e colaboradores (2012) que trouxe maiores informações acerca deste processo, identificado e quantificando, por LC-MS/MS, aproximadamente 3.000 proteínas, das quais a trans-sialidase foi uma das mais abundantes, apresentando um total de 18 isoformas positivamente reguladas em tripomastigotas.

Após esses estudos, diversos outros foram desenvolvidos, não apenas para observação de diferenças entre os morfotipos mas também para a determinação de localização de proteínas, fazendo uso de proteômica de organelas, bem como descrição de modificações pós-traducionais e busca por novos alvos para quimioterapia. Grande parte das publicações utiliza como modelo de estudo *T. cruzi* e diversas espécies de *Leishmania*.

No âmbito de proteoma de organelas, o trabalho de Ulrich e colaboradores (2011) identificou proteínas de vacúolo contrátil de *T. cruzi*. Sabendo da importância desta estrutura no processo de osmoregulação celular, a identificação e caracterização de suas proteínas permite o entendimento da fisiologia desta

organela para o parasito. Para isto, vacúolos contráteis foram separados e o extrato bruto total foi submetido a SDS-PAGE, sendo as proteínas posteriormente identificadas por LC-MS/MS. Deste modo, combinando fracionamento subcelular, proteômica e abordagens de bioinformática, foi possível identificar o metabolismo de fosfatos como mais uma função para esta organela.

Tendo em vista que o processo de interação celular pode ser mediado não apenas por receptores de superfície como também por proteínas secretadas no ambiente, estudos de secretomas vêm sendo realizados, como é o caso do trabalho de Bayer-Santos e colaboradores (2013). Neste trabalho, a combinação de imunofluorescência, SDS-PAGE e LC-MS/MS, permitiu a identificação proteômica de duas populações de vesículas extracelulares e de proteínas solúveis em meio condicionado de *T. cruzi*, provendo dados substanciais para a existência de, pelo menos, dois mecanismos de secreção neste parasito.

Como exemplos de proteômica comparativa de tripanossomatídeos estão os trabalhos de Magalhães e colaboradores (2014) e Matrangolo e colaboradores (2013). No primeiro trabalho proteínas de *L. amazonensis* diferencialmente abundantes, identificadas pela combinação de 2DE e MALDI TOF/TOF, foram associadas à diminuição da virulência deste parasito. Em um estudo comparativo entre cepas de *L. infantum* e *L. braziliensis*, resistentes e sensíveis a antimônio, utilizando 2DE e LC-MS/MS, a maioria das proteínas identificadas, que supostamente estariam relacionadas ao processo de resistência, foram correlacionadas com sistema de defesa antioxidante, resposta a estresse, metabolismo de glicose e aminoácidos e reorganização de citoesqueleto. Desse modo, a resistência ao antimônio é um processo complexo, dependente da integração de múltiplos fatores (Matrangolo et al., 2013).

A abrangência de proteínas observadas e identificadas em estudos proteômicos, gera um grande volume de dados, o qual favorece estudos complexos de biologia celular, podendo ser utilizados para identificar comportamentos celulares. Em seguida, metodologias clássicas de bioquímica de proteínas podem ser utilizadas para aumentar nossos conhecimentos em arquitetura e dinâmica das células.

## 2 JUSTIFICATIVA

A Família Trypanosomatidae é alvo de numerosos estudos por possuir membros causadores de importantes doenças em humanos, como leishmaniose, doença de Chagas e tripanossomíase africana. Por outro lado, tripanossomatídeos monoxênicos, classicamente não patogênicos ao homem, têm sido estudados pela facilidade de manejo laboratorial, uma vez que seu nível de biossegurança é de grau 1 (NB-1) mas principalmente por representarem um modelo para estudos de bioquímica, fisiologia, biologia celular, genética, filogenia e evolução. Alguns tripanossomatídeos monoxênicos apresentam uma bactéria em seu citoplasma, como é o caso de *S. culicis*, existindo uma sofisticada e intrincada relação mutualística entre a bactéria e o protozoário, na qual diversas vias metabólicas, classicamente incompletas em tripanossomatídeos, são complementadas pelo endossimbionte, tornando-os mais aptos do ponto de vista bioquímico. Além disso, a expressão diferenciada de glicoproteínas de superfície do protozoário contendo o endossimbionte leva a uma maior capacidade de aderir a células de insetos e até infectar células de hospedeiros mamíferos. Por outro lado, o endossimbionte é incapaz de sobreviver fora do protozoário, sendo sua divisão celular regulada e coordenada com o protozoário, com intensa transferência gênica, como é observado com a mitocôndria.

A possibilidade de obter cepas livres do endossimbionte, em laboratório, nos permite analisar, separadamente, cepas selvagem e apossimbiótica (curada), possibilitando uma avaliação mais aprofundada da influência do simbiote no metabolismo e estrutura da célula hospedeira. Esse modelo tem um enorme potencial de contribuir com informações valiosas acerca da origem evolutiva de organelas, considerando-se a teoria da origem simbiótica de organelas, e que o endossimbionte de tripanossomatídeos apresenta características de organela e de bactéria, representando um passo evolutivo intermediário.

A utilização de abordagens bioquímicas clássicas está normalmente limitada a responder perguntas específicas decorrentes de uma hipótese inicial de trabalho, gerando resultados pontuais, podendo não incluir a descoberta de variações, exceções e, inclusive, mecanismos adicionais. Por outro lado, a ciência dirigida por descoberta, da qual a tecnologia proteômica faz parte, gera um volume de dados

abrangente que pode posteriormente ser utilizado para retroalimentar projetos de ciência dirigida por hipótese.

Ainda não existem na literatura estudos proteômicos utilizando espécies de tripanossomatídeos que albergam simbioses, muito menos uma comparação abrangente da abundância global e diferencial de proteínas em cada uma dessas cepas (e no simbiote isoladamente); por outro lado, já se encontram finalizados os genomas tanto de *S. culicis* quanto de *A. deanei* (espécie filogeneticamente mais próxima), assim como de seus respectivos endossimbiontes. Nesse contexto, a tecnologia proteômica foi utilizada com o objetivo de estabelecer um painel molecular abrangente para cada uma das cepas, selvagem e “curada”, de *S. culicis*.

Os dados proteômicos gerados neste projeto, conjugados aos dados genômicos, poderão significar uma melhor compreensão do processo evolutivo e da relação simbiote/protozoário em tripanossomatídeos. Adicionalmente, a identificação de vias metabólicas compartilhadas entre os organismos, traria maiores informações acerca desta inter-relação bem como da biologia do parasito.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estabelecer um proteoma diferencial das cepas selvagem e apossimbiótica do tripanossomatídeo monoxênico *Strigomonas culicis*.

#### **3.2 Objetivos específicos / metas**

- Estabelecer um protocolo de extração de proteínas das duas cepas;
- Estabelecer um protocolo para separação por 2DE das amostras proteicas obtidas e geração dos perfis bidimensionais (2DE) das duas cepas;
- Estabelecer, primariamente, a identidade dos *spots* eletroforéticos que apresentarem abundância relativa diferencial (estatisticamente significativa) através de espectrometria de massas;
- Promover uma análise dos dados gerados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismos, condições de cultivo e determinação da curva de crescimento

As cepas apossimbiótica (Apo) (COLPROT 034) e selvagem (WT) (COLPROT 041) de *S. culicis*, foram mantidas a 28 °C em meio de infusão de fígado e triptose (LIT – *Liver infusion tryptose*), suplementado com hemina 0,1 % (p/v) e soro fetal bovino 20% (v/v). Os flagelados foram mantidos através de repiques semanais. As amostras foram obtidas da Coleção de Protozoários da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/COLPROT). Para as curvas de crescimento celular, as células retiradas da câmara fria foram repicadas três vezes, na ausência de antibióticos, antes de proceder à coleta do inóculo. Um inóculo inicial de  $10^6$  células/mL foi utilizado para dar início às curvas de crescimento, sendo as culturas realizadas em triplicata para cada uma das cepas e incubadas a 28 °C. Após intervalos de tempo pré-determinados (vide abaixo), células viáveis e móveis foram quantificadas em câmara de Neubauer.

### 4.2 Extração e precipitação de proteínas

Uma massa de  $6,0 \times 10^8$  células foi coletada em cada uma das etapas de crescimento celular a ser analisada, considerando 3 amostras da cepa selvagem (tempos de 24, 56 e 80 h de crescimento celular) e 4 amostras para a cepa apossimbiótica (tempos de 24, 56, 80 e 92 h de crescimento celular) para proceder ao processo de extração de proteínas. Para cada amostra, cinco culturas foram realizadas, conforme descrição do tópico anterior, sendo todas as replicatas biológicas de uma mesma amostra processadas simultaneamente.

Para o estabelecimento de um protocolo eficiente de extração de proteínas, cinco amostras da cepa selvagem em fim de fase exponencial ( $t=80$  h) foram coletadas e após lavagem por três vezes com PBS pH 7,2, as mesmas foram rompidas em 600  $\mu$ L de cinco tampões de extração diferentes, através de 5 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, com 30 s de “vórtex” entre cada ciclo. Os tampões utilizados foram: (1) tampão **Laemmli** [(SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v),

azul de bromofenol 0,01% (p/v), betamercaptoetanol 2% (v/v) e tris-HCl 50 mM pH 6,8]; (2) tampão **A** [SDS 1 % (p/v), tris 40 mM, ditiotretol 60 mM e anfólitos 1% (v/v)]; (3) tampão **B** [uréia 8 M, CHAPS 4 % (p/v), tris 40 mM, ditiotretol 60 mM e anfólitos 1% (v/v)]; (4) tampão **C** [uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4% (p/v), tris 40 mM, ditiotretol 60 mM e anfólitos 1% (v/v)]; ou (5) tampão **Ci** [tampão **C** adicionado de coquetel inibidor de proteases EASYpack (nº catálogo 04.693.124.001, Roche, Basel, Suíça)]. As amostras rompidas com tampão Laemmli e A foram fervidas por 5 min e submetidas à centrifugação (14.000 × g por 15 min), coletando-se o sobrenadante. As amostras tratadas com tampões **B**, **C** e **Ci** foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente, submetidas à homogeneização por 10 s a cada 10 min, e centrifugadas (14.000 × g por 15 min) para coleta do sobrenadante. Conjugada a essa metodologia de lise celular também foi avaliada uma etapa de maceração celular com o kit comercial *Sample Grinding* (GE Healthcare). Cada tratamento foi realizado em triplicata biológica.

Duas metodologias de precipitação de proteínas foram avaliadas: ácido tricloroacético (TCA) + Triton/acetona e etanol/acetona. Na primeira metodologia, foram adicionados a cada amostra TCA 50% (v/v) para concentração final de 10% e Triton X-100 para concentração final de 0,1% (v/v), sendo a mesma homogeneizada em “vórtex” por 10 s e incubada por 1 h em gelo. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (16.000 × g por 15 min a 4 °C) e o sedimento lavado 2 vezes com acetona 90% (v/v) em gelo, sendo o mesmo deixado à temperatura ambiente até a total evaporação dos solventes. Para a segunda metodologia 2.400 µL de etanol gelado foram adicionados a cada amostra com posterior homogeneização da mesma em “vórtex” por 10 s e adição de 2.400 µL de acetona gelada, seguida de nova homogeneização em “vórtex” [1 (extrato de proteínas): 4 (etanol): 4 (acetona) v/v/v]. As amostras foram precipitadas *overnight* a - 20 °C. Após o período de precipitação, as proteínas foram sedimentadas (16.000 × g por 15 min a 4 °C) e o sedimento lavado 3 vezes com solução em gelo de etanol/acetona/água (4:4:2 v/v/v), sendo o mesmo deixado à temperatura ambiente até a total evaporação dos solventes.

A solubilização das proteínas foi realizada em 200 µL de solução de solubilização **C** [uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4% (p/v), tris 5 mM, ditiotretol 60 mM, anfólitos 1% (v/v)] por 1 h a 4 °C sob agitação constante, seguido de

centrifugação (14.000 × g por 10 min) e coleta do sobrenadante, o qual foi estocado a - 80 °C.

### 4.3 Dosagem de proteínas

Alíquotas de cada amostra foram submetidas à dosagem de proteínas utilizando o kit comercial *2-D Quant Kit* (GE Healthcare, EUA) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Resumidamente, uma curva padrão foi preparada com albumina sérica bovina (BSA) 2 mg/mL em intervalo de 10 a 50 µg. Alíquotas da amostra foram misturadas a 500 µL de solução precipitante e 500 µL de solução co-precipitante. As amostras foram centrifugadas (14.000 × g por 10 min), o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados 100 µL de solução de cobre e 400 µL de água Mili-Q, seguido de adição de 1 mL de reagente de trabalho (100 partes de Reagente A e 1 parte de Reagente B). Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi avaliada a 480 nm em leitora de microplacas *VersaMax Microplate Reader Tunable* (Molecular Devices, EUA).

### 4.4 Eletroforese bidimensional

O desenho experimental foi formado por dois grupos (células de *S. culicis* selvagem e curada em diferentes etapas do crescimento celular) em quintuplicata biológica. De cada amostra, para padronização de géis preparativos de, um volume equivalente a 300 µg e 600 µg de proteína total foi coletado e o volume ajustado para 450 µL com solução de solubilização **C** [uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4% (p/v), tris 5 mM, ditiotretol 60 mM, anfólitos 1% (v/v)]. As amostras foram centrifugadas (14.000 × g por 10 min) e ao sobrenadante foi adicionado azul de bromofenol 0,002% (p/v). O sobrenadante foi depositado no centro de um suporte de *strip* e sobre ele uma fita de gradiente de pH imobilizado (IPG 24 cm pH 3-10 NL ou 4-7) (GE Healthcare, Suécia) foi suavemente depositada (com a face contendo o gel de acrilamida para baixo), sendo sobre esta adicionados 3 mL de óleo mineral, evitando a evaporação e cristalização da uréia. A focalização isoeletrica foi realizada utilizando o sistema *IPGPhor III* (Amersham Biosciences, Suécia). Após a

reidratação da amostra *in gel* a 30 V por 12 h, as seguintes condições de focalização isoelétrica foram utilizadas: 200 V por 1 h, 500 V por 1 h, 1.000 V por 1 h, um gradiente de 1.000 a 8.000 V por 30 min totalizando 64.000 Vh, para fitas de gradiente de pH 3-10 NL e 80.000 para fitas de gradiente de pH 4-7.

As proteínas, contidas nas fitas de gradiente de pH imobilizado, foram fracionadas em géis SDS-PAGE a 15% de poliacrilamida em sistema *Ettan Dalt Six* (GE Healthcare, EUA), sendo previamente desnaturadas e reduzidas pelo tratamento com ditioneitol em tampão de equilíbrio [tris-HCl 50 mM pH 8,8, uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), ditioneitol 65 mM] por 15 min, seguido de alquilação das pontes dissulfeto pelo tratamento com iodoacetamida em tampão de equilíbrio [tris-HCl 50 mM pH 8,8, uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), iodoacetamida 216 mM], por 15 min ao abrigo da luz, ambos em sistema de agitação constante. Os *strips* foram lavados com tampão de corrida/eletrodo tris-glicina [tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v) ] e posicionados na superfície do gel de poliacrilamida, sendo imobilizados pela adição de agarose a 0,5% (p/v) em tampão de corrida previamente liquefeita e aquecida a 80 °C. A separação eletroforética foi realizada sob as seguintes condições elétricas: 2,5 W por gel, por 30 min, e 100 W totais até o final da separação. Foi adicionado ao compartimento superior da cuba de eletroforese o mesmo tampão de eletrodo descrito previamente, porém 2 vezes concentrado. Os padrões de massa molecular (GE Healthcare, Reino Unido) foram fervidos por 5 min, misturados com agarose 1% (p/v) em água na proporção de 1:1 (v/v) e aplicados em pequenos pedaços de papel de filtro depositados ao lado da fita de focalização isoelétrica (Görg et al., 2004).

#### **4.5 Revelação dos géis por Coomassie coloidal**

Após a 2DE, as proteínas distribuídas na malha de poliacrilamida foram fixadas por 30 min em etanol 30% (v/v), ácido fosfórico 1,7% (v/v). A solução foi descartada e o procedimento repetido mais duas vezes. Após fixação, os géis foram lavados 3 vezes por 20 min em solução de ácido fosfórico 1,7% (v/v), seguido de incubação dos géis por 30 min em solução composta por ácido fosfórico 1,7% (v/v), etanol 18% e sulfato de amônio 15% (p/v), à qual foi adicionada solução aquosa de

Coomassie Blue G-250 2% (p/v) (Sigma Aldrich, EUA), em volume suficiente para alcançar a concentração final de 0,02% do corante. A coloração procedeu por 72 h (tempo equivalente ao ponto-final teórico de coloração) à temperatura ambiente sob agitação constante (Rabbiloud e Charmont, 2000).

#### **4.6 Digitalização e análise de imagem**

Imagens digitalizadas dos géis foram obtidas em densitômetro *Image Scanner III* (GE Healthcare, EUA) e a análise das imagens foi realizada utilizando o software *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, EUA). A detecção de *spots* foi feita automaticamente pelo programa com algumas edições manuais. Os parâmetros *smooth*, *saliência* e *área mínima* foram definidos manualmente. Para os géis de início de fase log e meio de fase log da cepa selvagem estes parâmetros foram determinados em 6, 400 e 100, respectivamente, enquanto para os géis de fim de fase log 6, 600 e 100. Para os géis da cepa apossimbiótica os parâmetros foram ajustados, respectivamente, para 6, 200 e 100.

Análises comparativas foram realizadas pareando as condições representadas por cada gel duas a duas (4 replicatas por condição analisada), sendo realizadas comparações intercepas e intracepa.

Uma das replicatas biológicas foi retirada sendo os dados gerados nesta tese referentes a ensaios em quadruplicata (vide seção “Resultados e Discussão”).

#### **4.7 Análise estatística**

As análises estatísticas foram feitas através de colaboração com o Dr. Veit Schwammle do *Protein Research Group* da Universidade do Sul da Dinamarca (Odense, DK)

Para a análise, sete condições foram consideradas: cepa selvagem coletada em fase logarítmica (log) [início (24 h), meio (56 h) e fim (80 h)] e cepa apossimbiótica coletada em fase log [início (24 h), meio (56 h) e fim (80 h)] e fase estacionária (92 h). Para cada condição os dados foram formados por quatro replicatas biológicas. A área do *spot* para cada replicata foi transformada para  $\log_2$  e

normalizada para a mediana. Os *spots* eletroforéticos que apresentaram *matching* entre os géis foram submetidos à análise estatística pelo método LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*) (Smyth, 2005).

Foram considerados, para fins de identificação por espectrometria de massas, os *spots* que estavam presentes em no mínimo 3 géis, representando valores de *missing value* igual a 1, de cada condição experimental. Para estes, um teste estatístico para comparações não pareadas do nível de intensidade de cada *spot* foi realizado. *P*-valores foram corrigidos por testes múltiplos (Storey, 2002). Todas as comparações de abundância com *q*-valores menores ou iguais a 0,05, correspondendo a uma taxa de falsa descoberta de 5%, foram consideradas como representativas de proteínas reguladas.

#### **4.8 Digestão trípica em gel de poliacrilamida e dessalinização**

As cadeias polipeptídicas separadas por eletroforese bidimensional, referentes aos *spots* eletroforéticos que apresentaram abundância relativa diferencial (após análise estatística) foram submetidas à digestão trípica *in gel* (Schevchenko et al., 1996). Inicialmente, os *spots* foram excisados da malha do gel (com auxílio de ponteiros de 1 mL) e transferidos para tubos previamente lavados, sequencialmente, com metanol, água e metanol. Os *spots* foram então descorados *overnight* em 200 µL de acetonitrila 50% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0. A descoloração foi repetida por mais duas vezes em tempos de 15 min, agitando os pedaços de gel em agitador do tipo “vórtex”. Após a etapa de descoloração os *spots* foram desidratados, por duas vezes, em acetonitrila 100 %, seguido de secagem total em concentrador de amostras *Speed Vac* por 15 min. Aos *spots* secos adicionou-se 15 µL de solução de tripsina (20 ng/µL em bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0) (Promega, USA) e os géis foram mantidos em gelo por 45 min com o objetivo de permitir a penetração da enzima na malha do gel sem o início de sua atividade proteolítica. Após este tempo o excesso de tripsina foi retirado e 20 µL de bicarbonato de amônio 40 mM foram adicionados, sendo os *spots* incubados a 37 °C por 18 a 24 h. Após o período de incubação os pedaços de gel foram submetidos à sonicação em ultrassom por 10 min, seguido de agitação em “vórtex” por 20 s. O sobrenadante foi removido e transferido para novo microtubo

previamente lavado como descrito acima. Ao pedaço de gel restante foram adicionados 30 µL de solução de extração [ácido fórmico 5% (v/v) e acetonitrila 50% (v/v)] seguido de agitação em “vórtex” por 20 s, incubação por 15 min à temperatura ambiente, sonicação por 2 min e agitação por 20 s adicionais em vortex. A solução contendo os peptídeos foi removida e adicionada ao sobrenadante previamente coletado. O procedimento de extração foi repetido mais uma vez. A solução de peptídeos obtida foi concentrada até 10 µL em concentrador a vácuo. Previamente à análise por espectrometria de massas, os peptídeos tripticos foram dessalinizados e concentrados em micro colunas de fase reversa *Zip Tip* C18 (Millipore, Irlanda), de acordo com o protocolo do fabricante.

## 4.9 Espectrometria de massas

### 4.9.1 MALDI-TOF/TOF

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (AB SCIEX TOF/TOF 5800) no modo *reflectron* positivo. Para isto foram aplicadas na placa pelo método de gota sobre gota em proporção equivolúmica de amostra para matriz. Alíquotas de 0,3 µL de cada amostra, previamente dessalinizadas com *Zip Tip* C18 (Millipore, Irlanda), foram aplicadas seguidas de alíquotas de uma solução de matriz saturada [10 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma Aldrich, EUA) em acetonitrila 50% (v/v) e 0,1% de ácido trifluoroacético]. A placa de MALDI foi calibrada para MS com os seguintes padrões de massas: arg-bradicinina ( $m/z$  904,468), angiotensina I ( $m/z$  1.296,685), glu<sup>1</sup>-fibrinopeptídeo B ( $m/z$  1.150,677), ACTH-(18-39) ( $m/z$  2.465,199). Para a calibração de MS/MS foi utilizado o espectro de fragmentação de glu<sup>1</sup>-fibrinopeptídeo B.

Espectros de MS foram obtidos selecionando uma faixa de 800 a 4.000 Da, com um foco em 1.500 Da, sendo cada espectro resultante de 2.040 tiros de laser aleatórios e uniformes. A intensidade do laser foi ajustada entre  $9,0 \times 10^3$  a  $1,0 \times 10^4$  e a voltagem final do detector foi de 2 kV. No modo MS/MS, foram selecionados para fragmentação por PSD os dez íons mais abundantes (relação sinal/ruído acima de 30) observados no espectro de MS. Os espectros de MS/MS foram obtidos selecionando uma faixa de 60 Da até a massa do precursor, sendo cada espectro

gerado correspondente a 1.000 tiros aleatórios e uniformes. A voltagem final do detector foi de 2 kV. Os seguintes parâmetros foram utilizados para geração da lista de massas dos fragmentos: para cada intervalo de 200 Da, um máximo de 200 picos com relação sinal/ruído mínima de 2 e área mínima de 10.

#### 4.9.2 ESI-LTQ/Orbitrap

Um microlitro do digesto trípico dessalinizado com *Zip Tip* foi analisado por ESI-LTq/Orbitrap após a adição de 9  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 1 % (v/v) em água. Em seguida, 4  $\mu\text{L}$  desta solução foram aplicados a uma pré-coluna (*trap column*) de 2 cm (diâmetro interno de 100  $\mu\text{m}$ ) empacotada com matriz *Magic C18 AQ* de 5  $\mu\text{m}$  e 200 Å (Michrom Bioresources, EUA), seguido de separação em coluna de 10 cm (diâmetro interno de 75  $\mu\text{m}$ ), empacotada com a mesma matriz, diretamente em um *PicoTip emitter* (New Objective, EUA) vazio com ponta de 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A cromatografia líquida foi realizada em instrumento EASY-nLC II (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram carregadas na pré coluna a 2.000 nL/min, enquanto a separação cromatográfica ocorreu a 200 nL/min. A fase móvel A foi composta por ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e a fase móvel B foi composta por ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila. As condições de gradiente foram: 2 a 40% B em 32 min e até 80% B em 4 min, mantendo essa concentração por 2 min, totalizando 38 min de análise. Os peptídeos eluídos foram introduzidos diretamente no espectrômetro de massas LTq/Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) para serem analisados. A voltagem da fonte foi ajustada para 1,9 kV, a temperatura do capilar para 200 °C e a voltagem das lentes para 100 V. Espectros MS1 foram adquiridos no analisador Orbitrap (com intervalo de  $m/z$  entre 300 a 1.700) a 60.000 de resolução. Para cada espectro, os 10 íons mais abundantes foram submetidos à fragmentação por CID (sinal mínimo requerido de 10.000); largura de isolamento de 2.5  $m/z$ ; energia de colisão normalizada em 35,0. A opção de exclusão dinâmica foi habilitada e ajustada com os seguintes valores para cada parâmetro: número de repetições = 1; duração = 30 s; tamanho da lista de exclusão = 500 massas; duração de exclusão = 45 s e uma variação da massa de exclusão = 10 ppm.

### 4.9.3 Análise dos dados

#### 4.9.3.1 Banco de Dados

Os dados de sequenciamento utilizados nesta tese foram obtidos em colaboração com a Dra. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, Petrópolis, RJ, Brasil). O banco de dados foi montado pela junção de sequências, das ORFs hipotéticas e das ORFs validadas, obtidas para *Strigomonas culicis* e *Angomonas deanei*, bem como para seus respectivos endossimbiontes, totalizando 30.041 entradas. Além disso, adicionamos 115 entradas de proteínas contaminantes usualmente achadas em experimentos proteômicos (cRAP – *common Repository of Adventitious Proteins* - <http://www.thegpm.org/cRAP/index.html>). Para estas 30.156 entradas, geramos suas sequências reversas como estratégia de *decoy*. O banco de dados final, denominado de LNCC&cRAP\_20130412, continha 60.312 entradas.

#### 4.9.3.2 Busca dos dados gerados por MALDI-TOF/TOF

Os espectros de massas (MS/MS) foram transformados para a forma de centróide, seguido de desconvolução para determinação da carga, finalizando com a obtenção do valor da massa monoisotópica. Todas as amostras foram analisadas utilizando a ferramenta de busca Mascot (Matrix Science, Londres, UK; versão 2.4.1). Os parâmetros utilizados ao buscar o banco de dados LNCC&cRAP\_20130402 assumiram o uso da enzima tripsina e até duas clivagens perdidas; uma tolerância de 0,40 Da para a massa dos íons-fragmento e 50 ppm para a massa dos íons precursores. A carbamidometilação de cisteínas foi considerada como uma modificação fixa enquanto que a oxidação de metionina foi considerada como modificação variável.

#### 4.9.3.3 Busca dos dados gerados por ESI-LTQ/Orbitrap

Os arquivos RAW (MS e MS/MS) foram transformados para arquivos concatenados DTA utilizando programa RAW Xtractor (versão 1.9.9.2) configurado para experimentos de dados dependentes na forma de centróide, seguido de desconvolução para determinação da carga, finalizando com a obtenção do valor da massa monoisotópica. Todas as amostras foram analisadas utilizando a ferramenta de busca Mascot (Matrix Science, Londres, UK; versão 2.4.1). Os parâmetros utilizados ao buscar o banco de dados LNCC&cRAP\_20130402 assumiram o uso da enzima tripsina e até duas clivagens perdidas; uma tolerância de 0,50 Da para a massa dos íons-fragmento e 20 ppm para a massa dos íons precursores considerando apenas íons de carga 2+ e 3+. A carbamidometilação de cisteínas foi considerada como uma modificação fixa enquanto que a oxidação de metionina foi considerada como modificação variável.

#### 4.9.3.4 Critérios para identificação proteica

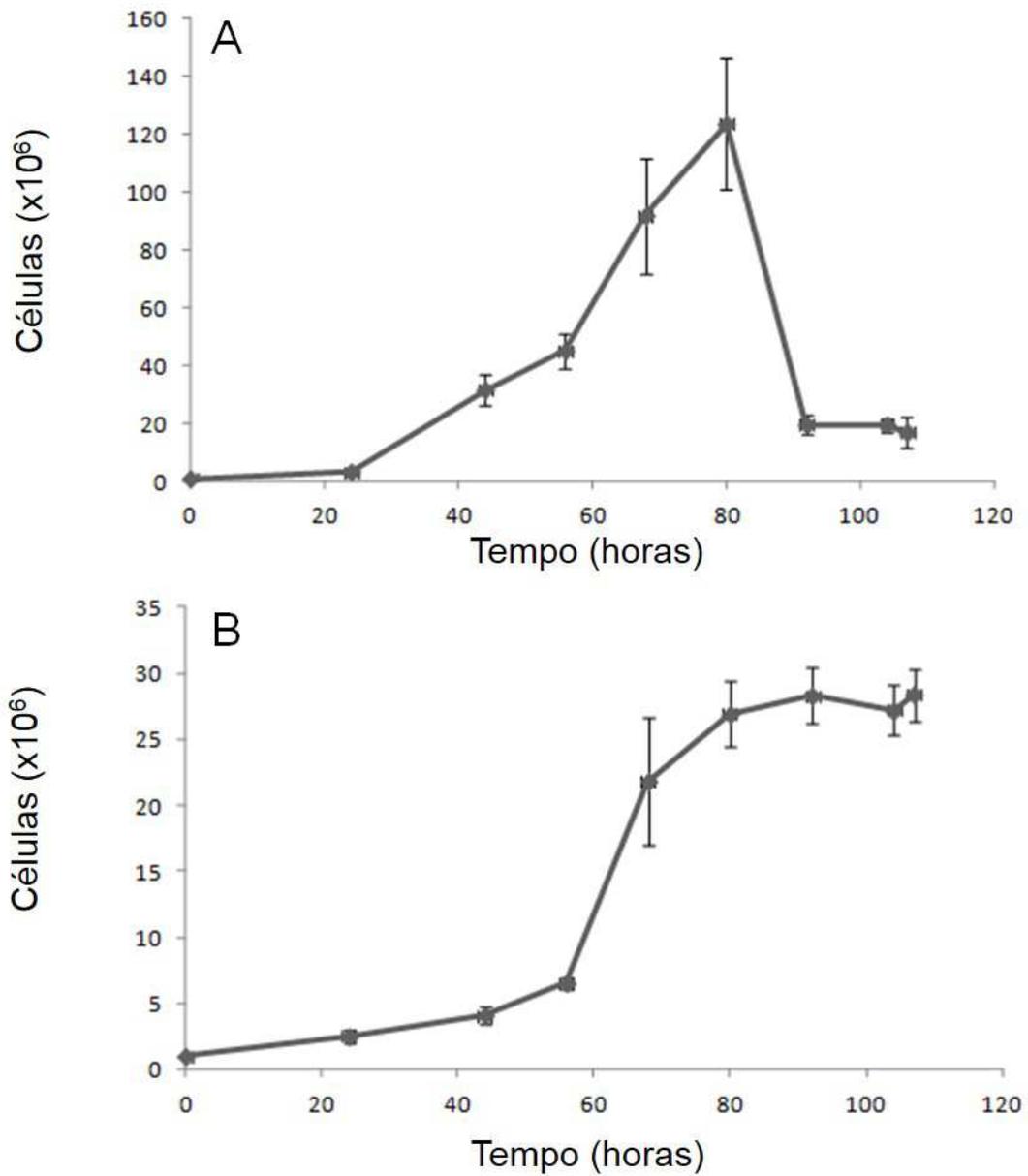
O software Scaffold (versão 4.3.0, Proteome Software Inc., Portland, EUA) foi utilizado para validar as identificações de peptídeos e proteínas baseadas na análise por PSM do algoritmo MASCOT. A identificação de peptídeos foi aceita quando alcançados valores acima de 90% de probabilidade pelo algoritmo *Peptide Prophet* (Keller et al., 2002) com correções pelo Scaffold delta-mass. A identificação de proteínas foi aceita quando alcançado valores acima de 95% de probabilidade e contendo pelo menos 1 peptídeo. Probabilidades proteicas foram determinadas pelo algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii et al., 2003).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estabelecimento de protocolo para extração de proteínas

Um conceito básico em estudos proteômicos baseados em 2DE é de que este é um processo realizado em duas etapas, a focalização isoeletrica e a separação por eletroforese em gel. Porém, as etapas anteriores ao processo de fracionamento, como a preparação da amostra, são críticas para um estudo reprodutível, tendo em vista que estas etapas influenciam diretamente os resultados obtidos; deste modo a preparação da amostra deve ser realizada de forma cautelosa sendo criticamente padronizada (Rabilloud e Lelong, 2011).

Tripanossomatídeos em cultura, mesmo quando em cultivo axênico, podem apresentar intensa variabilidade de morfotipos (Sousa, 1994). Portanto, como primeira etapa para o estabelecimento de um protocolo de extração de proteínas das cepas de *S. culicis*, curvas de crescimento celular foram determinadas para ambas as cepas visando definir quais os tempos de crescimento seriam selecionados para coleta das células a serem analisadas, visando a redução da variabilidade metabólica intrínseca da espécie em distintas etapas de crescimento celular (**Figura 5.1**). Para isto, durante a quantificação das células viáveis, a manutenção da morfologia celular foi acompanhada por microscopia óptica de contraste de fase. A presença de morfologias distintas foi considerada um fator indicativo de estresse, principalmente no fim de fase logarítmica e na fase estacionária.



**Figura 5.1 - Curvas de crescimento celular de *S. culicis*.**

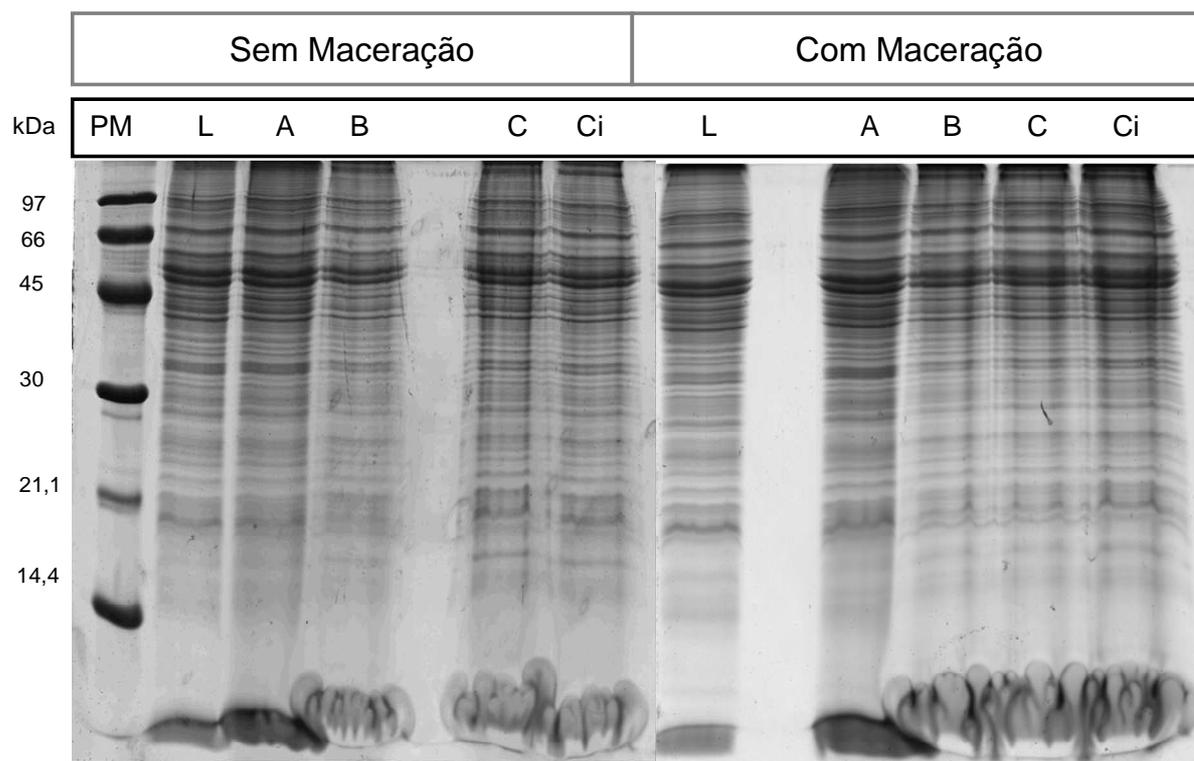
Os gráficos representam as curvas de crescimento das cepas (A) selvagem e (B) aposimbiótica de *S. culicis*. Os dados representam a média  $\pm$  o desvio-padrão do número de células viáveis de quatro culturas distintas.

A cepa WT apresentou uma fase de adaptação (fase lag) e uma fase de crescimento exponencial (fase log) bem definidas, sendo o crescimento máximo obtido após 80 horas de cultivo. Ao final da fase log, as células entram em fase de declínio rapidamente, não sendo possível observar uma fase estacionária de crescimento celular (**Figura 5.1A**) mesmo quando realizadas contagens celulares com intervalos de tempo menores (dados não mostrados). Para a cepa apossimbiótica, diferente da cepa selvagem, não foi possível observar uma fase lag definida, sendo a fase log iniciada prematuramente, quando comparada à curva de crescimento da cepa selvagem. Mais uma vez, foi observado no tempo de 80 horas o máximo de crescimento celular. Uma fase estacionária bem definida está presente na curva de crescimento da cepa apossimbiótica e se estendeu até o último tempo analisado (107 horas) (**Figura 5.1B**). A presença de fase estacionária na cepa apossimbiótica pode estar relacionada à menor densidade populacional observada, o que permite a manutenção dos nutrientes do meio de cultura por um período de tempo maior, associado a menor concentração de subprodutos tóxicos no meio de cultura.

A comparação das curvas de crescimento das cepas selvagem e apossimbiótica mostrou que a cepa selvagem alcançou uma densidade populacional cinco vezes maior que a cepa apossimbiótica, corroborando os dados de Chang (1974), a partir dos quais o autor sugeriu que o simbiote beneficia o crescimento do tripanossomatídeo. Atualmente, a hipótese de Chang já está comprovada com dados que indicam que o simbiote confere ao protozoário, por exemplo, vitaminas e complementos de rotas metabólicas, como é o caso da via biossintética de heme (Alves et al., 2011; Motta et al., 2013).

Após analisar as curvas de crescimento, os tempos de 24, 56 e 80 horas foram estabelecidos, para ambas as cepas, como representantes do início, meio e fim de fase log, respectivamente. No caso específico de Apo, o tempo de 92 horas foi definido como fase estacionária. Condições otimizadas para extração de proteínas e 2DE foram determinadas para WT, tendo em vista a facilidade de obtenção de um grande número de células. Desse modo, células coletadas em meio de fase log foram utilizadas nas etapas de padronização. Diversos tampões de extração de proteínas (Laemmli, A, B, C e Ci) conjugados a duas técnicas distintas de lise celular (congelamento em nitrogênio líquido conjugado, ou não, a processo de maceração), foram avaliados com relação à sua eficiência. A **Figura 5.2**

apresenta o perfil eletroforético de um experimento representativo de SDS-PAGE realizado com as amostras obtidas após as diferentes metodologias de extração.

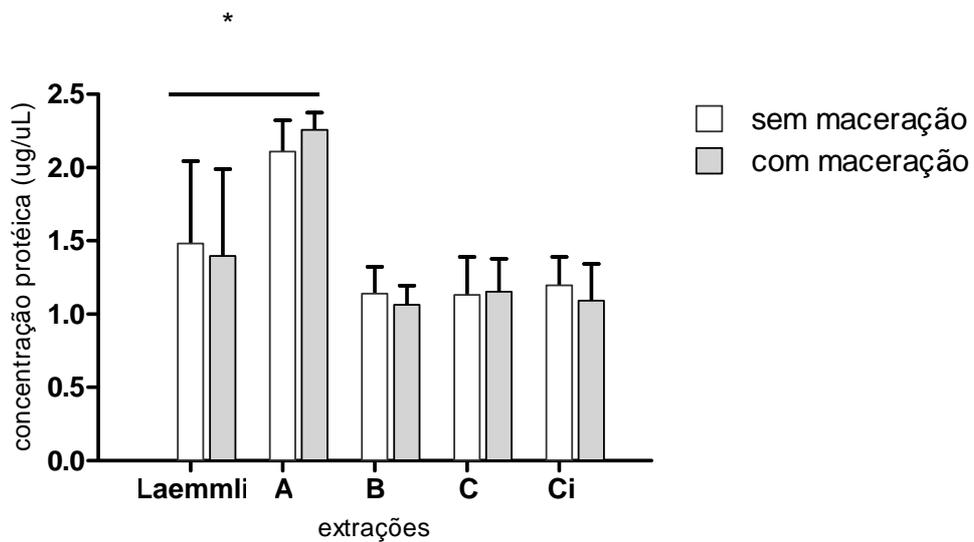


**Figura 5.2 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE das proteínas da cepa WT de *S. culicis*.**

SDS-PAGE 15% obtidos após extração de proteínas com diferentes tampões, utilizando ou não maceração celular. Tampão Laemmli (L), Tampão A (A), Tampão B (B), Tampão C (C) e Tampão C com adição de coquetel inibidor de proteases (Ci). PM – Padrão de Massa Molecular. Imagem representativa de experimento realizado em triplicata biológica.

A comparação dos perfis eletroforéticos, em SDS-PAGE unidimensional, obtidos para cada uma das soluções de lise, refletiu diferenças quantitativas na extração, para as quais podemos observar que o tampão A, aparentemente, obteve um melhor rendimento quantitativo em relação aos outros tampões, comparável ao obtido com o tampão Laemmli. Porém, diferenças quantitativas ou qualitativas não foram visualizadas, independente de ter sido utilizada, ou não, a metodologia de maceração das células, indicando que este procedimento não favoreceu o processo de extração de proteínas.

A dosagem de proteínas, dos extratos obtidos das distintas metodologias, foi realizada objetivando avaliar o rendimento quantitativo destas. O melhor rendimento proteico foi obtido com os tampões A e Laemmli, não havendo diferença significativa entre os dois. Com relação aos outros tampões avaliados, tanto o tampão B, quanto o C e o Ci, apresentaram rendimentos muito parecidos, sendo todos menores que tampões A e Laemmli. Com relação à etapa de maceração, esta não interfere no rendimento proteico, não contribuindo para um aumento significativo na concentração de proteínas para nenhum dos tampões utilizados (**Figura 5.3**).

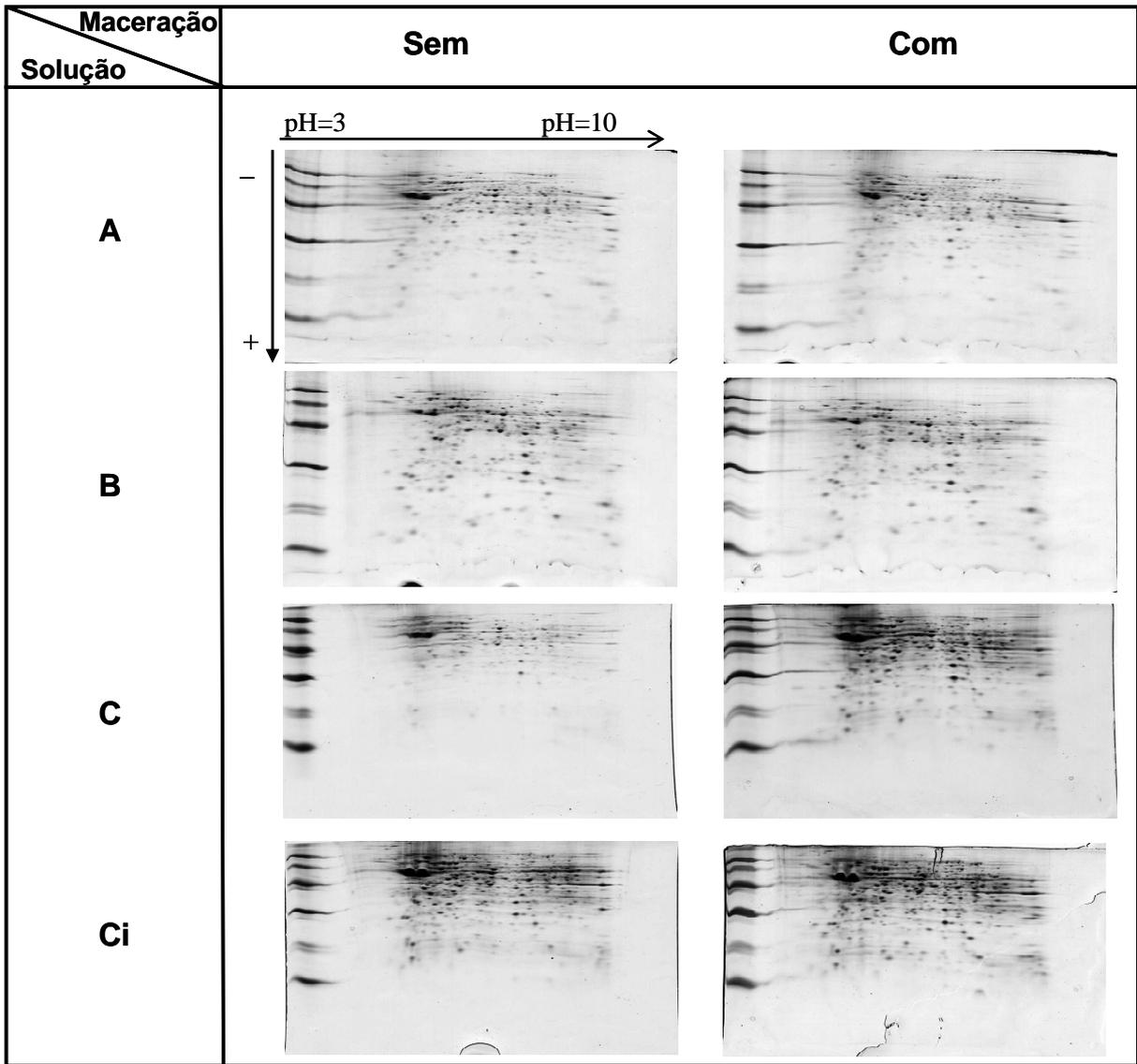


**Figura 5.3 - Quantificaçõ de proteínas apõs distintas metodologias de extraçõ.**

Apõs cada uma das metodologias de extraçõ das proteínas da cepa WT de *S. culicis* utilizando diferentes tampões: Tampõ Laemmli, Tampõ A (A), Tampõ B (B), Tampõ C (C) e Tampõ C com adiçõ de coquetel inibidor de proteases (Ci), com ou sem maceraçõ celular. Dados referentes à mÃdia ± o desvio-padrõ de duplicata experimental, utilizando as mesmas amostras obtidas em triplicata biolõgica. \*  $P > 0,05$

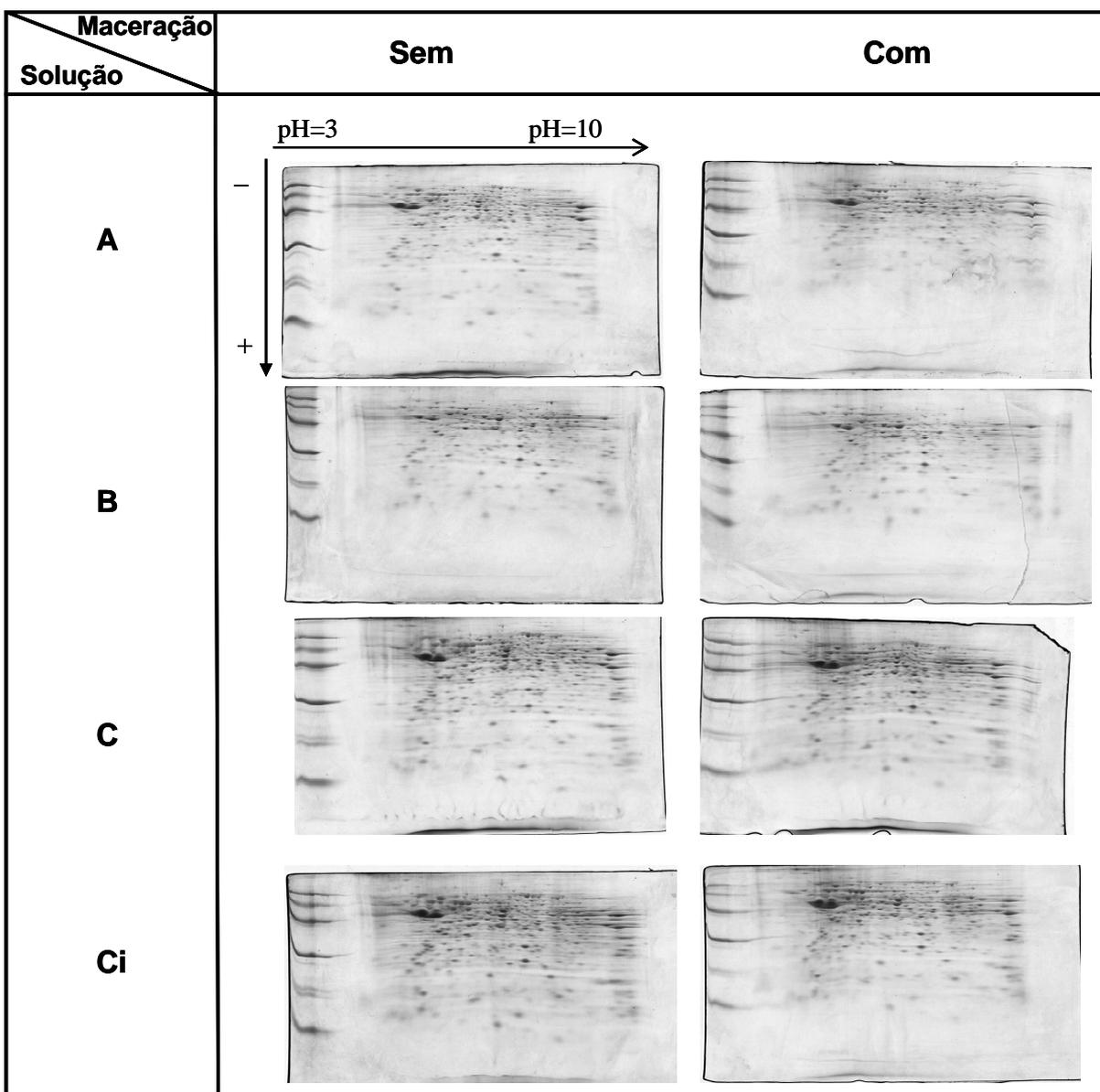
Com objetivo de realizar uma análise qualitativa dos extratos obtidos, as amostras proteicas foram submetidas à 2DE, o que permitiu avaliar a capacidade das distintas metodologias em extrair diferentes proteínas e isoformas (**Figuras 5.4 e 5.5**). Nesse momento, optou-se pela utilização de fitas de gradiente de pH imobilizado de 3-10 não linear para a etapa de focalização isoeletrica, objetivando uma observação global das proteínas presentes nas amostras. Amostras obtidas com tampão Laemmli não foram utilizadas devido à incompatibilidade dos componentes deste tampão com a etapa de focalização isoeletrica da 2DE.

