UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em Células de Mamífero

I. Papel da L-prolina
II. Expressão de proteínas

Renata Rosito Tonelli

Tese de Doutorado

Prof^ª. Dr^ª. Maria Júlia Manso Alves

Tese apresentada ao
Instituto de Química da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Ciências

SÃO PAULO

2003

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20651

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em Células de Mamífero
I. Papel da L-prolina
II. Expressão de proteínas

Renata Rosito Tonelli

Tese de Doutorado

Prof^a. Dr^a. Maria Júlia Manso Alves

SÃO PAULO

01 de outubro de 2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005751

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tonelli, Renata Rosito

T664d Diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em células de mamífero
I. Papel da L-prolina II. Expressão de proteínas / Renata Rosito
Tonelli. -- São Paulo, 2003.
106p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Alves, Maria Júlia Manso

1. Biologia celular 2. Bioquímica : Microrganismos I. T. II.
Alves, Maria Júlia Manso, orientador.

574.87 CDD

**"Diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em
células de mamífero**

I. Papel da L-prolina

II. Expressão de proteínas

RENATA ROSITO TONELLI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. MARIA JÚLIA MANSO ALVES
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ANA MARIA MOURA DA SILVA
IB

Prof. Dr. IGOR CORREIA DE ALMEIDA
ICB – USP

Prof. Dr. MICHEL PINKUS RABINOVITCH
UNIFESP

Prof. Dr. SAMUEL GOLDENBERG
IBMP

SÃO PAULO
01 DE OUTUBRO 2003.

Aos meus pais e irmãos

Ao Erick

Agradecimentos

À Júlia

Ao Professor Walter Colli

Ao Professor Ivan Schumacher

Aos amigos: Célia, Maga, Marinêi, Ariel, Jorge e Roberto

Aos colegas de laboratório

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Índice

RESUMO	I
ABSTRACT	III
ABREVIACÕES	V
INTRODUÇÃO	1
FORMAS DE DESENVOLVIMENTO	1
<i>Amastigotas</i>	2
<i>Epimastigotas</i>	2
<i>Tripomastigotas</i>	3
CICLO DE VIDA	3
CAPÍTULO 1.....	6
INTRODUÇÃO	6
METABOLISMO INTERMEDIÁRIO EM <i>T. CRUZI</i>	6
FATORES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO	8
OBJETIVOS.....	10
RESULTADOS.....	11
EFEITO DA L-PROLINA NO CICLO INTRACELULAR DE <i>T. CRUZI</i>	11
EFEITO DA TEMPERATURA NA ECLOSÃO DE TRIPOMASTIGOTAS	12
EFEITO DA L-PROLINA NA ECLOSÃO DE TRIPOMASTIGOTAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS	12
EFEITO DO CARENCIAMENTO DE L-PROLINA NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS INFECTADAS POR <i>T. CRUZI</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO	13
EFEITO DA L-PROLINA NAS FORMAS INTRACELULARES A DIFERENTES TEMPERATURAS	14
EFEITO DA L-PROLINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS ESTÁGIOS INTRACELULARES DE <i>T. CRUZI</i>	16
TRANSPORTE DE L-PROLINA NOS ESTÁGIOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO	18
CONTEÚDO INTRACELULAR DE PROLINA LIVRE.....	19
DISCUSSÃO.....	21

CAPÍTULO 2.....	27
INTRODUÇÃO.....	27
OBJETIVOS.....	29
RESULTADOS.....	30
CALICULINA A INDUZ TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA Y A FORMAS AMASTIGOTAS-SÍMILE A 37°C	30
CALICULINA A INDUZ TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DO CLONE CL-14 A FORMAS AMASTIGOTAS E EPIMASTIGOTAS-SÍMILE, A 37°C.....	33
CALICULINA A INDUZ TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DO CLONE CL-14 A FORMAS AMASTIGOTAS-SÍMILE A 33°C.	36
TRATAMENTO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS DO CLONE CL-14 COM CALICULINA A A 37°C	38
DISCUSSÃO.....	40
CAPÍTULO 3.....	46
INTRODUÇÃO.....	46
OBJETIVOS.....	50
RESULTADOS.....	51
CONSTRUÇÃO DE GEL MÍNIMO REPRESENTATIVO	52
ANÁLISE COMPARATIVA	55
CONSTRUÇÃO DE BANCO DE DADOS.....	56
ANÁLISE DOS POLIPEPTÍDEOS AO LONGO DO CICLO INTRACELULAR	57
<i>Análise da variação de expressão.....</i>	60
PERFIL POLIPEPTÍDICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	62
<i>Polipectídeos de epimastigotas intracelulares obtidos de culturas mantidas a 33°C ou 37°C.....</i>	62
<i>Polipectídeos de epimastigotas intracelulares em culturas mantidas na presença ou ausência de L-prolina.....</i>	65
DISCUSSÃO.....	66
DISCUSSÃO FINAL.....	73
MATERIAL & MÉTODOS	80
CÉLULAS HOSPEDEIRAS.....	80

EPIMASTIGOTAS EXTRACELULARES.....	80
TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS	80
AMASTIGOTAS E EPIMASTIGOTAS INTRACELULARES.....	80
TRIPOMASTIGOTAS DE CULTIVO.....	81
PURIFICAÇÃO DE FORMAS INTRACELULARES.....	81
PURIFICAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS.....	81
MARCAÇÃO METABÓLICA COM ³⁵ S-METIONINA	82
OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM MEMBRANAS E PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	82
QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	82
EFEITO DA L-PROLINA NA ECLOSÃO DE TRIPOMASTIGOTAS.....	82
EFEITO DA L-PROLINA NOS ESTÁGIOS INTRACELULARES.....	83
VIABILIDADE DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS.....	83
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI).....	83
ENSAIOS DE TRANSPORTE.....	84
DOSAGEM DE PROLINA INTRACELULAR LIVRE.....	84
<i>Preparo de conteúdo intracelular.....</i>	84
<i>Determinação de conteúdo de água.....</i>	85
<i>Dosagem de prolina</i>	85
EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS COM SOLUÇÃO TAMPONADA DE ETANOL FERVENTE.....	85
ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA	86
DIFERENCIAÇÃO CELULAR COM CALICULINA A	86
COLORAÇÃO COM DAPI	86
ANÁLISE ELETROFORÉTICA.....	86
<i>Eletroforese unidimensional – SDS-PAGE.....</i>	86
<i>Eletroforese bidimensional – 2D.....</i>	87
<i>Secagem e radioautografia.....</i>	87
ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	88
WESTERN BLOT	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
CURRICULUM VITÆ.....	105

Resumo

Capítulo 1 A transformação (metaciclogênese) das formas proliferativas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* em formas não proliferativas e infectivas - tripomastigotas metacíclicos - é um passo crucial que ocorre naturalmente no trato digestivo do inseto vetor reduviídeo. Este processo pode ser reproduzido *in vitro* em condições químicas definidas quando o meio de diferenciação TAU é suplementado com L-prolina e L-glutamato. Está bem estabelecido que prolina é uma fonte importante de energia e de carbono nos tripanossomatídeos, mas são poucas as evidências de sua participação na diferenciação intracelular do parasita no hospedeiro vertebrado. Este fato nos levou a desenvolver um modelo experimental para verificar se havia uma relação entre concentração de prolina e eclosão de formas tripomastigotas. Culturas mantidas sem L-prolina produziram consistentemente menos formas tripomastigotas quando comparadas a culturas mantidas em L-prolina, 20 - 200 μ M. A atividade de transporte de L-prolina foi 15 vezes e 23 vezes maior nos epimastigotas intracelulares em relação a amastigotas e tripomastigotas, respectivamente. A concentração de prolina medida nos epimastigotas intracelulares ($0,73 \pm 0,01$ mM) é bem menor que a de amastigotas ($6,61 \pm 0,01$ mM) e tripomastigotas ($2,74 \pm 0,02$ mM). Todos os estágios, no entanto, apresentaram concentração de prolina bem maior do que as células hospedeiras, na ordem de $0,27 \pm 0,03$ mM. A análise do efeito de prolina sobre os diferentes estágios intracelulares mostrou a importância desse aminoácido na transformação de epimastigotas intracelulares a tripomastigotas.