Tendo em vista a composição química incompatível de alguns tampões com a etapa de focalização isoeletrica, duas metodologias de precipitação de proteínas foram avaliadas, sendo os perfis bidimensionais representados após as metodologias de precipitação por ácido tricloroacético/acetona (**Figura 5.4**) e etanol/acetona (**Figura 5.5**).



**Figura 5.4 - Perfil eletroforético bidimensional das diferentes metodologias de extração de proteínas após precipitação com TCA/acetona.**

Mini géis utilizando fitas de 7 cm com gradiente de pH imobilizado 3-10 NL contendo as amostras proteicas oriundas de lisado total de *S. culicis* WT. Cada gel representa uma metodologia de extração de proteínas distinta com posterior precipitação com TCA/acetona. Apenas 1 amostra biológica foi utilizada para cada condição apresentada.



**Figura 5.5 - Perfil eletroforético bidimensional das diferentes metodologias de extração de proteínas após precipitação com etanol/Acetona.**

Mini géis utilizando fitas de 7 cm com gradiente de pH imobilizado 3-10 NL contendo as amostras proteicas oriundas de lisado total de *S. culicis* WT. Cada gel representa uma metodologia de extração de proteínas distinta com posterior precipitação com etanol/acetona. Apenas 1 amostra biológica foi utilizada para cada condição apresentada.

Uma análise visual destes dados indicou que as soluções de extração C e Ci apresentam os melhores perfis eletroforéticos, em relação à abundância de *spots*, quando comparados às outras soluções utilizadas, o que pode ser justificado pela combinação de uréia e tiouréia na composição destas soluções. A combinação dos dois agentes caotrópicos confere um maior poder de solubilização quando comparado a soluções contendo apenas uréia, favorecendo a solubilização de proteínas mais hidrofóbicas nas fitas de gradiente de pH imobilizado, além de facilitar sua transferência para a segunda dimensão da 2DE (Molloy et al. 1998; Rabilloud et al., 1997). Com relação à utilização da etapa de maceração das células, a conjugação desta técnica com a utilização das soluções C e Ci não interfere na abundância de *spots* observados. Desta forma, a extração de proteínas por maceração da amostra não foi selecionada para ser utilizada nos experimentos posteriores.

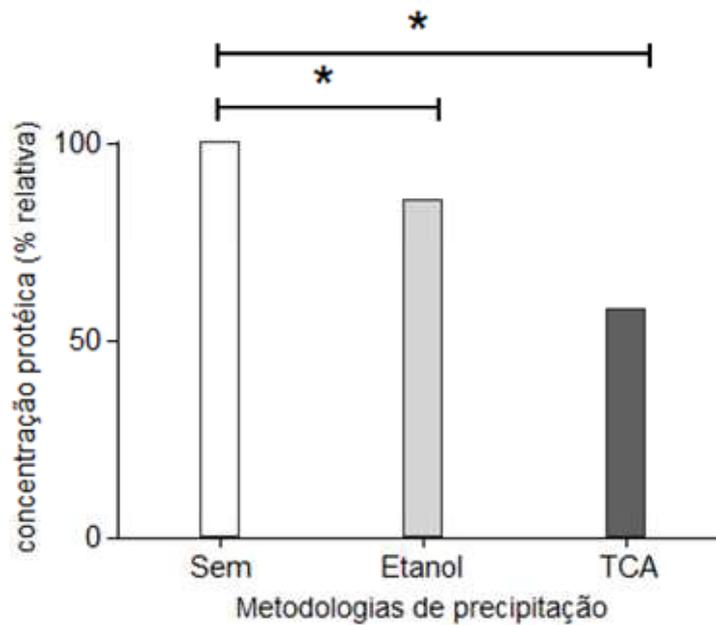
Uma preocupação no estudo de proteínas é a manutenção da estrutura proteica, a qual pode ser drasticamente alterada pela presença de enzimas hidrolíticas, como fosfatases, glicosidases e principalmente as peptidases. A maioria das enzimas hidrolíticas acaba sendo inativada rapidamente, pela ação dos agentes caotrópicos presentes nas soluções de extração, favorecendo a manutenção das modificações pós-traducionais. Porém, essa rápida inativação não acontece para a maioria das peptidases, já tendo sido relatada atividade proteolítica após solubilização em tampões contendo 9 M de uréia ou mesmo na presença de SDS, indicando um lento processo de desnaturação para essas enzimas, permitindo assim uma janela de tempo de atuação sobre proteínas que já foram desnaturadas e estão apresentando seus sítios para clivagem mediada por peptidases (Rabilloud e Chevallet, 2000; Colas dês Francs et al., 1985; Granzier e Wang, 1993). Por esta razão, optou-se pela metodologia de extração de proteínas utilizando a solução de extração Ci, devido ao grande número de proteases sabidamente expressas por tripanossomatídeos, visando garantir maior integridade da amostra obtida.

Com o objetivo de definir a melhor metodologia de precipitação de proteínas, uma comparação quantitativa dos perfis proteicos bidimensionais das amostras de *S. culicis* WT foi realizada após a utilização das metodologias de precipitação de proteínas. Os géis obtidos foram comparados em *software* de análise de imagens *Image Master 2D platinum 7* (GE), sendo quantificado o número de *spots* apresentados nas distintas condições de precipitação e na ausência desta etapa. A

análise das imagens apresenta uma grande variedade de manchas obtidos na condição após precipitação com etanol/acetona, em comparação à precipitação por TCA/acetona, o que indica que uma maior quantidade de proteínas distintas conseguiu ser precipitada e/ou ressuspensa com esta metodologia (**Tabela 5.1**). A verificação quantitativa do rendimento proteico, após precipitação de proteínas, foi realizada por dosagem de proteínas, como apresentado na **Figura 5.6**. Neste gráfico podemos observar o maior rendimento proteico conferido pela precipitação com etanol/acetona em relação à precipitação com TCA/acetona. Desta forma, a precipitação utilizando etanol/acetona foi selecionada para dar continuidade aos experimentos.

**Tabela 5.1 - Comparação quantitativa dos perfis eletroforéticos bidimensionais das amostras de *S. culicis* WT após precipitação com diferentes metodologias.**

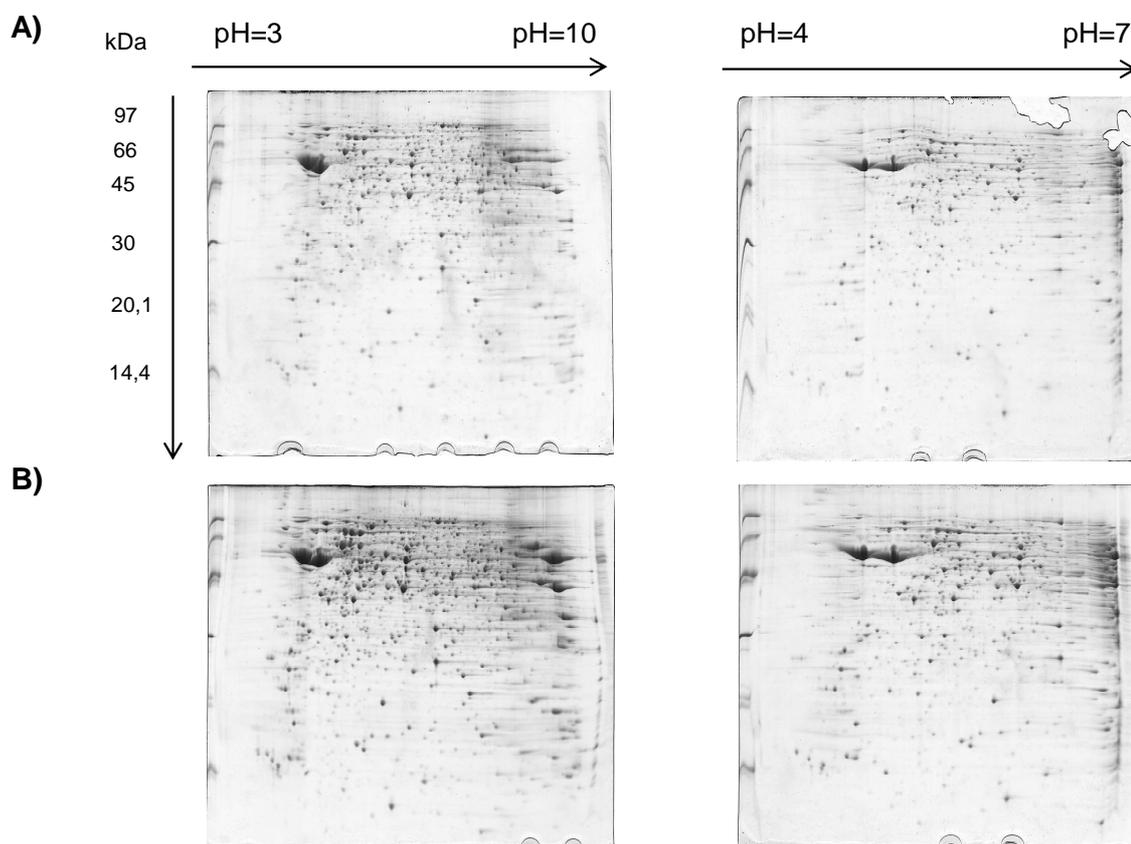
Precipitação	Número de <i>spots</i>
Sem	318
Etanol	297 ± 50
TCA	271 ± 61



**Figura 5.6 - Avaliação do rendimento proteico após diferentes metodologias de precipitação de proteínas da cepa WT de *S. culicis*.**

Dados referentes à porcentagem da concentração proteica relativa aos experimentos em que não foi realizada nenhuma precipitação (Sem) prévia à dosagem. Dados referentes à média de cinco experimentos individuais, realizados em duplicata técnica, com seus respectivos desvios-padrões. \* $P < 0,022$

Para a otimização dos géis bidimensionais preparativos, duas massas proteicas foram avaliadas (300 e 600 µg), bem como os intervalos de pH 3-10 não linear e 4-7 linear em fitas de 24 cm. As imagens dos géis obtidos nessas condições estão representadas na **figura 5.7** e o dado quantitativo após análise das imagens, está representado na **tabela 5.2**. A maior massa proteica analisada induziu não apenas um aumento na intensidade bem como um maior número de *spots* em ambas as condições de focalização isoeétrica, tendo sido observado um número significativamente maior de *spots* na condição utilizando um gradiente de pH 3-10 não linear. Dessa forma, objetivando avaliar o máximo de diferenças entre as cepas estudadas, estes parâmetros foram selecionados para serem utilizados em todo o projeto tendo em vista a maior diversidade obtida.



**Figura 5.7 - Avaliação da massa proteica e gradiente de pH a serem utilizados em géis preparativos.**

Proteínas da cepa WT de *S. culicis* obtidas após extração com tampão Ci e técnica de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, com posterior precipitação com etanol/acetona. Massas proteicas de 300 (A) e 600 µg (B) e gradientes de pH de 3-10 NL e 4-7 L imobilizados em fitas de 24 cm, foram testadas e os perfis eletroforéticos obtidos. Imagens representativas de um experimento com uma amostra biológica por condição testada.

**Tabela 5.2 - Número de *spots* observados em géis 2D preparativos. Variação na massa proteica e no gradiente de pH utilizado.**

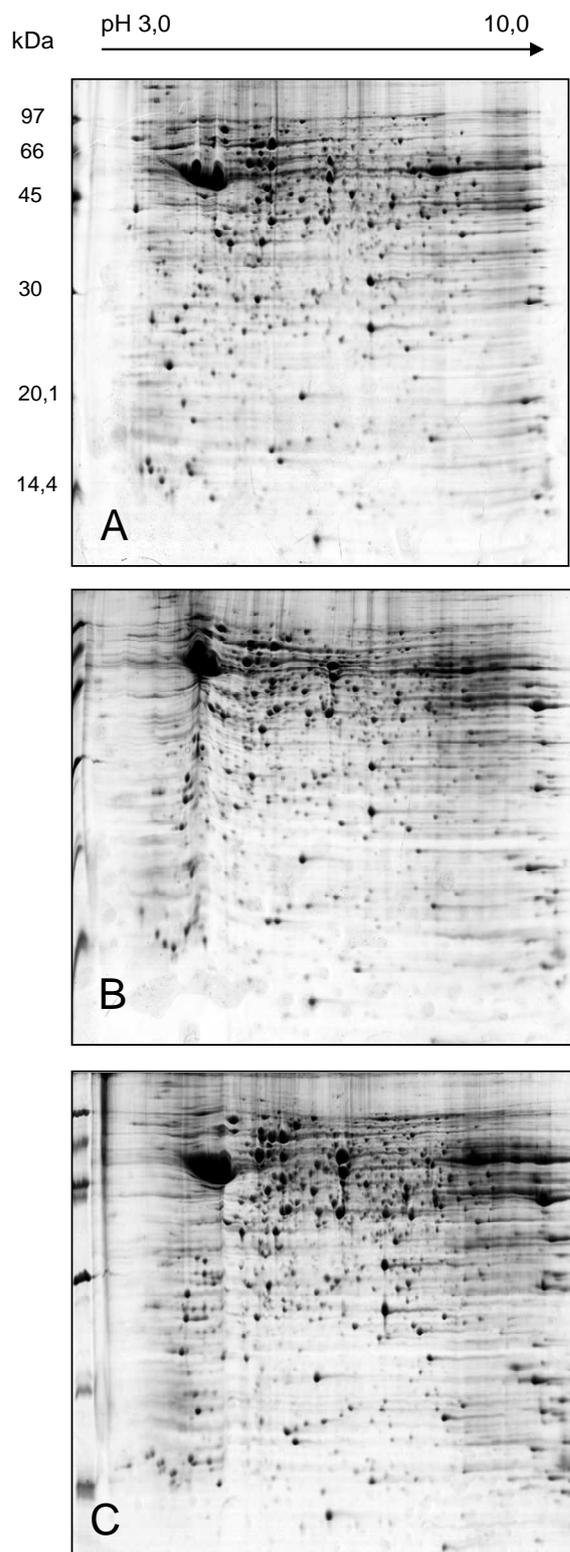
<b>Gradiente de pH</b>	<b>Massa proteica (<math>\mu\text{g}</math>) *</b>	<b>Número de <i>spots</i></b>
3 – 10 NL	300	699
3 – 10 NL	600	1.121
4 – 7 L	300	441
4 – 7 L	600	622

\* A massa proteica utilizada foi obtida da cepa WT de *S. culicis* após extração de proteínas com tampão Ci e técnica de congelamento e descongelamento, seguido de precipitação de proteínas utilizando etanol/acetona.

## 5.2 Geração dos perfis 2DE das cepas WT e Apo de *Strigomonas culicis*

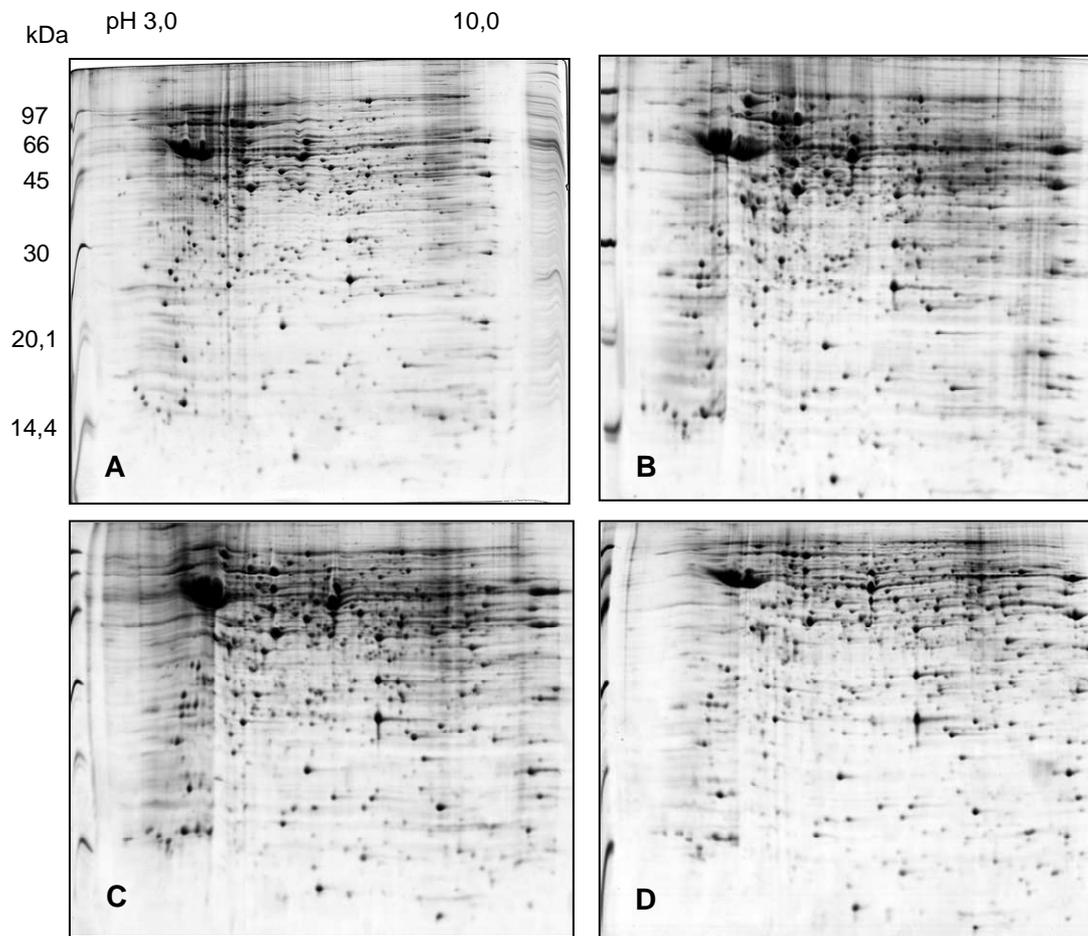
A **Figura 5.8** apresenta os géis referência para a cepa selvagem, para a qual um total de 15 géis foram obtidos para a fase log: 5 géis representando início (24 horas), 5 géis representando meio (56 horas) e 5 géis representando fim (80 horas). A **Figura 5.9** apresenta os géis referência para a cepa aposimbótica, para a qual um total de 20 géis foram obtidos para as fases logarítmica e estacionária: 5 géis representando início (24 horas), 5 géis representando meio (56 horas) e 5 géis representando fim de fase log (80 horas), e 5 géis representando a fase estacionária (92 horas). Os mesmos géis, em maior ampliação, podem ser individualmente visualizados no **Anexo** (item 9.1).

O uso de replicatas biológicas em detrimento de replicatas técnicas é justificado pela fórmula de cálculo de erro padrão. Nesta, o erro padrão (SE) pode ser calculado pela fórmula, onde  $S_b$  corresponde ao desvio padrão entre amostras biológicas e  $S_t$  entre replicatas técnicas de uma mesma amostra,  $n$  representa o número de replicatas biológicas e  $m$  o número de técnicas. Por este cálculo, é possível compreender que aumentos em  $n$  ou  $m$  induzem a uma redução de SE, porém um aumento de  $n$  induzirá uma maior redução de SE do que um aumento de  $m$ . Sendo assim, quando apenas um número limitado de géis pode ser confeccionado, tendo em vista a grande massa de proteínas a ser utilizada e a limitação metodológica de como lidar com uma grande quantidade de géis, como acontece em estudos utilizando 2DE, replicatas biológicas são sempre melhores que replicatas técnicas (revisto por Valledor e Jorrín, 2011).



**Figura 5.8 - Perfil eletroforético bidimensional das proteínas extraídas da cepa WT de *S. culicis* em distintas etapas da fase logarítmica de crescimento celular.**

Representação do perfil eletroforético de uma amostra contendo 600 µg de proteínas, oriundas do (A) início, (B) meio e (C) fim da fase logarítmica de crescimento celular da cepa WT de *S. culicis*, obtida após extração com tampão de lise Ci e técnica de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, com posterior precipitação de proteínas utilizando a metodologia de etanol/acetona. Focalização isoeétrica em fitas de pH imobilizado de 3-10 NL. Imagem, redimensionada, representativa do gel referência (*master*) de um experimento realizado em quintuplicata biológica.

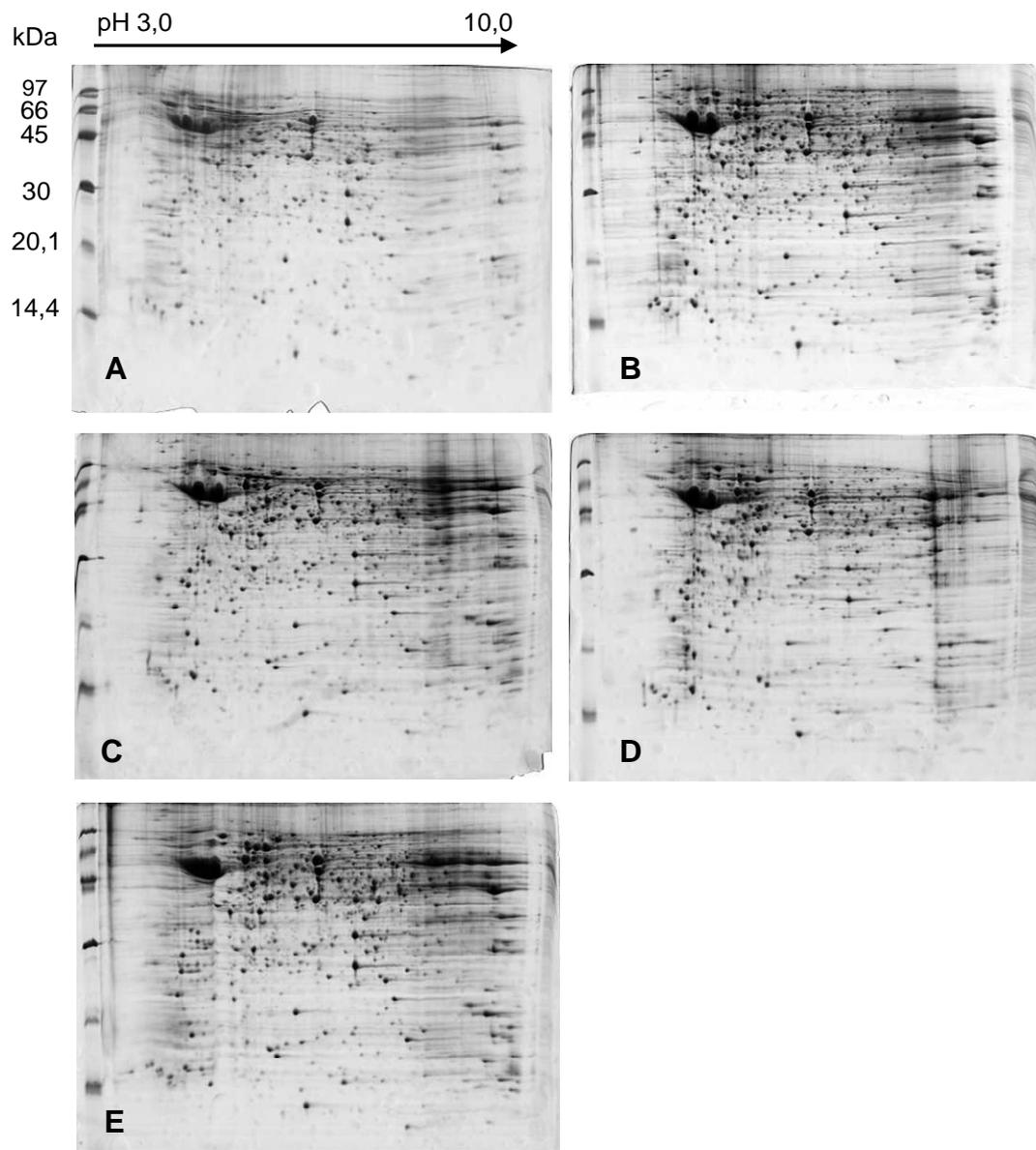


**Figura 5.9 - Perfil eletroforético bidimensional das proteínas extraídas da cepa Apo de *S. culicis* em distintas etapas da fase logarítmica e da fase estacionária de crescimento celular.**

Representação do perfil eletroforético de uma amostra contendo 600 µg de proteínas, oriundas do (A) início, (B) meio e (C) fim da fase log e de (D) fase estacionária de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*, obtida após extração com tampão de lise Ci e técnica de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, com posterior precipitação de proteínas utilizando a metodologia de etanol/acetona. Focalização isoeétrica em fitas de pH imobilizado de 24 cm 3-10 NL. Imagem, redimensionada, representativa do gel referência (*master*) de um experimento realizado em quintuplicata biológica.

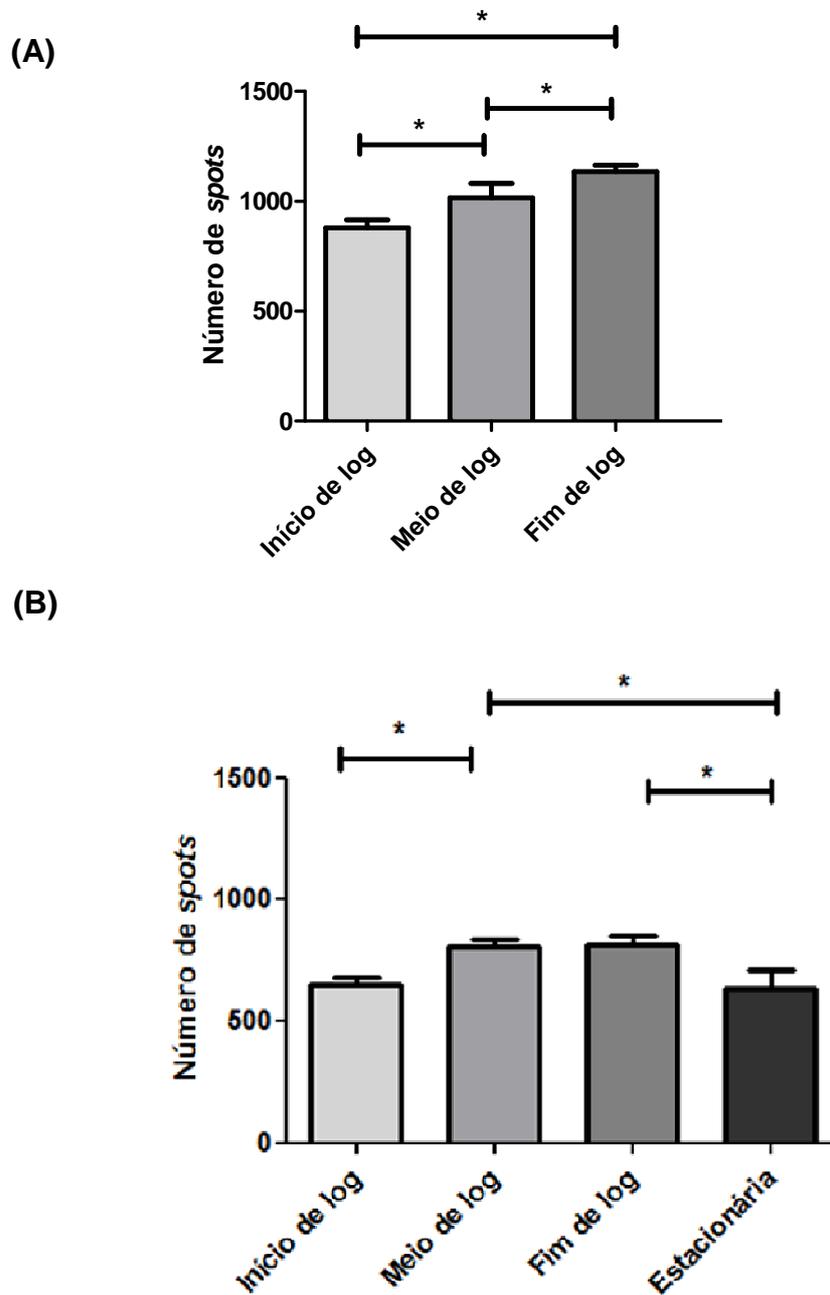
Uma das réplicas do tempo de 80 h (fim de fase exponencial – cepa WT) apresentou perfil eletroforético diferente do resto das replicatas do grupo. Na **figura 5.10A** pode-se observar o gel referente à réplica citada. Quando comparado às outras replicas (**Figura 5.10B, C, D e E**), este gel apresentou uma redução de 52,7% no número de *spots*, sendo observado um grande número de arrastes. Os motivos envolvidos nesta redução drástica podem estar relacionados a algum defeito na fita de pH imobilizado utilizada, tendo em vista que este foi o único *strip* oriundo de lote diferente dos utilizados para as outras replicatas. Tendo em vista o ocorrido, este gel foi excluído das análises de imagem, e visando igualar o número de réplicas utilizadas, para cada grupo experimental analisado, um gel de cada grupo também foi excluído, utilizando-se como parâmetro para exclusão o maior desvio padrão apresentado após quantificação de *spots*.

A análise de imagem dos géis da cepa WT de *S. culicis*, mostrou um aumento no número de *spots* detectados de acordo com o avanço da fase logarítmica do crescimento celular, como podemos observar pelos dados apresentados na **Figura 5.11A**. Para a cepa apossimbiótica, a análise de imagem dos géis indicou um aumento no número de *spots* quando a célula alcança a metade da fase exponencial, porém na passagem desta etapa para o fim da fase exponencial ocorre uma manutenção no número de *spots*, com ligeira diminuição na fase estacionária (**Figura 5.11B**). O perfil eletroforético das proteínas de ambas as cepas é semelhante, apresentando um maior número de proteínas de alta massa molecular, compreendidas entre 97 e 45 kDa, com uma grande concentração na região mais central referente ao processo de focalização isoeletrica, correspondente ao intervalo de pH de 4 a 6. Proteínas nos extremos de pI e volume molecular são representadas em menor quantidade e intensidade.



**Figura 5.10 - Géis bidimensionais referentes às replicatas biológicas de fim de fase logarítmica de *S. culicis*.**

Cada amostra utilizada foi oriunda de uma extração de proteínas após 80 horas de crescimento celular, equivalendo à etapa de fim de fase logarítmica da cepa WT de *S. culicis*.

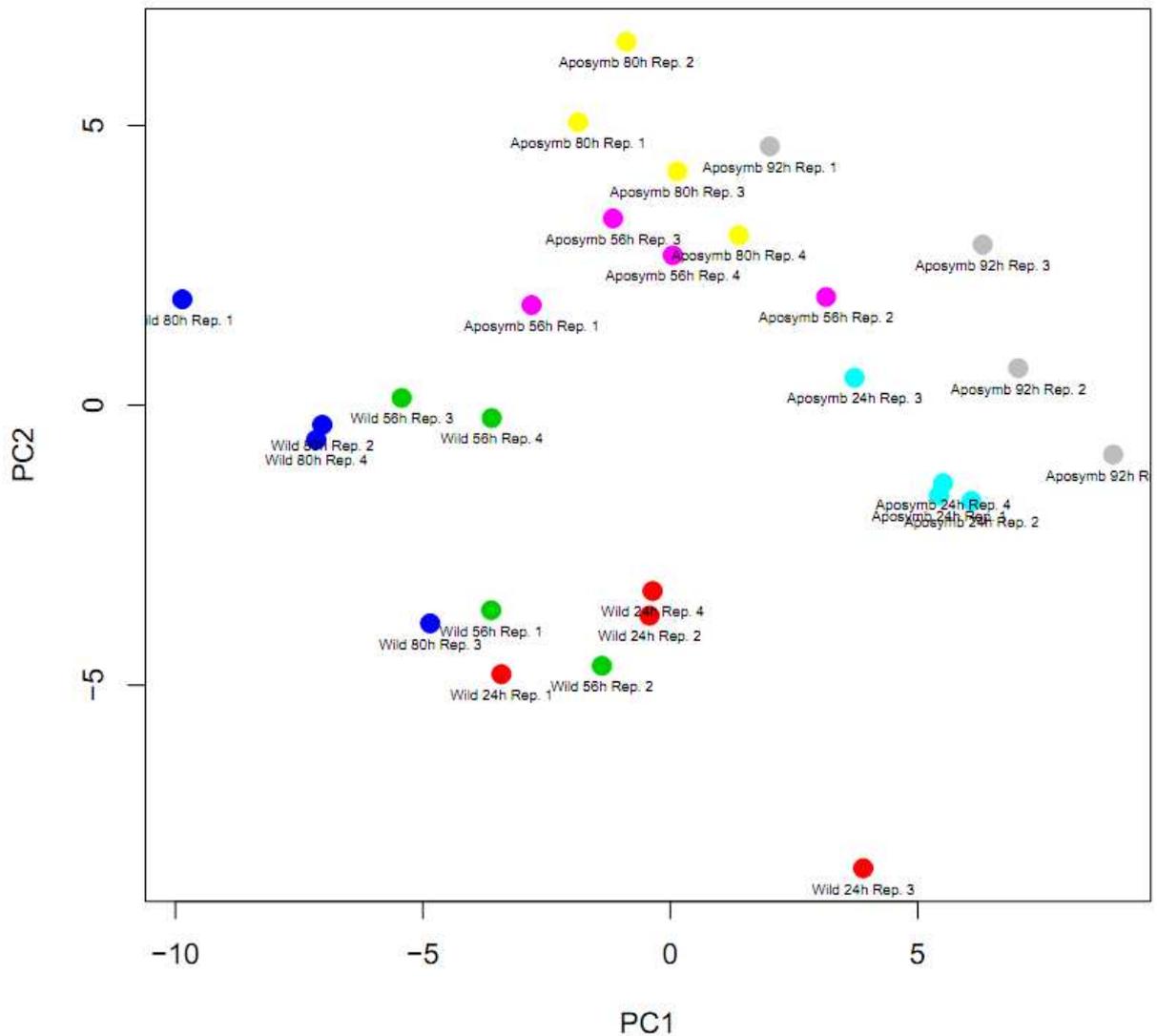


**Figura 5.11 - Quantificação de spots (A) em distintas etapas da fase log de crescimento celular da cepa WT e (B) das fases logarítmica e estacionária da cepa Apo de *S. culicis*.** Os dados obtidos representam a média do número de spots em cada uma das etapas com seus respectivos desvios-padrões. Experimento realizado em quadruplicata biológica. \*  $p < 0,05$

### 5.3 Análise comparativa dos perfis proteômicos bidimensionais

Um pré-processamento dos dados foi realizado, tendo em vista que dados proteômicos brutos tendem a apresentar uma grande variabilidade. Esta variabilidade está relacionada ao baixo número de replicatas utilizadas sendo inerente: (1) a técnica 2DE, (2) ao número de *spots* ausentes em uma série de réplicas de uma mesma amostra (denominados *missing values*), e (3) às diferentes variâncias entre os *spots*. Sabendo que a intensidade de um *spot* é diretamente proporcional ao número de *pixels* identificados pelo instrumento, manchas maiores sofrem maior interferência do processo de digitalização de imagem, a variância observada nos dados não é igualmente distribuída. Por estes motivos, transformações dos dados se fazem necessárias, sendo a transformação logarítmica, com normalização dos dados, uma das mais adequadas para dados de 2DE (Valledor e Jorrín, 2011).

Previamente à análise comparativa dos dados, a área de todos os *spots* detectados foi transformada e reorganizada a fim de realizar uma análise de componentes principais. O resultado mostrou que a variação entre as réplicas foi suficientemente pequena para distinguir as condições experimentais estabelecidas (**Figura 5.12**).



**Figura 5.12 - Análise de componentes principais das replicatas biológicas de cepas de *S. culicis*.**

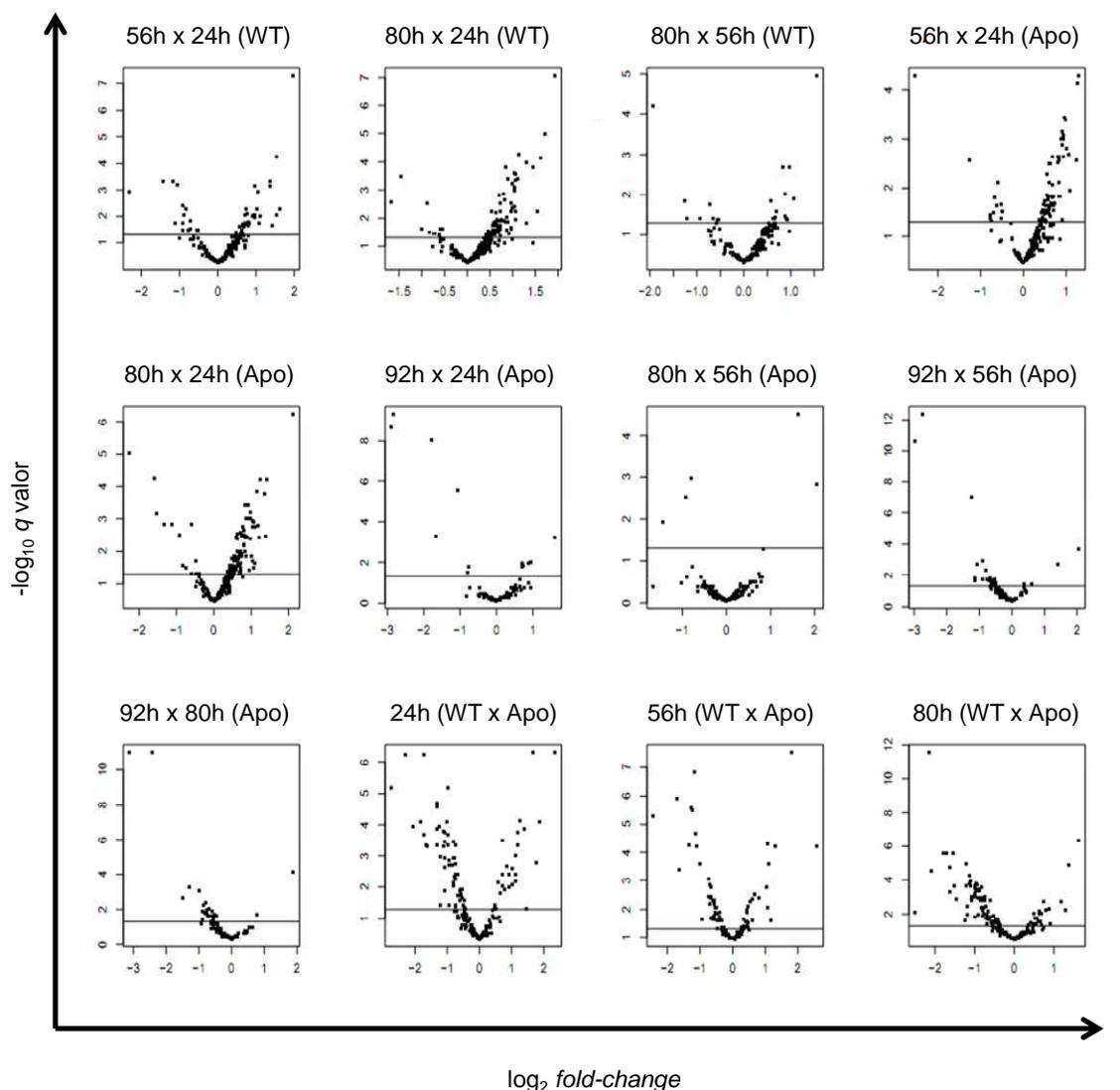
Cada cor representa um conjunto de replicatas de uma condição experimental. A cepa WT está representada pelas cores: vermelha (início de fase log), verde (meio de fase log) e azul (fim de fase log). A cepa Apo está representada pelas cores: ciano (início de fase log), lilás (meio de fase log), amarela (fim de fase log) e cinza (fase estacionária). Nos eixos X e Y a sigla PC equivale a componente principal 1 e 2.

Os perfis proteômicos bidimensionais foram comparados dois a dois em programa de análise de imagens *Image Master 2D platinum 7* (GE Healthcare), sendo dois tipos de análises comparativas realizadas: intercepa e intracepa. Na análise intracepa, também denominada neste trabalho de análise temporal, géis de início de fase log foram comparados aos géis de meio de fase log, e géis de meio de fase log foram comparados aos de fim de fase log. No caso específico da cepa Apo, géis de fim de fase log foram comparados aos de fase estacionária. Na análise intercepa, foram realizadas todas as combinações possíveis entre os géis de fase log da cepa WT e da cepa Apo.

Com esta análise foram definidos todos os *spots* que apresentaram abundância relativa diferencial, bem como os que só estavam presentes em uma das condições analisadas, sendo, portanto, denominados, exclusivos. O termo exclusivo indica apenas que aquele *spot* não pode ser detectado pela metodologia, não necessariamente implicando que a proteína representada pelo *spot* não esteja presente na amostra.

Os *spots* que apresentaram abundância relativa diferencial foram submetidos à análise estatística. No caso do uso de quatro replicatas biológicas, comumente os *softwares* de análise de imagens realizam o teste T ou análise de variância (ANOVA), testes que não são suficientemente poderosos para detectar, com alta confiabilidade, as diferenças observadas. Por este motivo escolhemos o método LIMMA (Smyth, 2005), inicialmente desenvolvido para ensaios de micro arranjos de RNA, o qual pode lidar com baixo número de replicatas e presença de *missing values* (Schwämmle, 2013). Para a análise, foi permitido até um *missing value* por grupo de replicatas biológicas sendo seguido por testes estatísticos para comparações não pareadas da intensidade dos *spots*. *P* valores foram corrigidos por múltiplos testes (Storey, 2002). Toda comparação da abundância com *q* valor inferior ou igual a 0,05, correspondendo a valores de taxas de falsa descoberta (*false-discovery rate* - FDR) de 5%, foi considerada como sendo representativa de *spot/proteína* regulada. A **Figura 5.13** apresenta os gráficos do tipo *volcano plot* onde o eixo horizontal representa o logaritmo de base 2 do valor da razão entre as abundâncias, de determinado *spot/proteína*, de duas condições experimentais sendo comparadas. Esta razão é usualmente chamada de *fold-change* na literatura. Para o ponto 0 (zero) temos que  $\log_2 \text{fold-change} = 0$ . Logo, *fold-change* (razão entre as abundâncias) =  $2^0 = 1$ . Ou seja, neste caso, o *spot* (proteína) encontra-se na mesma

concentração nas duas amostras comparadas. Valores de  $\log_2$  *fold-change* maiores do que zero indicam maior abundância relativa daquele *spot*, na amostra que encontra-se como numerador. Por outro lado, valores negativos de  $\log_2$  *fold-change* indicam abundância relativa diminuída. O eixo vertical da **figura 5.13** representa o valor negativo do logaritmo (base 10) dos  $q$  valores encontrados para cada comparação. A linha preta determina o ponto de corte, acima do qual estão as abundâncias com valores taxa de falsa descoberta (FDR) inferiores a 5%.

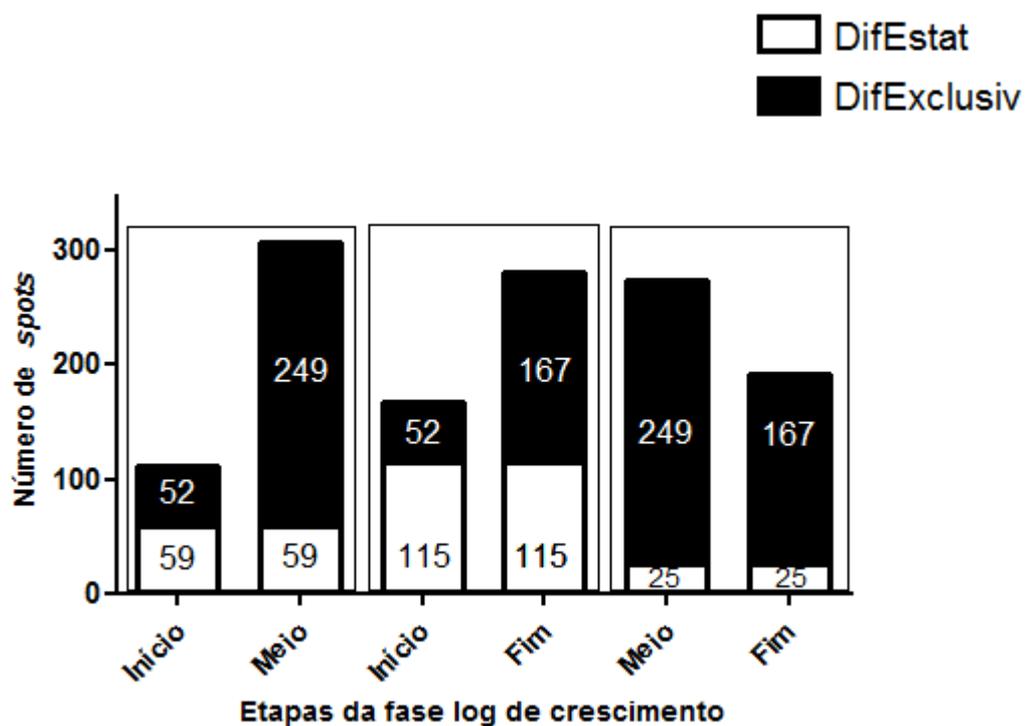


**Figura 5.13 - Abundância diferencial de spots em condições pareadas de *S. culicis*.** Representação dos spots diferenciais por estatística (DifEstat), após comparação duas a duas para cada uma das condições analisadas (cepa e tempo de crescimento). A linha horizontal indica o ponto de corte acima do qual estão os spots que apresentam taxa de falsa descoberta inferiores a 5%.

### 5.3.1 Comparações intracepas

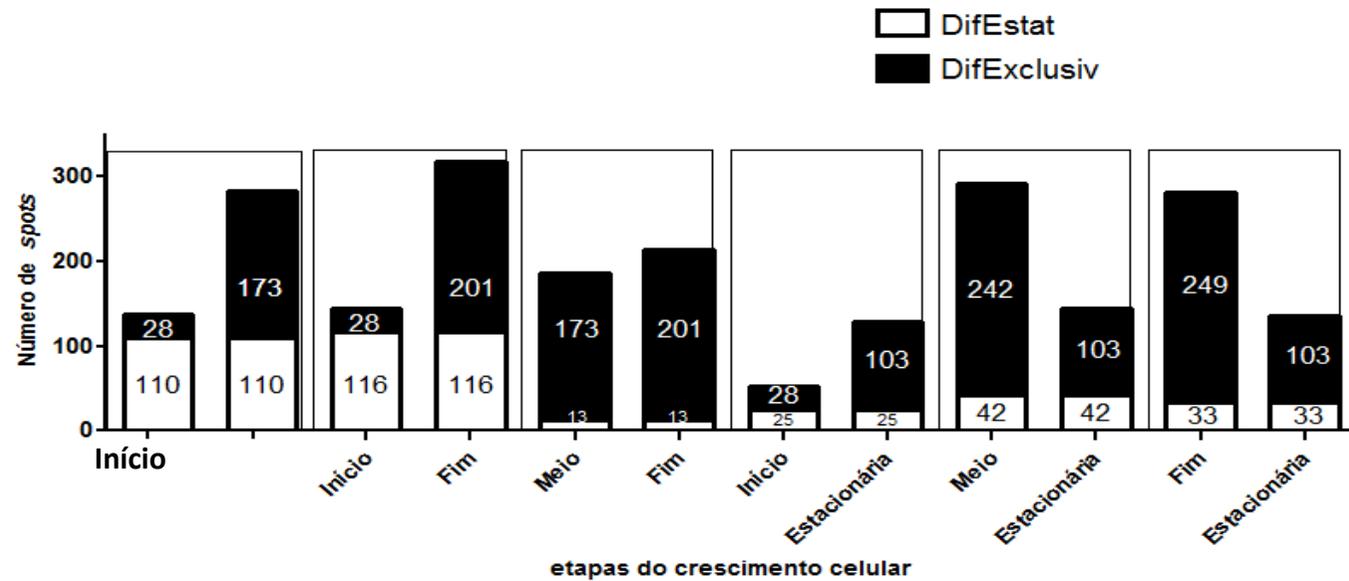
Dentre as comparações realizadas entre as fases de crescimento da cepa WT, é possível observar que a comparação que apresenta o maior número de *spots* com abundância diferencial com significância estatística é a realizada entre fim e início de fase log (80 h *versus* 24 h). Para a cepa Apo, isto acontece para as comparações entre meio e início de log (56 h *versus* 24 h) e fim e início de log (80 h *versus* 24 h). Na cepa Apo, a comparação entre fase estacionária e fim de fase log (92 h *versus* 80 h) apresenta maiores diferenças do que a comparação entre fase estacionária e meio de fase log (92 h *versus* 56 h), sendo que existem menos diferenças entre fase estacionária e início de fase log (92 h *versus* 24 h), indicando que possivelmente ocorre uma readaptação metabólica desta cepa na fase estacionária, aproximando-a às características celulares de início e meio de fase log, uma condição bem distinta do fim de fase log (**Figura 5.13**). Estes dados estão em concordância com a análise de componentes principais (**Figura 5.12**) onde, para a cepa Apo, ocorreu o agrupamento das replicatas biológicas dos géis bidimensionais de fase estacionária próximo aos géis de início de fase log da mesma cepa

A partir dos dados apresentados na **Figura 5.13**, foi quantificado o número de *spots* que apresentaram abundância relativa diferencial, com significância estatística, entre as condições analisadas. Estes serão denominados a partir desse momento diferenciais por estatística (DifEstat). Nas **Figuras 5.14 e 5.15** podemos observar as comparações intracepas. Nestes gráficos, além da quantificação dos DifEstat, estão também representados os *spots* exclusivos de cada condição. Estes últimos serão denominados diferenciais por exclusividade (DifExclusiv).



**Figura 5.14 - Relação de spots diferenciais por estatística (DifEstat) e diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) na cepa WT de *S. culicis*.**

Todas as comparações foram feitas duas a duas e estão representadas por pares de barras. Barras pretas indicam o número de spots diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) e barras brancas indicam o número de spots diferenciais por estatística (DifEstat). O somatório do número total de spots diferenciais está indicado no topo de cada comparação.



**Figura 5.15 - Relação de spots diferenciais por estatística (DifEstat) e diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) na cepa Apo de *S. culicis*.**

Todas as comparações foram feitas duas a duas e estão representadas por pares de barras. Barras pretas indicam o número de spots diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) e barras brancas indicam o número de spots diferenciais por estatística (DifEstat). O somatório do número total de spots diferenciais está indicado no topo de cada comparação.

Na cepa WT, há ocorrência de uma maior quantidade de DifExcluív, na metade da fase log (249 *spots*). Desta forma, quando quantificado o número total de *spots* diferenciais (soma dos DifEstat e DifExclusiv) a comparação feita entre meio e fim de fase log (56 h *versus* 80 h) apresenta o maior número de diferenças observadas, somando 441 *spots*, significando uma maior modulação de *spots*/proteínas entre estas etapas. Esta modulação pode estar relacionada não apenas à expressão de novas proteínas, mas também às modificações pós-traducionais de proteínas já expressas.

Diferentemente da cepa WT, a cepa Apo apresenta um padrão de aumento crescente no número de DifExclusiv com o decorrer da fase log de crescimento celular (28, 173 e 201), seguido de diminuição na fase estacionária (103). O somatório do número total de *spots* diferenciais indica a ausência de uma etapa marcadamente diferenciada entre a maioria das comparações realizadas, com exceção da comparação de início de fase exponencial com fase estacionária, para a qual está representada a menor quantidade de *spots* totais diferenciais (156), em relação a todas as outras comparações, as quais apresentaram uma média de  $364 \pm 35$  *spots*, sendo este mais um indicativo, em conjunto com a quantificação de DifEstat e com a análise de componentes principais de que, possivelmente, ocorre uma readaptação metabólica desta cepa na fase estacionária, aproximando-a às características celulares de início de fase log.

Em ambas as cepas, DifEstat apresentam razões de abundância distintas (eixo das abscissas da **Figura 5.13**), porém poucos apresentam uma alteração visualmente marcante. Considerando um valor arbitrário de razão de abundância (*fold-change*) igual a 3,00 [equivalente a valores acima de aproximadamente 1,58 no eixo x], apenas 11 *spots* se encontram nesta condição; destes, cinco em comparações realizadas intracepa selvagem e seis em comparações intracepa apossimbiótica. Quando consideramos uma razão de abundância igual a 0,33 [equivalente a valores abaixo de aproximadamente -1,58 no eixo x], existem apenas 12 *spots*, sendo três destes em comparações realizadas intracepa selvagem e nove em comparações intracepa apossimbiótica. Estes valores não correspondem a 10% do total de DifEstat de cada uma das cepas.

A análise das abundâncias dos *spots* com intuito de definir quais devem ser considerados importantes para identificação de proteínas deve sempre ser feita com cautela. A expectativa errônea de que apenas grandes variações em abundância, em distintas condições experimentais, são biologicamente importantes, não deve

nortear a seleção de *spots* a serem identificados. A justificativa para tal afirmação se baseia no fato de que nem sempre são necessárias grandes alterações na expressão de uma proteína para se enxergar sua função ou sua atuação, como é o caso de proteínas que atuam em controles finos e delicados dentro de uma célula, como por exemplo, fatores de inibição e transcrição gênica (revisto por Valledor e Jorrín, 2011). Sendo assim, mesmo com uma baixa taxa de DifEstat que apresentem grandes variações de abundância, diversas proteínas importantes podem estar sendo representadas por pequenas variações. Deste modo, todos os DifEstat, de acordo com os parâmetros previamente descritos, foram selecionados para serem identificados por espectrometria de massas.

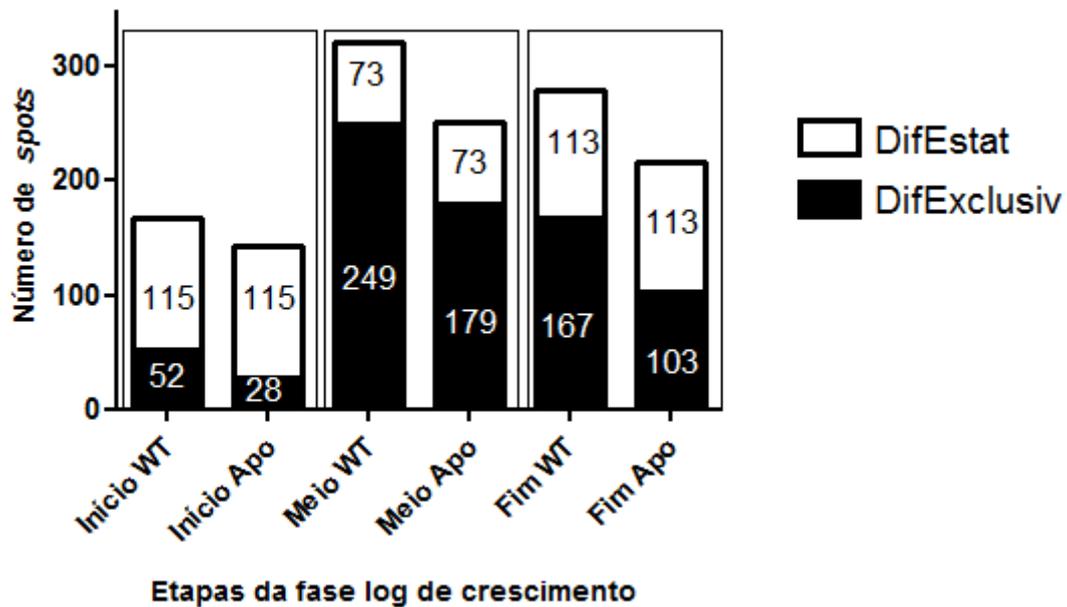
A imagem de 2DE representativa de cada comparação realizada está representada no **Anexo** (subitem 9.2), nesta é possível observar o posicionamento dos *spots* DifEstat e DifExclusiv.

### 5.3.2 Comparações intercepas

As comparações realizadas entre as distintas cepas de *S. culicis* foram realizadas pareando tempos de crescimento iguais. Desta forma, os perfis 2DE de início, meio e fim de fase log da cepa Apo foram comparados, respectivamente, com os perfis de início, meio e fim de fase log da cepa WT.

Os três últimos gráficos apresentados na **Figura 5.13** compreendem resultados desta análise. A quantificação de DifEstat e DifExclusiv está representada na **Figura 5.16**. Nesta figura podemos observar que o início de fase log, para ambas as cepas, é a etapa que apresenta o menor número total de *spots* diferenciais (195 *spots*), sendo ainda a etapa com menor número de DifExclusiv. Meio e fim de fase exponencial apresentam, respectivamente, número total de *spots* diferenciais 2,5 e 2,0 vezes maiores que o total apresentado pelo início de fase exponencial.

A imagem de 2DE representativa de cada comparação realizada está representada no **Anexo** (subitem 9.2), nesta é possível observar o posicionamento dos *spots* DifEstat e DifExclusiv.



**Figura 5.16 - Relação de spots diferenciais por estatística (DifEstat) e diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) na comparação entre cepas WT e Apo de *S. culicis*.**

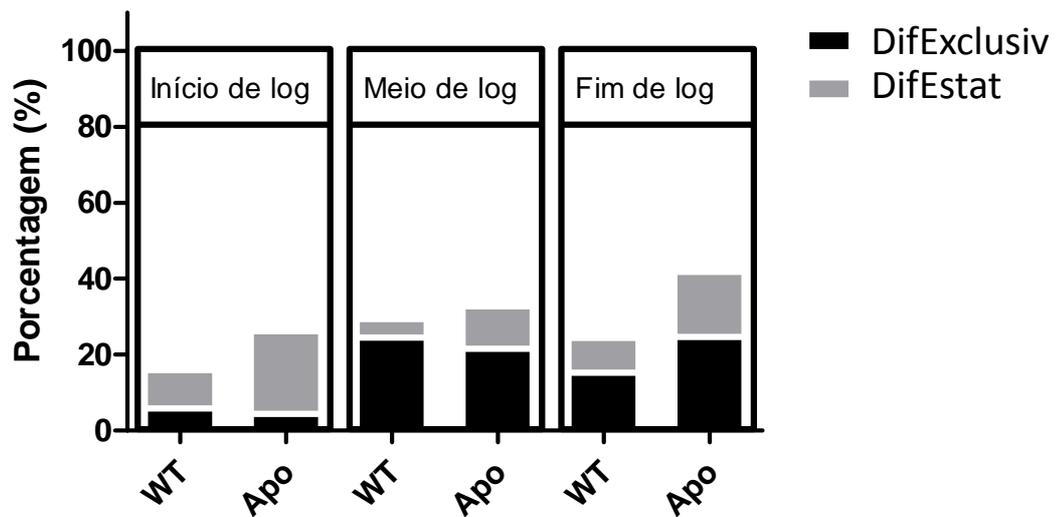
Todas as comparações foram feitas duas a duas e estão representadas por pares de barras. Barras pretas indicam o número de spots diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) e barras brancas indicam o número de spots diferenciais por estatística (DifEstat). O somatório do número total de spots diferenciais está indicado no topo de cada comparação.

A quantificação relativa de DifEstat e DifExclusiv, em relação ao número total de *spots* detectados em cada etapa do crescimento celular, está representada na **Figura 5.17**. Nesta figura podemos observar que a cepa Apo apresenta uma maior porcentagem de *spots* totais diferenciais, independente da comparação realizada. Além disso, a proporção de DifExclusiv em cada condição analisada se mantém parecida entre as cepas, ocorrendo uma maior variação na proporção de DifEstat. Apesar da fase de início de crescimento celular ser a detentora do menor número total de *spots* diferenciais, é esta a etapa que apresenta as maiores diferenças entre as cepas WT e Apo, sendo esta diferença representada pelos DifEstat. O mesmo ocorre quando comparamos o fim de fase log, porém nesta etapa a maior porcentagem de *spots* totais diferenciais é caracterizada pelos DifExclusiv.

Estes dados indicam que as diferenças estruturais e metabólicas entre as cepas WT e Apo de *S. culicis* são fruto conjunto da diferença em níveis proteicos bem como da presença de proteínas distintas ou de isoformas, diferencialmente expressas em cada cepa. No entanto, em início de fase log, as diferenças na abundância de proteínas compartilhadas entre ambas as cepas poderiam ser as responsáveis pelas diferenças observadas entre ambas.

Pelos mesmos motivos expostos na seção anterior, todos os DifEstat, de acordo com os parâmetros previamente descritos, foram selecionados para serem identificados por espectrometria de massas.

A importância dos DifExclusiv é inegável, porém devido ao grande número destes, se tornou impossível a identificação de todos durante esta tese, sendo, portanto, selecionados para identificação apenas uma parcela, compreendida pelos *spots* exclusivos em início de fase log de ambas as cepas, e os 10 mais intensos presentes em meio e fim de fase log de cada cepa.



**Figura 5.17 – Percentagem relativa de *spots* diferenciais por estatística (DifEstat) e diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) na comparação entre cepas WT e Apo de *S. culicis*.**

Todas as comparações foram feitas duas a duas e estão representadas por pares de barras. Barras pretas indicam o número de *spots* diferenciais por exclusividade (DifExclusiv) e barras brancas indicam o número de *spots* diferenciais por estatística (DifEstat). Os dados correspondem a percentagem de *spots* em relação ao número total de *spots* detectados em cada etapa do crescimento celular de cada cepa.

### 5.3.3 Proteínas identificadas

Todos os DifEstat e a parcela selecionada dos DifExclusiv foram identificados por *peptide-spectrum matching* (PSM) utilizando espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF. Na ausência de identificação por esta metodologia, as amostras foram identificadas por nano ESI-LTQ XL/Orbitrap. Com o objetivo de minimizar identificação de *spots* errôneos, foram excluídos do processo de identificação os que apresentavam intensidade de coloração insuficiente para serem detectados visualmente e os que não apresentavam definição de borda, impedindo a detecção de seu exato posicionamento frente aos *spots* circundantes.

Para a cepa Apo, do total de DifEstat, 194 foram submetidos à identificação por espectrometria de massas. Destes 106 (54,6%) foram identificados por MALDI-TOF/TOF e 22 (11%) por espectrometria de massas de alta resolução (**Anexo subitem 9.3, Tabela 1**). Para a cepa selvagem, do total de DifEstat 104 foram submetidos à identificação por espectrometria de massas. Destes, 69 (66,3%) foram identificados por MALDI-TOF/TOF e 5 (5%) por espectrometria de massas de alta resolução (**Anexo subitem 9.3, Tabela 2**). A comparação entre as cepas WT e Apo originou 174 DifEstat que foram submetidos à identificação por espectrometria de massas. Destes 112 (64,4%) foram identificados por MALDI-TOF/TOF e 28 (25%) por espectrometria de massas de alta resolução (**Anexo subitem 9.3, Tabela 3**). Os dados detalhados de cada comparação realizada estão representados nas tabelas 5.3, 5.4 e 5.5.

**Tabela 5.3 – Relação entre número de *spots* DifEstat e quantidade de proteínas identificadas na comparação intracepa WT de *S. culicis*.**

Identificação	Comparação intracepa (WT)		
	Início x Meio de log	Início x Fim de log	Meio x Fim de log
# <i>spots</i> DifEstat	59	115	25
# <i>spots</i> DifEstat identificados	30	53	17
# proteínas identificadas	45	72	22

**Tabela 5.4 - Relação entre número de *spots* DifEstat e quantidade de proteínas identificadas na comparação intracepa Apo de *S. culicis*.**

Identificação	Comparação intracepa (Apo)					
	Início x Meio de log	Início x Fim de log	Meio x Fim de log	Início de log x Estacionária	Meio de log x Estacionária	Fim de log x Estacionária
<b># <i>spots</i> DifEstat</b>	110	116	13	25	42	33
<b># <i>spots</i> DifEstat identificados</b>	70	60	2	17	29	22
<b># proteínas identificadas</b>	114	93	9	34	50	35

**Tabela 5.5 – Relação entre número de *spots* DifEstat e quantidade de proteínas identificadas na comparação intercepa WT e Apo de *S. culicis*.**

Identificação	Comparação intercepa (WT x Apo)		
	Início de log	Meio de log	Fim de log
<b># <i>spots</i> DifEstat</b>	115	73	113
<b># <i>spots</i> DifEstat identificados</b>	78	45	71
<b># proteínas identificadas</b>	125	57	120

Um total de 128 DifExclusiv foram submetidos à identificação, dos quais 47 (36,7%) foram identificados por MALDI-TOF/TOF e 20 (16%) por espectrometria de massas de alta resolução (**Anexo subitem 9.3, Tabela 4**).

Devido ao baixo número de spots DifExclusiv submetidos a identificação por MS aliado a baixa taxa de identificações destes, optamos por trabalhar com os DifEstat, utilizando-os para detalhamento de alguns processos biológicos: (1) expressão de peptidases, (2) síntese de heme e (3) interação tripanossomatídeo-hospedeiro.

### 5.3.3.1 Expressão de peptidases

As peptidases estão presentes em todos os domínios da vida: eukarya, archea e bacteria. Uma vez que estas enzimas compreendem um grupo de proteínas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, é natural a sua participação em diversas funções biológicas, tendo em vista que em todas as etapas de desenvolvimento celular se faz necessário processamento ou degradação proteolítica de proteínas (revisto em Santos et al., 2013). Estas enzimas são primariamente, e historicamente, subdivididas em dois grandes grupos de acordo com a reação catalisada: endopeptidases e exopeptidases. Atualmente, a classificação se tornou mais complexa devido à grande quantidade de informações estruturais e funcionais dessas enzimas, fazendo com que estas sejam subdivididas em classes, as quais podem ser agrupadas em famílias, sendo cada família representada por seu domínio catalítico: aspártico, cisteíno, metalo, serino, treonino, glutâmico e asparagino peptidases. Estas famílias podem ser agrupadas em clãs dependendo de sua homologia e ancestralidade em comum (Lima et al., 2013; revisto em Santos et al., 2013).

Em micro-organismos, além de exercerem funções biológicas básicas, as peptidases agem como fatores de virulência, atuando em processos de colonização, invasão, disseminação e evasão do sistema imunológico do hospedeiro (Lima et al., 2013; revisto em Santos et al., 2013). Em tripanossomatídeos as classes mais abundantes de peptidases são: cisteíno e metalo peptidases (Santos et al., 2013). Nos últimos anos o estudo de peptidases de tripanossomatídeos tem ganhado maior atenção, uma vez que estas enzimas possuem função essencial no processo de interação entre parasito e hospedeiro, sendo um importante alvo para ação de

quimioterápicos e para o estudo de interação celular (revisto por Vermelho et al, 2010; Lima et al, 2013).

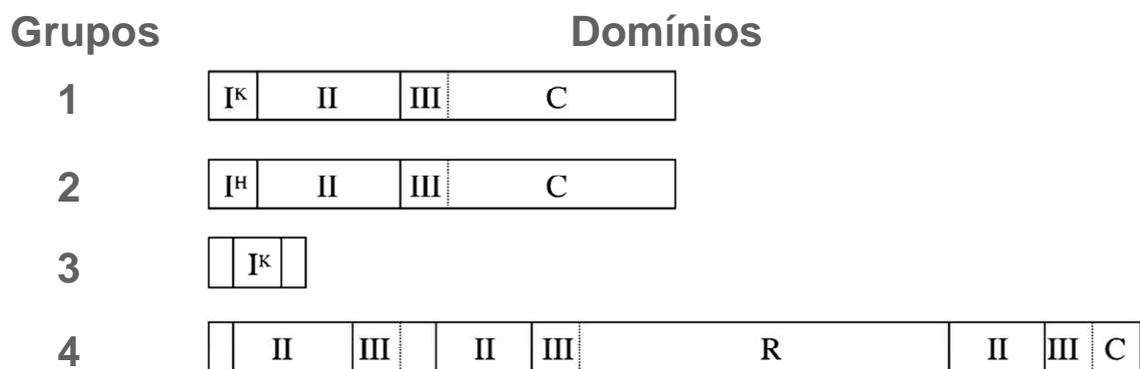
As peptidases presentes em tripanossomatídeos monoxênicos fazem parte das famílias das cisteíno peptidases (que inclui as calpaína-símile) e metalo peptidases (que inclui a gp63-símile), sendo a atividade destas enzimas evidenciada principalmente em frações aquosas e de membrana, respectivamente (Branquinha et al., 1996; revisto por Vermelho et al., 2010). Vale ressaltar que a atividade proteolítica para calpaínas-símile em tripanossomatídeos ainda não foi inequivocamente demonstrada (revisto por Branquinha et al., 2013).

As calpaínas foram inicialmente descritas em células de mamíferos e estão implicadas em funções celulares básicas, e como tal, sua atividade desregulada parece ser o fato crucial para o desencadeamento de importantes doenças humanas, como Alzheimer (revisto por Branquinha et al., 2013). As calpaínas típicas de mamíferos são peptidases heterodiméricas, compostas por duas subunidades, uma menor regulatória (30 kDa) e uma maior catalítica (80 kDa), sendo a maior formada por 4 domínios. O domínio I contém a região N-terminal e sua função é desconhecida; o domínio II apresenta o sítio catalítico e regiões ligadoras de cálcio; o domínio III serve de ligador entre os domínios II e IV; e o domínio IV é essencial para a atividade enzimática e dimerização da enzima. Os homólogos de calpaína encontrados em micro-organismos ou em organismos invertebrados podem apresentar os quatro domínios típicos, bem como apresentar diferenças na composição de aminoácidos desses domínios. A atividade proteolítica é modulada por cálcio e outros fatores, como fosfolípídeos, sugerindo uma atividade proteolítica em sítios próximos à membrana plasmática, uma vez que as concentrações de cálcio requeridas para a ativação da enzima não são as encontradas fisiologicamente nas células. As calpaínas parecem agir especificamente sobre substratos, modificando-os, em detrimento de uma ação proteolítica com fins degradativos. Neste sentido, proteínas dessa família estão envolvidas em processos de apoptose, transdução de sinal, diferenciação, remodelação de citoesqueleto e interação com a célula hospedeira (Ono et al., 1998; Hosfield et al., 1999; Ersfeld et al, 2005; Giese et al, 2008; revisto por Vermelho et al., 2010; revisto por Branquinha et al., 2013).

Famílias gênicas relacionadas à calpaínas em não-mamíferos são geralmente pequenas, porém em tripanossomatídeos essas famílias se destacam. O genoma recém-publicado indica para *S. culicis* a presença de 62 genes para cisteíno

peptidases do tipo calpaína-símile, enquanto *A. deanei* apresenta 85 genes, o que faz destas proteínas a maior família de genes presente em cada um dos genomas, podendo ser um indicativo da essencialidade destas enzimas para o desenvolvimento destes micro-organismos (Motta et al, 2013). Neste contexto, os estudos proteômicos ajudarão a aprofundar o conhecimento acerca desta família gênica, contribuindo para desvendar quais são os genes ou pseudogenes de fato expressos por estes tripanossomatídeos, questão ainda pouco compreendida.

As calpaínas de tripanossomatídeos podem ser categorizadas em quatro grupos: grupo 1 e 2, denominadas de calpaína-símile (CALPs), apresentam os quatro domínios das calpaínas típicas de mamíferos. Esses dois grupos são distinguíveis pelo seu domínio N-terminal, que pode ser encontrado apenas em cinetoplastídeos ( $I^k$ ), ou ser do tipo heterogêneo ( $I^h$ ) (**Figura 5.18**). O grupo 3 detém pequenas proteínas com homologia a  $I^k$ , sendo denominadas de pequenas proteínas de cinetoplastídeos relacionadas a calpaínas (SKCRPs). Em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* o comprimento médio destas proteínas é de 200 aminoácidos, a falta de similaridade deste domínio com outras calpaínas conhecidas impossibilita a determinação de sua função; por fim, as calpaínas do grupo 4 são altamente divergentes, e se caracterizam pela presença de uma ou mais regiões repetitivas (**Figura 5.18**) (Ersfeld et al, 2005). Calpaínas do grupo 4 têm sido detalhadamente estudadas por Galetovic e colaboradores (2011), porém sua função ainda não está claramente definida, mas sua detecção em estudos em *T. cruzi*, demonstram um relevante papel biológico (Andrade et al. 2008, Giese et al. 2008). Nossos dados proteômicos corroboram esses achados prévios e reforçam que a abundante expressão desta família multigênica em tripanossomatídeos monoxênicos e heteroxênicos indica uma função em processos celulares essenciais, ou em processos de interação com hospedeiros.

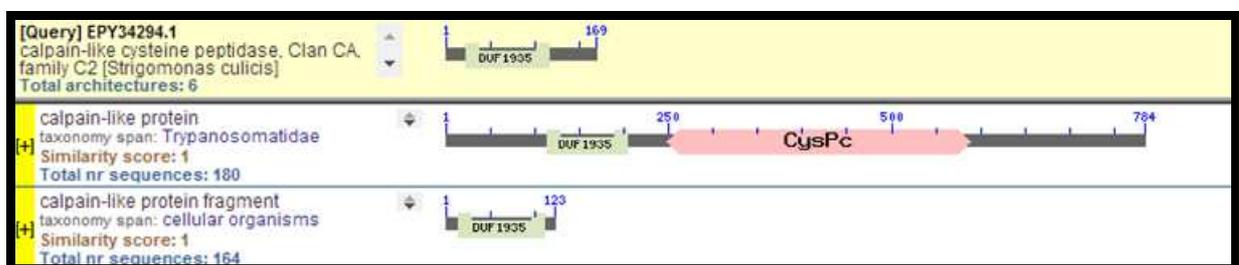


**Figura 5.18 - Classificação das calpaína-símile de tripanossomatídeos.**

Agrupamento das calpaínas de tripanossomatídeos de acordo com a estrutura de domínios apresentada. Os domínios representados são: domínio I específico de cinetoplastídeos (I<sup>K</sup>), domínio I heterogêneo (I<sup>H</sup>), domínio II que contém o sítio catalítico, mesmo que a tríade catalítica esteja alterada, domínio III de função desconhecida, domínio de sequências repetitivas (R) e domínio C-terminal (C). Extraído de Ersfeld et al., 2005.

Dentre as proteínas identificadas nesta tese, é possível observar a modulação de cisteíno peptidases e, mais especificamente, de uma calpaína-símile. Na análise intracepa da cepa WT de *S. culicis* foi possível identificar a modulação de uma calpaína-símile de 169 aminoácidos, representada por uma proteína com 19,5 kDa e pI de 6,3, tendo sido identificada por MALDI-TOF/TOF com 17% de cobertura de sequência. Esta proteína está modulada entre início e fim de fase log da cepa WT, apresentando maior abundância no início do crescimento celular (**Anexo subitem 9.3, Tabela 2**). Sua abundância diferencial também foi detectada na comparação intercepas. Nesta comparação é possível observar a modulação desta proteína, nas comparações entre início, meio e fim de fase log (**Anexo subitem 9.3, Tabela 3**). Este dado indica uma maior abundância em toda a etapa log de crescimento da cepa WT em comparação à cepa Apo.

O uso da funcionalidade de busca de domínios conservados (Web CD-search tool) do NCBI permitiu correlacionar o domínio identificado na sequência de aminoácidos da calpaína encontrada com a arquitetura de domínios similares em outras proteínas, fazendo uso da funcionalidade *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* (Marchler et al., 2004, 2009, 2011; Geer et al., 2002). Como podemos observar na **Figura 5.19**, o domínio DUF foi o único identificado na sequência desta proteína; este domínio possui função desconhecida e está presente em calpaínas do grupo 3, caracterizando esta como uma SKCRP.



**Figura 5.19 - Identificação de domínios conservados.**

A sequência de aminoácidos da calpaína-símile de *S. culicis*, identificada neste trabalho, foi submetida à busca por domínios conservados (Web CD-search tool). Cada linha indica a similaridade com proteínas de outros organismos. O domínio DUF 1935 está representado em verde e o domínio II representado em rosa (CysPC).

Até o momento a identificação de calpaínas em tripanossomatídeos monoxênicos, realizada através de reatividade cruzada de anticorpos só foi realizada para *A. deanei* e *H. samuelpeessoai* (d'Avila-Levy et al., 2003; Pereira et al., 2009). Para *A. deanei*, uma calpaína-símile secretada foi purificada por cromatografia e sua massa molecular estimada em 80 kDa, o que poderia corresponder a um dímero. A atividade hidrolítica relacionada a esta enzima foi inibida por EGTA e por E-64. Além disso, a apoenzima gerada pela incubação com EGTA e 1,10-fenantrolina teve a atividade completamente restaurada por cloreto de cálcio mas apenas parcialmente por outros íons divalentes. Desta forma, os dados bioquímicos indicavam se tratar de uma calpaína-símile. Além disso, a reatividade ao anticorpo anti-calpaína de uma calpaína atípica de *Drosophila melanogaster* reforçou esta possibilidade. Entretanto, no momento da publicação do artigo, devido à falta de dados genômicos da espécie, não foi possível definir se a enzima identificada correspondia a um membro verdadeiro da família das calpaínas (d'Avila-Levy et al., 2003).

Um estudo proteômico utilizando *L. donovani* identificou uma SKCRP correlacionando-a a processos de sensibilidade a antimônio. Uma maior abundância desta proteína aumenta a sensibilidade a antimônio por apoptose. Os autores propõem que esta proteína, a qual apresenta estrutura de domínio idêntica à calpaína descrita nesta tese, atue como um regulador de morte programada, devendo interagir com outras calpaína-símeis detentoras de domínios II e III (Vergnes et al., 2007).

A dualidade de massas moleculares observadas para as calpaínas de *A. deanei* e a identificada por abordagem proteômica pode estar relacionada a diferentes grupos de calpaínas sendo identificados. Uma vez que as SKRCPs não apresentam atividade hidrolítica, sua identificação por estudos que utilizem perfil de inibição de atividade enzimática não pode ser alcançada.

A grande abundância de genes de calpaínas em tripanossomatídeos que albergam simbiote pode estar relacionada à presença do simbiote, uma vez que sua presença requer um maior controle de regulação do ciclo celular e da distribuição das organelas no citoplasma, atividades biológicas intimamente associadas às funções de calpaínas (Ersfeld et al., 2005; Motta et al., 2013). Deste modo, nosso achado de maior abundância em início de fase log (para a comparação intracepa WT), e em cepa WT quando comparado à cepa Apo (para a comparação intercepas) é justificado pelo momento em que a célula se encontra, no qual a mesma está se preparando para iniciar o processo de divisão celular, ocorrendo

uma remodelação da estrutura citoplasmática, incluindo a movimentação de organelas e do próprio simbiote (Brum et al., 2014).

Além da presença destas enzimas, uma cisteíno peptidase, de 95 kDa e pI de 4,8 também foi identificada na análise intracepa Apo, não sendo observada abundância diferencial para a mesma cisteíno peptidase em cepa WT e nem quando as duas cepas são comparadas. Para esta peptidase, ocorre apenas a modulação entre início e meio de fase log de cepa Apo, apresentando maior abundância no início desta fase (**Anexo subitem 9.3, Tabela 1**).

Interessantemente, no trabalho de Santos e colaboradores (2001), o grupo analisou a influência das condições de cultivo sobre peptidases de *S. culicis* WT associadas à célula (de membrana e citoplasma) e secretadas e observou um aumento da atividade proteolítica com o desenvolvimento celular. Esta atividade estaria relacionada a cisteíno peptidases de baixa massa molecular (< 60 kDa) associada à célula (Santos et al., 2001). Este trabalho deixa claro que a composição do meio de cultura interfere diretamente nos tipos e na abundância de peptidases associadas à célula e secretadas, o que não excluiria a observação realizada em nosso trabalho, tendo em vista a utilização de meio de cultura e condições de cultivo diferenciadas. Além disso, o trabalho de Santos e colaboradores (2001) não padroniza massa de proteínas para a análise de atividade proteolítica por enzimografia, trabalhando com um determinado número de células a ser submetido à extração de proteínas, e pré-determinando um volume do extrato proteico total a ser utilizado. É sabido que a espécie *S. culicis* apresenta uma tendência ao agrupamento celular na forma de rosetas à medida que a densidade populacional aumenta, proporcionando a presença de grandes agrupamentos celulares em culturas de fim de fase log. A abordagem metodológica utilizada por Santos e colaboradores não leva em consideração esta situação, o que poderia permitir a utilização de um número bem maior de células em fim de fase exponencial em comparação com as outras etapas. Desta forma, em suas análises o aumento da atividade proteolítica pode estar relacionado à utilização de uma maior concentração destas enzimas devido à extração de proteínas de um maior número de células.

Em nosso trabalho, nenhum *spot* correspondente a outras peptidases foi identificado como diferencialmente abundante entre cepa WT e Apo. No entanto, um estudo comparativo prévio, realizado entre as cepas de *S. culicis*, uma maior atividade gelatinolítica foi observada na cepa Apo em fase exponencial do crescimento celular (d'Avila-Levy et al., 2005). Diferenças qualitativas não foram

observadas, porém o repertório enzimático total foi quantificado por ensaio utilizando gelatina solúvel, comprovando-se dados de zimografia para maior atividade gelatinolítica em cepa desprovida de seu simbiote. A não detecção desta diferença entre as cepas em nosso trabalho pode ser explicada por: (1) modificação pós-traducional que selecionaria quais enzimas estariam ativas em cada cepa, justificando a diferença na intensidade de atividade observada no trabalho de d'Avila-Levy e colaboradores (2005) e não se correlacionando à quantidade de proteínas; (2) ausência de correlação direta (limitação da técnica de 2DE), entre a massa de uma peptidase e a intensidade de sua atividade hidrolítica, a qual posteriormente não seria identificada como diferencialmente abundante pelos programas de análise de imagem e (3) a classe de enzima mais abundante detectada por zimografia corresponde a das metalo-peptidases, sendo estas homólogas à gp63 de *Leishmania* spp. (d'Avila-Levy et al. 2005). A análise do genoma de *S. culicis* indica a presença de 9 genes de gp63-símile (Motta et al., 2013). Sabendo que esta é uma proteína de membrana e que tais proteínas são difíceis de serem detectadas em géis bidimensionais, devido ao seu caráter hidrofóbico, é possível que as diferenças observadas por d'Avila-Levy e colaboradores sejam relacionadas a gp63, que não foi detectada neste estudo.

#### 5.3.1.1 Biossíntese de heme

Heme é um grupamento prostético composto por um átomo de ferro  $Fe^{+2}$  inserido em um anel tetrapirrólico (também denominado porfirina). Para a maioria dos organismos vivos este é um componente essencial por fazer parte de diversos processos celulares como: transporte de elétrons (componente dos complexos II-IV), metabolismo de drogas e esteróis, transdução de sinais e transcrição e regulação de enzimas do sistema de defesa antioxidante. Logo, os índices intracelulares de heme devem ser finamente controlados (Furuyama et al., 2007; Rytter e Tyrrel, 2000).

Em tripanossomatídeos, com exceção dos que albergam simbioses, a biossíntese de heme é deficiente ou até mesmo ausente, e por isso hemina, hematina ou hemoglobina devem ser adicionadas aos meios de cultura. Esses organismos podem viver sem a rota biossintética de heme tendo em vista o fácil acesso a este composto no ambiente em que vivem. Nas análises dos genomas de *T. cruzi* e *T. brucei* nenhum gene relacionado a enzimas da via biossintética de

heme foi identificado mas, interessante, a análise dos genomas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. tarentolae*, revelou a presença de genes para três enzimas da via biossintética (coproporfirinogênio III oxidase, protoporfirinogênio oxidase e ferroquelase), composta por um total de dez enzimas (**Figura 5.20**). Este achado pode ser um indicativo de que o tripanossomatídeo ancestral dos que existem atualmente na natureza tenha sobrevivido sem nenhuma das enzimas necessárias para biossíntese de heme e em algum momento do processo evolutivo teria ocorrido uma transferência horizontal de genes para as três últimas proteínas da rota, enquanto o gênero *Trypanosoma* se manteve como o ancestral, sem nenhum gene, obtendo este composto diretamente de seus hospedeiros, o que suportaria a teoria de um ancestral heteroxênico (Chang e Traeger, 1974; Kořený et al., 2010; Tripodi et al., 2011).



**Figura 5.20 - Via biossintética de heme.**

Enzimas representadas: glutamil-RNAt sintetase (gltX), glutamil-RNAt redutase (hemA), glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase (GSA), ácido aminolevulônico desidratase (ALAD), porfobilinogênio desaminase (PBGD), uroporfirinogênio III sintase (UROS), uroporfirinogênio III descarboxilase (UROD), coproporfirinogênio III oxidase (CPOX), coproporfirinogênio III oxidase independente de oxigênio (HemN), protoporfirinogênio oxidase (PPOX), ferroquelase (FeCH). Compostos representados: L-glutamina (1), L-glutamil-RNAt (2), glutamato-1-semialdeído (3), ácido aminolevulônico (4), porfobilinogênio (5), hidroximetilbilina (6), uroporfirinogênio (7), coproporfirinogênio III (8), protoporfirinogênio IX, protoporfirina IX (10) e heme (H) (Tripodi et al., 2011).

Diferente dos tripanossomatídeos que não albergam simbioses, *S. culicis* e outros tripanossomatídeos que albergam simbiote não necessitam da adição de fontes exógenas de heme, tendo em vista que seus simbioses possuem as enzimas necessárias para a síntese de heme (Chang et al., 1975). O genoma nuclear de *S. culicis* possui genes codificadores de coproporfirinogênio oxidase III (CPOX), protoporfirinogênio oxidase (PPOX) e ferroquelase, enquanto os sete outros genes codificadores das proteínas remanescentes da via estão ausentes. O genoma do simbiote apresenta os genes codificantes de todas as proteínas da via, com exceção da proteína CPOX, para a qual o simbiote possui o gene para uma CPOX independente de oxigênio (Alves et al., 2011).

Nossa análise proteômica indicou a presença de CPOX tanto em cepa WT quanto em cepa Apo (**Anexo subitem 9.3, Tabelas 1 e 2**), o que é condizente com achados genômicos, tendo em vista que esta proteína tem sua origem em um gene nuclear do tripanossomatídeo. Esta enzima sofre modulação tanto no crescimento celular da cepa Apo e da cepa WT, quanto entre as cepas. A identificação desta enzima foi feita a partir de três *spots* distintos, obtendo-se valores de massa molecular de 34,1 kDa e pI de 6,2 em cepa Apo, e para cepa WT valores de 34,5 e 43,2 kDa e pI, respectivos, de 6,1 e 5,3.

A modulação na cepa WT ocorre com o avanço da fase log, sendo a etapa iniciada com uma menor quantidade de CPOX em relação ao meio e fim de fase log, não tendo sido identificada diferença significativa entre a abundância da proteína entre o meio e fim de fase log (**Anexo subitem 9.3, Tabela 2**). Na cepa Apo, a abundância diferencial da enzima está aparente entre início e meio de fase log, estando mais abundante em meio de fase log (**Anexo subitem 9.3, Tabela 1**).

CPOX está mais abundante em todas as etapas da fase log da cepa WT quando comparada à cepa Apo (**Anexo subitem 9.3, Tabela 3**). Este resultado não poderia ser justificado pela presença da mesma enzima no simbiote, uma vez que o simbiote de *S. culicis* não apresenta uma CPOX clássica, possuindo uma CPOX independente de oxigênio. O alinhamento das sequências de ambas as proteínas mostra um baixo nível de identidade (13%), caracterizando duas proteínas completamente distintas, o que indica a correta identificação por espectrometria de massas das duas proteínas identificadas como CPOX, mesmo apresentando perfis eletroforéticos distintos. A maior abundância de CPOX em cepa selvagem pode estar relacionada à própria síntese de heme, um metabolismo mais ativo na cepa WT. Uma via biossintética mais ativa nesta cepa, devido à presença do simbiote,

poderia induzir a um aumento de expressão de CPOX do tripanossomatídeo para finalizar a síntese de heme. Uma explicação para uma maior síntese de heme, independente da presença ou ausência do simbionte, poderia estar relacionada a maior necessidade de síntese de proteínas ligadoras de heme, como por exemplo proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons e proteínas relacionadas à detoxificação de espécies reativas de oxigênio, uma vez que o grupamento heme em peroxidases, no caso triparedoxina peroxidases em tripanossomatídeos, é capaz de consumir peróxido de hidrogênio, atuando diretamente no balanço de espécies reativas de oxigênio intracelulares. Sendo a mitocôndria uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio dentro da célula, uma cepa que respire mais (desta forma fazendo uso constante da fosforilação oxidativa) necessitará de maiores quantidades dessas hemeoproteínas, e portanto, maior quantidade de heme poderá ser sintetizado (revisto por Toh et al., 2010; revisto por Van Dooren et al., 2012; revisto por Kořený et al., 2013; revisto por Mena-Barreto e Castro, 2014).

Em tripanossomatídeos o metabolismo energético pode variar entre as espécies, indo desde um metabolismo basicamente alimentado por via glicolítica, como ocorre para a forma sanguínea de *T. brucei*, até um metabolismo mediado por respiração aeróbia, dependente de cadeia transportadora de elétrons, na forma procíclica. Já em *T. cruzi*, existem indícios de que a ausência da atividade de oxidases alternativas às mitocondriais faz com que este parasito dependa exclusivamente da cadeia transportadora de elétrons (composta pelos complexos I, II, III, IV). Porém, para a forma sanguínea de *T. brucei*, o qual apresenta uma oxidase alternativa de tripanosoma, terminal à cadeia transportadora de elétrons e independente de citocromo, esta enzima se torna essencial, e unicamente necessária para o processo respiratório (Allen et al., 2004; Chaudhuri et al., 2006; Souza et al., 2009; revisto por Tripodi et al., 2011).

O complexo IV da cadeia transportadora de elétrons é formado por um conjunto de 13 proteínas distintas. A subunidade IV encontra-se ligada covalentemente a heme, sendo este essencial para a funcionalidade do complexo citocromo c oxidase (Spejer et al., 1996; Tripodi et al., 2011). Em mamíferos, este complexo já foi reportado como o maior regulador da oxidação fosforilativa (Li et al., 2006).

Em *S. culicis*, evidenciamos a modulação da abundância desta subunidade entre a cepa WT e Apo, ocorrendo em maior quantidade na cepa WT em início de fase log (**Anexo subitem 9.3, Tabela 3**).

Ensaio comparando rotas bioenergéticas de ambas as cepas de *S. culicis* demonstraram que a cepa Apo apresenta um metabolismo energético mais fermentativo, diferente da cepa WT, a qual apresenta um metabolismo aeróbio (comunicação pessoal: Dra. Cristina Motta). Uma vez que o complexo citocromo c oxidase, componente da cadeia transportadora de elétrons, necessita da incorporação de heme para exercer suas funções (revisto por Tripodi et al., 2011), uma maior abundância de CPOX e da subunidade IV do complexo citocromo c oxidase na cepa WT são indicativos de diferenças no metabolismo energético.