Capítulo 2 A diferenciação das formas infecciosas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* a formas amastigotas não-infectivas e replicativas ocorre normalmente no citoplasma de células infectadas. Um estudo sobre o envolvimento de proteínas fosfatase do tipo 1 e 2A na diferenciação extracelular a 37°C e 33°C de tripomastigotas a formas amastigotas foi realizado, utilizando-se o clone CL-14 de *T. cruzi*. Demonstrou-se que Caliculina A (um inibidor de proteínas fosfatase 1 e 2A) desencadeia a transformação de tripomastigotas a amastigotas em pH neutro, através da passagem por formas intermediárias flageladas semelhantes aos epimastigotas. O tratamento de tripomastigotas com duas concentrações de Caliculina A (1nM e 5 nM) resultou, após 6 horas de incubação, em mais de 50% de formas epimastigota-símbles. Após 8 horas de tratamento, todos os

tripomastigotas estavam diferenciados a formas amastigotas ou epimastigota similares. Tripomastigotas metacíclicos do clone CL-14 submetidos ao mesmo tratamento com Caliculina A não apresentaram alterações morfológicos dentro do período de incubação de 8 horas.

Capítulo 3 Fatores ambientais, como a temperatura, e a presença ou ausência de metabólitos tais como a L-prolina influenciam a diferenciação intracelular do *Trypanosoma cruzi* do clone CL-14. Estes fatos, juntamente com a ausência de dados na literatura sobre o perfil proteico de epimastigotas intracelulares levou-nos a estudar o perfil de expressão de proteínas durante a transformação de epimastigotas intracelulares a tripomastigotas em culturas celulares mantidas a 37°C (temperatura restritiva), comparando-as com aquelas cuja manutenção foi feita a 33°C (temperatura permissiva). Também foram comparados os perfis proteicos quando os parasitas foram obtidos de culturas celulares mantidas na ausência ou presença de diferentes concentrações de L-prolina. Para tanto, foram feitas preparações de frações enriquecidas em membranas e frações citossólicas dos diferentes estágios do parasita para posterior resolução por eletroforese bidimensional. Através desta análise foi possível identificar polipeptídeos comuns entre os diferentes estágios bem como polipeptídeos específicos de cada estágio de desenvolvimento.

Abstract

Chapter 1 The transformation of the proliferative epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* into the non-proliferative and infective metacyclic trypomastigotes (metacyclogenesis) is a crucial step occurring naturally in the digestive tract of the reduviid insect vector. This process can be reproduced, *in vitro*, under chemically defined conditions. It is well established that L-proline is an important energy and carbon source for trypanosomatids but no evidence for its participation in the differentiation of vertebrate host stages of the parasite exists in the literature. This fact prompted us to develop an experimental model to study whether a correlation exists between proline concentration and trypomastigote bursting. In fact, cultures maintained in the absence of L-proline consistently produced fewer trypomastigote forms when compared to cultures maintained in 20 - 200 μ M L-proline. The transport activity of L-proline was 15-fold and 23-fold higher in intracellular epimastigote-like forms as compared to amastigotes and trypomastigotes, respectively. Interestingly, proline concentration in intracellular epimastigote-like parasites was 0.73 ± 0.01 mM, as compared to 6.61 ± 0.01 mM for amastigotes and 2.74 ± 0.02 mM for trypomastigotes, while host cells showed an intracellular proline concentration of 0.27 ± 0.03 mM. The data suggest the importance of L-proline in the transformation of intracellular epimastigote-like forms to trypomastigotes.

Chapter 2 Differentiation of the infective trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* to the non-infective and replicative amastigotes normally occurs in the cytoplasm of infected cells. A study about the involvement of protein phosphatases type 1 and 2A in the extracellular differentiation at 37°C and 33°C from trypomastigotes to amastigotes was undertaken using the CL-14 clone of *T. cruzi*. Calyculin A (an inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A) triggers the transformation of trypomastigotes to amastigotes at neutral pH through epimastigote-like intermediate forms. Treatment of trypomastigotes for 6 hours with two Calyculin A concentrations (1 nM and 5 nM) resulted in more than 50% of epimastigote-like forms. After 8 hours, all trypomastigotes were differentiated to amastigotes or epimastigotes-like forms. Metacyclic trypomastigotes from the CL-14 clone submitted to the same treatment with Calyculin A showed no morphological changes.