Nenhuma das enzimas da rota biossintética de heme expressas pelo endossimbionte foi identificada como diferencialmente abundante entre as cepas WT e Apo, provavelmente devido à baixa concentração dessas proteínas frente à quantidade total de proteínas do tripanossomatídeo, dificultando sua identificação por espectrometria de massas, e até mesmo devido a limitações de detecção na 2DE.

#### 5.3.1.2 Interação tripanossomatídeo-hospedeiro

Uma interação bem sucedida é iniciada pelo reconhecimento de uma célula hospedeira por um parasito. Para que isto ocorra, moléculas de superfície atuam neste reconhecimento. Em tripanossomatídeos a membrana plasmática possui diferenças morfológicas típicas que permitem sua subdivisão em três regiões distintas: membrana do flagelo, membrana da bolsa flagelar e membrana plasmática pelicular. Cada um desses domínios representa uma membrana altamente especializada apresentando funções distintas (Lopes et al., 2010).

O flagelo é a estrutura motora dos tripanossomatídeos, porém sua função vai muito além de fornecer a mobilidade, atuando também no reconhecimento e adesão a células hospedeiras, podendo ser também, em conjunto com a bolsa flagelar, uma estrutura sensorial, já tendo sido identificada sinalização por cálcio nesta estrutura. A bolsa flagelar atua em processos de reconhecimento e adesão a células de hospedeiros, sendo o único sítio de endocitose de nutrientes e excreção de enzimas, além de atuar na integração de proteínas à membrana celular. Postula-se que o

movimento flagelar influencia a entrada de moléculas através da bolsa flagelar (revisto Landfear e Ignatushchenko, 2001; Ralston et al., 2009; Lopes et al, 2010).

A complexidade flagelar foi desvendada, em *T. brucei*, após uma laboriosa metodologia de isolamento do flagelo, combinada à MS, 158 e 666 proteínas foram identificadas, respectivamente, nas frações de superfície e matriz, sendo 87 encontradas em ambas as frações. Análises de ontologia gênica indicaram uma extensa gama de funcionalidades atribuídas às proteínas identificadas, porém para mais de 50% destas não foi possível atribuir uma função (Oberholzer et al., 2011).

Um estudo avaliando a capacidade de interação de *S. culicis* com linhagens celulares de *Anopheles gambiae*, *Aedes albopictus* e *Lutzomya longipalpis* demonstrou a maior capacidade de adesão da cepa selvagem frente à cepa Apo, bem como a adesão mediada pelo flagelo (Fampa et al., 2003). A interação da cepa WT com células de glândula salivar de *Aedes aegypti* também é iniciada pelo flagelo, seguido de invasão celular, sendo esta invasão possivelmente mediada por enzimas secretadas e/ou intenso movimento flagelar (Nascimento et al., 2010). Estes dados confirmam a importância da estrutura flagelar, mas não explicam como esta estrutura atua, tampouco quais proteínas mediarão a interação.

Na comparação proteômica entre as cepas WT e Apo realizadas, três proteínas de flagelo foram identificadas como diferencialmente abundantes entre as cepas, sendo elas: proteína de membrana de 11 kDa de kinetoplastídeos (KMP-1); proteína miristoilada pequena 1 (SMP-1) e proteína miristoilada pequena 2 (SMP-2).

A KMP-11 foi inicialmente identificada em *L. donovani* e *T. brucei* como uma proteína de membrana de flagelo indutora da proliferação de linfócitos T (Tolson et al., 1994). Sua distribuição é diversa em tripanossomatídeos (*Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas collosma* e *Phytomonas*), estando localizada no flagelo e bolsa flagelar, mas também no citoplasma. A expressão desta proteína é diferenciada durante o ciclo de vida do parasito, sendo encontrada em grande quantidade na membrana de parasitos em estágios de interação com insetos, como a forma epimastigota de *T. cruzi*. A molécula de *T. brucei* apresenta reatividade contra anticorpos monoclonais de lipofosfoglicano de *Leishmania* mesmo apresentando sequência completamente distinta. O padrão de fluorescência exibido tanto em *Leishmania* quanto em *Trypanosoma* se estende por todo o flagelo com concentração da fluorescência em sua base, indicando que esta proteína poderia atuar como um componente estrutural e/ou funcional do flagelo e da bolsa flagelar (Stebeck et al.1995). Em *T. brucei* a depleção de KMP-11 bloqueia o processo de

citocinese, provavelmente devido a inibição da segregação do corpo basal, porém não afeta a progressão do processo mitótico, o qual continua com divisões defectivas do núcleo. Apesar de sua localização flagelar e sua associação com microtúbulos, esta proteína aparentemente não é essencial para a montagem do flagelo, uma vez que células depletadas de KMP-11 apresentam flagelo com comprimento total normal, porém a funcionalidade do flagelo na ausência desta proteína não foi avaliada (Li e Wang, 2008). Apesar da funcionalidade desta proteína ainda não ter sido definida, sua presença em diversos tripanossomatídeos sugere que esta seja uma proteína essencial.

Em nossa análise proteômica, KMP-11 foi identificada com massa molecular de 12,1 kDa e pI de 5,6, sendo modulada na cepa Apo entre início e meio de fase log, com maior abundância em meio de fase log (**Anexo subitem 9.3, Tabela 1**), além de também ser regulada entre a cepa WT e Apo, com maior abundância na cepa WT em início e fim de fase log (**Anexo subitem 9.3, Tabela 3**), corroborando dados de que esta cepa apresenta maior capacidade de interação com células hospedeiras, e sugerindo um papel dessa proteína neste processo.

Um segundo grupo de proteínas identificadas foram as proteínas miristoiladas pequenas, SMP-1 e SMP-2. A proteína SMP-1 foi inicialmente identificada em frações de membrana plasmática insolúveis em Triton X-100 ricas em proteínas ancoradas por glicosil-fosfatidil-inositol, esterol e esfingolipídeos (Denny et al., 2001; Ralton et al., 2002). SMP-1 pertence a uma família de proteínas mono ou diaciladas que existe em todos os tripanossomatídeos. Esta proteína apresenta localização celular restrita ao flagelo, podendo ser extraída da membrana flagelar sob condições que favoreçam a solubilização de membranas resistentes a detergente, mas não componentes do axonema, indicando a ausência de interações efetivas entre ela e proteínas do axonema ou da estrutura paraflagelar do flagelo, sendo sua localização limitada à face intracelular da membrana flagelar. Por analogia, a função de proteínas dessa família pode estar relacionada ao direcionamento de proteínas a membranas celulares (Tull et al., 2004). A função desta proteína foi avaliada em *Leishmania*, para a qual a existência de SMP-1 diacilada se mostrou essencial para a biogênese de um flagelo normal (Tull et al., 2010). A expressão desta enzima em *Leishmania* está diretamente associada à formação de um flagelo alongado durante a diferenciação de amastigota em promastigota, sendo detectada quando o flagelo começa a se estender através da bolsa flagelar, antes mesmo da detecção de PRF-1. A deleção de SMP-1 está associada a alterações da dinâmica da membrana

flagelar, promovendo acúmulo de vesículas na matriz flagelar além de induzir, em promastigotas, um aumento da sensibilidade desta membrana, devido à perturbação na composição de lipídeos. A forma como esta proteína estabiliza a membrana ainda não é inteiramente compreendida. Provavelmente SMP-1 se estrutura em uma capa densa e compactada no folheto interno da membrana, prevenindo a formação de estruturas de membrana não planares e endovesículas, uma vez que membranas ricas em domínios resistentes a detergente tendem a formar vesículas internas. Desse modo, SMP-1 modularia o recrutamento de lipídeos e/ou o empacotamento da membrana, podendo atuar como conservadora de domínios lipídicos de membrana. Sendo assim, sua função biológica poderia representar, pelo menos em *Leishmania*, um processo adaptativo a alterações termonutricionais ocasionadas pelo ambiente no qual o parasito se encontra, impactando as propriedades e composição lipídica da membrana flagelar (Tull et al., 2004 e 2010). Quando as SMPs de tripanossomatídeos, SMP-1 e SMP-2 (uma variação de SMP-1 com localização limitada à bolsa flagelar e membranas próximas) são “deletadas”, as células resultantes apresentam flagelos reduzidos e defeitos de direcionamento da movimentação flagelar (Tull et al., 2010)

Em *S. culicis*, evidenciamos a presença de SMP-1 e SMP-2 em ambas as cepas, ocorrendo maior abundância de ambas em fim de fase log da cepa WT, enquanto para SMP-2 ocorre ainda uma maior abundância em início de fase log (**Anexo subitem 9.3, Tabela 3**). A maior presença destas proteínas em cepa WT pode estar relacionada a dois fatores: (1) maior capacidade de aproveitamento de nutrientes do meio de cultura, o que proporcionaria uma maior secreção de proteínas hidrolíticas, assim como de subprodutos de metabolismo, no meio de cultura através da bolsa flagelar, papel representado pela SMP-2 e (2) aumento da capacidade de interação de cepas WT com células do hospedeiro, uma vez que SMP-1 atua na regulação e distribuição de lipídeos de membrana, estes poderiam atuar indiretamente na distribuição de proteínas de superfície envolvidas em processo de interações celulares, facilitando a distribuição das cargas superficiais e permitindo a exposição de epítomos importantes para este processo.

Dentre as diversas proteínas propostas como mediadoras do processo de interação do tripanossomatídeo com células hospedeiras, em *Leishmania*, três se destacam: o lipofosfoglicano (LPG), os glicosil-inositol fosfolipídeos e a metaloproteinase dependente de zinco (gp63) (Descoteaux e Turco 1999; Ilgoutz e McConville 2001; Yao et al. 2003). Homólogos de gp63 também são encontrados em

*S. culicis* e compreendem a maior classe de glicoproteínas de membrana, além de compreenderem a segunda maior família de genes, composta por nove genes, em seu genoma (d'Avila-Levy et al. 2001, 2003; Motta et al, 2013). Curiosamente, apesar da abundância desta enzima em cepas WT de tripanossomatídeos que albergam simbiote e em *Leishmania*, nenhum estudo proteômico foi capaz de identificar a presença desta em extratos proteicos destes tripanossomatídeos. Em nosso estudo diferencial esta proteína não foi identificada, mesmo existindo dados concretos de variação da atividade proteolítica entre cepa WT e Apo, correlacionada a gp63 (d'Avila-Levy et al. 2005). Igualmente, proteínas identificadas em spots exclusivos, não identificaram a presença desta enzima em *S. culicis*, no entanto é importante ressaltar que ainda falta a identificação por MS de uma grande parcela destes spots. Para tanto, acredita-se que existam limitações técnicas que interfiram na identificação desta proteína. Tais limitações poderiam ser explicadas pela alta glicosilação da proteína, que promoveria uma inibição alostérica da atividade proteolítica da tripsina, impedindo que a enzima alcance diversos sítios de clivagem. A formação de poucos peptídeos trípticos da gp63 em uma mistura complexa de peptídeos trípticos de outras proteínas, poderia justificar a não identificação desta peptidase, devido ao princípio do intervalo dinâmico de uma amostra.

## 6 CONCLUSÕES

- Um protocolo eficiente para extração de proteínas e eletroforese bidimensional foi desenvolvido sendo baseado em: extração de proteínas utilizando tampão Ci conjugado a cinco ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, seguido de precipitação de proteínas por Etanol/Acetona e solubilização em tampão C, com posterior focalização isoeétrica de 600 µg de proteínas em fitas de gradiente de pH imobilizadas de 3 a 10 NL e eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.
- Pela primeira vez o perfil bidimensional de proteínas de cepa WT e Apo de *S. culicis* foi obtido. Os perfis são similares, com grande abundância de proteínas com pI entre 4 e 6 e com massas moleculares entre 95 e 45 kDa; como esperado, um maior número de spots foi visualizado na cepa selvagem.
- As diferenças entre as cepas estão relacionadas tanto a alterações quantitativas, quanto a *spots* (proteínas) exclusivos de cada condição; é importante destacar que estas proteínas podem indicar não apenas proteínas distintas, mas também modificações pós-traducionais em uma das condições analisadas.
- Durante o crescimento da cepa WT, uma maior modulação é observada entre meio e fim de fase exponencial.
- Durante o crescimento da cepa Apo as etapas de início de fase log e fase estacionária apresentam a menor quantidade de diferenças.
- A comparação entre as cepas indica menores diferenças entre o início de fase log.
- Os *spots* diferenciais por estatística representam a maior parcela entre as cepas em início de fase log, enquanto para as outras etapas os diferenciais por exclusividade são a maior parcela.
- Pela primeira vez foi identificada, na sua forma proteica, uma calpaína-símile em *S. culicis*. A calpaína identificada é modulada não apenas entre as etapas da fase logarítmica de *S. culicis* WT mas também entre a cepa WT e Apo, com maior abundância em cepa WT, com possível

função relacionada ao remodelamento do citoesqueleto durante o processo de divisão celular.

- A enzima CPOX foi identificada em ambas as cepas de *S. culicis*, comprovando dados genômicos da origem desta em genes do parasito, sendo diferencialmente abundante entre as cepas WT e Apo de *S. culicis*.
- A modulação da subunidade IV do complexo citocromo c oxidase, com maior abundância em início de fase log, quando comparadas ambas as cepas de *S. culicis*, é mais um indicativo da diferença de metabolismo respiratório entre as cepas, pelo menos em início de crescimento.
- Até o momento, para tripanossomatídeos monoxênicos, a única proteína relacionada ao processo de interação tripanossomatídeo-hospedeiro descrita é a gp63. Os resultados apresentados sugerem a participação de outras proteínas, tendo em vista sua abundância diferencial entre cepa WT e Apo, e sua localização flagelar, estrutura sabidamente relacionada ao processo de adesão, a saber: KMP-1, SMP-1 e SMP-2.

## 7 PERSPECTIVAS

A quantidade de dados gerados nesta tese expõe um leque amplo de análises comparativas a serem realizadas, uma vez que o tempo limitado de uma tese de doutoramento não permite abordar todas as vertentes possíveis oriundas de trabalhos de ciência dirigida por descoberta.

Um dos pontos a ser investido é a anotação das proteínas diferencialmente abundantes por processos metabólicos/fisiológicos, uma vez que esta etapa não foi realizada por completo durante o sequenciamento do genoma de *S. culicis*. Esta informação nos trará um panorama mais informativo com relação às atividades diferenciais entre as cepas, permitindo traçar rotas metabólicas influenciadas pelo simbionte. A influência da bactéria poderá ficar mais clara com a obtenção do seu proteoma descritivo, uma vez que, com esta informação, poderemos descrever seu metabolismo exclusivo. Esta etapa, apesar de ter sido iniciada, não foi completada tendo em vista as dificuldades em obtenção de uma fração de simbionte livre do tripanossomatídeo. O proteoma obtido por *shotgun* de ambas as cepas, já realizado e em etapa de análise, poderá adicionar a esta tese informações complementares, não obtidas com a abordagem baseada em gel.

Como já previamente discutido, as peptidases apresentam importância crucial no ciclo de vida de tripanossomatídeos, porém a abordagem utilizada, não nos permitiu detectar a principal metalopeptidase de *S. culicis*, a gp63. Espera-se obter melhores resultados com a abordagem *shotgun*, uma vez que fazendo uso desta abordagem excluímos as impossibilidades técnicas discutidas nesta tese para a identificação de proteínas de membrana utilizando abordagem baseada na utilização de géis bidimensionais. Na ausência de resultados positivos, pretende-se desenvolver uma metodologia mais específica para identificação desta enzima por análises proteômica, objetivando sua posterior caracterização em tripanossomatídeos monoxênicos, na tentativa de contribuir para a compreensão das funções desempenhadas por essa molécula.

Conforme abordado na discussão, as cepas com simbionte são mais aptas a interagir com os hospedeiros invertebrados quando comparadas às cepas apossimbióticas. O processo de interação é muti-fatorial, e as abordagens empregadas até o momento são pontuais. Os resultados obtidos nesta tese acerca das proteínas com expressão diferencial, bem como sua anotação funcional, poderão indicar caminhos a serem explorados para determinação das moléculas

moduladas pelo simbiote, que poderiam ajudar a compreender a maior capacidade da cepa selvagem no processo de adesão.

Por fim, o estudo das proteínas exclusivas de cada condição analisada é de suma importância para a caracterização de diferenças entre as cepas, porém o grande número de proteínas DifExclusiv obtidas inviabilizou a identificação de sua totalidade durante esta tese. A identificação dessas proteínas pode apontar mudanças cruciais, e até então não caracterizadas entre as cepas e, portanto, merecem atenção especial. Sua efetiva análise por espectrometria de massas depende de isolamento de *spots* de 2DE, e será efetuada.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature* 1999; 402:715–720.
- Abreu Filho BA, Dias Filho BP, Vermelho AB, Jankevicius SI, Jankevicius JV, dos Santos RL. Surface component characterization as taxonomic tools for *Phytomonas* spp. *Parasitol res.* 2001; 87:138-44.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207.
- Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.* 2001, 101: 269-295.
- Allen JWA, Ginger M L, Ferguson SJ. Maturation of the unusual single-cysteine (XXXCH) mitochondrial c-type cytochromes found in trypanosomatids must occur through a novel biogenesis pathway. *Biochemical Journal* 2004; 383 (3): 537–542.
- Alves JM, Voegtly I, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano, MG, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *Plos one.* 2011; 6: e23518.
- Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 1997; 18:533–537.
- Anderson NG, Anderson, NI. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis.* 1996; 17(3): 443-453.
- Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *J. proteome res.* 2008 Jun; 7(6):2357–2367
- Atwood JA 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science.* 2005 Jul; 309 (5733):473–476.

- Barret MP, Curchmore JS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. *The lancet* 2003;362:1469–1480.
- Barreto-de-Souza V, Xavier Medeiros T, Machado Motta MC, Bou-Habib DC, Saraiva EM. HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF-beta1 production. *Microbes Infect.* 2008, 10:642-9
- Basile G, Peticca ME. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol* 2009; 43:273–278.
- Bates PA. *Leishmania* sandfly interaction: progress and challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 11:340–344.
- Benard G, Rossignol R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid. Redox signal* 2008; 10: 1313-42.
- Bjellqvist B et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods.* 1982, 6: 317-339.
- Branquinha MH, Vermelho AB, Goldenberg S, Bonaldo MC. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J eukaryot microbiol.* 1996 mar-apr; 43(2):131-5.
- Branquinha MH, Marinho FA, Sangenito LS, Oliveira SSC, Gonçalves KCS, Ennes-Vidal V, d'Avila-Levy CM, Santos ALS. Calpains: potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids.. *Current Medicinal Chemistry.* 2013, 20: 3174-3185.
- Bruce C et al. Proteomics and the analysis of proteomic data: 2013 overview of current protein-profiling technologies *Curr Protoc Bioinformatics.* 2013 Mar;Chapter 13:Unit 13.21.
- Bruesk WA (1967) The diplosome of *Blastocrithidia culicis* (Novy, F.G., Mc Neal, W.J. & Torrey, H.N., 1907) (Mastogophora: Trypanosomatidae). University of Minnesota, Minneapolis, pp 401 vol Ph.D.)

- Brum FL, Catta-Preta CMC de Souza W, Schenkman S, Elias MA, Motta MCM. Structural characterization of the cell division cycle in *Strigomonas culicis*, an endosymbiont-bearing trypanosomatid. *Microsc. Microanal.* 2014; 20:228–237.
- Bulat SA, Mokrousov IV, Podlipaev SA. Classification of trypanosomatids from insects and plants by the UP-PCR (universally primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. *European Journal of Protistology.* 1999, 35(3): 319-326.
- Burnett, w.j. The organic relations of some of the Infusoria, including investigations concerning the structure and nature of the genus *Bodo* (Ehr.). *Proc. Boston soc. Nat. Hist.* 1851; 4:124–125.
- Camargo EP, Kastelein P, Roitman I. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitology Today.* 1990; 6: 22-25.
- Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Advances in Parasitology.* 1998, 42:29-112.
- Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006, 4: 295-320.
- Candiano G, Bruschi M, Musante I, Santucci I, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi I et al. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie g-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 2004; 25 (9): 1327-1333.
- Catta-Pretaa CMC, Nascimento MTC, Garcia MCF, Saraiva EM, Motta MCM, Meyer-Fernandes JR. The presence of a symbiotic bacterium in *Strigomonas culicis* is related to differential ecto-phosphatase activity and influences the mosquito–protozoa interaction. *International Journal for Parasitology,* 2013, 43: 571–577
- Chagas C. Neue trypanosomen. *Vorläufige mitteilung arch schiff tropenhyg.* 1909; 13:120–122.

- Chagas C. Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia. Mem. Inst. Oswaldo cruz. 1916; 8(2): 37-60.
- Chandler JA, James PM. Discovery of trypanosomatid parasites in globally distributed *Drosophila* species. PLoS One. 2013; 29; 8(4):e61937.
- Chang KP, Chang CS, Sassa S. Heme biosynthesis in bacterium protozoon symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbiotes. Proceedings of the national academy of sciences of the USA 1975; 72(8): 2979–2983.
- Chang KP, Trager W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. Science 1974; 183(4124) 531–532.
- Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. Trends in Parasitology 2006; 22(10): 484–491.
- Chicharro C, Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 2003; 97(1): S75-S78.
- Colas des Francs C, Thiellement H, De Vienne D. Analysis of leaf proteins by two dimensional electrophoresis. Plant Physiol 1985; 78: 178-182.
- Corrêa-da-Silva M, Fampa P, Lessa LP, Silva ER, Mallet JRS, Saraiva BEM, Motta MCM. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. Parasitol. Res. 2006; 99:384–391.
- Cottrel JS. Protein identification using MS/MS data. J Proteomics 2011, 74(10): 1842-1851.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta trop. 2010;115:5–13.
- Cox J, Mann M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven. Annu Rev. Biochem. 2011; 80:273-99.

- Craig R, Beavis R. Tandem: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 2004; 20(9): 1466-7.
- Crain PF, Alfonzo JD, Rozenski J, Kapushoc ST, McCloskey JA, Simpson L. Modification of the universally unmodified uridine-33 in a mitochondria-imported edited tRNA and the role of the anticodon arm structure on editing efficiency. *Rna* 2002 Jun; 8(6): 752-61.
- Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics* 2010, 73: 845-867.
- d'Avila-Levy CM, Araújo FM, Vermelho AB, Branquinha MH, Alviano CS, Soares RM, dos Santos AL. Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications. *Fems microbiol. Lett.* 2004; 231: 171-6.
- d'Avila-Levy CM, Araújo FM, Vermelho AB, Soares RMA, Santos ALS, Branquinha MH. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. *Parasitology* 2005a.; 130: 413– 420.
- d'Avila-Levy CM, Silva BA, Hayashi EA, Vermelho AB, Alviano CS, Saraiva EM, Branquinha MH, Santos AL Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression and on *Aedes aegypti* interaction. *FEMS Microbiol Lett.* 2005b, 252:279-86
- d'Avila-Levy CM, Dias FA, Nogueira de Melo AC, Martins JL, Lopes AHCS, Santos ALS, Vermelho AB, Branquinha MH. Insights into the role of gp63-like proteins in insect trypanosomatids. *Fems microbiol lett* 2006a.; 254: 149– 156.
- d'Avila-Levy CM, Souza RF, Gomes RC, Vermelho AB, Branquinha MH. A metalloproteinase extracellularly released by *Crithidia deanei*. *Can j microbiol* 2003a; 49: 625– 632.

- d'Avila-Levy CM, Souza RF, Gomes RC, Vermelho AB, Branquinha MH. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. *Arch biochem biophys* 2003b; 420: 1-8
- d'Avila-Levy CM, Santos LO, Marinho FA, Matteoli FP, Lopes AH, Motta MC, Santos AL, Branquinha MH. *Crithidia deanei*: influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont-harboring and aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut. *Exp Parasitol*, 2008, 118:345-53.
- Damerval C, Vienne D, Zivy M, Thiellement H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 1986; 7: 52-54
- de Azevedo-Martins AC, Frossard ML, de Souza W, Einicker-Lamas M, Motta MC. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. *FEMS Microbiol Lett.* 2007, 275:229-36
- De Jesus AR, Cooper R, Espinosa M, Gomes JE, Garcia E, Paul S, Cross GA. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *J cell sci* 1993; 106 (pt 4): 1023–1033.
- de Souza W, Attias M, Rodrigues JCF. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2009; 41(10): 2069–2080.
- de Souza W, Motta MCM. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. 1999. *FEMS Microbiol Lett.* 1999. 173: 1-8.
- De souza W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr pharm des* 2008; 14: 822-38.
- Dedet JP, Pratlong F. Leishmania, Trypanosoma and monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents. *J Eukaryot Microbiol* 2000; 47: 37-39.
- Dedet JP, Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, Huerre M. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous

- trypanosomatid in a patient infected with hiv. *Trans r soc trop med hyg* 1995; 89: 644– 646.
- Denny PW, Field MC, Smith DF. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett.* 2001, 491:148-153.
- Descoteaux A, Turco SJ. Glyconconjugates in Leishmania infectivity. *Biochem et Biophy Acta.*1999, 1455: 341-352.
- Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 2006Apr 14; 312(5771):212-7.50.
- Van Dooren GG, Kennedy AT, McFadden G. The use and abuse of heme in Apicomplexa parasites. *Atioxidants & Redox Signaling.* 2012: 1-23,
- Du Y, Maslov DA, Chang KP. A monophyletic origin of beta-division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America* 1994a; 91: 8437–8441.
- Du Y, Mclaughlin G, Chang KP. 6s ribosomal DNA sequence identities of beta-proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. *Journal of bacteriology* 1994b; 176: 3081–3084.
- Dwyer DM, Chang KP. Surface membrane carbohydrate alterations of a flagellated protozoan mediated by bacterial endosymbiotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976, 73:852-6
- Eng Jk, McCormack AL, Yate JR3rd. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 1994; 5(11): 976-989.
- Ersfeld K, Barraclough H, Gull K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *Journal of molecular evolution* 2005; 61: 742–757.

- Esteves MJ, Andrade AF, Angluster J, de Souza W, Mundim MH, Roitman I, Perreira ME. Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiote. *Eur J Cell Biol.* 1982, 26:244-8
- Fampa P, Correa-da-silva MS, Lima DC, Oliveira SM, Motta MC, Saraiva EM. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. *Int. J. Parasitol.* 2003; 33:1019–1026.
- Faria e Silva PM, Fiorini JE, Soares MJ, Alviano CS, de Souza W, Angluster J. Membrane-associated polysaccharides composition, nutritional requirements and cell differentiation in *Herpetomonas roitmani*: influence of the endosymbiont. *J Eukaryot Microbiol.* 1994, 41:55-9
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC et al. 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* 2001; 95(1): 97-9.
- Fields S. Proteomics. *Proteomics in genomeland.* *Science* 2001;291: 1221-4.
- Flegnov P, Votýpka J, Skalichý T, Logacheva MD, Penin AA, Tanifuji et al. *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid. *Current Biology* 2013; 23(18): 1788-1793.
- Forner F, Foster LJ, Toppo S. Mass spectrometry data analysis in the proteomics era. *Cur Bioinf.* 2007; 2: 63-93.
- Freymuler E, Camargo EP. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *J Protozoo* 1981; 28(2): 175-182.
- Furuyama K, Kaneko K, Vargas PD. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku Journal of Experimental Medicine.*2007;213(1):1–16.

- Gadelha C, Lebowitz JH, Manning J, Seebeck T, Gull K. Relationships between the major kinetoplastid paraflagellar rod proteins: a consolidating nomenclature. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004; 136:113–115.
- Gadelha C, Wickstead B, de Souza W, Gull K, Cunha-e-Silva N. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. *Eukaryotic cell* 2005; 516–525.
- Geer L et al. CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res.* 2002; 12(10): 1619-23.
- Giese V, Dallagiovanna B, Marchini FK, Pavoni DP, Krieger MA, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Mem inst osvaldo cruz* 2008; 103: 598-601.
- Godoy LM, Marchini FK, Pavoni DP et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics.* 2012, 12(17): 2694-703.
- Görg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 2009; 30 (Suppl 1): S122-132.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Wildgruber R, Weiss W. The current of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, Weinheim, Germany. 2000; 21: 1037-1053.
- Görg A, Postel W, Günther S, Wese J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis*, Weinheim, Germany. 1985; 6: 599-604.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4(12): 3665-85.
- Görg A. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual. Germany: Technical University of Munich, 2003. Disponível em: [www.weinheinstephan.de/blm/deg](http://www.weinheinstephan.de/blm/deg)

- Granzier HLM, Wang K. Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis* 1993; 14: 56-64
- Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol and Mol Biol rev.* 2002, 66(1): 39-63.
- Gygi S P, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19:1720–1730.
- Hager JW. QTRAP mass spectrometer technology for proteomics applications. *Targets.* 2004, 3(2): S31-S36.
- Hamilton PB, Stevens Jr, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal rna. *Int j parasitol* 2004; 34: 1393-404.
- Han X, Aslanian A, Yates JR 3<sup>rd</sup>. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2008; 12(5): 483–490.
- Herbert BR, Harry JL, Packer NH, Gooley AA, Pnderse SK, Williams KL. What place for polyacrylamide in proteomics? *Trends in Biotechnology* 2001; 19(supplement): 3-9.
- Herbert BR. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 1999; 20: 660-663.
- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 1966; 212: 1385-1386.
- Hoare, CA. Morphological and taxonomical studies on mammalian trypanosomes. X revision of the systematics. *J. Potozool.* 1964; 11: 200-210.
- Hoare CA. *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph.* Oxford: Blackwell, 1972. 749p.

- Hollar L, Lukes J, Maslov DA. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *J Euk Microbiol.* 1998. 45: 293-297.
- Holwill ME, Mcgregor JL. Micromanipulation of the flagellum of *Crithidia oncopelti*. *J Exp Biol* 1974; 60: 437-444.
- Hosfield, C.M.; Elce, J.S.; Davies, P.L.; Jia, Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.*, 1999, 18: 6880-6889.
- Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005; 40: 430–443.
- Ilgoutz SC, McConville M. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol.* 2001; 31:899–908.
- Jiménez MI, Ló Pez-Vélez R, Molina R, Cañavate C, Alvar J. Hiv co-infection with a currently non-pathogenic flagellate. *Lancet* 1996; 347: 264– 265.
- Junqueira M, Carvalho PC. Tools and challenges for diversity-driven proteomics in Brazil. *Proteomics* 2012; 12:2601–2606.
- Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987; 78: 53-68.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry.* 1988, 60 (20): 2299–301.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem.* 2002, 74: 5383–5392
- Klose J. Protein mapping by comined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for indiced point mutations in mammals. *Humagenetik* 1975; 26: 231-243.

- Kořený L, Lukeš J, Oborník M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all. *Int J Parasitol.* 2010,40:149-156.
- Kořený L, Oborník M, Lukes J. Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites. *Plos Pathogens.* 2013, 9(1): e1003088.
- Kushnir S, Gase K, Breitling R, Alexandrov K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr Purif* 2005; 42(1), 37–46.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Landfear SM, Ignatushchenko M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 2001, 115: 1-17.
- Li Z, Wang CC. KMP-11, a basal body and flagellar protein, is required for cell division in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* 2008,7 (11):1941-50.
- Li Y, Park JS, Deng JH, Bai Y. Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J Bioenerg Biomembr.* 2006, 38(5-6):283-91.
- Lima AP, Reis FC, Costa TF. Cysteine peptidase inhibitors in trypanosomatid parasites. *Curr Med Chem.* 2013, 20(25):3152-73.
- Liu T, Belov ME, Jaitly N, Qian WJ, Smith RD. Accurate mass measurements in proteomics. *Chem Rev.* 2007; 107(8): 3621–3653.
- Lom J 1976. Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 269-337.

- Lopes AH, Costa e Silva Filho F, Alviano CS, Jurkiewicz A, Angluster J, de Souza W. Changes in cell surface anionogenic groups induced by propranolol in *Herpetomonas muscarum muscarum*. *J protozool* 1989; 36: 231-7.
- Lopes JD, Caulada Z, Barbieri CL, Camargo EP. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of chagas' disease. *Am j trop med hyg* 1981; 30: 1183 – 1188.
- Lopes AH, Gomes MT, Dutra FL, Vermelho AB, Meyer-Fernandes JR, Silva-Neto MAC, Souto-Padrón T, Vieira DP. Intracellular signaling pathways involved in cell differentiation in trypanosomatids. *The Open Parasitol J.* 2010, 4: 102-110.
- Lopes AH, Souto-Padrón, T, Dias FA, Gomes MT, Rodrigues GC, Zimmermann LT, Alves e Silva TL. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal.* 2010: 4: 30-59.
- Lukes J, Guilbride DL, Votýpka J, Ziková A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eucaryotic cell* 2002; 1: 495-502.
- Magalhães RDM, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli, Lage DP, Menezes-Souza D, Régus WCB. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonenses* associated with the loss of virulence of the parasites. *Plos Neglected Tropical diseases.* 2014, 8(4): e2764.
- Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* 2000 Mar 15; 72(6):1156-62.55.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 2001;70: 437-73.
- Marchini FK, de Godoy IM, Rampazzo RC, Pavoni DP, Probst CM, Gnäd F, Mann M, Krieger MA. Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *Plos one* 2011; 6(9):e25381.

- Marchler-Bauer A et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(D): 225-9.
- Marchler-Bauer A et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(D): 205-10.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(W): 327-331.
- Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of the parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(3): 397-402.
- Maslov DA, Votýpka J, Yurchenko V, Lukes J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trend in Parasitol* 2013; 29(1): 43-52.
- Marmur J, Cahoon ME, Shimura Y, Vogel H. DNA type attributable to a bacterial endosymbiote in the protozoon, *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. *Nature.* 1963, 197:1228-1229
- Matrangolo FS, Liarte DB, Andrade LC, de Melo MF, Andrade JM, Ferreira RF, Santiago AS, Pirovani CP, Silva-Pereira RA, Murta SM. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol Biochem Parasitol.* 2013 190 (2): 63-75.
- Matteoli FP, d'Avila-Levy CM, Santos LO, Barbosa GM, Holandino C, Branquinha MH, Santos AL. Roles of the endosymbiont and leishmanolysin-like molecules expressed by *Crithidia deanei* in the interaction with mammalian fibroblasts. *Exp Parasitol.* 2009, 121:246-53
- McGhee BR, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbiol reviews* 1980; 44(1)140-173.
- Menna-barreto RF, Beghini DG, Ferreira AT, Pinto AV, De Castro SL, Perales J. A proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in

trypanosoma cruzi epimastigotes in vitro. J proteomics 2010; 73(12):2306–2315.

Menna-Barreto RFS, de Castro SL. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. BioMed Research International. 2014:1-14

Merzlyak E, Yurchenko A, Kolesnikov A, Alexandrov K, Podlipaev S, Maslov DA. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatid based on small subunit rRNA genes. Polyphyly of Leptomonas and Blastocrithidia. J Eukaryot Microbiol. 2001, 48: 163-171.

Miller L, Crawford J, Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? Proteomics. 2006, 6: 5385-5408.

Miranda K, Docampo R, Grillo O, de Souza W. Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. Protist 2004; 155: 395-405.

Molloy MP, Herbert BR, Walsh BJ, Tyler MI, Traini JC, Hochstrasser DF, Williams KL, Gooley AA. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis. 1998, 19(5): 837-844.

Momen H. Some current problems in the systematics of trypanosomatids. Int j parasitol 2011; 31: 640-2.

Moreira D, Lopez-Garcia P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. Int J Syst Evol Microbiol; 2004, 54, 1861–1875

Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analytical biochemistry 1981; 117(2):307-310.

Motta MCM, Picchi GFA, Palmie-Peixoto IV, Rocha MR, Carvalho TMU, Morgado-Diaz J, de Souza W, Goldenberg SJ, Fragoso SP. The microtubule analog

- protein, FtsZ, in the endosymbiont of trypanosomatid protozoa. *Eukaryot Microbiol.* 2004; 51(4): 394-401.
- Motta MC, Picchi GF, Palmie-Peixoto IV, Rocha MR, de Carvalho TM, Morgado-Diaz J, de Souza W, Goldenberg S, Fragoso SP. The microtubule analog protein, FtsZ, in the endosymbiont of trypanosomatid protozoa. *J Eukaryot Microbiol.* 2004, 51:394-401
- Motta MCM. Endosymbiosis in trypanosomatids as a model to study cell evolution. *Open parasitol* 2010; 4:139–147.
- Motta MCM, Martins AC, de Souza SS et al. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. *PLoS One.* 2013; 8(4):e60209.
- Nascimento MT, Garcia MC, da Silva KP, Pinto-da-Silva LH, Atella GC, Motta MC, Saraiva EM. Interaction of the monoxenic trypanosomatid *Blastocrithidia culicis* with the *Aedes aegypti* salivary gland. *Acta Trop.* 2010; 113(3): 260-278.
- Nesvizhskii AI, Jeller A, Kolker EM, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2003, 75: 4606-4658.
- Nogueira de Melo AC, d'Avila-Levy CM, Dias fFA, Armada JLA, Silva HD, Lopes AHCS, Santos ALS, Branquinha MH, Vermelho AB. Peptidases and gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: possible involvement in the adhesion to the invertebrate host. *Int j parasitol* 2006; 36(4):415-22.
- Novak E, Haapallainen EF, Silva S, Silveira JF. Protein synthesis in isolated symbiots from the flagellate protozoon *Crithidia deanei*. *J Protozool.* 1988, 35:375-378.
- Novey FG, McNeal WJ, Torrey HN. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. *J Infect Dis.* 1907, 4:223-276.
- Oberholzer M, Langousis G, Nguen HT et al. Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in

- mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. *Mol & Cel Proteomics*. 2011, 10:1-14.
- O'Farrel PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The J of Biological Chemistry*. 1975, 250 (10): 4007-4021.
- Oda LM, Alviano CS, Costa e Silva Filho F, Angluster J, Roitman I, De Souza W. Surface anionic group in symbiote-bearing and symbiote-free strains of *Crithidia deanei*. *J. Protozool*. 1984, 31:131-134
- Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem biophys res commum* 1998; 245:289-94.
- Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* 2004; 4(4): 1052-9.
- Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Geetics*. 2003, 33: 311-323.
- Pereira FM, Elias CGR, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS. Cysteine peptidases in *herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation. *Parasitology* 2009b, 136: 45-54.
- Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom*. 2007, 42: 1422-1432.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20(18): 3551–6.
- Perry R, Cooks G, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews* 2008; 27: 661– 699.
- Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse trypanosomatidae appears. *Int j parasitol* 2001; 31: 648-52.

- Podlipaev S. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader rna and 5s rna genes and intergenic regions. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2004; 51: 283-290.
- Podlipaev SA. Insect Trypanosomatids: the need to know more. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2000; 95: 517-22
- Podlipaev S, Sturm N, Fiala I, Fernandes O, Westenberger SM, Campbell D, Lukes J. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *J Eukaryot Microbiol* 2004; 51: 283-290.
- Podlipaev SA, Bulat SA. Characterisation of trypanosomatids from insects and plants: UP-PCR (universally primed PCR) and cross hybridization of PCR products. *Proc Zoological Inst St. Petersburg.* 1998, 276: 155 -160.
- Podlipaev SA, Lobanov AL. The employing of measure characters for discrimination of lower trypanosomatids. *Parasitologija (St. Petersburg).* 1996, 30: 324-332
- Poinar Jr GO, Poinar R. Evidence of vector-borne disease of Early Cretaceous reptiles. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2004, 4: 281-284.
- Rabbiloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunadi J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1997; 18: 307-316.
- Rabilloud T, Chevallet M, Lucheb S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past,present and future. *J of Proteomics* 2010; 73: 2064 – 2077.
- Rabilloud T, Chevallet M. Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. In.Capitulo 2 Solubilization of proteins in 2D electrophoresis. 2000.
- Rabilloud T, Lelong C, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. *J Proteomics*, 2011, 74(10): 1829-1841.

- Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics^a tutorial. *J Proteomics*. 2013, 74(10): 1829-1941.
- Raston KS, Kabututu ZP, Melehani JH, Oberholzer M, Hill KL. The *Trypanosoma brucei* flagellates: moving parasites in new directions. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63: 335-62.
- Rogowska-Wrzesinska A, Bihan MCL, Thaysen-Andersen M, Roepstorff P. 2D gels still have a nich in proteomics. *J Proteomics*, 2013, 88: 4-13.
- Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*.2000; 28(2):289–309.
- Sadygov RG, Cociorva D, Yates Jr 3rd. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. *Nat Methods* 2004; 1(3):195-202.
- Sadygov RG, Cociorva D, Yates Jr 3<sup>rd</sup>. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. *Nat methods* 2004; 1:195–202.
- Santos AL, Abreu CM, Alviano CS, Soares RM. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology* 2005; 130: 79-88.
- Santos LO, Garcia-Gomes A, Sodr  CL, Santos ALS, Branquinha MH, Avilalevy CMD. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2013, 20:3116-3133.
- Saville-Kent W. *A manual of the Infusoria: including a description of all known flagellate, ciliate, and tentaculiferous protozoa, British and foreign, and an account of the organization and the affinities of the sponges.* Series: Museum of Comparative Zoology-Biodiversity Heritage Library digitization project. By

Saville-Kent, William, 1845-1908. Book. Publication info London: D. Bogue, 1880-1882.

Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometry sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996, 68(5): 850-858.

Schwämmle V, Léon IR, Jensen ON. Assessment and improvement of statistical tools for comparative proteomics analysis of sparse data sets with few experimental replicates. *J Proteome Res*, 2013, 12(9): 3874-3883.

Simpson AG, Stevens J, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends parasitol* 2006; 22: 168-74.

Simpson L. The kinetoplast of the haemoflagellates. *Int. Rev. Cytol.* 1972, 32. 139-207.

Smyth G. Limma: Linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor statistics for biology and health.* 2005, pp 397-420.

Souza MCM, Reis AP, Silva WD, Brener Z. Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *trypanosoma cruzi* in mice. *J protozool* 1974; 21: 579– 583.

Sousa MA. Trypomastogotes in cultures of *B. culicis* (Novt, MacNeal & Torreey, 1907) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994, 89(1): 111-112.

Speijer D, Muijsers AO, Dekker A, de Hann CK, Breek SP. Purification and characterization of cytochrome c oxidase from the insect trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 79:47-59.

Stebeck CE, Beecroft RP, Singh BN, Jardim A, Olafson RW, Tuckey C, Prenevost KD, Pearson TW. *Mol and Biochem Parasitol.* 1995, 71: 1-13.

- Stevens J, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomatidae. *Adv parasitol* 2001; 48: 1-56.
- Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100:9440-5
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, Mckerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens different diseases. *J clin invest*. 2008; 118:1301–1310.
- Sugino M, Niimi T. Expression of multisubunit proteons in *Leishmania tarentolae*. *Methods in Mol Biol* 2012; 824: 317-325.
- Teixeira MMG, Serrano MG, Camargo EP. New data from old trypanosomatid preparation. *Parasitol. Today* 2000; 16: 261-3.
- The gene ontology consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet*. 2000; 25(1):25-9.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist*. 2011, 162:503-24
- Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005;35(3):237-47.
- Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CK, Martin W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature rev*. 2004, 5 : 123-135
- Toh SQ, Glanfield A, Gobert GN, Jones MK. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? *Parasit Vectors*. 2010, 18: 108
- Tripodi KE, Menendez Bravo SM, Cricco JA. Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *EnzymeRes*. 2011; 2011:873230.

- Tolson DL, Jardim A, Schnur LF, Stebeck C, Tuckey C, Beecroft RP, Teh HS, Olafson RW, Pearson TW. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosome is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 1994; 62: 4893-4899.
- Tuan, RS, Chang, KP. Isolation of intracellular symbiotes from flagellate protozoa by immune lysis and characterization of their DNA. *J. Cell Biol.* 1975; 65: 309-323.
- Tull D, Vince JE, Calaghan JM, Naderer T, Spurck T, McFadden GI, Currie G, Ferguson K, Bacic A, McConville MJ. *Mol Biol of the Cell.* 2004, 15: 4775-4786.
- Tull D, Naderer T, Surck T, Mertens HDT, Heng J, McFadden GI, Gooley PR, McConville MJ. Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*. *J of Cell Sci.* 2010: 544-554.
- Twyman RM. (2014) *Principles of Gene Manipulation and Genomics* (8th edn). Wiley-Blackwell, Oxford UK (forthcoming)
- Týč J, Votýpka J, Klepetková H, Suláková H, Jirků M, Lukeš J. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): frequent cosmopolitanism and moderate host specificity. *Mol Phylogenet Evol.* 2013 Oct; 69(1):255-64.
- Ulrich PN, Jimenez V, Park M, Matins VP, Atwood III J, Moles K, Collins D, Rohloff P, Tarletn R, Moreno SNJ, Orlando R, Docampo R. Identification of contractile vacuole proteins in *Yrypanosoma cruzi* . *Plos one* 2011; 6:e18013
- Valledor L, Jorrín J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *J of Proteomics* 2011; 74:1-18.
- Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-

related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(1):88-101.

Vermelho AB; Branquinha MH; d'Avila-Levy CM; Santos ALS; Souza EP; Melo ACN de. Biological roles of peptidases in trypanosomatids. *The Open Parasitology Journal* 2010; 4: 5-23.

Vickerman K 1976. The Diversity of the kinetoplastid flagellates. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 1-34  
Vickerman, k. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int. J. Parasitol.* 24: 1317-1331.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 1994; 24(8): 1317-1331.

Votýpka J, Suková E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duží I, Lukeš J, Yurchenko V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist* 2013; 164(6): 763-781.

Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp parasitol* 1966; 18(1); 124-93.

Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 2010; 190(4): 491-500.

Welburn SC, Maudlin I. Tsetse-trypanosome interactions: rites of passage. *Parasitol. Today*. 1999; 15:399–403.

Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The limits on trypanosomatid morphological diversity. *Plos one* 2013; 8(11): 1-18.

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

- YAO C, DONELSON JE AND WILSON ME.. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression and function. *Mol Biochem Parasitol.* 2003, 132: 1-16.
- Yates JR 3rd, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2009; 11: 49-79.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering.* 2009; 11(1):49-79.
- Yurchenko V, Lukes J, Xu X, Maslov DA. An integrated morphological and molecular approach to a new species description in the trypanosomatidae: the case of *Leptomonas podlipaevi* n. Sp., a parasite of *Boisea rubrolineata* (hemiptera: rhopalidae). *J eukaryot microbiol* 2006; 53: 103-11.
- Zenobi R, Knochenmuss R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spec Rev.* 1998, 17(5): 337-366.
- Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. *Annu rev biochem* 2003; 72: 783-812.
- Zubarev RA, Makarov A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2013; 85(11): 5288–5296.

## **9 ANEXOS**

### **9.1 Géis representativos das condições analisadas**

#### **9.1.1 Cepa selvagem**

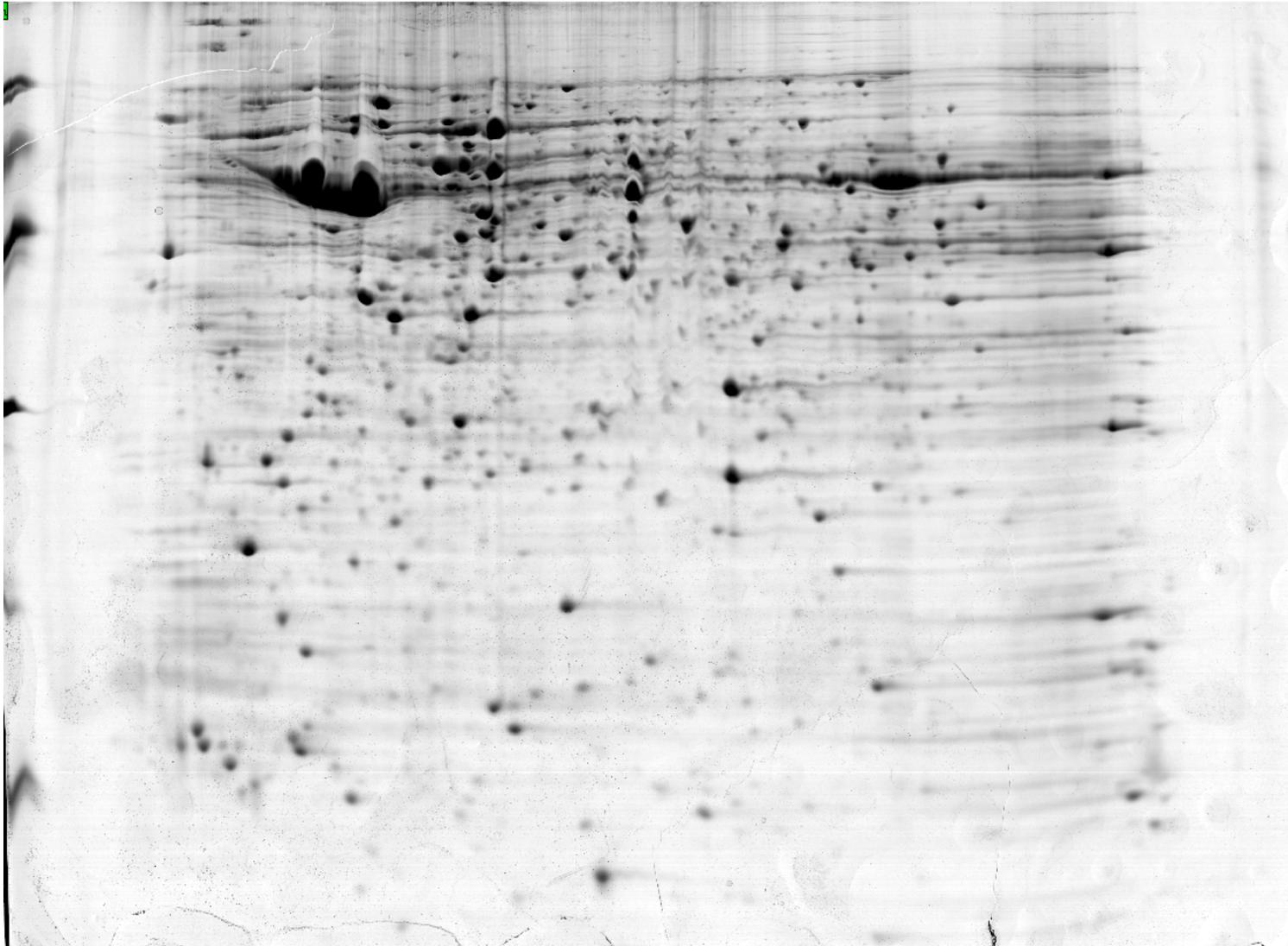


Figura 9.1 - Gel 2DE representativo do início da fase log de crescimento celular da cepa WT de *S. culicis*.

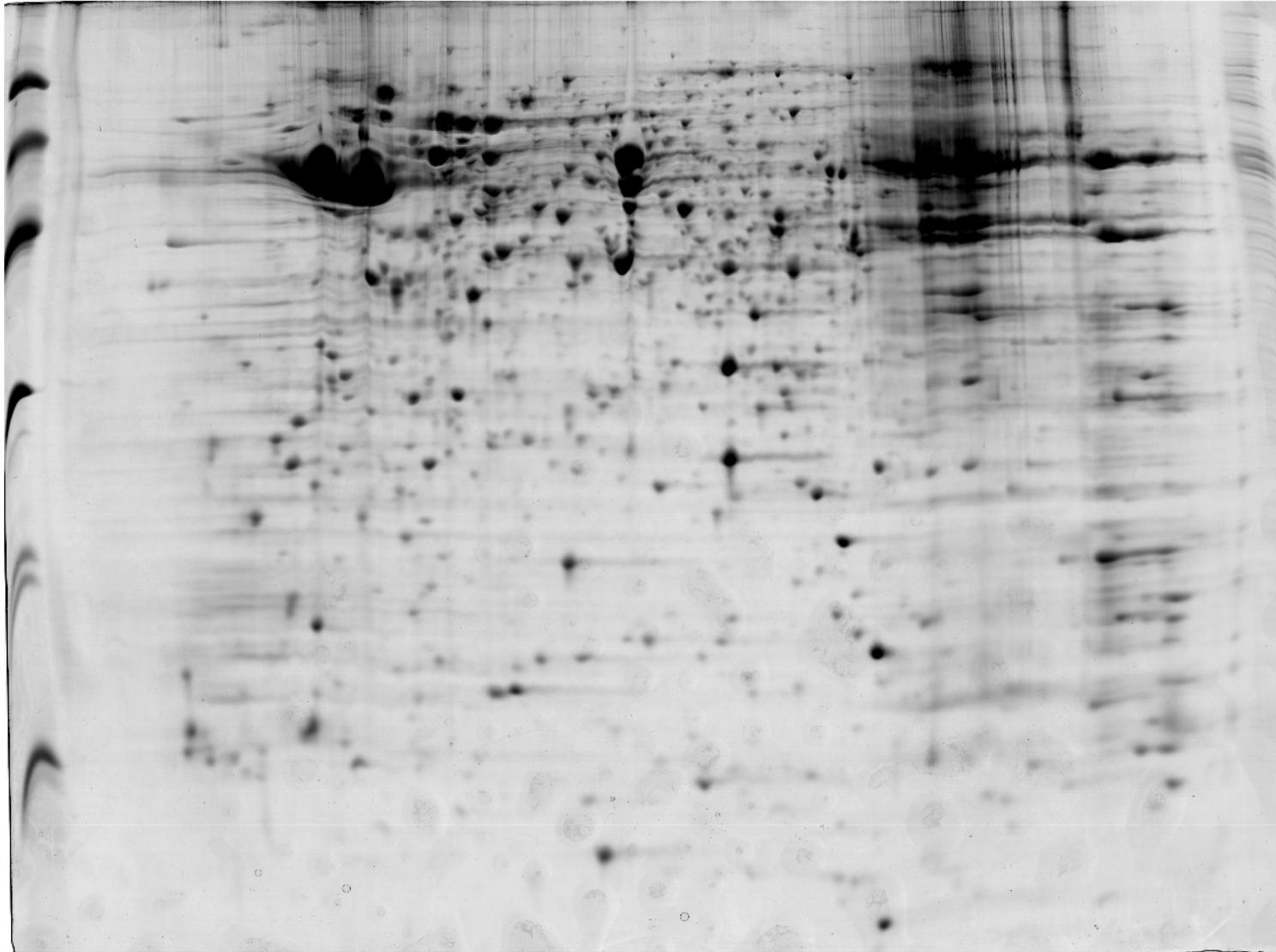


Figura 9.2 - Gel 2DE representativo do meio da fase log de crescimento celular da cepa WT de *S. culicis*.

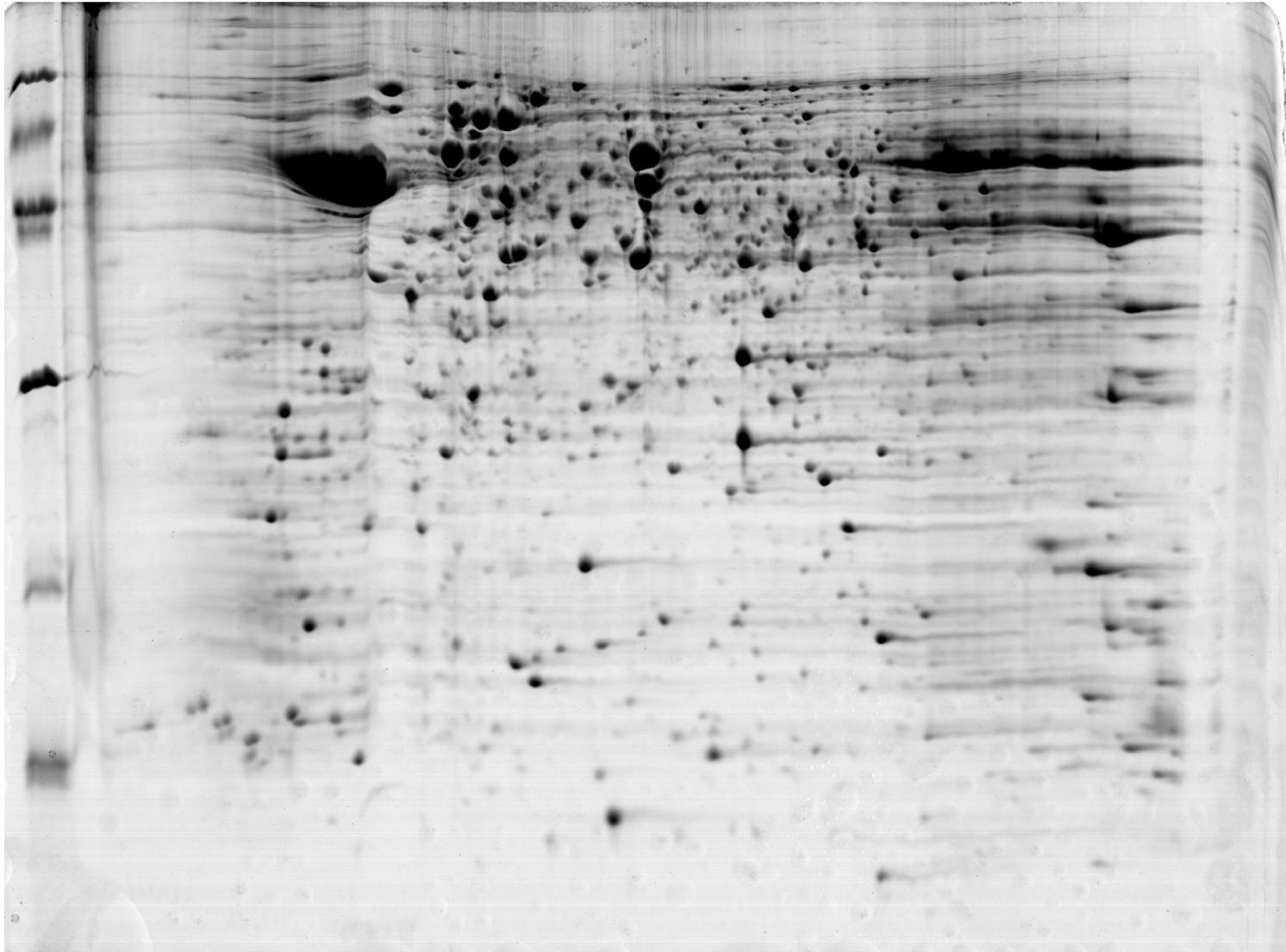


Figura 9.3 - Gel 2DE representativo do fim da fase log de crescimento celular da cepa WT de *S. culicis*.

9.1.1.2 Cepa aposimbiótica

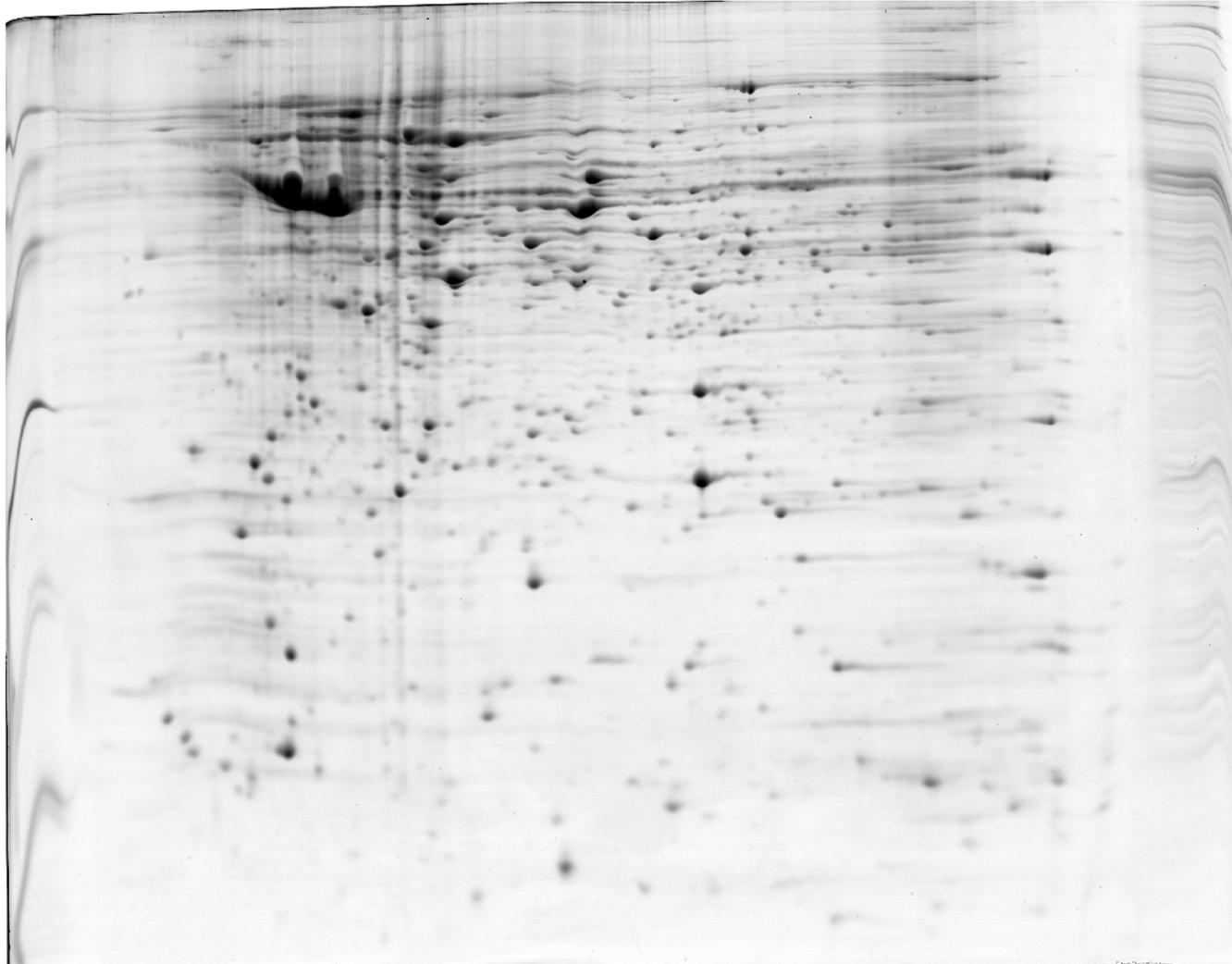


Figura 9.4 - Gel 2DE representativo do início da fase log de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*.

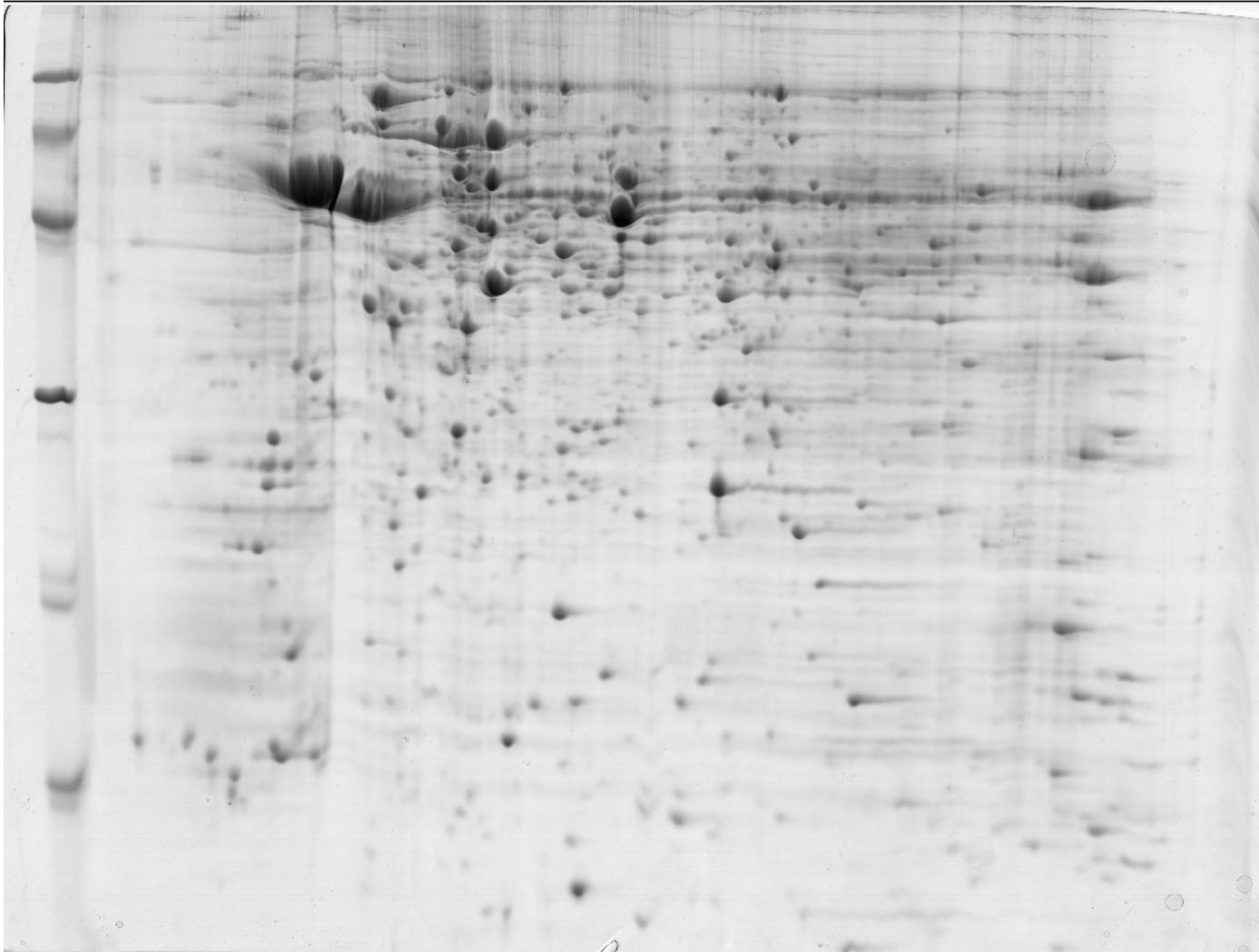


Figura 9.5 - Gel 2DE representativo do meio da fase log de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*.

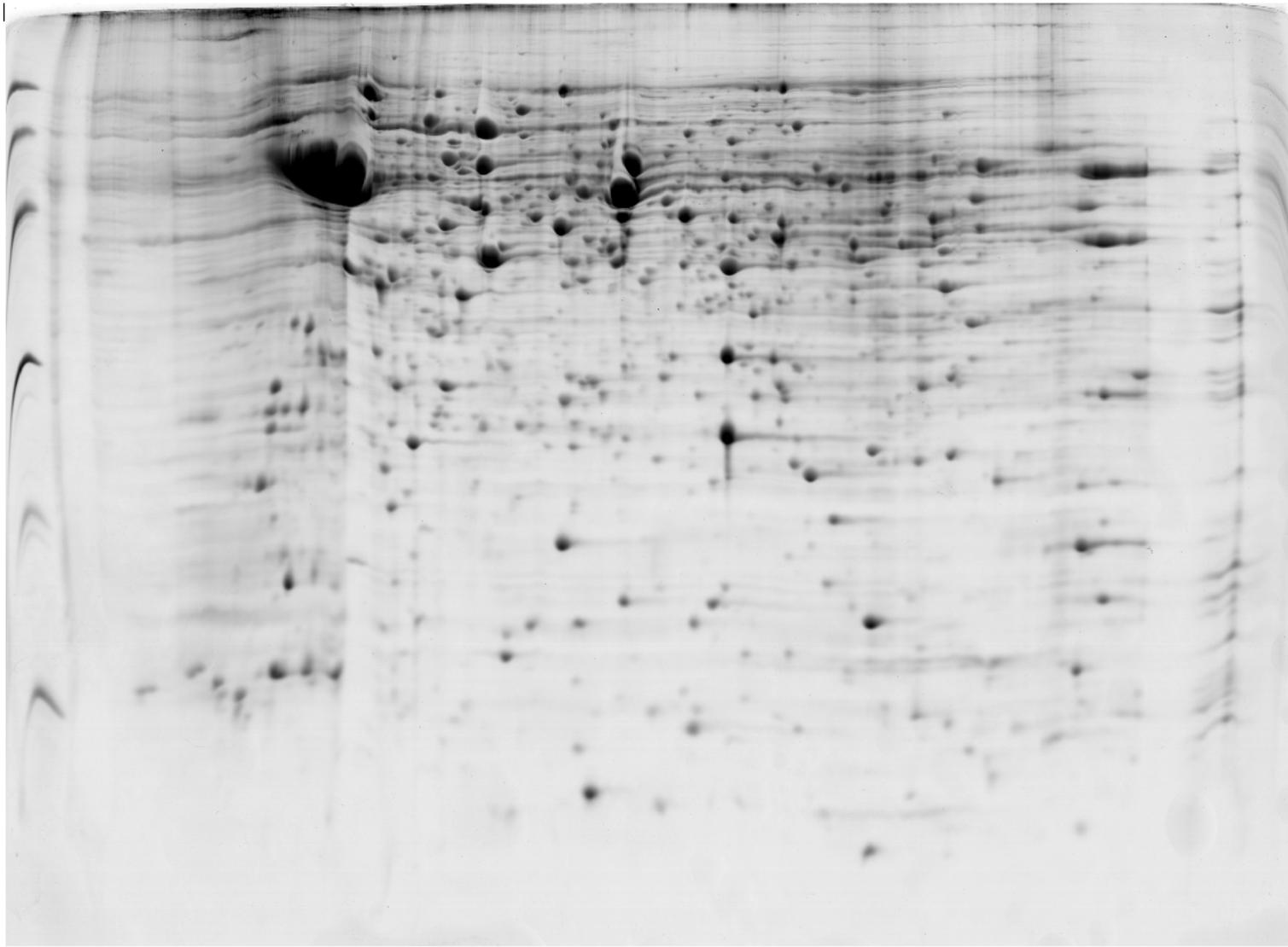


Figura 9.6 - Gel 2DE representativo do fim da fase log de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*.

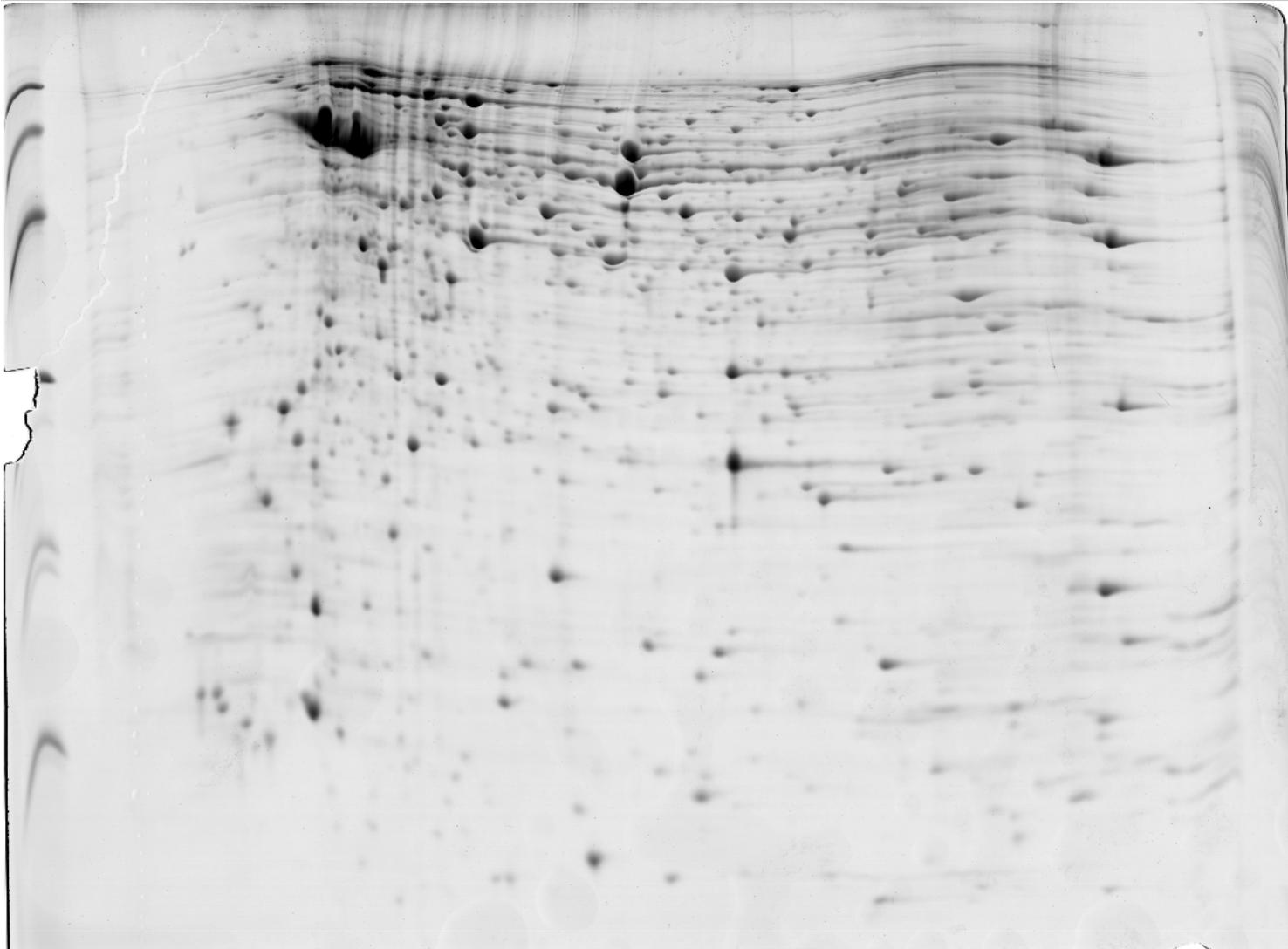
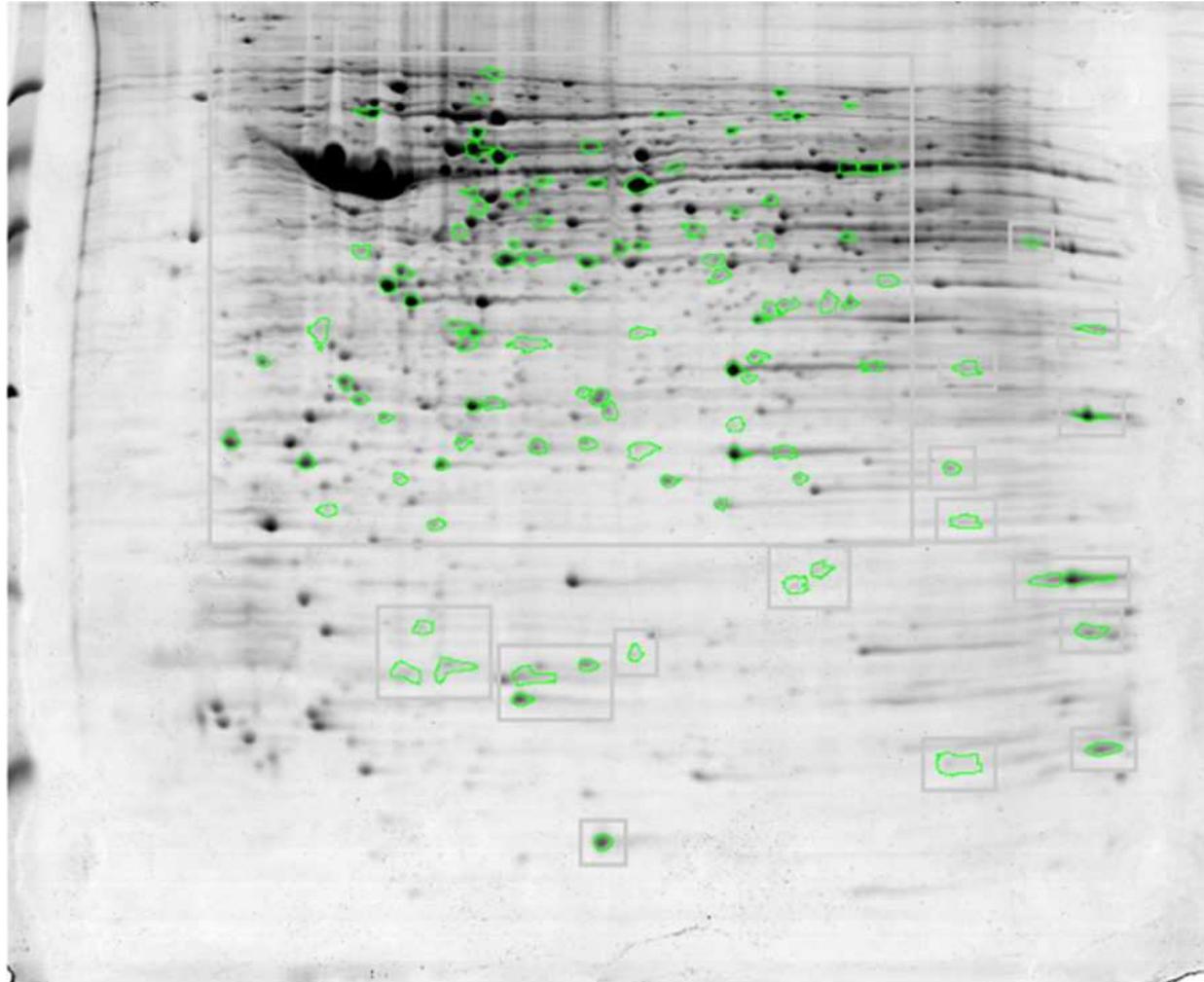


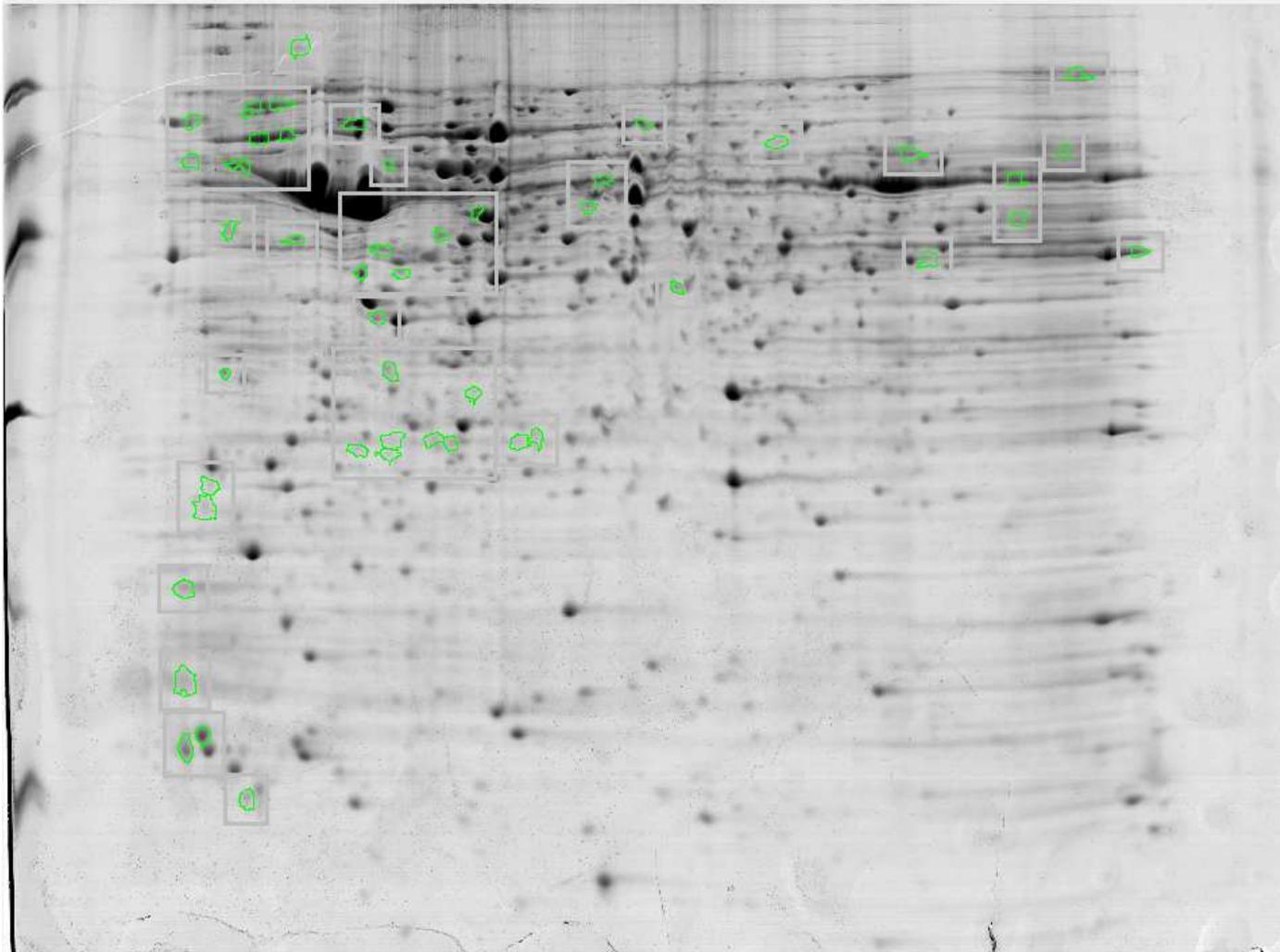
Figura 9.7 - Gel 2DE representativo da fase estacionária de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*.

## **9.2 Análise comparativa – mapa de *spots* DifEstat e DifExclusiv**

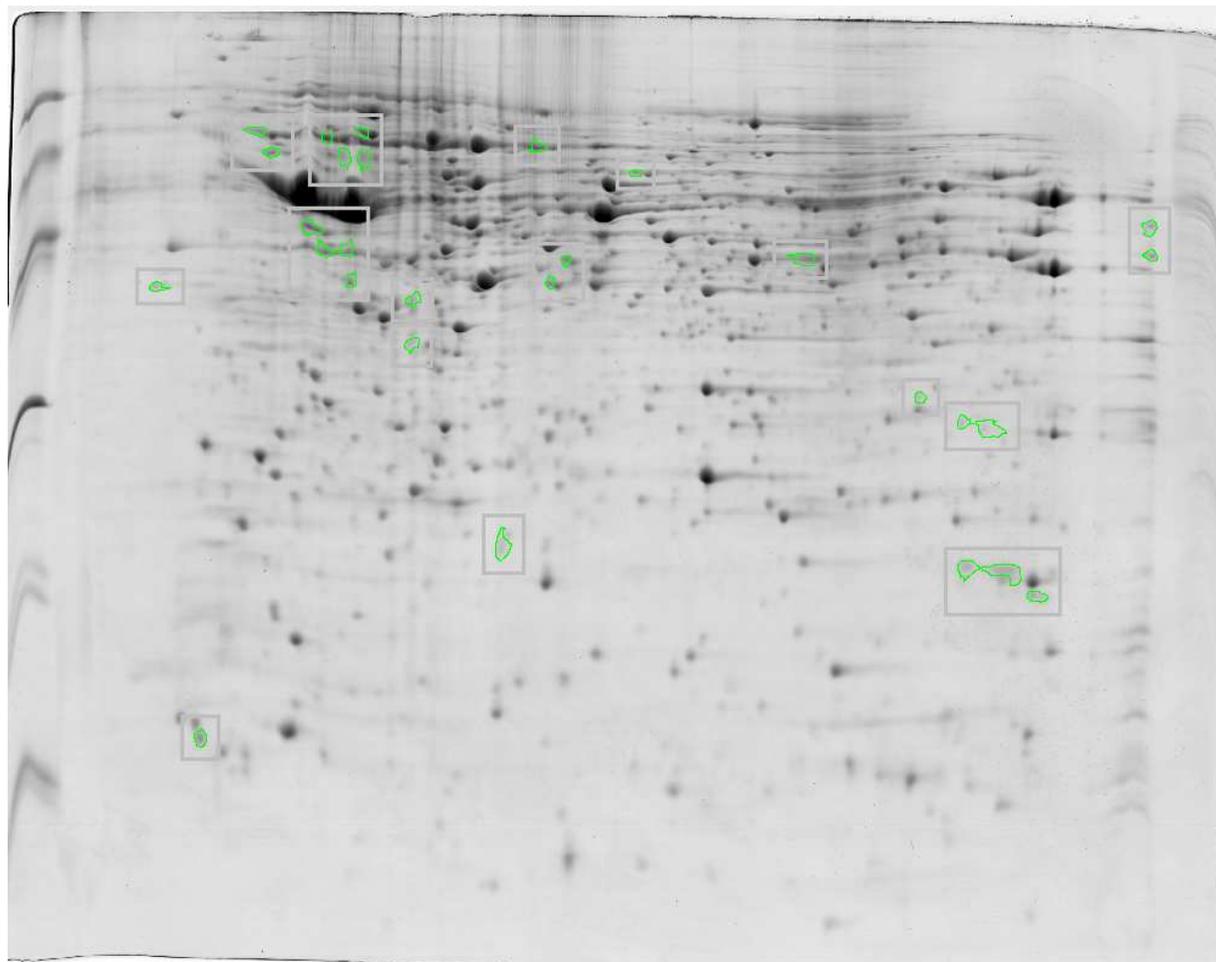
### **9.2.1 Comparação intracepa**



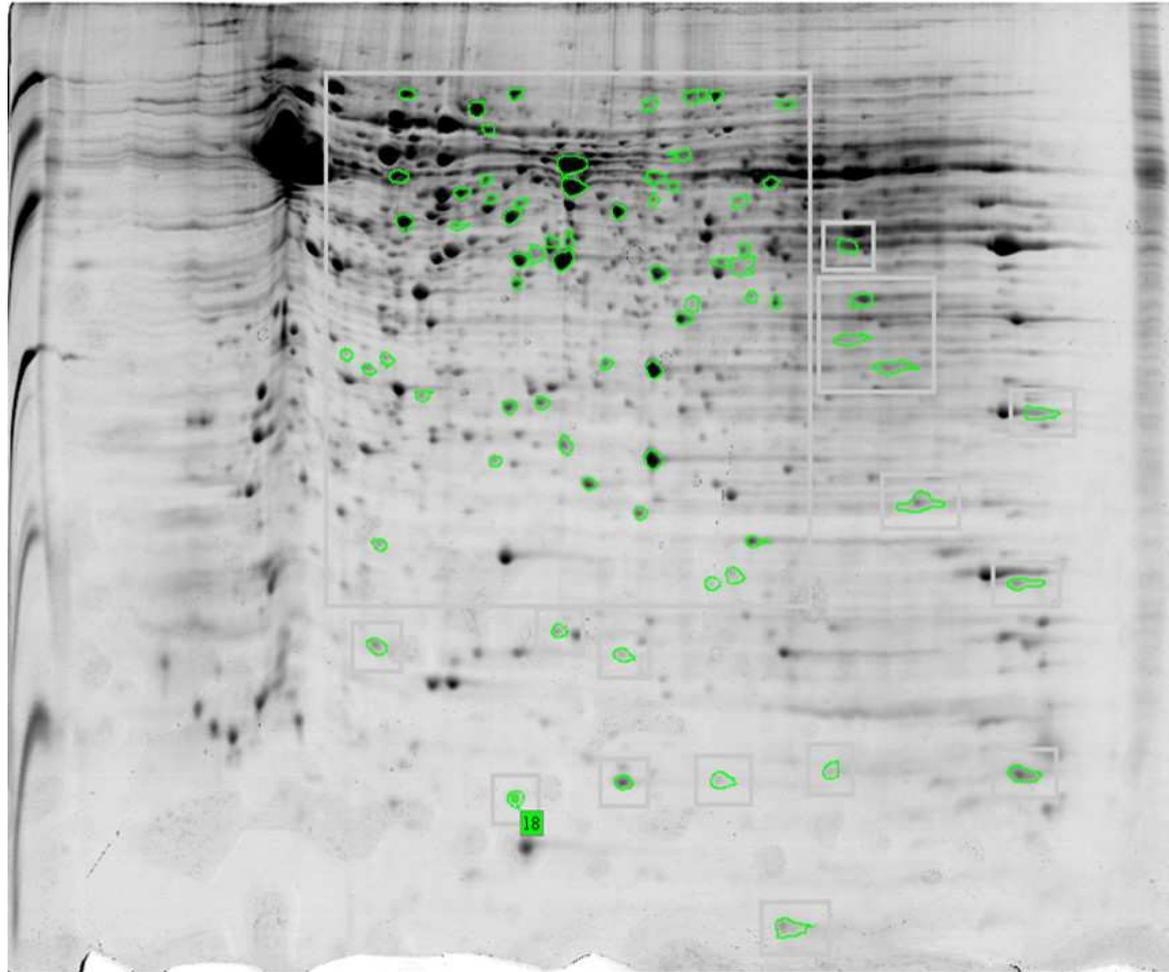
**Figura 9.8 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes em início de fase log de crescimento celular da cepa WT e Apo de *S. culicis*.** O gel apresentado é o gel 2DE referência de início de fase log da cepa WT. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após comparação das cepas em início de fase log de crescimento celular.



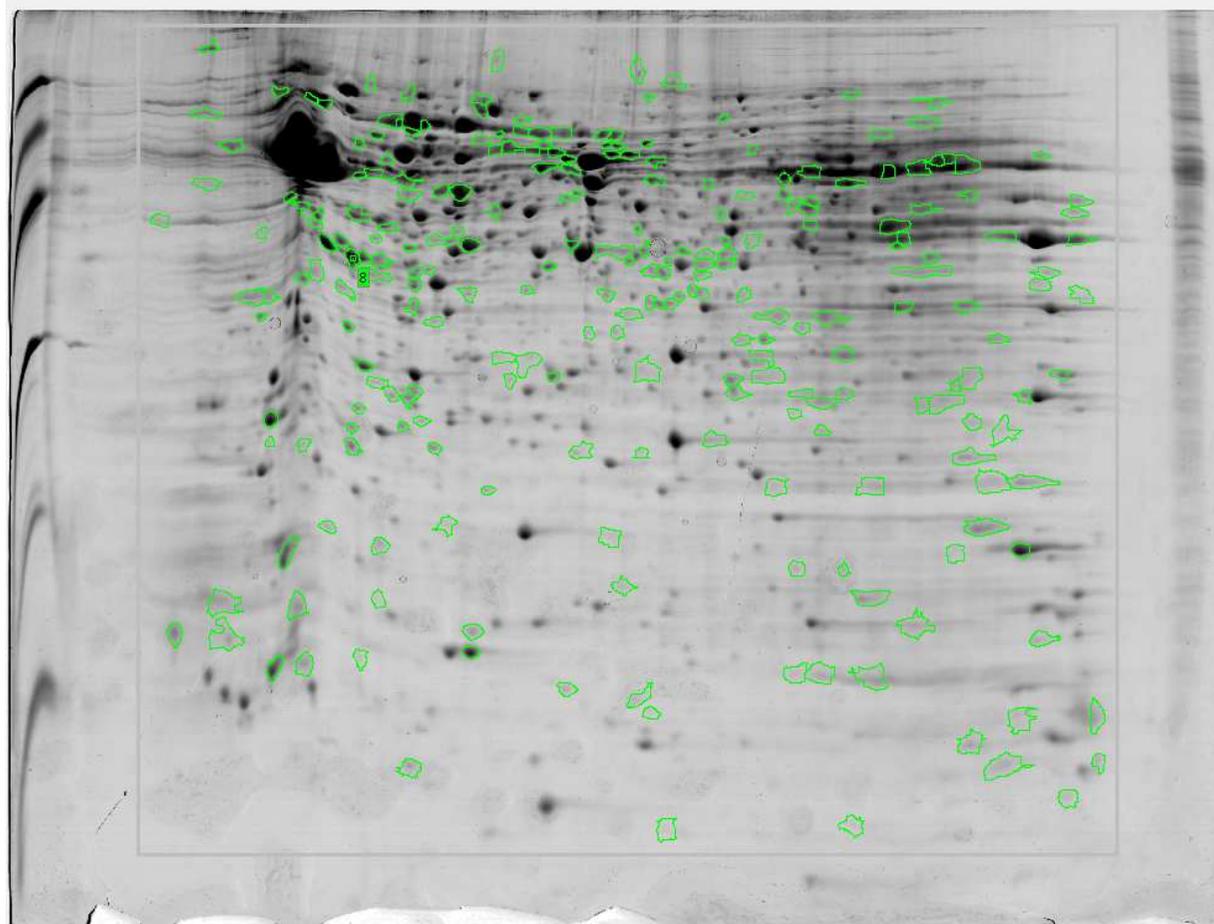
**Figura 9.9 – Visualização dos spots DifExclusiv presentes em início de fase log de crescimento celular da cepa WT de *S. culicis*.** O gel apresentado é um gel 2DE referência de início de fase log da cepa WT. Os spots contornados em verde representam todos os DifExclusiv identificados apenas nos géis de início de fase log de crescimento celular.