Abreviações

BSA	Albumina sérica bovina
CA	Caliculina A
Chaps	(3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]1-propanosulfonato)
Cpm	Contagens por minuto
CHO-K1	“Chinese Hamster Ovary” – Células de ovário de Hamster chinês
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DEAE-celulose	Dietilaminoetil-celulose
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium” – Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HEPES	Hidroxietil-piperazina-N-2-etano-sulfônico
IPG Buffer	Immobiline pH Gradient Buffer – Tampão de anfólitos
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	“Liver Infusion Tryptose” – Meio axênico contendo infusão de fígado e triptose
MEM	“Minimum Essential Medium” – Meio de cultura mínimo
MEM-TAU	Meio de cultura contendo MEM e TAU3AAG (1:1)
PBS	“Phosphate buffered saline” – Tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4, cloreto de sódio 150 mM
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro fetal bovino
TAU	“Triatomine Artificial Urine” – Meio de cultivo axênico de urina artificial de triatomínio
TAU3AAG	Meio de cultivo TAU contendo 10 mM L-prolina, L-glutamato, L-aspartato e 2 g/L D-glicose
TBS	Tris 50 mM pH 7,5, cloreto de sódio 150 mM
TBS-TT	Tampão Tris contendo 0,2 % TritonX-100, 0,3 % Tween 20
TCA	Ácido tricloroacético
TLCK	N-tosil-L-lisinaclorometilcetona
Tris	Tris-(hidroximetilaminometano)

Introdução

Dados estatísticos fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), mostram que os parasitas são responsáveis pelo maior número de mortes humanas, embora se excluam HIV/AIDS e a tuberculose, sendo que esta última infecta um terço da população mundial, e é responsável por dois a três milhões de mortes por ano (WHO 2001). Pode-se dizer que uma em cada dez pessoas sofre de uma, ou mais, das oito principais doenças tropicais: malária; esquistossomose (bilharzia); filariase linfática (leva a elefantíase); oncocercose; lepra; tripanossomíase africana (doença do sono); tripanossomíase americana (doença de Chagas) e leishmaniose (incluindo kala-azar) (Remme *et al.*, 1993). No ano de 2001, foram contabilizadas 135 mil mortes causadas por uma delas sendo que deste número, 13 mil foram causadas pela doença de Chagas (<http://www3.who.int/whosis>).

A tripanossomíase americana é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e estima-se que o número de pessoas infectadas seja de 16 e 18 milhões nas Américas, desde o México até o Chile (WHO 1997). São revisadas as estimativas sobre a prevalência da infecção e acredita-se que haja atualmente 11 milhões de pessoas infectadas (www.who.int/ctd/chagas/disease.htm).

A maior parte dos casos de infecção dos seres humanos, ou outros vertebrados, se dá pela transmissão vetorial, ou seja, pelo contato da pele, mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos contaminados por *T. cruzi*. A segunda via de transmissão mais freqüente aparece com a transfusão de sangue de doadores contaminados (WHO 1997), seguida pela transmissão congênita (Nisida *et al.*, 1999), que ocorre por meio da placenta e pela amamentação (Díaz 1979).

FORMAS DE DESENVOLVIMENTO

A família dos protozoários Trypanosomatidae apresenta, durante seu ciclo de vida, diferentes formas de desenvolvimento que são definidas a partir de aspectos morfológicos como: a forma do parasita, posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e região de emergência do flagelo no bolso flagelar (Hoare & Wallace 1966). Estes critérios permitem que sejam definidas as seguintes formas evolutivas: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas.

Amastigotas

De acordo com a nomenclatura proposta por Hoare (Hoare & Wallace 1966) são denominadas amastigotas as formas intracelulares multiplicativas de *T. cruzi* e *Leishmania*. Apesar de descrita como uma forma aflagelada, Meyer & De Souza (Meyer & De Souza 1976) observaram, por microscopia eletrônica e de contraste de fase, a presença de um curto flagelo, nestas formas, que a designaram esferomastigotas. De acordo com Brack (Brack 1968), os esferomastigotas são formas arredondadas encontradas no estômago do inseto vetor. A mesma denominação é dada para as formas arredondadas obtidas quando tripomastigotas de cultivo são incubados em meio axênico por 18 horas a 37°C (Piras *et al.*, 1982). As formas amastigotas também são obtidas pela lise prematura de células infectadas (Behbehani 1973), ou pela diferenciação extracelular de tripomastigotas (Pan 1978; Mortara 1991). Estas formas amastigotas apresentam características morfológicas, imunológicas, bioquímicas e ultraestruturas semelhantes aos amastigotas intracelulares (Villalta & Kierszenbaum 1982; Hudson *et al.*, 1984; Andrews *et al.*, 1987). Assim, são denominadas amastigotas, as formas arredondadas multiplicativas que apresentam um núcleo esférico e central, um cinetoplasto localizado na porção anterior do parasita e podem ser encontradas no interior de células do hospedeiro, em culturas celulares, no intestino do hospedeiro invertebrado, bem como em meio axênico.