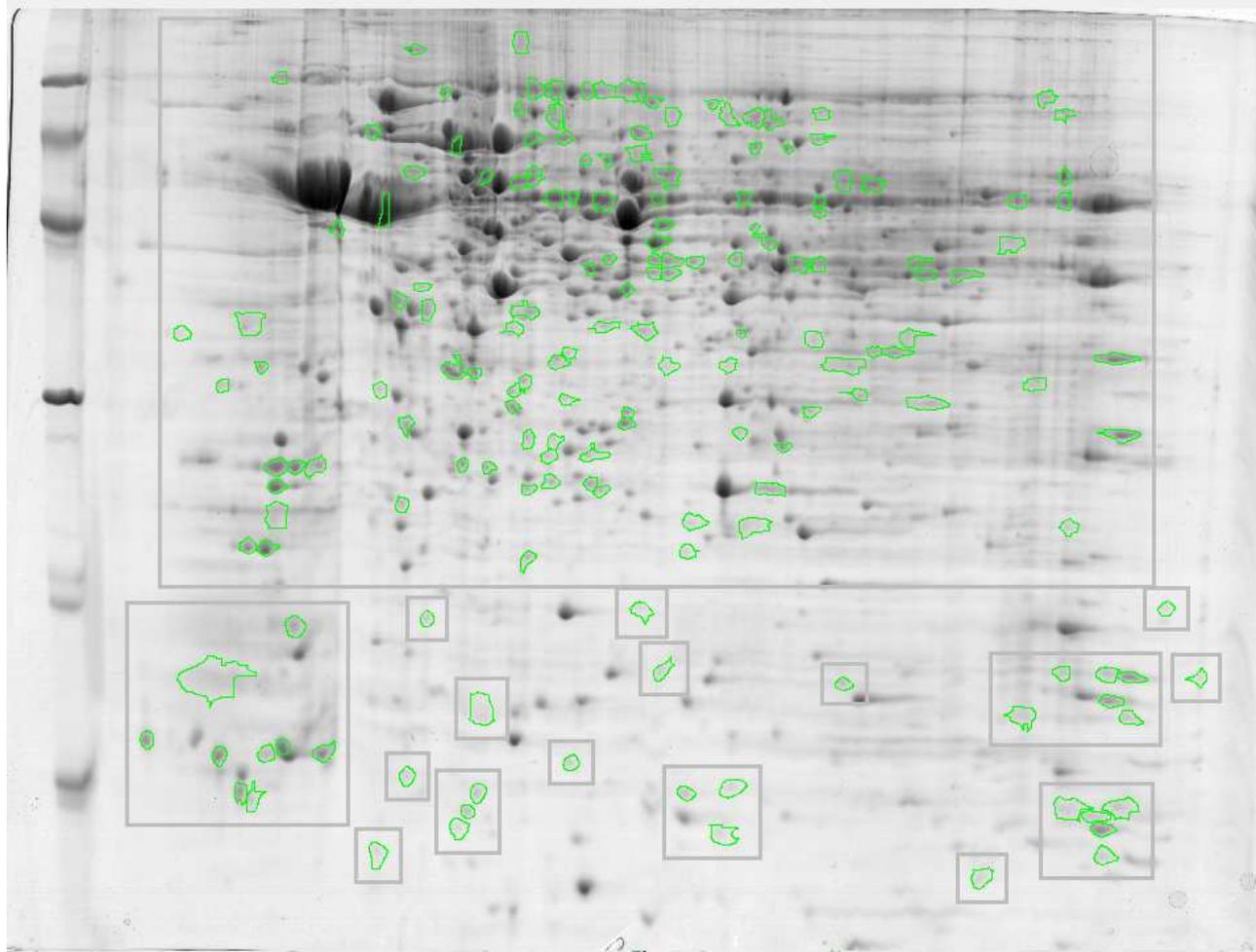
**Figura 9.10 – Visualização dos spots DifExclusiv presentes em início de fase log de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*.** O gel apresentado é um gel 2DE referência de início de fase log da cepa Apo. Os spots contornados em verde representam todos os DifExclusiv identificados apenas nos géis de início de fase log de crescimento celular.



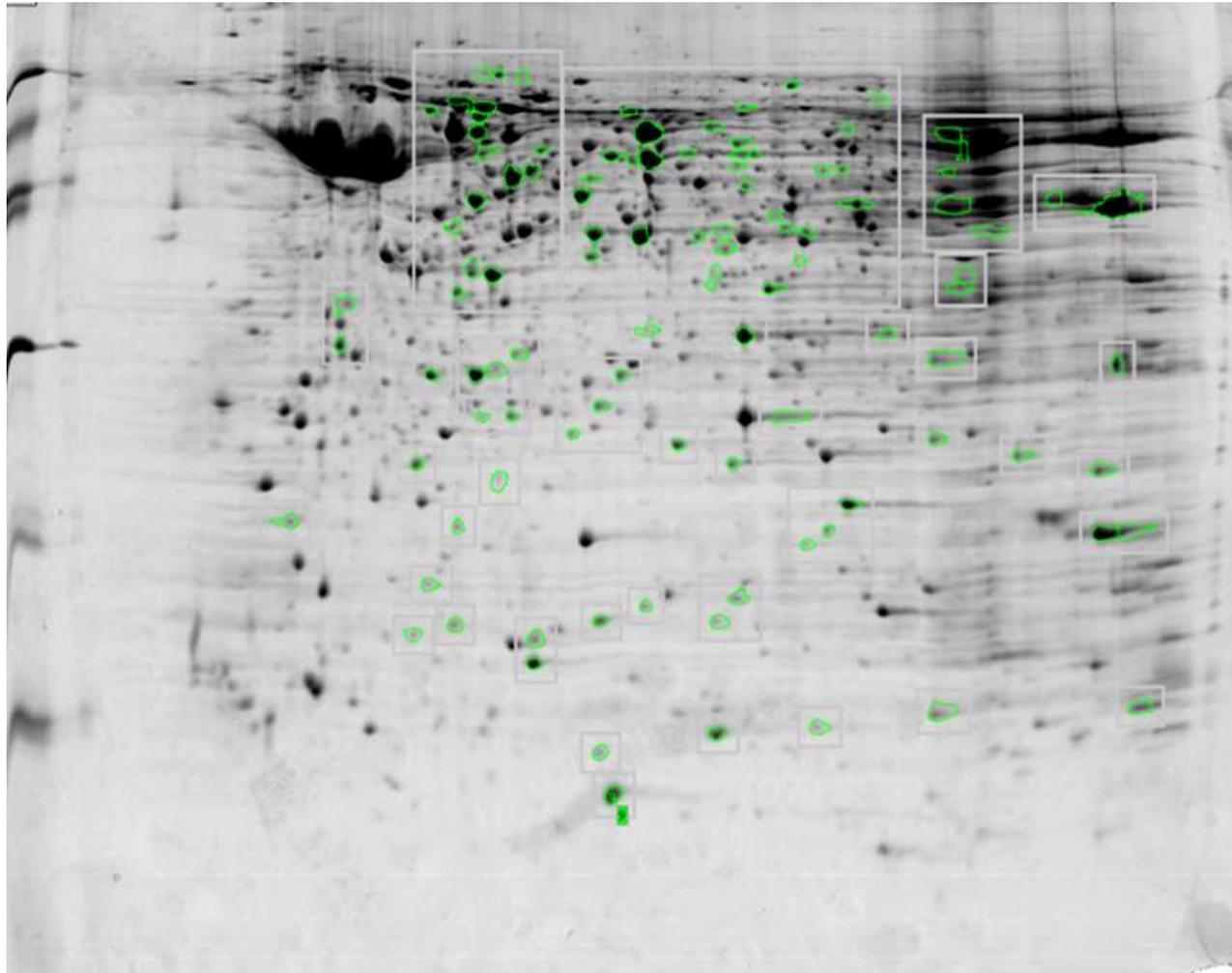
**Figura 9.11 – Visualização dos spots DifEstat presentes em meio de fase log de crescimento celular da cepa WT e Apo de *S. culicis*.** O gel apresentado é o gel 2DE referência de meio de fase log da cepa WT. Os spots contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após comparação das cepas em meio de fase log de crescimento celular.



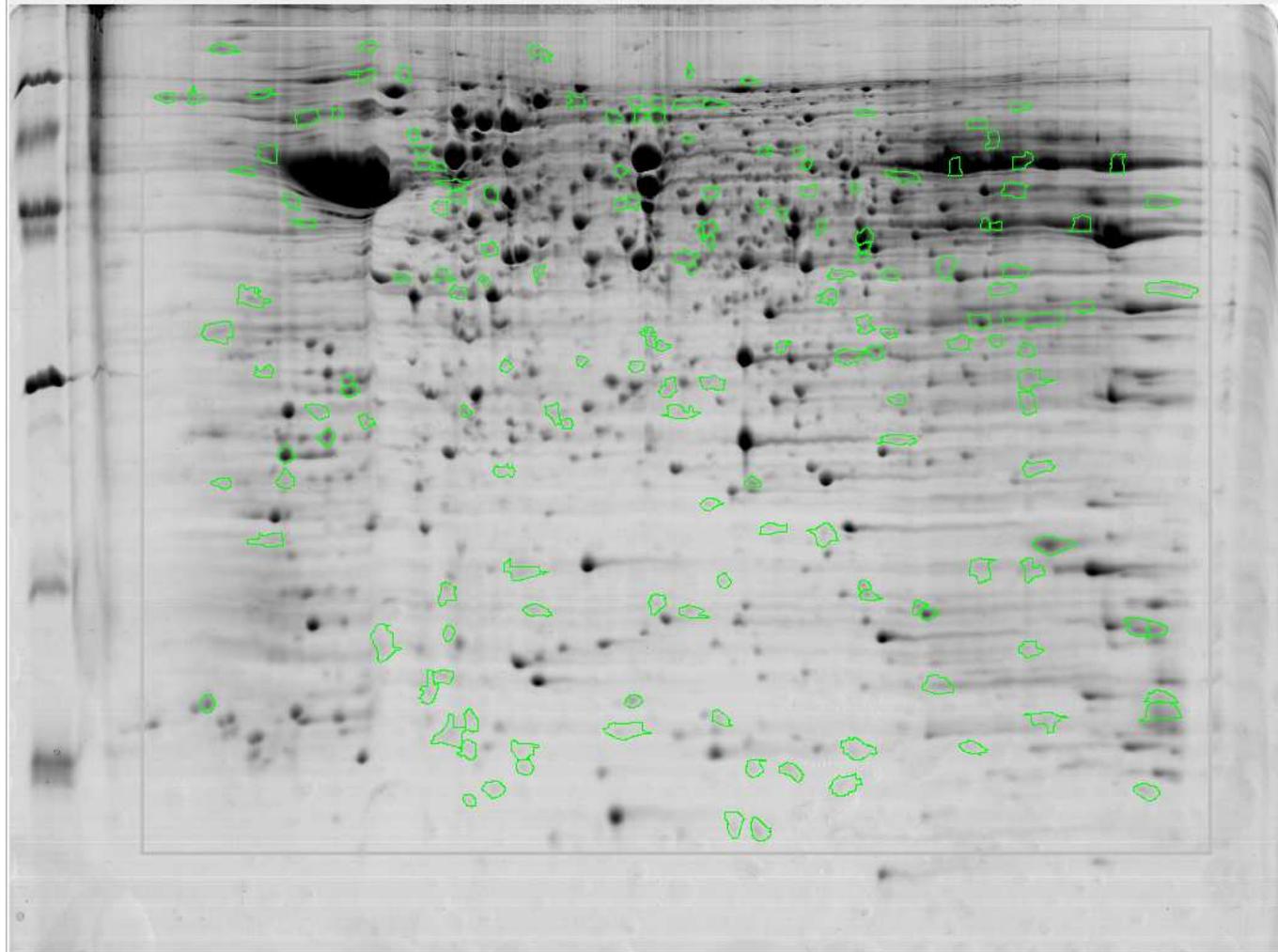
**Figura 9.12 – Visualização dos *spots* DifExclusiv presentes em meio de fase log de crescimento celular da cepa WT de *S. culicis*.** O gel apresentado é um gel 2DE referência de meio de fase log da cepa WT. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifExclusiv identificados apenas nos géis de meio de fase log de crescimento celular.



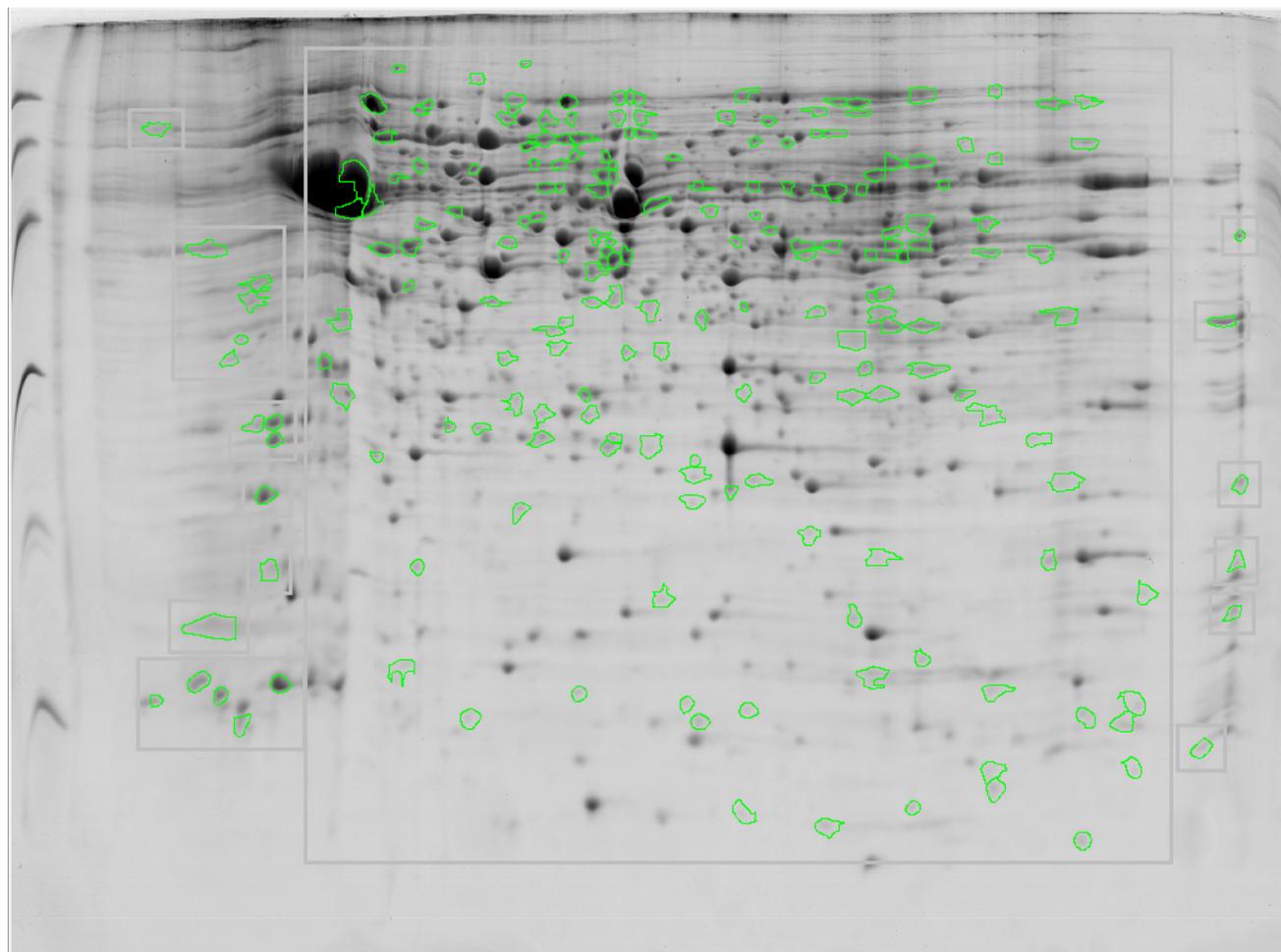
**Figura 9.13 – Visualização dos *spots* DifExclusiv presentes em meio de fase log de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*. O gel apresentado é um gel 2DE referência de meio de fase log da cepa Apo. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifExclusiv identificados apenas nos géis de meio de fase log de crescimento celular.**



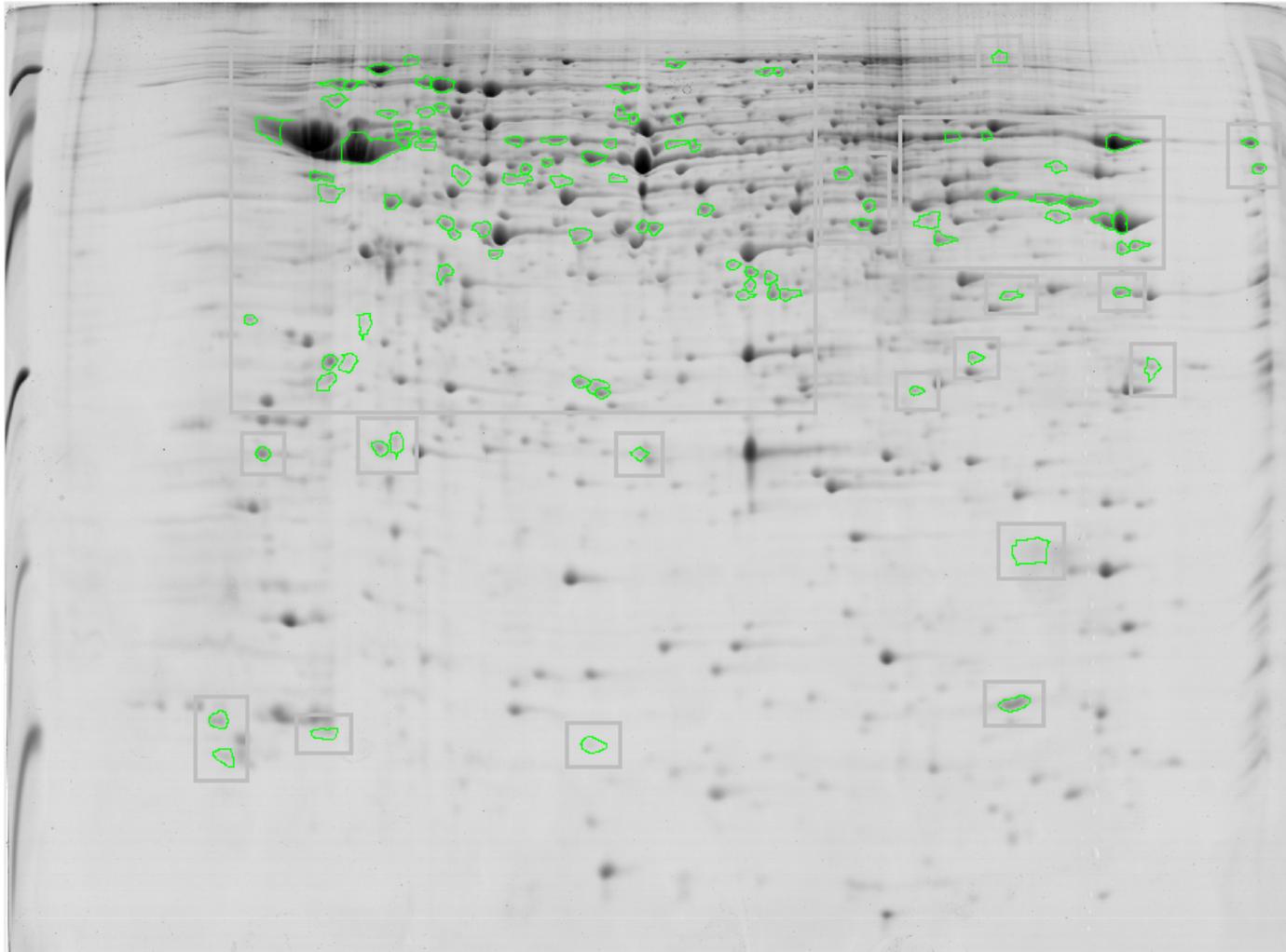
**Figura 9.14 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes em fim de fase log de crescimento celular da cepa WT e Apo de *S. culicis*.** O gel apresentado é o gel 2DE referência de fim de fase log da cepa WT. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após comparação das cepas em fim de fase log de crescimento celular.



**Figura 9.15 – Visualização dos spots DifExclusiv presentes em fim de fase log de crescimento celular da cepa WT de *S. culicis*.** O gel apresentado é um gel 2DE referência de fim de fase log da cepa WT. Os spots contornados em verde representam todos os DifExclusiv identificados apenas nos géis de fim de fase log de crescimento celular.

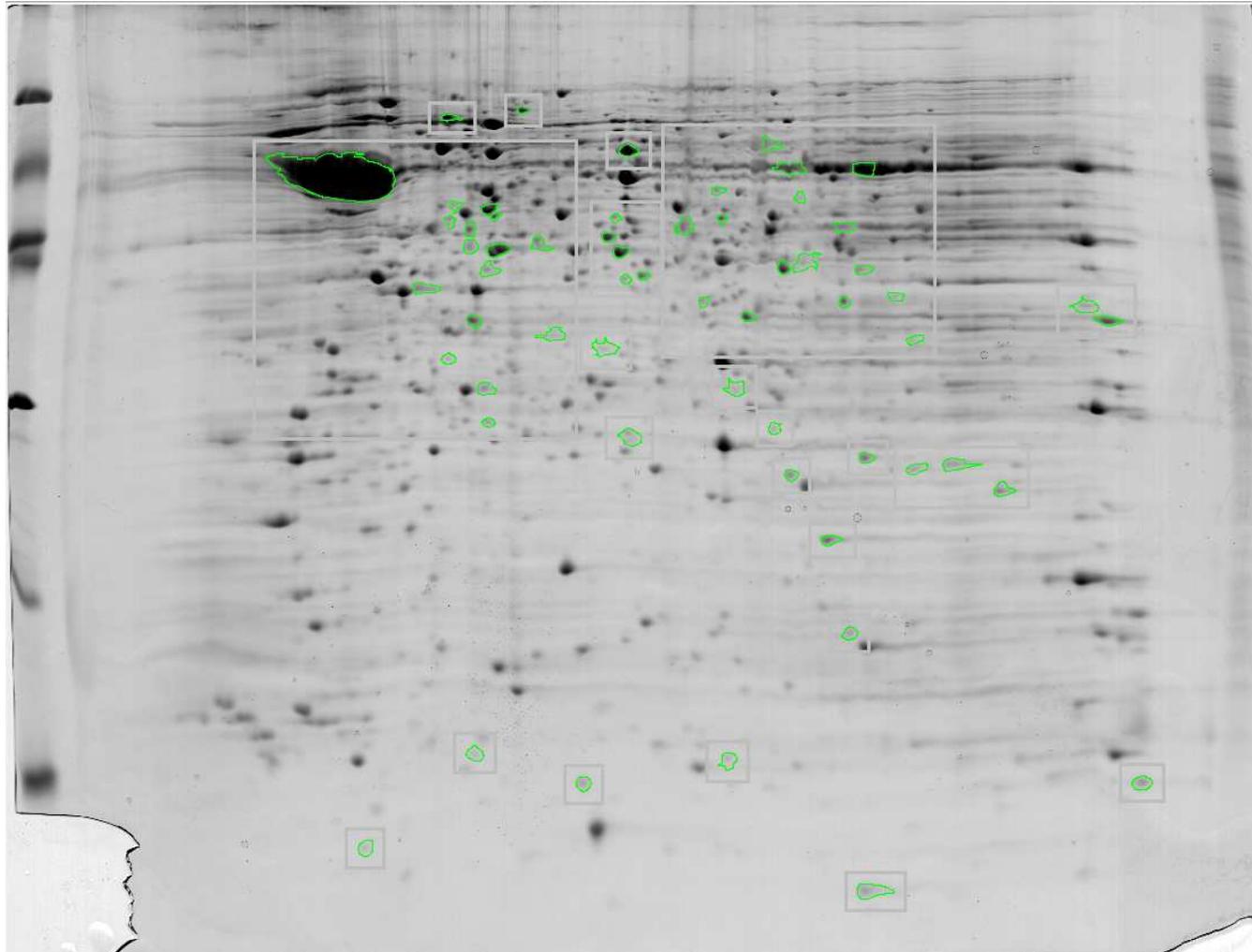


**Figura 9.16 – Visualização dos *spots* DifExclusiv presentes em fim de fase log de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*. O gel apresentado é um gel 2DE referência de fim de fase log da cepa Apo. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifExclusiv identificados apenas nos géis de fim de fase log de crescimento celular.**

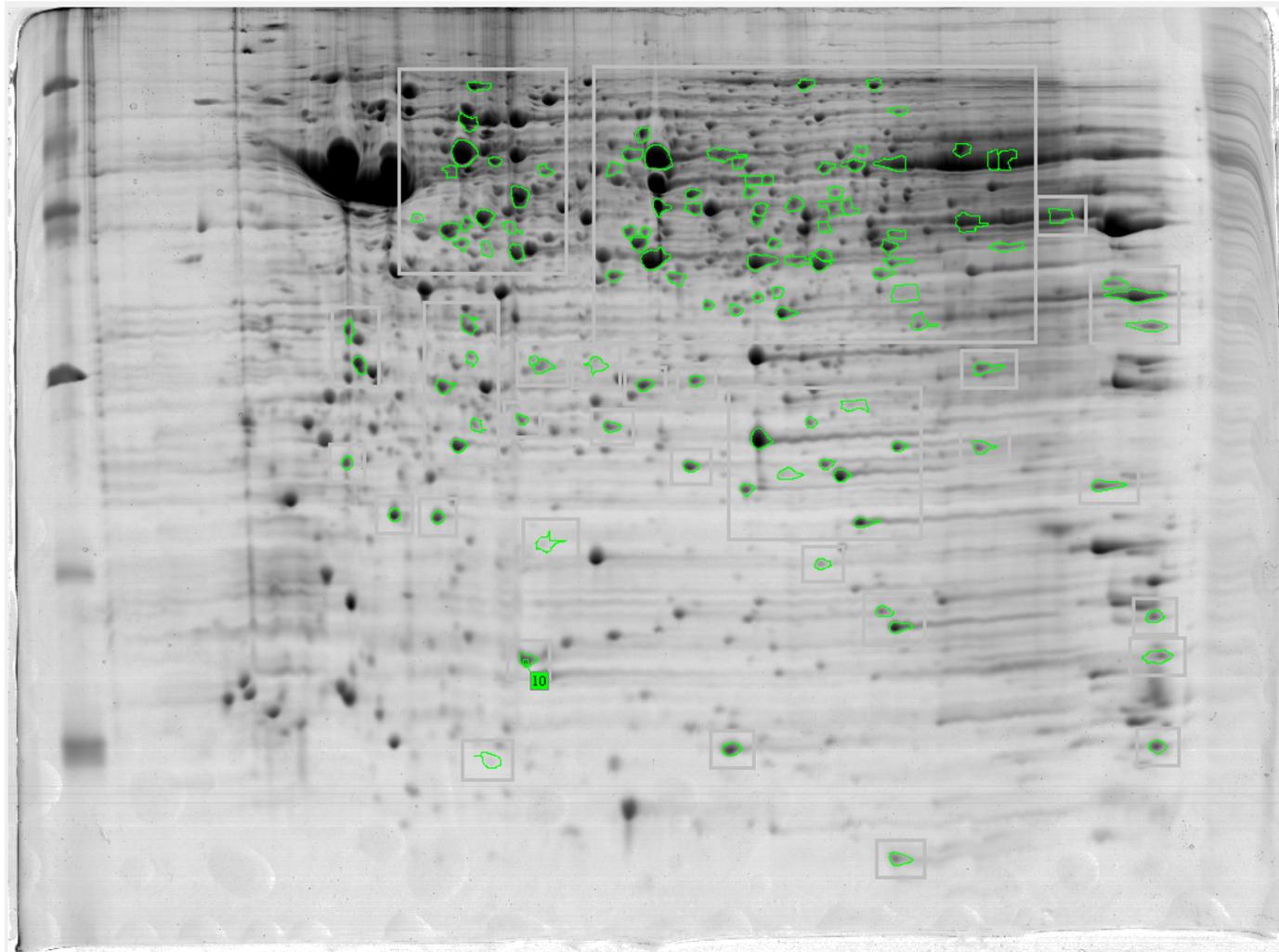


**Figura 9.17 – Visualização dos spots DifExclusiv presentes em fase estacionária de crescimento celular da cepa Apo de *S. culicis*.** O gel apresentado é um gel 2DE referência de fase estacionária da cepa Apo. Os spots contornados em verde representam todos os DifExclusiv identificados apenas nos géis de fase estacionária de crescimento celular.

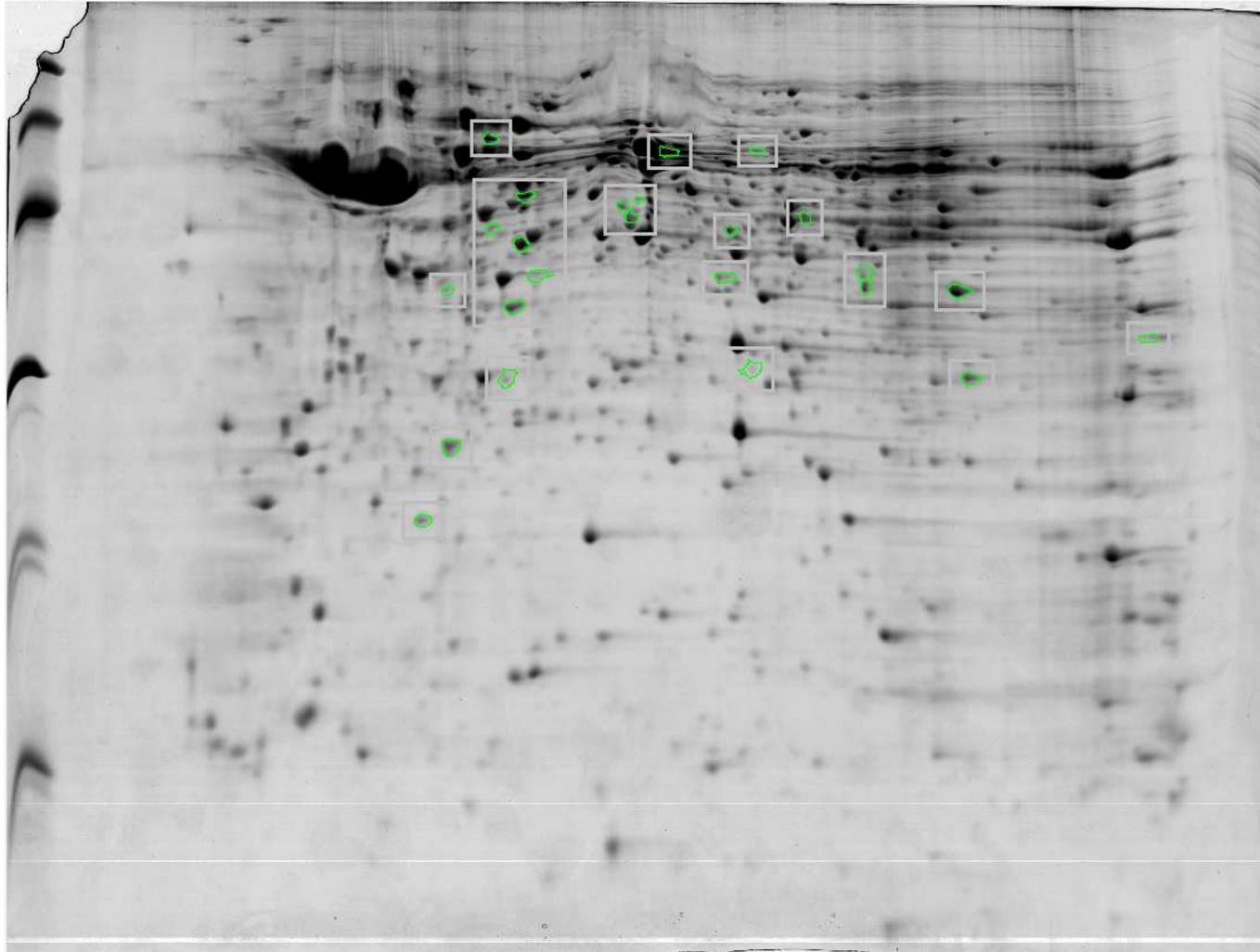
### 9.2.2 Comparação intercepas



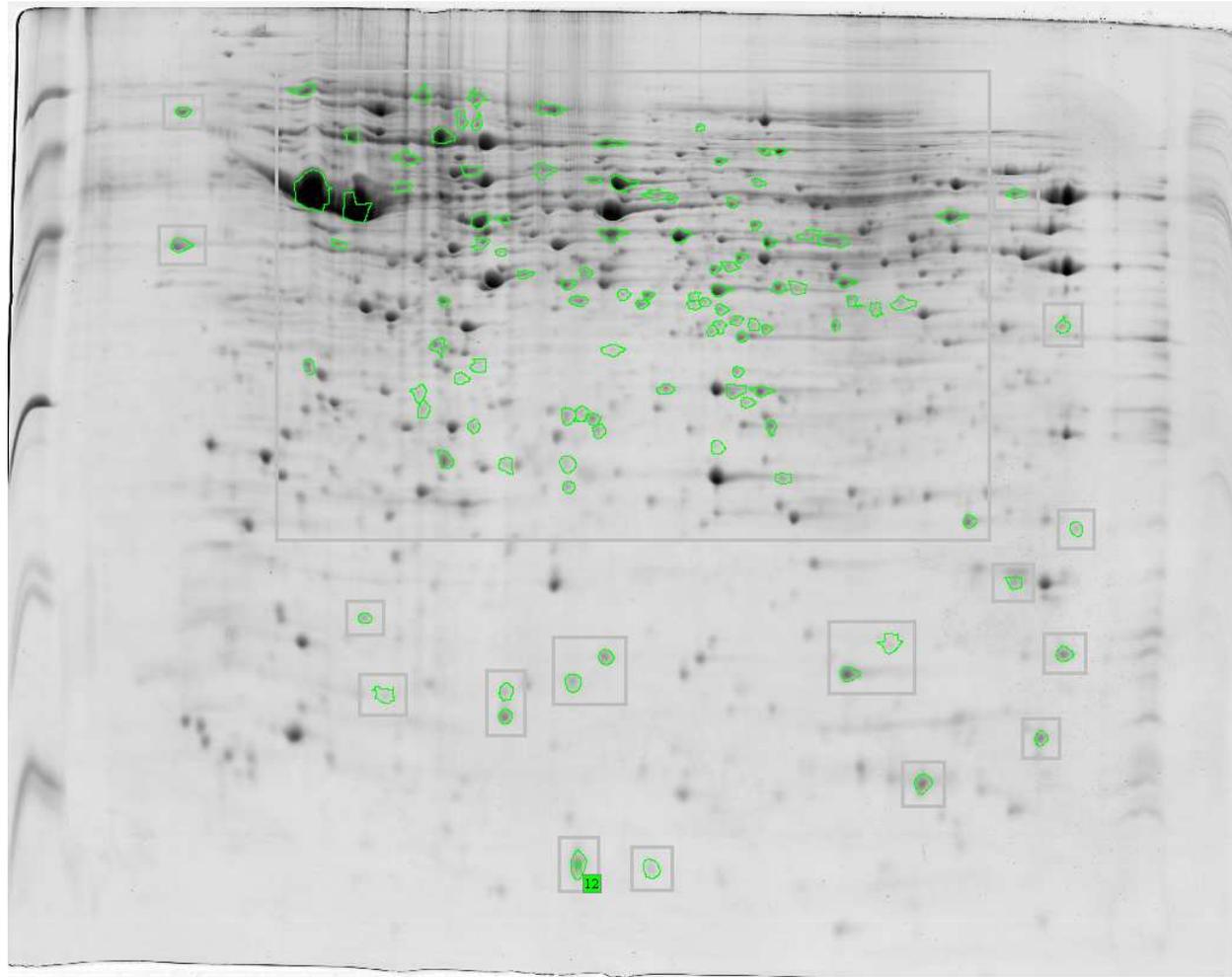
**Figura 9.18 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes na comparação entre início e meio de fase log de crescimento celular da cepa WT. O gel 2DE apresentado é o gel referência de início de fase log da cepa WT. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.**



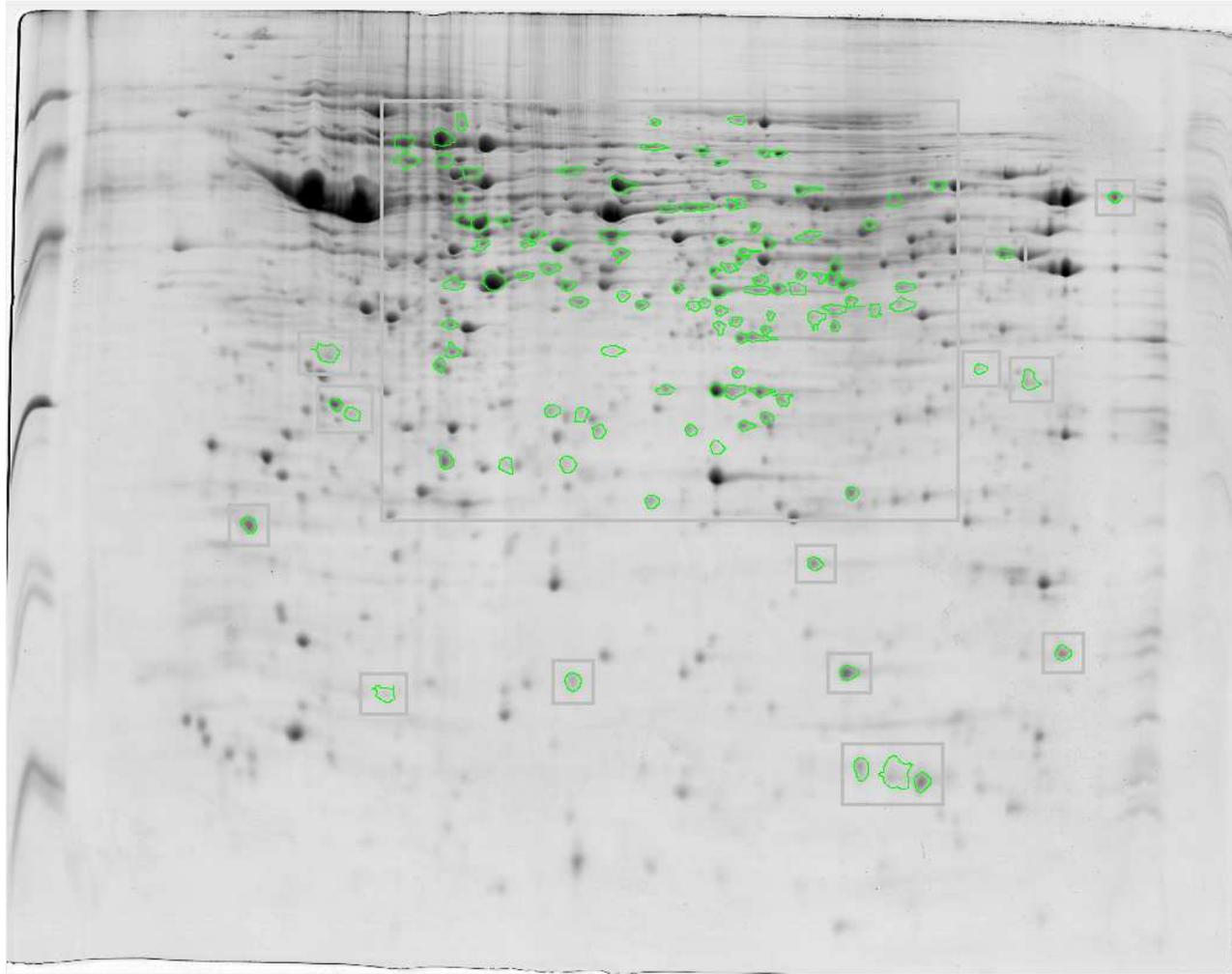
**Figura 9.19 – Visualização dos spots DifEstat presentes na comparação entre início e fim de fase log de crescimento celular da cepa WT. O gel 2DE apresentado é o gel referência de início de fase log da cepa WT. Os spots contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.**



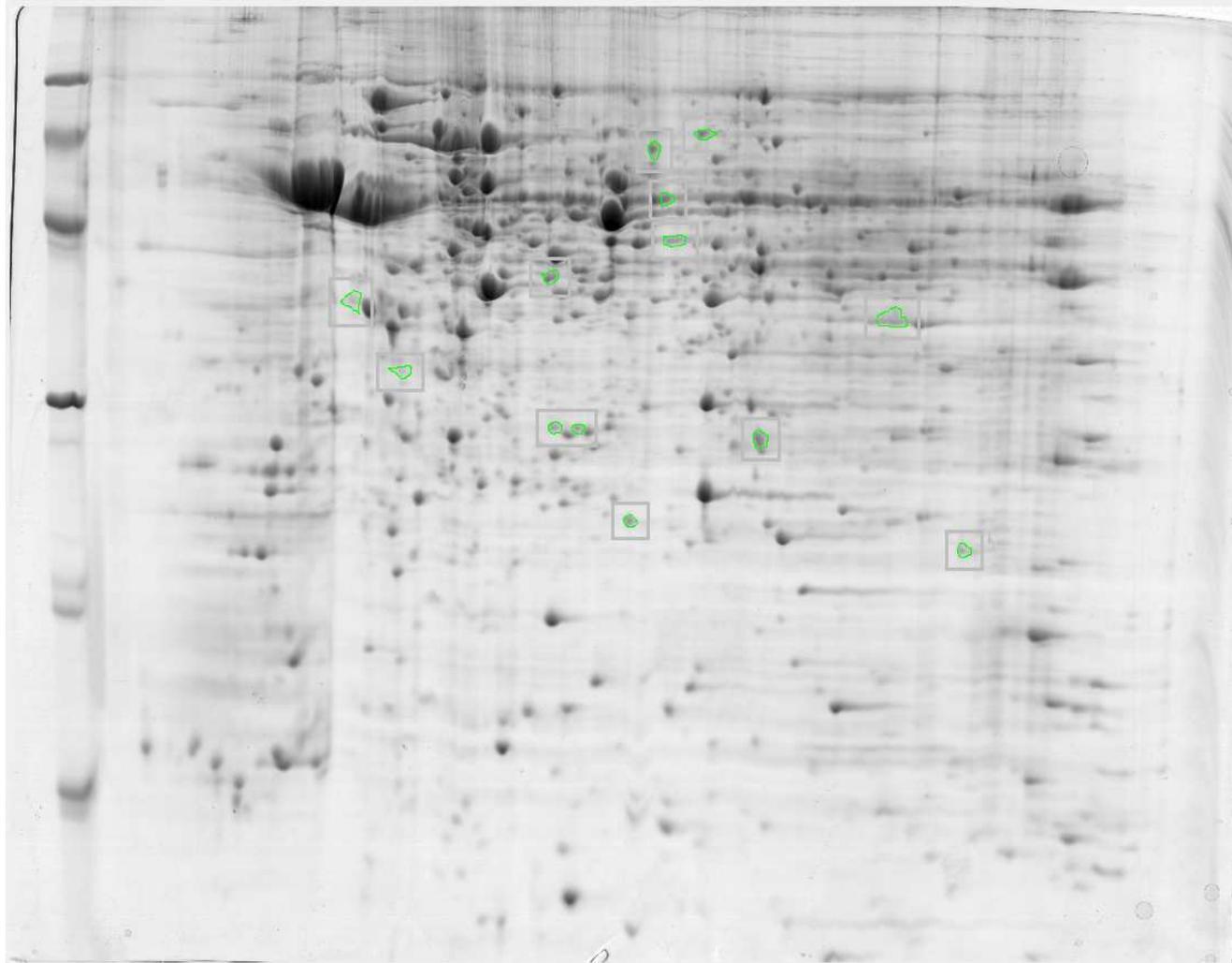
**Figura 9.20 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes na comparação entre meio e fim de fase log de crescimento celular da cepa WT. O gel 2DE apresentado é o gel referência de meio de fase log da cepa WT. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.**



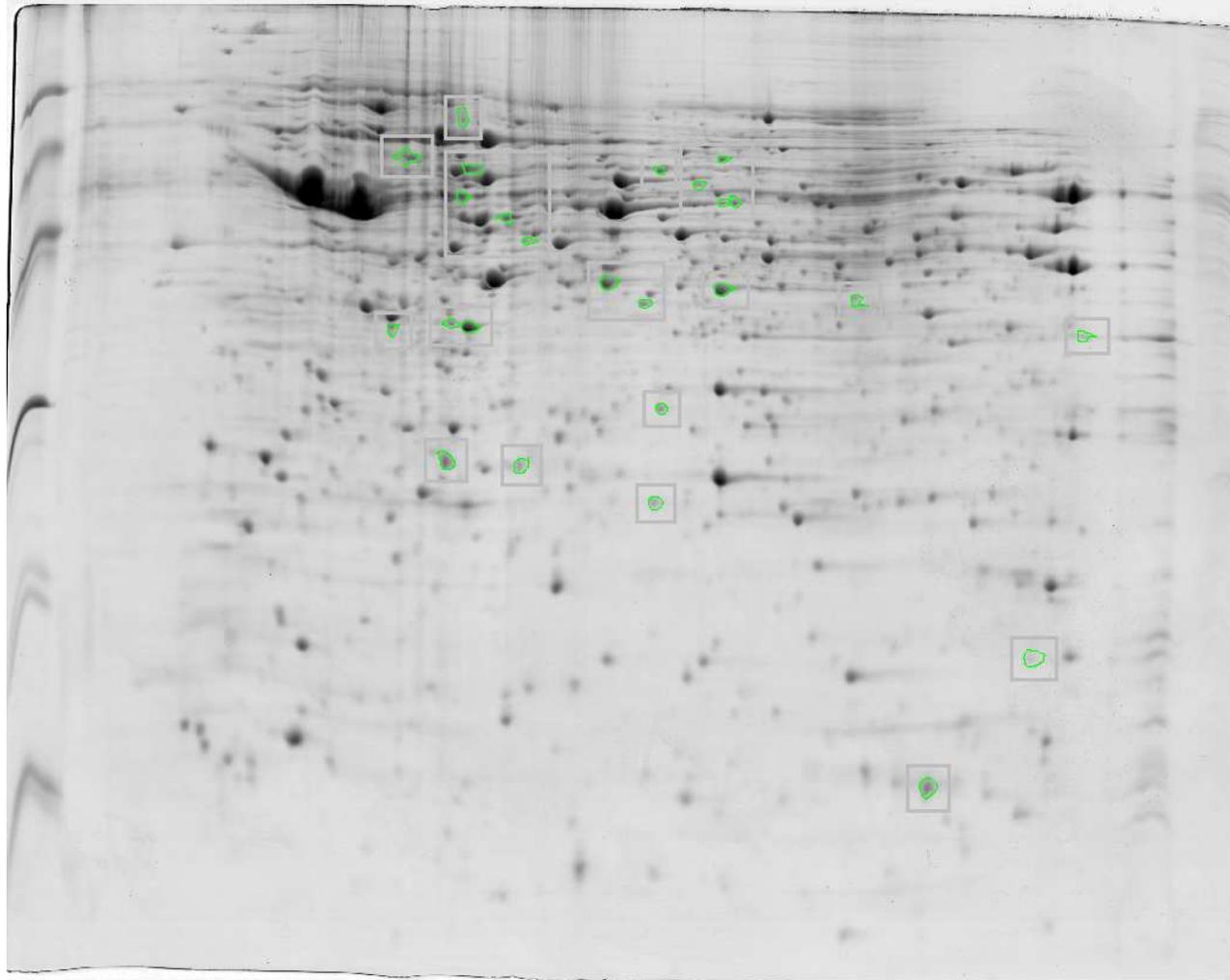
**Figura 9.21 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes na comparação entre início e meio de fase log de crescimento celular da cepa Apo.** O gel 2DE apresentado é o gel referência de início de fase log da cepa Apo. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.