Epimastigotas

As formas epimastigotas são encontradas no tubo digestivo do inseto vetor ou em cultivo axênico, principalmente durante a fase logarítmica de crescimento e correspondem a formas alongadas que apresentam o cinetoplasto localizado na porção anterior ao núcleo e um flagelo que emerge lateralmente do bolso flagelar. Os epimastigotas são multiplicativos, porém não infectivos e também podem ser encontrados no ciclo intracelular durante o processo de transformação de amastigotas a tripomastigotas, sendo denominados, neste caso, epimastigotas intracelulares (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999).

Epimastigotas Intracelulares

A presença de formas semelhantes aos epimastigotas, como formas intracelulares do *T. cruzi*, foi sugerida por Romãña & Meyer (Romãña & Meyer 1942) e posteriormente outros trabalhos relataram a existência destas formas, tanto *in vivo*,

como *in vitro* (Moraes-Rêgo 1956), como um estágio replicativo presente durante a fase final do ciclo intracelular quando amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas ou vice-versa, quando tripomastigotas transformam-se em amastigotas (Meyer & De Oliveira 1948). A confirmação desta forma como um estágio intracelular epimastigota-símile foi feita em 1995, quando Faucher e colaboradores mostraram reatividade destas formas com um anticorpo monoclonal dirigido contra lipídeos de epimastigotas de meio axênico (Faucher *et al.*, 1995). Almeida-de-Faria *et al.* mostraram que essas formas intracelulares apresentam características comuns com amastigotas e com tripomastigotas, embora suas características predominantes assemelhem-se às do epimastigota, levando à denominação destas formas como epimastigotas intracelulares (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999). De maneira geral, os epimastigotas intracelulares, os provenientes de meios axênicos ou do intestino do inseto vetor, compartilham características semelhantes, como por exemplo, a incapacidade de invadir células de cultura de tecidos, a morfologia (apesar dos epimastigotas intracelulares serem cinco vezes menores) e a disposição relativa entre as principais organelas. Outros parâmetros mostraram outras semelhanças, tais como a carga de superfície, a suscetibilidade à lise pelo sistema de complemento, a reatividade com determinadas lectinas e com um anticorpo monoclonal (3C5). Durante o processo de diferenciação de amastigota para tripomastigota, tudo indica que este estágio se desenvolve com características que o distingam de tripomastigotas e amastigotas.

Tripomastigotas

Estas formas possuem um comprimento de aproximadamente 25 μm e diâmetro de 2 μm , apresentam um corpo alongado com o cinetoplasto localizado posterior ao núcleo e um longo flagelo que emerge lateralmente do bolso flagelar. Podem ser observados na porção terminal do intestino do hospedeiro invertebrado, nas fezes e urina do inseto vetor, em cultura de células, no sangue e espaço intercelular do hospedeiro vertebrado e na fase estacionária de crescimento em culturas acelulares. Estas formas são infectivas para os vertebrados e são incapazes de se dividirem.

CICLO DE VIDA

O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* é complexo, envolvendo um hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem), e um hospedeiro invertebrado (Esquema I-1).

Insetos hematófagos que possuem a probóscida especializada para a sucção sangüínea, estão agrupados na família Reduviidae e subfamília Triatominae, onde estão os vetores do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (Chagas 1909). As espécies mais importantes relacionadas com a doença são *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasilienses*, *Triatoma sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Lent & Wygodzinsky 1979).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico do *T. cruzi* tem início quando o sangue de animais infectados, contendo formas tripomastigotas sangüíneas, é ingerido durante o processo de hematofagia. Ao chegar ao estômago do inseto vetor, os tripomastigotas transformam-se gradualmente em formas epimastigotas. Em seguida, os parasitas migram para o intestino, onde se multiplicam como formas epimastigotas. Posteriormente, estas formas migram para a parte mais posterior do tubo digestivo, atingindo o reto, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicas, que são eliminados com as fezes e urina do inseto triatomíneo (Brener *et al.*, 2002).