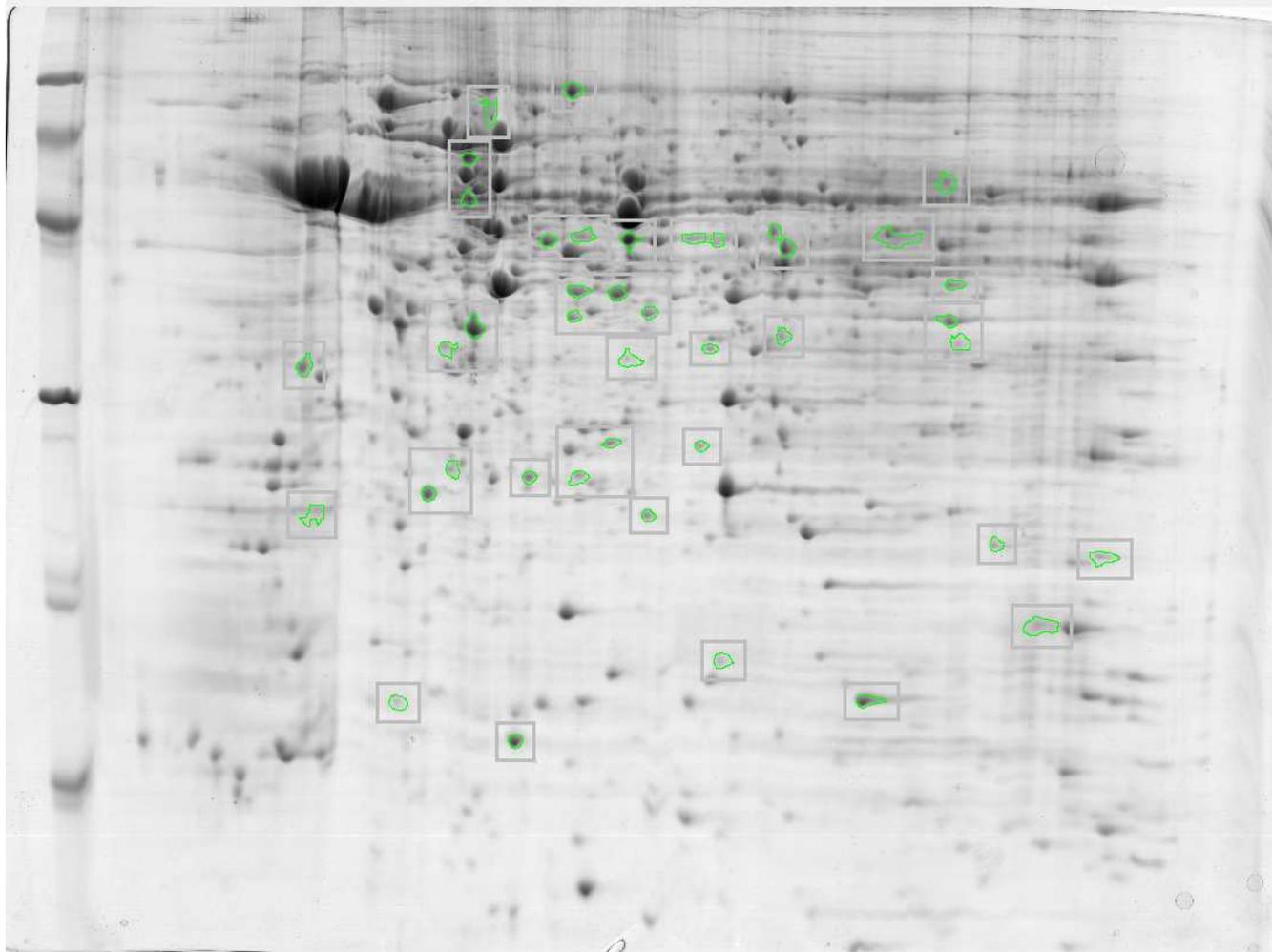
**Figura 9.22 – Visualização dos spots DifEstat presentes na comparação entre início e fim de fase log de crescimento celular da cepa Apo.** O gel 2DE apresentado é o gel referência de início de fase log da cepa Apo. Os spots contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.



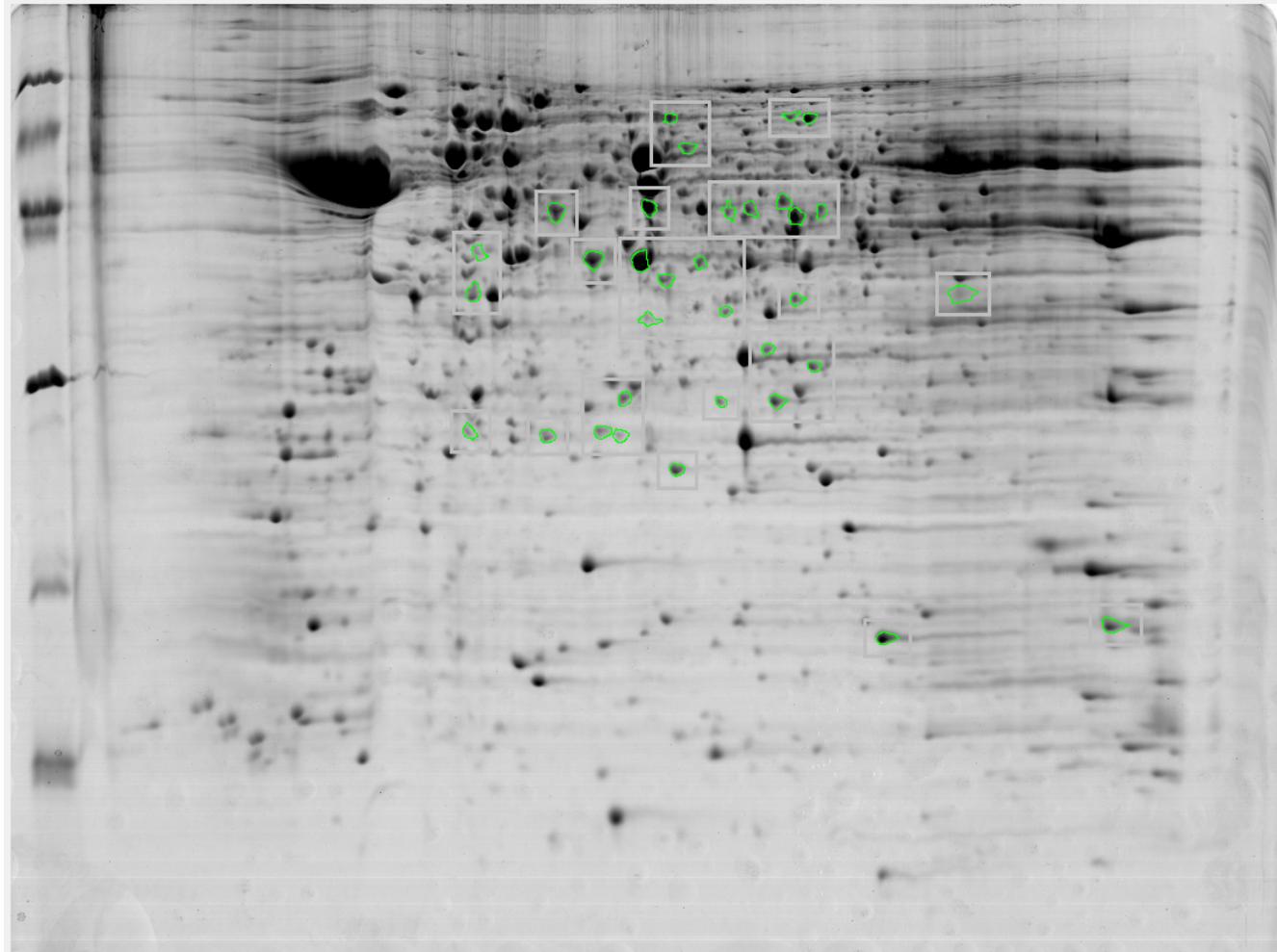
**Figura 9.23 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes na comparação entre meio e fim de fase log de crescimento celular da cepa Apo.** O gel 2DE apresentado é o gel referência de meio de fase log da cepa Apo. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.



**Figura 9.24 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes na comparação entre início de fase log e fase estacionária de crescimento celular da cepa Apo.** O gel 2DE apresentado é o gel referência de início de fase log da cepa Apo. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.



**Figura 9.24 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes na comparação entre meio de fase log e fase estacionária de crescimento celular da cepa Apo.** O gel 2DE apresentado é o gel referência de meio de fase log da cepa Apo. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.



**Figura 9.25 – Visualização dos *spots* DifEstat presentes na comparação entre fim de fase log e fase estacionária de crescimento celular da cepa Apo. O gel 2DE apresentado é o gel referência de fim de fase log da cepa Apo. Os *spots* contornados em verde representam todos os DifEstat identificados após a comparação entre as distintas etapas de crescimento celular.**

### 9.3 Identificação de *spots*

**Tabela 1. Identificação de spots diferencialmente abundantes (DifEstat) por espectrometria de massas após comparação dos perfis 2DE intracepa Apo de *S. culicis*.**

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h /24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
0	Homoserine kinase	528248856	37,0 / 39,7	6,2 / 6,3	3	12	-	1,5	-	-	-	-
4	kinetoplastid membrane protein KMP-11	528256906	11,1 / 12,0	5,9 / 5,6	2	15	1,5	-	-	-	-	-
9	hypothetical	528257386	12,9 / 15,5	8,9 / 8,8	2	18	1,5	-	-	-	-	-
29	Nucleoside- diphosphate kinase	528257238	16,5 / 17,2	6,8 / 6,8	9	30	1,6	1,7	-	-	0,6	2,7
18	Cofilin	528227814	15,6 / 15,8	5,7 / 5,4	5	32	1,8	-	-	-	0,6	-
22	Tryparedoxin	528254309	17,3 / 16,6	5,7 / 5,5	7	45	1,4	-	-	-	-	-
	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11	528250380	15,5 / 16,6	5,6 / 5,5	2	15						
	cytosolic tryparedoxin peroxidase, trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	528204906	22,1 / 16,6	6,2 / 5,5	3	25						
32	Flagellar associated protein	528254274	16,7 / 15,6	9,1 / 8,6	5	44	-	-	3,0	-	-	3,7
	cytochrome c oxidase VII	528250085	18,8 / 15,6	8,9 / 8,6	2	15						

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
33	FKBP-type peptidyl cis-trans isomerase	528256990	16,7 / 18,2	6,3 / 6,1	3	23	-	-	-	-	0,6	-
49	Bis(5'-nucleosidyl)- tetraphosphatase	528242570	15,4 / 21,1	6,2 / 6,6	2	22	-	1,1	-	-	-	-
58	Cytosolic tryparedoxin peroxidase	528257400	22,1 / 23,2	8,2 / 8,0	3	17	0,6	-	-	1,8	1,5	-
64	nucleoside- diphosphate kinase	528257238	16,5 / 24,1	6,8 / 4,8	6	50	-	-	-	-	0,4	-
71	cytochrome c oxidase subunit V	528247959	22,1 / 23,9	6,2 / 5,8	5	38	-	0,7	0,5	-	0,4	0,7
75	Cytosolic tryparedoxin peroxidase	528204906	22,1 / 24,7	6,2 / 5,6	4	20	1,5	-	-	-	-	-
	Rab family	528250100	22,9 / 24,7	6,7 / 5,6	3	20						
	Hypothetical	528255293	22,6 / 24,7	6,2 / 5,6	2	12						
		528246918	26,5 / 24,7	6,4 / 5,6	2	10						
76	Superoxide dismutase, Fe-Mn Family	528238522	25,5 / 24,6	8,2 / 6,9	7	31	-	1,6	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
78	Mitochondrial tryparedoxin peroxidase, trypanosomatid typical 2-cys peroxiredoxin	528224473	16,9 / 24,6	5,0 / 5,2	6	51	-	-	-	-	1,3	-
90	20S proteasome subunit alpha	528247276	25,2 / 26,2	5,4 / 5,3	1	6	0,4	0,3	0,1	-	0,3	0,4
110	V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit E	528240967	24,8 / 28,6	6,5 / 6,2	6	34	-	2,5	-	-	-	-
117	Large subunit ribosomal protein L13e	528242976	29,8 / 28,7	11,5 / 5,6	1	7	1,8	-	-	-	-	-
120	Tyrosyl or methionyl-tRNA synthetase-like protein	528257550	25,6 / 29,5	6,2 / 6,2	3	17	0,8	-	-	-	-	-
125	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit – alpha	528246523	56,6 / 28,9	9,0 / 5,8	2	6	-	-	1,6	-	-	-
126	20S proteasome subunit alpha	528234589	33,2 / 29,3	5,8 / 5,2	7	26	0,7	-	-	-	-	-
	Rab family	528242535	26,0 / 29,3	5,5 / 5,2	4	15						
129	Uracil phosphoribosyltransferase	528249872	29,0 / 29,8	6,5 / 6,4	3	15	-	1,7	-	-	-	0,6

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
135	Prostaglandin f synthase	528245046	30,9 / 30,3	5,8 / 5,9	5	21	1,4	1,5	-	-	-	-
141	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase	528238550	31,8 / 31,4	5,8 / 5,3	14	53	1,7	-	-	-	-	-
	Transcription elongation factor S- II	528246483	26,3 / 31,4	6,8 / 5,3	2	10						
149	Ubiquinone biosynthesis methyltransferase	528238550	31,8 / 32,2	5,8 / 4,8	2	10	1,5	-	-	-	0,6	-
	Tyrosine 3- monooxygenase/try ptophan 5- monooxygenase activation protein	528257498	29,2 / 32,2	5,1 / 4,8	3	11						
	Elongation factor 1- beta	528228892	22,6 / 32,2	4,8 / 4,8	7	39						
155	Tubulin-specific chaperone	528255477	26,1 / 33,4	4,9 / 4,9	4	18	-	0,6	-	-	-	-
162	nitrilase	528247400	21,9 / 33,4	5,8 / 5,7	3	17	2,8	2,2	-	-	0,4	0,5
165	Glyoxalase II	528226870	35,8 / 34,3	6,1 / 6,0	4	12	-	-	-	-	0,7	0,7
168	Malate dehydrogenase	528242015	33,6 / 35,3	9,3 / 9,2	2	8	-	-	2,7	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	56h/24h					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
172	5'- methylthioadenosin e phosphorylase	528248536	33,4 / 34,9	6,05 / 6,08	1	3	1,6	-	-	-	-	-
175	phosphomannomut ase	528256670	28,1 / 35,4	5,4 / 7,7	1	6	-	-	-	-	1,6	1,7
	hypothetical	528248884	27,9 / 35,4	5,8 / 7,7	2	8						
177	Enoyl-[acyl-carrier protein] reductase	528254757	33,8 / 35,7	6,6 / 6,8	6	24	1,8	2,0	-	-	-	-
182	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	528243782	37,6 / 35,5	5,3 / 5,1	9	26	-	-	4,0	-	-	-
186	Guanine nucleotide- binding protein subunit beta-2-like 1 protein	528229899	34,1 / 35,4	5,4 / 5,3	6	33	-	-	0,6	-	0,6	-
191	Hypoxanthine phosphoribosyltrans ferase	528237723	23,3 / 36,8	6,7 / 7,7	6	22	-	-	-	-	1,6	-
	Succinyl-CoA synthetase alpha subunit	528257470	30,9 / 36,8	8,6 / 7,7	5	20						
194	GDP-fucose synthase	528251005	29,0 / 37,1	6,2 / 6,7	1	5	-	2,0	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
200	hypothetical	528222379	36,3 / 37,2	6,2 / 5,6	6	23	1,4	1,3	-	-	-	-
202	hypothetical	528212327	35,7 / 37,6	7,8 / 7,4	2	7	6,0	2,5	-	0,4	-	-
		528253559	36,2 / 37,6	7,1 / 7,4	8	24						
	ribokinase	528247338	34,5 / 37,6	7,0 / 7,4	6	23						
	NADPH 2:quinone reductase	528247447	36,7 / 37,6	8,8 / 7,4	6	17						
	NADPH-cytochrome b5 reductase	528253616	34,3 / 37,6	6,9 / 7,4	2	7						
	Succinyl-CoA synthase alpha subunit	528253616	30,9 / 37,6	6,9 / 7,4	2	11						
	GDP-L-fucose synthase	528249821	41,6 / 37,6	6,8 / 7,4	3	8						
	5'-AMP-activated protein kinase, regulatory beta subunit	528247311	34,6 / 37,6	7,2 / 7,4	5	21						
Glucose-6-phosphate 1-epimerase	528257240	35,3 / 37,6	8,1 / 7,4	5	18							

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
209	hypothetical	528246898	36,8 / 38,2	5,9 / 5,7	2	5						
	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor	528246898	36,8 / 38,2	5,9 / 5,8	5	15	1,5	1,4	-	-	-	-
	NADPH2:quinone reductase	528249842	30,4 / 38,2	5,6 / 5,7	2	7						
	Alcohol dehydrogenase	528243459	41,3 / 38,2	6,0 / 5,7	3	7						
210	5'-AMP-activated protein kinase, regulatory beta subunit	528247311	34,6 / 38,1	7,2 / 6,9	4	14						
	hypothetical	528230198	38,1 / 38,1	6,4 / 6,9	3	10	1,8	2,1	1,9	-	-	-
	Protein kinase	528240871	38,4 / 38,1	7,1 / 6,9	3	8						
219	Alcohol dehydrogenase (NADP+) [A. <i>deanei</i> ]	528273440	38,3 / 38,9	6,1 / 6,4	4	9	1,5	2,1	-	-	-	-
225	Alcohol dehydrogenase	528243459	41,4 / 38,9	6,0 / 5,6	8	22	1,7	1,5	-	-	0,4	0,5

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
230	Sterol 24-C- methyltransferase	528222259	40,2 / 40,3	6,5 / 6,5	5	19	-	1,5	-	-	-	-
236	Cystathionine beta- synthase	528244906	38,7 / 40,5	6,1 / 6,1	10	31	1,4	1,4	-	-	-	-
263	Argininosuccinate synthase	528241568	47,8 / 43,1	5,9 / 5,5	6	14	-	1,9	1,8	-	-	-
	Isocitrate dehydrogenase	528241562	45,8 / 43,1	5,5 / 5,5	3	6						
	Protein phosphatase	528248181	41,3 / 43,1	5,6 / 5,5	3	7						
266	Cytosolic tryparedoxin peroxidasem trypanosomatid typical 2-cys peroxiredoxin	528243040	22,1 / 42,5	6,2 / 5,6	8	3	-	1,4	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptideos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
271	Argininosuccinate synthase	528241568	47,8 / 44,0	5,9 / 6,1	6	16						
	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	528237969	44,0 / 44,0	5,9 / 6,1	11	32						
	Cystathionine gamma-synthase	528240456	52,5 / 44,0	6,5 / 6,1	5	14	-	-	-	-	0,8	0,5
	Agmatinase-like protein	528240456	36,7 / 44,0	6,5 / 6,1	8	32						
	hypothetical	528236714	48,0 / 44,0	5,9 / 6,1	2	5						
	Acetylornithine deacetylase	528216874	46,1 / 44,0	6,5 / 6,1	2	5						
275	Translation initiation factor 4A	528238662	45,3 / 43,9	5,6 / 5,5	8	29						
	Elongation factor Tu	528250888	42,9 / 43,9	5,4 / 5,5	2	9	-	2,0	-	-	0,4	0,3
	Protein phosphatase	528248181	41,4 / 43,9	5,84 / 5,53	1	4						
278	Adenosylhomocyste inase	528221685	34,3 / 44,1	6,0 / 6,0	3	12	0,2	-	-	-	4,1	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
282	S-adenosylmethionine synthetase	528244340	43,2 / 44,4	5,8 / 5,6	3	10	-	-	-	-	0,6	-
288	S-adenosylmethionine synthetase	528244340	43,2 / 45,7	5,77 / 6,3	10	30	1,9	2,2	-	-	0,6	0,5
	Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	528242675	47,7 / 45,7	6,0 / 6,3	5	18						
	ATP-dependent RNA helicase UAP56/SUB2	528222789	48,9 / 45,7	6,3 / 6,3	11	28						
291	Protein disulfide-isomerase	528234909	52,0 / 45,6	5,5 / 5,4	8	2	0,6	0,7	-	-	-	-
292	hexokinase	528216037	51,9 / 45,2	8,9 / 7,0	2	8	-	-	-	-	0,4	-
	Citrate synthase	528234944	52,3 / 45,2	7,6 / 7,0	5	15						
315	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 49,7	5,8 / 6,2	2	7	3,9	1,9	1,7	-	-	-
345	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	528243840	56,0 / 55,1	5,1 / 5,2	3	8	2,4	-	-	-	-	-
346	IMP dehydrogenase	528242410	55,4 / 56,0	8,8 / 8,6	8	18	1,9	-	-	-	-	-
350	Hypothetical	528226690	56,6 / 55,9	6,2 / 6,0	2	4	-	-	2,2	-	-	-
351	Glutamine synthetase	528241493	43,0 / 55,z	5,19 / 6,49	5	15	-	1,6	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
356	Pyruvate/indole-pyruvate carboxylase	528227460	60,8 / 55,9	5,8 / 5,7	14	38	1,8	-	-	-	-	-
365	Alcohol dehydrogenase	528243459	41,3 / 54,8	6,0 / 5,8	1	6	1,4	1,5	-	-	-	-
369	T-complex protein 1 subunit gamma	528243248	51,9 / 58,8	5,6 / 5,6	6	13	-	1,6	-	-	-	-
370	T-complex protein 1 subunit eta	528250013	61,8 / 59,8	5,9 / 5,8	5	10	-	-	0,4	-	-	0,4
375	2-3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	528247083	59,8 / 62,0	5,4 / 5,3	4	8	-	0,5	-	-	-	-
380	2,3-phosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	528247083	59,8 / 62,0	5,4 / 5,3	9	26	-	-	-	-	0,6	-
385	Trypanothione reductase	528246207	52,9 / 62,4	6,0 / 6,1	2	4	2,0	2,7	1,8	-	-	-
	UDP glucose 6-dehydrogenase	528238298	54,5 / 62,4	6,3 / 6,1	2	4						
	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 62,4	5,8 / 6,1	3	6						
	Extracellular signal-regulated kinase 1/2	528257312	58,7 / 62,4	6,2 / 6,1	4	7						
	Sucrose-phosphate synthase-like protein	528235651	60,4 / 62,4	6,0 / 6,1	4	10						

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
396	Heat shock 70 KDa protein 1/8	528255509	64,7 / 70,2	5,8 / 5,0	6	13	0,7	-	-	-	-	-
	cAMP-dependent protein kinase regulator	528236423	57,8 / 70,2	4,9 / 5,0	3	7						
414	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	528222811	71,9 / 79,1	5,6 / 5,4	11	20	1,6	-	-	-	0,5	-
	Vesicle-fusing ATPase	528236669	79,0 / 79,1	6,0 / 5,4	9	14						
	Prolyl oligopeptidase	528214331	78,2 / 79,1	5,5 / 5,4	2	3						
	ATP-binding protein cassette	528228962	76,3 / 79,1	6,2 / 5,4	3	4						
	Molecular chaperone DnaK	528242500	71,4 / 79,1	5,8 / 5,4	3	5						
	Methylmalonyl-CoA mutase	528231872	79,5 / 79,1	6,4 / 5,4	8	13						
	AP-1 complex subunit beta-1	528232473	82,8 / 79,1	5,5 / 5,4	4	6						
	Paraflagelar rod protein 1D	528251011	69,1 / 79,1	5,4 / 5,4	8	16						
	hypothetical	528235611	81,8 / 79,1	5,5 / 5,4	29	38						
	528217899	70,5 / 79,1	5,7 / 5,4	3	5							

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
415	Propionyl-CoA alpha chain	528234674	71,2/ 88,6	5,5 / 5,3	2	4	0,4	0,3	0,3	-	-	-
	ATP-dependent Clp protease ATP- binding subunit ClpB	528221679	90,5/ 88,6	6,6 / 5,3	17	19						
	Peptide alpha-N- acetyltransferase	528251229	80,0 / 88,6	6,2 / 5,3	2	3						
	hypothetical	528235611	81,8 / 88,6	5,5 / 5,3	10	15						
	Internalin A	528210945	72,8 / 88,6	5,8 / 5,3	3	4						
	Methylmalonyl-CoA mutase	528231872	79,5 / 88,6	6,4 / 5,3	3	4						
	Vesicle-fusing ATPase	528236669	80,0 / 88,6	6,0 / 5,3	5	8						
	Carnitine/choline acetyltransferase	528239639	66,3 / 88,6	5,9 / 5,3	2	3						
430	Elongation factor 2	528214720	94,2 / 93,7	5,9 / 5,22	32	40	-	-	-	-	-	-
	Trypanothione synthetase/amidase	528244134	82,6 / 93,7	5,3 / 5,2	5	7						
	Cysteine peptidase	528229585	95,7 / 93,7	5,4 / 5,2	7	10						
	26S proteasome regulatory subunit N1	528241267	99,4 / 93,7	4,9 / 5,2	4	5						
	Pyruvate, orthophosphate dikinase	528215750	99,3 / 93,7	6,1 / 5,2	9	11						

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
439	Pyruvate, orthophosphate dikinase	528215750	99,3 / 86,3	6,1 / 6,3	9	15	-	-	-	-	0,6	-
1168	Translation initiation factor 5A	528255345	17,6 / 14,3	4,7 / 7,3	2	18	-	0,4	-	-	-	-
1176	Cytochrome c oxidase subunit 6b	528247919	19,1 / 18,1	6,7 / 7,3	5	30	1,4	-	-	-	-	-
1177	Large subunit ribosomal protein L26e	528229729	20,3 / 18,8	10,9 / 5,0	3	20	1,5	-	-	-	-	-
1189	Succinate fdehydrogenase iron-sulfur subunit	528255565	27,3 / 28,7	8,3 / 5,7	1	8	1,4	4,3	-	-	-	-
1191	Rab family	528242535	26,0 / 29,4	5,5 / 5,6	2	8	-	0,2	-	-	-	-
	Proteasome activator protein PA26	528257502	26,8 / 29,4	6,1 / 5,6	4	15						

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
1197	Hypothetical	528243572	23,3 / 32,6	5,9 / 5,4	11	54	2,4	-	-	-	-	-
	ATP-binding protein involved in chromosome partitioning	528248416	30,6 / 32,6	5,5 / 5,4	4	20						
	Cell cycle checkpoint protein	528244048	32,0 / 32,6	5,5 / 5,4	2	10						
	Branch point binding protein	528226794	30,3 / 32,6	5,5 / 5,4	3	12						
1199	Coatomer epsilon subunit	528222244	43,7 / 33,8	5,2 / 5,3	9	24	-	0,4	-	-	-	-
	Mitochondrial carrier protein	528240337	35,0 / 33,8	6,2 / 5,3	2	6						
	hypothetical	528253673	30,0 / 33,8	5,4 / 5,3	3	13						
	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	528254377	33,6 / 33,8	6,0 / 5,3	6	20						
1202	Coprophorphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 34,5	6,1 / 6,2	10	33	-	1,6	-	-	-	-
	5'-methylthioadenosine phosphorylase	528248536	33,4 / 34,5	6,0 / 6,2	8	31						
1240	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein SNU13	528255694	20,1 /	8,8 / 8,8	2	13	-	2,1	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
1278	Arf/Sar family	528251008	23,3 / 43,0	5,78 / 4,9	5	17	1,9	-	-	-	-	-
1283	hypothetical	528250186	22,1 / 47,2	4,64 / 5,0	5		0,5	-	-	-	-	-
1298	20S proteasome subunit alpha 1 (A. deanei)	528276665	27,2 / 59,2	5,48 / 5,6	1	4	0,5	-	-	-	-	-
81	cytosolic trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	528243040	22,1 / 26,4	6,2 / 6,2	1	6	1,8	-	-	-	-	-
83	hypothetical	528251089	26,6 / 25,8	5,4 / 5,5	1	9						
	2,4-dihydroxyphenyl-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	528256605	24,0 / 25,8	6,1 / 5,5	11	52	-	-	0,6	-	0,5	0,5
91	Guanylate kinase	528250097	26,2 / 26,0	7,1 / 5,6	3	12	1,8	1,7	-	-	-	0,6
97	GTP-binding protein nuclear protein Ran	528254870	24,8 / 28,0	6,4 / 6,2	10	63	-	1,6	-	-	-	0,6
105	20S proteasome subunit alpha	528257396	27,6 / 27,7	6,0 / 5,9	6	35	-	1,4	-	-	0,7	0,6
106	adenine phosphoribosyltransferase	528256866	25,9 / 27,8	6,0 / 5,7	4	17	1,5	1,5	-	-	0,7	0,7

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
109	Phosphomannutase	528256670	28,1 / 28,2	5,4 / 5,4	5	31	1,9	1,9	-	-	-	-
	Translation initiation factor 4E	528250309	21,5 / 28,3	5,4 / 5,4	4	32						
116	short chain dehydrogenase	528248594	24,9 / 28,5	5,9 / 5,7	6	27	1,5	1,5	-	-	-	-
119	cytochrome c oxidase subunit V	528247959	22,1 / 29,2	6,2 / 5,0	4	28	-	2,8	-	-	-	-
121	Cytosolic trypanothione peroxidase, trypanosomatid typical 2-cys peroxiredoxin	528243040	22,1 / 29,3	6,2 / 4,9	1	6	-	0,5	-	-	-	-
123	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	528256605	24,0 / 30,0	6,1 / 6,1	3	19	0,6	0,4	-	-	-	-
	peptidylprolyl isomerase	528248052	23,9 / 30,0	6,2 / 6,1	2	10						
136	Prostaglandin synthase	528214710	31,2 / 30,3	6,1 / 6,3	11	51	-	-	-	-	-	-
138	Lysophospholipase I	528233803	38,2 / 31,4	6,0 / 6,2	6	24	1,5	-	-	-	-	-
161	Coproporphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 34,1	6,1 / 6,2	6	24	1,9	-	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
163	Spermidine synthase	528253706	34,6 / 34,1	5,2 / 6,2	6	22	1,6	-	-	-	0,5	-
170	RNA binding protein	528229068	32,6 / 35,1	6,2 / 6,3	2	11	3,1	-	-	-	-	-
176	Pyridoxine kinase	528226060	33,7 / 35,4	6,0 / 6,1	5	22	2,4	-	-	-	-	-
179	Cytochrome-b5 reductase	528243919	33,6 / 35,9	9,3 / 9,1	2	5	2,0	-	-	-	-	-
	Malate dehydrogenase	528242015	38,0 / 35,9	9,3 / 9,1	1	4						
180	hypothetical	528237994	34,0 / 35,4	6,2 / 6,3	1	3	2,0	-	-	-	-	-
	hypothetical	528248391	33,2 / 35,4	6,8 / 6,3	3	11						
	Hypothetical	528240827	29,9 / 35,4	6,9 / 6,3	5	27						
185	Proteasome activator PA26	528257502	26,8 / 35,9	6,1 / 6,2	4	21	1,5	1,7	-	-	-	-
	RNA-binding protein	528255250	32,7 / 35,9	7,8 / 6,1	1	4						
	V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit E	528240967	24,8 / 37,0	6,47 / 6,1	3	18						
187	hypothetical	528255697	36,0 / 35,8	5,4 / 5,3	1	2	-	2,0	0,6	-	-	-
	Alpha-soluble NSSF attachment protein	528241718	32,3 / 35,8	5,3 / 5,3	2	6						
	Heat shock protein-like protein	528231812	34,9 / 35,8	5,4 / 5,3	3	15						
188	hypothetical	528226630	24,5 / 36,6	7,8 / 6,1	2	11	1,9	-	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
195	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor	528245081	39,9 / 37,1	6,33 / 5,8	3	12	1,9	-	-	-	-	-
216	2,4-dihydroxyphenyl-2-ene-dioic acid aldolase	528256605	24,0 / 39,0	6,1 / 6,5	1	8	2,4	-	-	-	-	-
222	NADPH:quinone reductase	528249842	30,4 / 38,8	5,56 / 5,7	3	11	-	0,7	-	-	-	2,2
224	BirA family transcriptional regulator, biotin operon repressor	528233487	35,5 / 39,6	5,4 / 5,3	3	21	-	0,7	-	-	-	2,2
	NADH:flavin oxidoreductase/NA DH oxidase	528244173	39,1 / 39,6	5,5 / 5,3	9	28						
	cytochrome c oxidase subunit IV	528244086	37,7 / 39,6	5,7 / 5,3	5	22						

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
238	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	528251122	37,6 / 40,0	6,7 / 6,7	2	6	-	2,3	-	-	-	-
	Map kinase	528256590	42,4 / 40,0	6,4 / 6,7	2	9						
	Alcohol dehydrogenase (NADP+)	528253607	37,8 / 40,0	6,5 / 6,7	1	3						
241	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	528226582	36,0 / 40,2	5,7 / 5,7	6	25	1,9	-	-	-	-	-
	Aspartate-amonía ligase	528256350	39,6 / 40,2	5,7 / 5,7	4	17						
269	hypothetical	528240827	29,9 / 43,4	6,9 / 6,3	2	8	-	-	-	-	0,6	-
272	Pyridoxine kinase	528226060	33,7 / 45,6	6,0 / 6,1	3	14	-	1,8	-	-	-	0,7
	NADH:flavin oxidoreductase/NA DH oxidase	528244173	39,1 / 45,6	5,5 / 6,1	5	12						
280	Enoyl-[acyl carrier protein] reductase II	528254757	33,9 / 44,8	6,6 / 6,5	4	13	2,2	-	-	-	-	-
295	Protein disulfide-isomerase	528234909	52,0 / 51,5	5,5 / 5,3	6	24	-	0,6	-	-	-	-
348	Elongation factor 1-alpha	528248216	49,0 / 57,4	9,0 / 5,8	4	10	4,4	-	-	-	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Número de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão <sup>e</sup>					
							56h/24h	80h/24h	92h/24h	80h/56h	92h/56h	92h/80h
354	Pyruvate kinase	528224213	54,0 / 56,5	6,5 / 6,3	1	3						
	Succinate- semialdehyde dehydrogenase (NADP+)	528253926	53,7 / 56,5	6,4 / 6,3	5	11	1,9	-	-	-	-	-
378	T-complex protein 1 subunit epsilon	528230274	58,9 / 62,0	5,2 / 5,2	3	10	0,6	0,5	0,6	-	-	-
405	Amidohydrolase	528232668	44,3 / 67,8	5,6 / 6,4	6	19						
	Transketolase	528215291	45,4 / 67,8	6,2 / 6,4	3	8	1,6	-	-	-	-	-
409	transketolase	528215291	45,4 / 72,0	6,2 / 6,2	4	14	1,5	1,7	-	-	-	0,6
426	Enolase	528235542	46,4 / 89,8	5,7 / 5,7	1	3						
	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 89,8	5,8 / 5,7	5	14	-	2,5	-	-	-	-
427	Glycyl tRNA synthetase	528222199	70,4 / 80,4	5,8 / 5,9	1	3	7,3	-	-	-	-	-
432	Cysteine peptidase	528243116	87,0 / 95,9	4,9 / 4,8	7	17	0,6	-	-	-	-	-
1231	hypothetical	528248588	11,5 / 46,7	6,3 / 7,1	1	12	-	2,0	-	-	-	-
1235	Heat shock protein 67Bb	528253983	13,3 / 53,2	5,6 / 7,1	2	23	-	2,5	-	-	-	-
1277	PUA domain protein	528241985	21,5 / 41,4	5,8 / 3,9	1	8	0,3	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> *gene identifier*, <sup>b</sup> valor de massa molecular excluindo o peptídeo sinal, <sup>c</sup> número de peptídeos identificados por espectrometria de massas, <sup>d</sup> porcentagem de cobertura de sequência obtida e <sup>e</sup> razão das abundâncias. As identificações proteicas, quando não indicadas, foram realizadas em *Strigomonas culicis*.

Linhas preenchidas em cinza indicam as identificações utilizadas para a descrição de processos.

**Tabela 2. Identificação de spots diferencialmente abundantes (DifEstat) por espectrometria de massas após comparação dos perfis 2DE intracepa WT de *S. culicis*.**

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertur a (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
315	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 49,7	5,8 / 6,2	2	7	-	1,7	-
439	Pyruvate, orthophosphate dikinase	528215750	99,3 / 86,3	6,1 / 6,3	9	15	-	1,6	-
350	Hypothetical	528226690	56,6 / 55,9	6,2 / 6,0	2	4	-	2,1	-
288	S-adenosylmethionine synthetase	528244340	43,2 / 45,7	5,8 / 6,3	10	30	-	1,5	-
	ATP-dependent RNA helicase UAP56/SUB2	528222789	48,9 / 45,7	6,3 / 6,3	11	28			
	Glutamate-5- semialdehyde dehydrogenase	528242675	47,7 / 45,7	6,0 / 6,3	5	18			
280	Enoyl-[acyl carrier protein] reductase II	528254757	33,9 / 44,8	6,6 / 6,5	4	13	-	1,7	-
272	Pyridoxine kinase	528226060	33,7 / 45,6	6,0 / 6,1	3	14	-	1,6	-
	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	528244173	39,1 / 45,6	5,5 / 6,1	5	12			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
261	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	528215369	34,5 / 43,2	5,8 / 5,8	2	16	0,7	-	-
	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	528223955	32,3 / 43,2	6,6 / 5,8	3	26			
	Coproporphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 43,2	6,1 / 5,8	1	4			
	Malate dehydrogenase	528242015	33,1 / 43,1	9,3 / 5,8	1	3			
356	Pyruvate/indole- pyruvate carboxylase	528227460	60,8 / 56,0	5,8 / 5,7	14	38	-	2,4	-
7	Hypothetical	528212705	10,9 / 13,7	6,3 / 6,0	2	13	-	1,9	-
29	Nucleoside- diphosphate kinase	528257238	16,5 / 17,2	6,8 / 6,8	9		-	1,5	-
49	Bis(5'-nucleosidyl)- tetraphosphatase	528242570	15,4 / 21,1	6,2 / 6,6	2	22	1,9	3,0	-
71	cytochrome c oxidase subunit V	528247959	22,1 / 23,9	6,2 / 5,8	5	38	-	1,4	-
52	Peptidylprolyl isomerase	528226786	21,1 / 22,9	9,3 / 8,9	5	30	-	2,7	-
66	nitroreductase	528247350	31,3 / 23,9	9,0 / 6,4	5	27	2,1	2,0	-
	endoribonuclease L- PSP	528256530	11,4 / 23,9	5,2 / 6,4	1	7			
73	MAR1 ribonuclease	528244268	21,2 / 24,5	7,7 / 7,7	2	11	1,8	1,6	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptideos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
76	Superoxide dismutase, Fe-Mn family	528238522	25,5 / 24,6	8,2 / 6,9	7	31	1,5	2,1	-
78	Mitochondrial tryparedoxin peroxidase, trypanosomatid typical 2-cys peroxiredoxin	528224473	17,0 / 25,1	5,0 / 5,2	6	51	-	1,8	1,5
90	20S proteasome subunit alpha	528247276	25,2 / 26,2	5,4 / 5,3	1	6	-	1,6	-
108	TNF receptor- associated protein 1	528251364	84,1 / 28,1	6,4 / 5,2	6	11	-	1,6	-
109	Phosphomannutase	528256670	28,1 / 28,7	5,4 / 5,4	5	31	0,5	-	2,0
	Translation initiation factor 4E	528250309	21,5 / 28,7	5,4 / 5,4	4	32			
145	propionyl-CoA carboxylase alpha chain	528213738	45,5 / 33,0	5,4 / 7,2	5	13	4,1	-	-
161	Coproporphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 34,2	6,1 / 6,2	6	21	2,0	2,0	-
168	Malate dehydrogenase	528242015	33,6 / 34,6	9,3 / 9,4	2	8	3,0	4,9	-
175	hypothetical	528248884	28,0 / 35,7	5,8 / 7,4	2	8	-	-	0,3
	phosphomannomutase	528256670	28,1 / 35,7	5,4 / 7,4	1	6			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
176	Pyridoxine kinase	528226060	33,7 / 36,3	6,0 / 6,0	5	22	-	1,7	-
178	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	528249758	33,9 / 36,0	6,0 / 6,0	6	25	1,8	-	1,1
179	Malate dehydrogenase	528242015	33,6 / 35,9	9,3 / 9,1	1	4	2,3	1,9	-
	Cytochrome-b5 reductase	528243919	38,0 / 35,9	8,5 / 9,1	2	5			
195	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit, mitochondrial precursor	528245081	39,9 / 37,1	6,3 / 5,8	3	12	1,7	1,7	-
216	2,4-dihydroxyphept-2-ene-dioic acid aldolase	528256605	24,0 / 39,0	6,1 / 6,5	1	8	2,1	-	-
222	alcohol dehydrogenase	528243459	41,3 / 39,6	6,0 / 5,7	3	8	3,0	3,3	-
223	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	528244173	39,1 / 39,8	5,5 / 5,4	4		0,4	0,7	1,5
	cytochrome c oxidase subunit IV	528244086	37,7 / 39,8	5,7 / 5,4	5	22			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
224	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	528244173	39,1 / 39,6	5,5 / 5,3	9	28	0,5	0,5	-
	cytochrome c oxidase subunit IV	528244086	37,7 / 39,6	5,7 / 5,3	5	22			
	BirA family transcriptional regulator, biotin operon repressor	528233487	35,5 / 39,6	5,4 / 5,3	3	21			
241	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	528226582	36,0 / 40,0	5,7 / 5,7	6	25	0,7	2,0	3,0
	Aspartate-amonía ligase	528256350	39,6 / 40,2	5,7 / 5,7	1	3			
256	hypothetical	528234437	30,4 / 43,2	4,6 / 5,3	2	8	2,6	2,7	-
	Coproporphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 43,2	6,1 / 5,3	2	8			
301	Pirin domain- containing protein	528208613	47,7 / 49,1	6,0 / 6,0	3	9	1,7	2,1	-
	Aspartate carbamoyltransferase	528236899	35,2 / 49,1	6,1 / 6,0	2	10			
318	Tubulin beta	528243748	49,9 / 50,5	4,7 / 4,9	8	16	0,01	-	151,6

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
327	Aromatic-L-aminon-decarboxylase	528246060	55,7 / 55,7	5,6 / 5,5	1	2	-	0,3	-
338	Cystathionine beta-synthase	528244906	38,7 / 55,4	6,0 / 8,0	1	3	-	3,7	-
343	Dihydrolipoamide dehydrogenase	528251463	51,3 / 54,5	6,8 / 6,7	1	2	0,5	0,3	-
380	2,3-phosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	528247083	59,8 / 62,0	5,4 / 5,3	9	26	-	-	1,8
599	Cystathionine beta-synthase	528244906	38,7 / 41,1	6,0 / 7,0	7	16	-	1,5	-
	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	528254677	42,4 / 41,1	6,1 / 7,0	2	7			
	Hustidinol-phosphate aminotransferase (Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii)	438000077	42,2 / 41,1	6,1 / 7,0	5	13			
	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	438000013	39,6 / 41,1	6,0 / 7,0	6	18			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptideos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	528226582	36,0 / 41,1	5,7 / 7,0	2	6			
	Aspartate-ammonia ligase	528256350	39,6 / 41,1	5,7 / 7,0	3	11			
618	Argininosuccinate synthase	528241568	47,8 / 44,2	5,9 / 5,1	9	26	-	0,6	-
	Aspartate kinase (Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii)	437999857	44,5 / 44,2	5,5 / 5,1	6	16			
	Phosphoribosylpyrophosphate	528236312	38,6 / 44,2	5,5 / 5,1	2	5			
	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	528222109	42,1 / 44,2	5,5 / 5,1	5	12			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
622	5- (carboxyamino)imidazo le ribonucleotide synthase	437999827	43,5 / 44,0	5,8 / 6,0	2	5	2,6	2,0	-
	Aspartate kinase (Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii)	437999857	44,5 / 44,2	5,5 / 5,1	3	9			
	Argininosuccinate synthase	528241568	47,8 / 44,0	5,9 / 6,0	6	16			
	Histidyl-tRNA synthetase (Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii)	438000042	50,1 / 44,0	6,0 / 6,0	2	5			
	Adenylosuccinate synthetase (Candidatus Kinetoplastibacterium blastocrithidii)	438000034	46,8 / 44,0	6,0 / 6,0	8	23			
	Diphosphomevalonate decarboxylase	528255521	42,3 / 44,0	5,8 / 6,0	7	19			
471	nitroreductase	528247350	31,3 / 18,0	9,0 / 6,6	5	20	1,9	1,6	-
483	hypothetical	528243572	23,3 / 21,0	5,9 / 5,5	6	36	-	0,4	-
511	Branched-chain amino acid aminotransferase	528232983	45,2 / 26,6	6,3 / 5,4	6	19	1,6	2,1	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
	Fructose-bisphosphate aldolase	528252563	49,3 / 26,6	9,1 / 5,4	3	9			
	ATP-dependent RNA_helicase UAP56/SUB2	528222789	48,9 / 26,6	6,3 / 5,4	1	5			
573	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 36,4	5,8 / 5,2	1	4	0,2	-	3,9
	Dihydrolipoamide dehydrogenase	528251463	51,3 / 36,4	6,8 / 5,2	9	21			
	hypothetical	528243953	53,7 / 36,4	6,4 / 5,2	2	8			
597	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	528254982	33,3 / 39,7	6,5 / 6,2	3	18	-	2,3	-
	Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit	528254377	33,6 / 39,7	6,0 / 6,2	4	16			
620	DNA repair protein RAD51	528253529	39,6 / 43,7	5,9 / 5,7	2	9	0,6	-	1,0
236	Cystathionine beta-synthase	528244906	38,7 / 41,2	6,0 / 6,0	10	31	-	-	1,6
386	Aspartyl-tRNA synthetase	528248966	62,8 / 66,2	5,7 / 5,7	8	16	-	1,6	-
177	Enoyl-[acyl-carrier protein] reductase	528254757	33,9 / 36,1	6,6 / 6,6	6	24	1,6	-	0,6
78	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkIB	528256990	16,7442 / 24,6111	6,3 / 5,2	2	18	-	1,8	1,5

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
194	GDP-fucose synthase	528251005	29,0 / 37,1	6,2 / 6,7	1	5	-	1,8	2,1
370	T-complex protein 1 subunit eta	528250013	61,8 / 59,8	5,9 / 5,8	5	10	-	-	0,5
577	Acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	528255146	57,7 / 36,3	5,6 / 5,4	7	17	-	-	1,8
91	Guanylate kinase	528250097	26,2 / 27,0	7,1 / 5,6	3	12	-	1,5	-
56	4-methyl-5(b- hidroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis	528250376	21,0 / 23,0	6,1 / 6,0	3	26	-	1,5	-
41	Calpain-like cysteine peptidase	528250231	19,3281 / 19,576	6,9 / 6,2	3	17	-	0,7	-
128	Uracil phosphoribosyltransfer ase	528247531	27,1 / 30,3	6,4 / 4,9	3	14	-	1,7	-
284	adenosylhomocysteina se	528221685	34,3 / 45,9	6,0 / 4,6	1	4	-	2,0	-
	Tyrosine aminotrasferase	528253965	52,6 / 45,9	7,6 / 4,6	6	22			
165	Glyoxalase II	528226870	35,7 / 35,1	6,1 / 6,0	4	12	-	1,5	-
125	F-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit alpha	528246523	56,6 / 29,5	9,0 / 5,8	2	6	-	1,5	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
185	Proteasome activator PA26	528257502	26,8 / 37,0	6,1 / 6,1	4	21	-	1,5	-
	RNA-binding protein	528255250	32,7 / 37,0	7,8 / 6,1	1	4			
	V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit E	528240967	24,8 / 37,0	6,5 / 6,1	3	18			
67	F-Type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit alpha	528246523	56,6 / 24,4	9,0 / 7,2	2	6	1,8	-	-
	Nitroreductase	528247350	31,4 / 24,4	9,0 / 7,2	1	4			
200	hypothetical	528222379	36,3 / 38,4	6,2 / 5,7	6	23	-	1,4	-
524	Elongation factor 1- alpha	528248216	49,0 / 28,8	9,0 / 7,6	3	6	-	-	0,4
2	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 55,4	4,9 / 5,3	3	8	-	0,4	-
169	Phosphatidylinositol-4- phosphate 5-kinase	528215673	36,4 / 35,3	6,0 / 5,9	5	23	-	1,5	-
210	5'-AMP-activated protein kinase, regulatory beta subunit	528247311	34,6 / 38,1	7,2 / 6,9	4		1,7	2,0	-
	hypothetical	528230198	38,1 / 38,0	6,4 / 6,9	3				
	Protein kinase	528240871	38,4 / 38,1	7,1 / 6,9	3				

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão (SELVAGEM) <sup>e</sup>		
							56h/24h	80h/24 h	80h/56h
1336	Glycosomal glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase	528255110	39,1 / 45,4	9,0 / 5,2	2	10	3,3	-	-
	hypothetical	528254885	41,9 / 45,4	8,3 / 5,2	2	5			

<sup>a</sup> gene identifier, <sup>b</sup> valor de massa molecular excluindo o peptídeo sinal, <sup>c</sup> número de peptídeos identificados por espectrometria de massas, <sup>d</sup> porcentagem de cobertura de sequência obtida e <sup>e</sup> razão das abundâncias. As identificações proteicas, quando não indicadas, fora realizadas em *Strigomonas culicis*. Linhas preenchidas em cinza indicam as identificações utilizadas para a descrição de processos.

**Tabela 3. Identificação de spots diferencialmente abundantes (DifEstat) por espectrometria de massas após comparação dos perfis 2DE intercepa Apo e WT de *S. culicis*.**

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
0	Putative RNA-binding protein	528255242	26,5 / 40,6	6,3 / 6,2	2	9	-	-	0,7
	Homoserine kinase	528248856	37,0 / 40,6	6,2 / 6,2	3	12			
2	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 55,4	4,9/ 5,3	3	8			0,5
4	kinetoplastid membrane protein KMP-11	528256906	11,1/ 12,1	6,0 / 5,6	2	15	0,6		0,6
7	Hypothetical	528212705	10,9 / 13,7	6,3 / 6,0	2	13		1,7	0,6

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
8	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	528234674	71,2 / 88,6	5,5 / 5,3	6	11		0,5	0,5
	Heat shock protein 70 kDa protein 1/8	528245216	80,6 / 88,6	6,3 / 5,3	10	17			
	Large subunit ribossomal protein L30e	528250364	11,3 / 13,9	9,6 / 6,3	2	25			
9	hypothetical	528257386	12,9 / 15,5	8,9 / 8,8	1	18	0,4	0,6	0,4
18	Cofilin	528227814	15,6 / 15,8	5,7 / 5,4	4	32	0,5		0,5
22	Tryparedoxin	528254309	17,3 / 16,6	5,7 / 5,5	7	29	3,2	3,5	3,1
	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11	528250380	15,5 / 16,6	5,6 / 5,5	2				
	cytosolic tryparedoxin peroxidase, trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	528204906	22,1 / 16,6	6,2 / 5,5	4	15	0,3		0,7
35	small myristoylated protein-2	528257638	18,1 / 18,8	5,2 / 5,2	2	12	0,5		0,6

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
39	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (cyclophilin A)	528234435	18,8 / 19,8	8,98 / 8,7	11	62	0,4		
	Protein-tyrosine phosphatase	528242640	22,9 / 19,8	8,48 / 8,7	2	10			
	Peptidylprolyl isomerase	528217318	11,2 / 19,8	7,78 / 8,7	8	63			
40	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (cyclophilin A)	528234435	18,8 / 20,3	8,98/9,13	9	55	0,5		0,6
41	Calpain-like cysteine peptidase	528250231	19,4 / 19,6	6,86 / 6,25	3	17	0,3	0,5	0,5
42	hypothetical	528207900	15,1 / 19,7	8,8 / 9,3	1	8		0,5	0,2
44	hypothetical	528207120	18,6 / 20,3	6,3 / 6,3	5	25	0,5	0,4	0,3
46	cofilin	528227814	15,6 / 20,7	5,7 / 5,2	4	40		1,4	0,6
49	Bis(5'-nucleosidyl)-tetraphosphatase	528242570	15,4 / 21,1	6,2 / 6,6	2	22		1,5	0,6
52	Peptidylprolyl isomerase	528226786	21,1 / 23,0	9,3 / 9,1	5	30			0,4
54	Small myristoylated protein-1	528256585	15,0 / 22,6	5,9 / 5,4	2	18			0,6
56	4-methyl-5(b-hidroxyentyl)-thiazole monophosphate biosynthesis	528250376	21,0 / 22,9	6,1 / 6,0	3	26	0,6	0,4	0,4
58	Cytosolic trypanredoxin peroxidase	528257400	22,1 / 23,2	8,2 / 8,0	3	17	1,6	0,6	1,6

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
59	hypothetical	528251023	21,9 / 21,9	5,2 / 5,2	10	51			
	hypothetical	528251023	16,6 / 21,9	5,2 / 5,2	2	12			1,3
66	endoribonuclease L-PSP	528256530	11,4 / 23,9	5,2 / 6,4	1	7	1,8		
67	Nitroreductase	528247350	31,3 / 24,4	9,0 / 7,2	1	4	2,0		0,6
	F-Type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit alpha	528246523	56,6 / 24,4	9,0 / 7,2	2	6			
70	mitochondrial trypanoxidase, trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	528224473	17,0 / 24,7	5,02 / 5,1	1	9	2,1		
71	cytochrome c oxidase subunit V	528247959	22,1 / 23,9	6,2 / 5,8	5	38	0,5		
73	MAR1 ribonuclease	528244268	21,2 / 24,5	7,7 / 7,7	2	11	1,7		
78	Mitochondrial trypanoxidase, trypanosomatid typical 2-cys peroxiredoxin	528224473	17,0 / 25,1	5,0 / 5,2	6	51	1,6		
79	GMP-PDE delta subunit family protein	528255445	31,6 / 25,9	9,6 / 5,4	4	12			0,6

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
80	Cytosolic trypanredoxin peroxidase trypanosomatid typical 2-cys peroxiredoxin	528243040	22,1 / 25,5	6,2 / 6,0	8		1,5	0,7	
81	cytosolic trypanredoxin peroxidase, trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	528243040	22,1 / 26,4	6,2 / 6,2	1	6	0,4		0,4
83	2,4-dihydroxyphospho-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	528256605	24,0 / 25,8	6,1 / 5,5	11	52	0,7		
84	Cytosolic trypanredoxin peroxidase	528204906	22,1 / 26,7	6,2 / 5,4	2	12			0,5
	hipotética	528255293	22,6 / 26,7	6,2 / 5,4	3	18			
86	hypothetical	528255293	22,6 / 26,1	6,2 / 5,7			1,5	0,4	
90	20S proteasome subunit alpha	528247276	25,2 / 26,2	5,4 / 5,3	1	6	5,1		
108	hypothetical	528251023	21,9 / 28,9	5,2 / 6,1	5	21	-	-	0,6
	Hypothetical	528248391	33,2 / 29,0	6,8 / 6,1	9	37			
109	Translation initiation factor 4E	528250309	21,5 / 28,7	5,4 / 5,4	4	32	0,4	1,6	0,6
	phosphomannutase	528256670	28,1 / 28,7	5,4 / 5,4	5	31			
111	Pyrroline-5-carboxylate reductase	528257486	28,5 / 29,0	7,4 / 7,1	3	11	-	-	1,6

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
112	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	528237742	29,8 / 29,5	4,9 / 5,0	5	24	0,4	-	-
116	short chain dehydrogenase	528248594	24,9 / 29,3	5,9 / 5,7	7	30	0,5	-	-
123	peptidylprolyl isomerase	528248052	23,9 / 30,0	6,2 / 6,1	2	10	3,6	-	-
	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	528256605	30,0 / 30,0	6,1 / 6,1	3	19			
133	Hypothetical	528220283	30,7 / 31,0	6,7 / 6,8	4	20	0,3	-	1,6
134	Hypothetical	528227942	29,4 / 30,6	8,3 / 7,6	1	7	1,9	1,6	-
	Hypothetical	528228904	29,0 / 30,6	9,1 / 7,6	2	12			
135	Prostaglandin f synthase	528245046	31,0 / 30,3	5,8 / 5,9	5	21	-	0,7	-
138	Lysophosphogolipase I	528233803	38,2 / 31,8	6,0 / 6,1	6	24	0,6	-	-
145	propionyl-CoA carboxylase alpha chain	528213738	45,5 / 32,9	5,4 / 7,2	5	13	0,5	0,3	-
146	20S proteasome subunit alpha	528257111	29,8 / 32,2	5,3 / 5,2	2	16	0,4	-	-
		528242202	32,0 / 32,2	5,4 / 5,2	2				
150	Small subunit protein S4e	528249050	30,6 / 32,3	10,5 / 5,5	3	13	0,3	-	-
	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	528243782	37,6 / 32,3	5,3 / 5,5	3	7			
	Arf/Sar family	528247840	38,7 / 32,3	6,6 / 5,5	5	14			
	Small subunit ribosomal protein SAe	528257460	27,3 / 32,3	7,6 / 5,5	3	13			
155	Tubulin-specific chaperone	528255477	26,1 / 33,9	4,9 / 4,9	4	18	-	-	0,5
156	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	528254377	33,6 / 33,1	6,03 / 5,3	6	23	1,6	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
161	Coproporphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 34,1	6,1 / 6,2	6	24	0,6	0,6	0,5
162	Nitrilase	528247400	21,9 /	5,3 /	3	17	0,5	-	-
163	spermidine synthase	528253706	34,6 / 34,1	5,2 / 6,2	6	25	1,6	-	0,4
164	Nascente polypeptide-associated complex subunit alpha	528248726	18,3 / 34,3	4,6 / 7,6	4	37	0,3	-	0,5
167	cytochrome-b5 reductase	528243919	38,0 / 35,4	8,5 / 8,4	4	13	2,1	-	-
168	Malate dehydrogenase	528242015	33,6 / 35,3	9,3 / 9,2	2	8	0,4	-	-
170	RNA binding protein	528229068	32,6 / 35,1	6,2 / 6,3	2	11	0,4	0,6	-
175	Hypothetical	528248884	28,0 / 35,7	5,78 / 7,4	2	8	-	0,2	0,6
	phosphomannomutase	528256670	28,1 / 35,7	5,4 / 7,4	1	6			
178	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	528249758	33,9 / 36,0	6,0 / 6,0	6	25	-	-	1,6
182	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	528243782	37,6 / 35,5	5,3 / 5,1	9	26	0,1	-	-
186	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 protein	528229899	34,1 / 35,4	5,4 / 5,3	6	33	-	-	0,5
187	hypothetical	528255697	36,0 / 35,8	5,38 / 5,28	1	2	-	-	0,6
	Alpha-soluble NSSF attachment protein	528241718	32,3 / 35,8	5,29 / 5,28	2	6			
	Heat shock protein-like protein	528231812	34,9 / 35,8	5,4 / 5,3	3	15			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
205	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	528257240	35,4 / 37,2	8,3 / 5,0	4	14	0,6	-	-
	hypothetical	528253559	36,2 / 37,2	7,1 / 5,0	2	7			
	Glutathione-S-transferase/glutaredoxin	528257510	35,2 / 37,2	9,2 / 5,0	4	12			
	Molecular chaperone DnaK	528242500	71,4 / 37,2	5,8 / 5,0	8	14			
	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 37,2	4,9 / 5,0	4	10			
	transaldolase	528248521	36,9 / 37,2	5,2 / 5,0	4	14			
	Sam11 subunit ribosomal protein S3Ae	528256966	31,1 / 37,2	10,1 / 5,0	5	21			
	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	528243782	37,6 / 37,2	5,3 / 5,0	7	23			
	Large subunit ribosomal protein LPO	528222286	34,7 / 37,2	4,9 / 5,0	12	27			
	Heat shock protein 70 kDa 1/8	528245216	80,6 / 37,2	6,3 / 5,0	8	14			
	Elongation factor 1-beta	528228892	22,6 / 37,2	4,8 / 5,0	2	10			
	hypothetical	528243974	36,6 / 37,2	5,8 / 5,0	3	10			
211	hypothetical	528256690	41,8 / 38,2	5,1 / 5,1	3	11	0,5	-	-
		528255871	35,9 / 38,2	9,0 / 5,1	3	11			
		528237484	30,7 / 38,2	5,3 / 5,1	2	11			
		528252457	38,7 / 38,2	9,2 / 5,1	3	7			
	transaldolase	528248521	36,9 / 38,2	5,2 / 5,1	5	18			
	Adenosine kinase	528247391	36,6 / 38,2	5,2 / 5,1	11	34			
	Small subunit ribosomal protein S3Ae	528256966	31,1 / 38,2	10,1 / 5,1	3	13			
	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	528243782	37,6 / 38,2	5,3 / 5,1	3	11			
	large subunit ribosomal protein LPO	528222286	34,7 / 38,2	4,9 / 5,1	6	15			
	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase NAD+, glycosomal/mitochondrial	528250327	45,3 / 38,2	9,5 / 5,1	3	10			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	Translation initiation fator 3 subunit G	528239468	30,9 / 38,2	5,1 / 5,1	6	25			
214	Eléctron transfer flavoprotein alpha subunit	528255916	33,3 / 39,5	6,6 / 5,9	3	11	1,4	-	-
	Homoserine kinase	528248856	37,0 / 39,5	6,2 / 5,9	2	7			
216	2,4-dihydroxyphept-2-ene-dioic acid aldolase	528256605	24,0 / 39,0	6,1 / 6,5	1	8	-	1,5	-
217	Thioredoxin domain-containing protein	528251161	27,9 / 40,0	5,5 / 7,9	2	10	-	-	0,2
219	Alcohol dehydrogenase (NADP+) [ <i>A. deanei</i> ]	528273440	38,3 / 39,0	6,1 / 6,4	4	19	-	2,1	1,8
220	Lysophospholipase	528233803	38,2 / 31,8	6,0 / 6,1	2	6	0,5	-	0,5
221	hypothetical	528229769	33,2 / 4,1	5,4 / 5,5	1	3	0,3	-	-
222	alcohol dehydrogenase	528243459	41,3 / 39,6	6,0 / 5,7	3	8	-	0,3	0,3
223	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	528244173	39,1 / 39,8	5,5 / 5,4	4	18	0,2	-	-
	cytochrome c oxidase subunit IV	528244086	37,7 / 39,8	5,7 / 5,4	5	22			
225	Alcohol dehydrogenase	528243459	41,3 / 38,9	6,0 / 5,6	8	22	0,5	0,6	0,1
227	Alcohol dehydrogenase	528243459	41,3 / 40,0	6,0 / 5,6	1	6	-	1,6	-
	Geranyl diphosphate syntase	528227250	39,3 / 40,0	5,9 / 5,6	8	28			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
<b>230</b>	Sterol 24-C-methyltransferase	528222259	40,2 / 40,3	6,5 / 6,5	5	19	-	1,4	-
<b>233</b>	Mitochondrial processing peptidase	528235741	49,7 / 42,6	6,1 / 5,5	2	5	2,2	-	-
	Malonate-semialdehyde dehydrogenase	528204980	54,9 / 42,6	6,5 / 5,5	3	4			
	Extracelular signal-regulated kinase 1/2	528257312	58,7 / 42,6	6,2 / 5,5	2	3			
	Lipoate-protein ligase	528229142	51,4 / 42,6	6,2 / 5,5	4	10			
	Alanine transaminase	528227731	54,2 / 42,6	6,1 / 5,5	12	24			
	Enolase	528235542	46,4 / 42,6	5,7 / 5,5	7	18			
	Axoneme central apparatus protein	528227485	55,4 / 42,6	5,9 / 5,5	6	14			
<b>234</b>	Mitochondrial processing peptidase	528235741	49,7 / 41,6	6,1 / 6,1	2	5	0,2	-	0,3
	Malonate-semialdehyde dehydrogenase (acetylating)	528204980	54,9 / 41,6	6,5 / 6,1	3	4			
	Extracellular signal-regulated kinase 1/2	528257312	58,7 / 41,6	6,2 / 6,1	2	3			
	Lipoate-protein ligase	528229142	51,4 / 41,6	6,2 / 6,1	4	10			
	Alanine transaminase	528227731	54,2 / 41,6	6,1 / 6,1	12	24			
	enolase	528235542	46,4 / 41,6	5,7 / 6,1	7	18			
	Axoneme central apparatus protein	528227485	55,4 / 41,6	5,9 / 6,1	6	14			
	hypothetical	528229615	45,5 / 41,6	5,6 / 6,1	2	6			
<b>238</b>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	528251122	37,6 / 41,0	6,7 / 6,4	2	6	0,3	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	Alcohol dehydrogenase (NADP+)	528253607	37,8 / 41,0	6,5 / 6,4	1	3			
241	Aspartate-amonia ligase	528256350	39,6 / 40,2	5,7 / 5,7	4	17	0,2	0,,7	-
	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	528226582	36,0 / 40,2	5,7 / 5,7	6	25			
244	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	528226582	36,0 / 41,7	5,7 / 5,7	5	22	2,3	2,5	-
	Hypothetical	528256098	35,5 / 41,7	5,9 / 5,7	4	16			
	Aspartate-ammonia ligase	528256350	39,6 / 41,7	5,7 / 5,7	14	57			
245	Fructose-1,6-bisphosphatase I	528250841	38,9 / 43,0	8,8 / 8,7	9	32	3,4	-	0,4
	Developmentally regulated GTP-binding protein	528243907	41,1 / 43,0	8,8 / 8,7	8	23			
	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	528232947	43,6 / 43,0	8,5 / 8,7	2	6			
	Elongation factor 1-alpha	528248216	49,0 / 43,0	9,0 / 8,7	2	8			
	Fructose-bisphosphate aldolase, class I	528220452	41,0 / 43,0	8,8 / 8,7	23	46			
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	528255110	39,1 / 43,0	9,3 / 8,7	2	5			
248	Glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	528255110	39,1 / 41,6	9,3 / 9,2	3	12	-	-	0,2
256	hypothetical	528234437	30,4 / 43,2	4,6 / 5,3	2	8	2,6	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	Coproporphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 43,2	6,1 / 5,3	2	8			
261	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	528215369	34,5 / 43,2	34,5 / 43,2	2	16	0,4	-	-
	Fructose-bisphosphate aldolase	528252563	49,3 / 43,2	9,0 / 5,8	1	3			
	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	528223955	32,3 / 43,2	6,6 / 5,8	3	26			
	Coproporphyrinogen III oxidase	528249860	34,8 / 43,2	6,1 / 5,8	1	4			
	Malate dehydrogenase	528242015	33,6 / 43,2	9,3 / 5,8	1	3			
262	Fructose-bisphosphate aldolase	528252563	49,3 / 42,9	9,0 / 6,5	2	7	-	-	0,5
	Hypothetical	528247003	45,9 / 42,9	6,5 / 6,5	6	18			
266	Argininosuccinate synthase	528247003	47,8 / 43,9	6,5 / 5,6	11	32	-	0,8	0,8
272	Pyridoxine kinase	528226060	33,7 / 45,6	6,0 / 6,1	3	14	2,4	-	2,6
	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	528244173	39,1 / 45,6	5,5 / 6,1	5	12			
279	Succinyl-CoA synthetase beta subunit	528253974	44,8 / 46,2	5,8 / 5,3	2	5	1,9	-	-
282	S-adenosylmethionine synthetase	528244340	43,2 / 44,4	5,8 / 5,6	3	10	-	2,2	1,7
288	Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	528242675	47,7 / 47,0	6,0 / 6,2	5	18	1,4	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	S-adenosylmethionine synthetase	528244340	43,2 / 47,0	5,8 / 6,2	10	30			
	ATP-dependent RNA helicase UAP56/SUB2	528222789	48,9 / 47,0	6,3 / 6,2	11	28			
<b>290</b>	Amidohidrolase	528232668	44,3 / 47,6	5,6 / 5,5	2	7	-	0,6	-
<b>295</b>	Protein disulfide-isomerase	528234909	52,0 / 51,5	5,5 / 5,4	6		2,1	-	-
<b>296</b>	hypothetical	528222018	50,3 / 49,0	7,2 / 6,5	2	5	-	-	1,4
	Glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase	528235746	47,7 / 49,0	6,0 / 6,5	11	27			
	Citrate synthase	528234944	52,3 / 49,0	7,6 / 6,5	2	4			
	Glutamate dehydrogenase (NADP+)	528257055	48,9 / 49,0	7,0 / 6,5	12	31			
		528233868	48,8 / 49,0	6,6 / 6,5	11	31			
	Rab-GDP dissociation inhibitor	528257564	40,3 / 49,0	6,9 / 6,5	5	16			
	ATP-dependent RNA helicase	528222789	48,9 / 49,0	6,3 / 6,5	8	20			
	Mitochondrial processing peptidase	528234174	50,4 / 49,0	7,8 / 6,5	6	13			
	Tyrosine aminotransferase	528246225	40,8 / 49,0	6,2 / 6,5	5	17			
<b>299</b>	Hypothetical	528243974	36,6 / 49,7	5,8 / 7,5	7	23	-	-	0,4
<b>301</b>	Pirin domain-containing protein	528208613	47,7 / 49,1	6,0 / 6,0	2	7	-	1,4	0,6
	Aspartate carbamoyltransferase	528236899	35,2 / 49,1	6,1 / 6,0	3	9			
<b>308</b>	Enolase	528235542	46,4 / 52,4	5,7 / 5,5	8	28	1,9	2,1	-
<b>312</b>	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 51,2	5,8 / 5,7	7	20	-	-	2,4
<b>315</b>	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 49,7	5,8 / 6,2	2	7	-	2,1	1,7

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
317	Enolase	528235542	46,4 / 52,0	5,7 / 5,7	8	28	1,6	-	1,5
323	Chaperonin GroEL	528233838	59,2 / 52,8	5,7 / 5,2	2	3	-	1,6	-
	Hypothetical	528214358	46,0 / 52,8	5,6 / 5,2	3	6			
325	Enolase	528235542	46,4 / 50,8	5,7 / 5,8	11	45	1,6	1,5	1,4
327	Aromatic-L-aminon-decarboxylase	528246060	55,7 / 55,7	5,6 / 5,5	1	2	-	-	2,5
333	Trypanothione reductase	528246207	52,9 / 55,0	6,0 / 6,0	17	45	-	1,7	0,7
339	Trypanothione reductase	528246207	52,9 / 59,6	6,0 / 6,6	7	15	0,2	-	2,4
	adenosylhomocysteinase	528271170	52,2 / 59,6	8,3 / 6,6	2	5			
	Protein kinase	528253902	54,0 / 59,6	6,7 / 6,6	3	7			
	Elongation fator 1-alpha	528248216	49,0 / 59,6	9,0 / 6,6	5	12			
	Nucleolar protein 56	528216584	52,3 / 59,6	8,5 / 6,6	3	6			
	Serine/threonine protein phosphatase type	528230110	53,1 / 59,6	6,5 / 6,56	4	7			
	hypothetical	528243953	53,7 / 59,6	6,4 / 6,56	2	4			
	Propionyl-CoA carboxylase beta chain	528234267	56,7 / 59,6	9,1 / 6,56	6	14			
	Dihydrolipoamide dehydrogenase	528251463	57,3 / 59,6	6,8 / 6,56	8	23			
Mitochondrial processing peptidase	528244686	54,1 / 59,6	6,5 / 6,56	4	9				
342	Mitochondrial processing pptidase	528244686	54,1 / 55,9	6,5 / 7,64	4	8	-	-	0,2
	26S proteasome regulatory subunit N5	528255497	54,4 / 55,9	6,8 / 7,64	4	8			
	Elongation fator Tu	528255170	51,1 / 55,9	7,0 / 7,64	4	10			
	Propionyl-CoA carboxylase beta chain	528234267	56,7 / 55,9	9,1 / 7,64	9	21			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	Protein kinase	528253902	54,0 / 55,9	6,7 / 7,6	8	20			
		528240841	54,0 / 55,9	7,0 / 7,6	2	5			
	Elongation fator 1-alpha	528248216	49,0 / 55,9	9,0 / 7,6	14	32			
	Protein kinase	528254254	55,2 / 55,9	8,3 / 7,6	3	7			
	3-oxoacid CoA-transferase	528254254	52,7 / 55,9	8,3 / 7,6	2	5			
	Large subunit ribosomal protein L3e	528249743	47,4 / 55,9	11,0 / 7,6	3	8			
	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18	528219408	49,3 / 55,9	8,3 / 7,6	4	10			
	Nucleolar protein 56	528216584	52,3 / 55,9	8,5 / 7,6	8	19			
	Glycerol kinase	528220809	63,0 / 55,9	7,1 / 7,6	3	7			
	hypothetical	528245176	55,6 / 55,9	7,6 / 7,6	2	5			
	Dihydrolipoamide dehydrogenase	528251463	51,3 / 55,9	6,8 / 7,6	6	14			
IMP dehydrogenase	528242410	55,5 / 55,9	8,8 / 7,6	2	4				
<b>343</b>	Dihydrolipoamide dehydrogenase	528251463	51,3 / 54,5	6,8 / 6,7	1	2	0,2	-	-
<b>348</b>	Elongation factor 1-alpha	528248216	49,0 / 57,4	9,0 / 5,8	3	10	0,4	-	-
<b>353</b>	Mannose-1-phosphate guanyltransferase	528223955	32,3 / 57,4	6,5 / 5,4	2	6	1,5	-	-
<b>354</b>	Pyruvate kinase	528224213	54,0 / 56,5	6,5 / 6,3	1	3			
	Succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+)	528253926	53,7 / 56,5	6,4 / 6,3	5	11			
<b>358</b>	Chaperonin GroEL	528232154	60,3 / 57,3	5,7 / 5,3	17	28	0,5	-	0,7
		528233838	59,2 / 57,3	5,7 / 5,3	10	14			
		528229072	46,4 / 57,3	5,2 / 5,3	23	47			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	T-complex protein 1 subunit gamma	528218587	60,2 / 57,3	5,7 / 5,3	2	3			
	T-complex protein 1 subunit theta	528218587	58,6 / 57,3	5,72 / 5,31	8	15			
	Malic enzyme	528241367	65,7 / 57,3	6,66 / 5,31	2	4			
	Malate dehydrogenase (oxalacetate-decarboxylating)	528214583	62,8 / 57,3	5,83 / 5,31	3	5			
<b>360</b>	Translation initiation factor 2 subunit 3	528241015	52,2 / 57,5	6,0 / 5,9	6	18	-	-	0,4
<b>365</b>	Alcohol dehydrogenase	528243459	41,3 / 54,8	6,0 / 5,8	1	6	-	0,4	0,5
<b>369</b>	T-complex protein 1 subunit gamma	528243248	51,9 / 58,8	5,56 / 5,6	6	13	0,5	-	-
<b>378</b>	T-complex protein 1 subunit epsilon	528230274	58,9 / 62,0	5,2 / 5,2	3	10	-	-	0,6
<b>380</b>	2,3-phosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	528247083	59,8 / 62,0	5,4 / 5,3	9	26	0,6	-	0,3
<b>385</b>	Trypanothione reductase	528246207	52,9 / 62,4	6,0 / 6,1	2	4	0,6	-	1,6
	UDP glucose 6-dehydrogenase	528238298	54,5 / 62,4	6,3 / 6,1	2	4			
	Alanine transaminase	528254034	53,2 / 62,4	5,8 / 6,1	3	6			
	Extracellular signal-regulated kinase 1/2	528257312	58,7 / 62,4	6,2 / 6,1	4	7			
	Sucrose-phosphate synthase-like protein	528235651	60,4 / 62,4	6,0 / 6,1	5	10			
<b>386</b>	Aspartyl-tRNA synthetase	528248966	62,8 / 66,2	5,7 / 5,7	8	16	-	-	0,5

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
393	Hypothetical	528253869	61,8 / 64,8	6,0 / 5,2	4	8			
	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	528241931	67,4 / 64,8	5,4 / 5,2	9	16	-	-	0,2
	Molecular chaperone DnaK	528242500	71,4 / 64,8	7,8 / 5,2	13	22			
396	Heat shock 70 KDa protein 1/8	528255509	64,7 / 70,2	5,8/ 5,0	6	13	0,5	-	-
	cAMP-dependent protein kinase regulator	528236423	57,8 / 70,2	4,9 / 5,0	3	7			
400	Heat shock 70 kDa protein 1/8	528255509	64,7 / 67,1	5,8 / 5,3	4	10	-	-	0,4
		528250876	70,4 / 67,1	5,5 / 5,3	16	8			
	Calmodulin-like protein containing EF hand	528252778	65,2 / 67,1	5,4 / 5,3	12	25			
	Molecular chaperone DnaK	528242500	71,4 / 67,1	5,8 / 5,3	34	40			
	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	528241931	67,4 / 67,1	5,4 / 5,3	17	29			
	hypothetical	528235059	72,1 / 67,1	5,2 / 5,3	2	3			
	Flagelar associated protein	528235164	67,8 / 67,1	5,5 / 5,3	2	4			

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	528234674	71,2 / 67,1	5,5 / 5,3	17	28			
401	Dynein intermediate chain 2, axonemal	528229312	68,3 / 67,1	5,5 / 5,5	2	4	-	1,6	-
	Molecular chaperone DnaK	528242500	71,4 / 67,1	5,8 / 5,5	2	4			
	NADPH-cytochrome p450 reductase-like protein	528219095	73,6 / 67,1	5,5 / 5,5	6	11			
	Mitochondrial intermediate peptidase	528226882	77,5 / 67,1	7,8 / 5,5	3	4			
	hypothetical	528253869	61,8 / 67,1	6,0 / 5,5	2	4			
	DNA polymerase delta subunit 2	528257398	58,9 / 67,1	5,5 / 5,5	3	7			
	Flagellar associated protein	528235164	67,8 / 67,1	5,5 / 5,5	2	4			
405	Amidohidrolase	528232668	44,3 / 67,8	5,6 / 6,4	6	15	0,6	-	-
	Transketolase	528215291	45,4 / 67,8	6,2 / 6,4	3	8			
409	Transketolase	528215291	45,4 / 72,0	6,2 / 6,2	4	14	0,5	-	-
416	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocystei nemethyltransferase	528247924	86,0 / 79,6	5,5 / 5,5	4	8	-	1,9	-
417	hypothetical	528235611	81,8 / 84,7	5,5 / 5,5	4	6	-	-	0,4
425	aconitase	528242093	97,5 / 79,6	6,5 / 6,7	4	7	3,3	0,5	-
427	Glycyl tRNA synthetase	528222199	70,4 / 80,4	5,8 / 5,9	1	3	-	6,0	-
439	Pyruvate, orthophosphate dikinase	528215750	99,3 / 86,3	6,1 / 6,3	9	15	2,6	2,1	1,3
440	Elongation fator 2	528214720	94,2 / 92,5	5,9 / 5,4	22	27	1,0	-	-

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sup>b</sup>	pI Teór. / Exp.	Número de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Razão Apo / WT		
							Fase log de crescimento celular		
							Início	Meio	Fim
	UDP-sugar pyrophosphorylase	528242820	87,0 / 92,5	5,4 / 5,4	8	11			
	Heat shock 70 kDa protein 4	528241856	90,6 / 92,5	5,6 / 5,4	8	12			
	Heat shock 70 kDa protein 1/8	528245216	80,6 / 92,5	6,3 / 5,4	4	7			
	Pyruvate, orthophosphate dikinase	528215750	99,4 / 92,5	6,1 / 5,4	9	11			
443	Ribonucleoside-diphosphate reductase large chain	528220932	90,6 / 87,2	6,7 / 6,2	9	11	-	2,1	-
	Peptide chain release factor subunit 3	528220068	77,7 / 87,2	6,7 / 6,2	8	13			
	Pyruvate, orthophosphate dikinase	528215750	99,3 / 87,2	6,1 / 6,2	31	31			

<sup>a</sup> *gene identifier*, <sup>b</sup> valor de massa molecular excluindo o peptídeo sinal, <sup>c</sup> número de peptídeos identificados por espectrometria de massas, <sup>d</sup> porcentagem de cobertura de sequência obtida e <sup>e</sup> razão da abundância entre cepa Apo e WT. As identificações proteicas, quando não indicadas, foram realizadas em *Strigomonas culicis*. Linhas preenchidas em cinza indicam as identificações utilizadas para a descrição de processos.

Tabela 4. Identificação de spots exclusivos (DifExclusiv) das cepas WT e Apo de *S. culicis* por espectrometria de massas.

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sub>b</sub>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Cepas e tempo de crescimento						
							WT			Apo			
							24 h	56 h	80 h	24 h	56 h	80 h	92 h
2597	calmodulin	528215074	16,8 / 15,4	4,1 / 4,2	8	50	X						
	Hitone H2B	528257450	8,3 / 15,4	10,9 / 4,2	2	25							
2600	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	528243782	37,6 / 37,3	5,3 / 5,1	4	14	X						
2602	Hypothetical	528235686	37,8 / 41,3	4,9 / 5,04	4	16	X						
	4-nitrophenyl phosphatase	528253514	38,1 / 41,3	5,1 / 5,04	1	5							
2604	Heat shock 70 kDa protein 1/8	528257620	71,5 / 75,0	5,3 / 4,68	2	6	X						
2607	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein subunit ClpB	528221679	90,5 / 81,0	6,5 / 5,8	3	4	X						
	Heat shock 70 kDa protein 5	528240425	71,6 / 81,0	5,0 / 5,8	10	16							
	Heat shock 70 kDa protein 1/8	528245216	80,6 / 81,0	6,2 / 5,8	2	4							
2606	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	528219132	77,4 / 78,5	6,1 / 5,8	2	3	X						
	Transketolase	528225056	75,0 / 78,5	5,7 / 5,8	3	4							
	Molecular chaperone DnaK	528242500	71,4 / 78,5	5,7 / 5,8	4	7							
	Thimet oligopeptidase	528220123	76,9 / 78,5	5,7 / 5,8	9	12							
	Heat shock protein 70 kDa 1/8	528245216	80,6 / 78,5	6,2 / 5,8	10	15							
	Intraflagellar transport protein-like protein	528222579	67,3 / 78,5	5,7 / 5,8	5	8							
	GMP synthase	528226886	68,6 / 78,5	5,9 / 5,8	9	15							
2608	Molecular chaperone DnaK	528225728	69,9 / 79,4	4,9 / 4,3	3	9	X						
2613	Histone H2B	528257450	8,3 / 15,8	10,9 / 4,4	1	16	X						
2637	Aromatic-amino-acid transaminase	528249008	45,2 / 43,2	7,6 / 7,3	7	19	X						

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) b	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Cepas e tempo de crescimento							
							WT			Apo				
							24 h	56 h	80 h	24 h	56 h	80 h	92 h	
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	528255110	39,1 / 43,2	9,0 / 7,3	6	18								
	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	528253995	40,3 / 43,2	7,1 / 7,3	5	14								
	Ankyrin/TPR repeat protein	528218913	43,4 / 43,2	7,1 / 7,3	4	12								
	hypothetical	528254885	41,9 / 43,2	8,2 / 7,3	12	25								
	Fructose-bisphosphate aldolase, class I	528220452	41,0 / 43,2	8,8 / 7,3	4	10								
	Aminomethyltransferase, mitochondrial precursor	528246138	42,7 / 43,2	8,6 / 7,3	3	8								
	Mitochondrial DNA polymerase beta	528248561	42,7 / 43,2	8,8 / 7,3	6	16								
<b>2638</b>	Glycosomal Glyceraldehyde 2-phosphate dehydrogenase	528255110	39,1 / 42,3	9,0 / 9,8	2	8	X							
<b>2642</b>	hypothetical	528254785	41,6 / 46,4	5,3 / 5,3	6	16	X							
<b>2643</b>	hexokinase	528229959	35,3 / 47,8	8,9 / 8,2	1	7	X							
<b>2644</b>	Protein disulfide-isomerase	528234909	52,0 / 52,0	5,5 / 5,4	2	4	X							
<b>2645</b>	Tubulin beta	528243748	49,9 / 64,6	4,7 / 4,5	1	2	X							
<b>2646</b>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	528250195	65,0 / 64,3	8,9 / 5,1	1	2	X							
<b>2651</b>	Heat shock 70 kDa protein 1/8	528245216	80,6 / 75,8	6,2 / 4,8	12	19	X							
<b>2652</b>	TNF receptor-associated protein 1	528251364	84,1 / 85,1	6,4 / 4,7	1	1	X							
<b>2653</b>	Molecular chaperone HtpG	528267439	80,6 / 86,7	5,0 / 4,7	12	12	X							
		528232722	80,2 / 86,7	5,0 / 4,7	23	29								
	Heat shock protein 90 kDa beta	528229346	85,4 / 86,7	5,4 / 4,7	13	19								
	Hypoxia up-regulated 1	528238368	81,3 / 86,7	5,6 / 4,7	2	4								
<b>2654</b>	Molecular chaperone HtpG	29339012	80,2 / 89,6	8,8 / 4,8	4	7	X							

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) b	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Cepas e tempo de crescimento						
							WT			Apo			
							24 h	56 h	80 h	24 h	56 h	80 h	92 h
	Heat hock protein 90 KDa beta	528229346	85,4 / 89,6	5,4 / 4,8	2	3							
2682	Propionyl-CoA carboxylase beta chain	528234267	56,7 / 57,9	9,1 / 8,0	13	27	X						
	Elongation fator 1-alpha	528248216	49,0 / 57,9	8,9 / 8,0	6	14							
	Large subunit ribosomal protein L3e	528249743	47,4 / 57,9	10,9 / 8,0	4	12							
	Nucleolar protein 56	528216584	52,3 / 57,9	8,5 / 8,0	2	3							
	Trypanothione reductase	528246207	52,9 / 57,9	6,0 / 8,0	2	3							
	hypothetical	528243953	53,7 / 57,9	6,3 / 8,0	4	7							
	Dihydrolipoamide dehydrogenase	528251463	51,3 / 57,9	6,8 / 8,0	6	14							
	IMP dehydrogenase	528242410	55,5 / 57,9	8,7 / 8,0	6	12							
2683	Sucrose-phosphate synthase-like protein	528235651	60,4 / 58,1	6,0 / 9,1	2	4	X						
2689	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	528250195	65,0 / 66,3	8,9 / 8,5	2		X						
2520	Peptidylpropyl isomerase-like protein	528240011	36,5 / 48,3	5,9 / 5,0	2	11		X					
	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 48,3	4,94 / 5,0	1	3							
	FK506 binding protein	528241351	42,7 / 48,3	11,8 / 5,0	1	5							
2187	Cytochrome c oxidase assembly factor-like protein	528233733	27,6 / 46,5	4,7 / 5,4	2	11		X					
2185	NAD:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	528244173	39,1 / 39,5	5,5 / 5,4	2	12		X					
2405	Replication factor A1	BC03955	43,7 / 51,9	5,8 / 5,5	3	8		X					
	Sucrose-phosphate synthase-like protein	528235651	60,4 / 51,9	6,0 / 5,5	2	4							
	Enolase	528235542	46,4 / 51,9	5,7 / 5,5	2	5							
	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 51,9	4,9 / 5,5	3	6							
	Aldehyde dehydrogenase (NAD+)	528244821	53,8 / 51,9	5,9 / 5,5	14	30							

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) b	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Cepas e tempo de crescimento						
							WT			Apo			
							24 h	56 h	80 h	24 h	56 h	80 h	92 h
2506	Fructose-bisphosphate aldolase	528252563	49,3 / 41,6	9,0 / 7,2	3								
	Isocitrate dehydrogenase NADP, mitochondrial precursor	528243172	48,1 / 41,6	8,3 / 7,2	6		X						
931	Fructose-bisphosphate aldolase	528252563	49,3 / 43,3	9,0 / 8,9	5			X					
728	1,2-dihydroxy-3-keto-5- methylthipenteno dioxigenase	528249758	33,9 / 41,4	6,0 / 6,6	3	13		X					
825	Translation initiation factor 5A	528255345	17,6 / 25,7	4,7 / 4,7	3	28			X				
956	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 51,6	4,9 / 5,3	5	14							
	F-Type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit beta	528214273	51,1 / 51,6	5,2 / 5,3	5	14			X				
2136	Tubulin beta	528243748	49,9 / 51,0	4,7 / 4,9	1					X			
2145	Heat shock 70 KDa protein 1/8	528257620	71,5 / 72,8	5,3 / 4,9	7	14				X			
2144	Dynein intermediate chain 2, axonemal	528229312	68,3 / 66,9	5,6 / 5,6	3	5							
	Molecular chaperone DnaK	528242500	71,4 / 66,9	5,7 / 5,6	12	20							
	Hypothetical	528253652	61,8 / 66,9	5,9 / 5,6	4	9							
	Threonine synthase	528250416	76,1 / 66,9	5,7 / 5,6	12	19				X			
	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	528241931	67,4 / 66,9	5,3 / 5,6	5	10							
	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	528219132	77,4 / 66,9	6,1 / 5,6	6	10							
2132	Fructose-bisphosphate aldolase, class I	528220452	41,0 / 41,9	8,8 / 6,5	3	6							
	,amnose-1-phosphate guanylyltransferase	528215369	34,5 / 41,9	5,8 / 6,5	2	7				X			
	Hypothetical	528247003	45,9 / 41,9	6,5 / 6,5	6	15							

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) b	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Cepas e tempo de crescimento						
							WT			Apo			
							24 h	56 h	80 h	24 h	56 h	80 h	92 h
2134	Molecular chaperone DnaK	528225728	69,9 / 45,6	4,9 / 4,9	4	7							
2147	Heat shock 70 KDa protein 1/8	528257620	71,5 / 72,5	4,9 / 4,61	1	3				X			
2135	Glutamine synthetase	528243624	45,3 / 42,6	5,1 / 5,0	4	11							
	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 42,6	4,9 / 5,0	4	9				X			
	hypothetical	528257708	42,9 / 42,6	5,9 / 5,0	4	11							
		528227165	45,1 / 42,6	5,1 / 5,0	6	9							
2142	Stress-induced-phosphoprotein 1	528234377	62,4 / 65,6	6,2 / 5,0	2	4				X			
	Lysyl-tRNA synthetase	528250495	69,1 / 65,6	6,1 / 5,0	2	4							
2117	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	528243782	37,6 / 21,2	5,3 / 8,6	3	10				X			
2113	Large subunit ribosomal protein LP1	528246171	10,4 / 15,0	4,2 / 4,2	2	56				X			
2130	4-nitrophenyl phosphate	528233733	38,1 / 39,5	4,7 / 5,0	3	10							
	Cytochrome c oxidase assembly factor-like protein	528233733	27,6 / 39,5	4,7 / 5,0	3	14							
	Adenosine kinase	528247391	36,6 / 39,5	5,2 / 5,0	2	6							
	Peptidyl-prolyl isomerase D (cyclophilin D)	528248938	37,7 / 39,5	5,9 / 5,0	2	5				X			
	Tubulin alpha	528254825	49,7 / 39,5	4,9 / 5,0	2	4							
	hypothetical	528236228	39,1 / 39,5	5,0 / 5,0	8	22							
		528235686	37,8 / 39,5	5,0 / 5,0	7	17							
2116	V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit	528240967	24,8 / 20,1	6,5 / 8,9	1	7				X			
1971	Molecular chaperone HtpG	429339012	80,2 / 54,1	5,3 / 9,4	1	3					X		
	Elongation factor 1-alpha	528248876	34,5 / 54,1	8,8 / 9,4	2	6							

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) b	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Cepas e tempo de crescimento						
							WT			Apo			
							24 h	56 h	80 h	24 h	56 h	80 h	92 h
1958	ATP-dependent RNA helicase DDX6/DHH1	528214560	34,9 / 43,0	8,4 / 5,9	4	13							
	hypothetical	528241595	43,9 / 43,0	4,9 / 5,9	2	5							
	adenosylhomocysteinase	528221685	34,3 / 43,0	6,3 / 5,9	9	20							
	Translation initiation factor 4A	528238662	45,3 / 43,0	5,6 / 5,9	6	17							
	Aspartate aminotransferase	528257075	46,5 / 43,0	6,8 / 5,9	6	18				X			
	ATP-dependent RNA helicase UAP56/SUB2	528222789	48,9 / 43,0	6,3 / 5,9	2	6							
	S-adenosylmethionine synthetase	528232453	43,2 / 43,0	5,5 / 5,9	6	17							
	Arginine N-methyltransferase	528236789	49,8 / 43,0	6,9 / 5,9	2	7							
	Succinyl-CoA synthetase beta subunit	528253974	51,9 / 43,0	5,8 / 5,9	7	17							
	hypothetical	528247768	45,3 / 43,0	6,0 / 5,9	5	12							
	Protein phosphatase	528248181	41,3 / 43,0	5,7 / 5,9	3	7							
1848	Calpain-like cysteine peptidase	528242555	17,4 / 15,1	5,7 / 4,7	2	12					X		
1994	Heat shock 70 kDa protein 1/8	528257620	71,5 / 63,2	5,4 / 5,3	1	3					X		
1883	Hypothetical	528250186	22,1 / 26,0	4,6 / 4,6	4	24							
	Translation initiation factor 3 subunit K	528246723	23,4 / 26,0	4,7 / 4,6	2	12					X		
1915	Malate dehydrogenase	528251472	24,3 / 34,7	9,5 / 9,4	2	14					X		
1866	IgE-dependent histamine-releasing factor	528243104	19,0 / 22,1	4,4 / 4,6	5	48					X		
1719	Molecular chaperone HtpG	429339012	80,2 / 85,7	5,3 / 5,0	3	9						X	
1659	Dihydrolipoamide dehydrogenase	528243939	51,3 / 52,7	5,8 / 6,4	4	8						X	
1718	Heat shock 70 kDa protein 4	528241856	90,6 / 90,4	5,6 / 5,6	8	11						X	

Spot	Nome da proteína	gi <sup>a</sup>	M.M. Teór. / Exp. (kDa) <sub>b</sub>	pI Teór. / Exp.	Numero de Peptídeos <sup>c</sup>	Cobertura (%) <sup>d</sup>	Cepas e tempo de crescimento						
							WT			Apo			
							24 h	56 h	80 h	24 h	56 h	80 h	92 h
1631	Spermidine synthase	528253706	34,6 / 41,1	5,2 / 5,0	2	7							
	Coatomer epsilon subunit	528222244	43,7 / 41,1	5,2 / 5,0	6	14						X	
	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	528254377	33,6 / 41,1	6,0 / 5,0	2	7							
1431	Elongation factor 1-alpha	528248216	49,0 / 55,7	9,0 / 9,4	11	33							X
1452	Molecular chaperone HtpG	528232722	80,1 / 94,9	5,07 / 5,0	12	29							X
1422	Enolase	528235542	46,4 / 50,9	5,7 / 5,6	5	17							X
1449	Heat shock 70 Kda protein 1/8	528245216	80,6 / 82,5	6,3 / 5,2	3								

<sup>a</sup> *gene identifier*, <sup>b</sup> valor de massa molecular excluindo o peptídeo sinal, <sup>c</sup> número de peptídeos identificados por espectrometria de massas e <sup>d</sup> porcentagem de cobertura de sequência obtida. As identificações proteicas, quando não indicadas, fora realizadas em *Strigomonas culicis*.