Esquema I-1 O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo evolutivo, no hospedeiro vertebrado, inicia-se quando formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas nas fezes e urina do inseto vetor penetram pela mucosa ou por soluções de continuidade na epiderme. As formas tripomastigotas podem penetrar qualquer tipo de célula por um mecanismo endocítico que envolve a mobilização de lisossomos da região perinuclear para o

sítio de invasão e sua subsequente fusão com a membrana do vacúolo parasitóforo (Schenkman *et al.*, 1991; Tardieux *et al.*, 1994), que resulta na passagem obrigatória por um vacúolo ácido (Ley *et al.*, 1990; Tardieux *et al.*, 1992) onde tem início o processo de diferenciação. A diferenciação celular inicia-se pelo arredondamento do parasita com o flagelo todo associado ao corpo, seguido pelo seu encurtamento e mudança da estrutura do cinetoplasto, adquirindo a forma de bastão. Cerca de 2 horas após a invasão, inicia-se a fragmentação da membrana do vacúolo parasitóforo (Carvalho & De Souza 1987) e as formas arredondadas do *T. cruzi* (amastigotas) passam a viver no citoplasma da célula hospedeira. Uma vez no citoplasma, os amastigotas permanecem algumas horas quiescentes (dependendo da cepa) e posteriormente, iniciam um processo de divisão celular por fissão binária. Após sucessivas divisões no interior da célula hospedeira, as formas amastigotas se diferenciam em epimastigotas intracelulares (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999) e na etapa seguinte, em tripomastigotas (a forma infectiva do parasita) que, por ruptura da célula hospedeira, são liberados para o meio extracelular. Uma vez na corrente sangüínea, os tripomastigotas podem invadir células de outros tecidos do hospedeiro ou serem ingeridos pelo inseto vetor. Um ciclo alternativo pode ocorrer no hospedeiro vertebrado caso formas amastigotas, que se originem da lise prematura de células infectadas (Behbehani 1973; Nogueira & Cohn 1976; Carvalho *et al.*, 1981; Umezawa *et al.*, 1985), invadam células fagocíticas profissionais ou não profissionais. Dentro da célula, os amastigotas sobrevivem e mantêm o ciclo infectivo do parasita (Ley *et al.*, 1990).

Capítulo 1

L-Prolina como Fator de Diferenciação Intracelular de *Trypanosoma cruzi*

Introdução

METABOLISMO INTERMEDIÁRIO EM *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta uma série de características que o tornam singular quanto à utilização de carboidratos como fonte de energia. Neste organismo, a transição da anaerobiose para aerobiose é acompanhada por um rápido aumento na velocidade de utilização da glicose, numa situação inversa ao “Efeito Pasteur” (Cannata & Cazzulo 1984). Nestas condições, a glicose é degradada incompletamente, resultando em uma mistura final de CO₂, ácidos mono- e dicarboxílicos (principalmente succinato) e pequenas quantidades de alanina e acetato (Cannata & Cazzulo 1984; Cazzulo 1992).

A via glicolítica, nestes parasitas, não está regulada nos pontos clássicos de controle (hexoquinase e fosfofrutoquinase) e está contida, até gliceraldeído-1,3-bisfosfato (G-1,3-BP), em uma organela denominada de glicossomo por Oppenheimer e Borst (Oppenheimer & Borst 1977). O fosfoenolpiruvato (PEP) produzido no citossol tem dois destinos: um que leva a acetato e CO₂ na mitocôndria via piruvato quinase citoplasmática (PK) ou a succinato (produto final no glicossomo), sendo esta via confirmada pela presença de uma fumarato redutase glicossomal em *T. brucei* e em epimastigotas de *T. cruzi* (Besteiro *et al.*, 2002).

Epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de utilizar tanto glicose como aminoácidos, excretando no meio de cultivo alguns catabólitos de glicose e NH₃ (Von Brand & Agosin 1955; Von Brand 1967). Glicose é preferida aos aminoácidos e é consumida, primeiramente, quando ambos estão presentes (Cannata & Cazzulo 1984; Cazzulo *et al.*, 1985). De fato, foi demonstrado que o crescimento de

Capítulo 1

Introdução

A observação segundo a qual os aminoácidos têm funções de reserva energética no processo de remodelação celular que ocorre durante a diferenciação de epimastigota a tripomastigota metacíclico (Rodriguez *et al.*, 1990), bem como o bloqueio da diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos pela inibição da cruzipaina (protease abundante em *T. cruzi*) (Bonaldi *et al.*, 1991).

indica que os aminoácidos derivados da hidrólise de proteínas podem servir, em várias circunstâncias, como fonte de carbono e energia para o parasita.

Outros fatos indicam a capacidade do parasita de utilizar aminoácidos como fonte de carbono e energia, a julgar pela habilidade em metabolizar, de maneira rápida e completa, leucina e prolina a CO₂, succinato e L-alanina (Cazzulo 1984). Pequenas quantidades de acetato também estão presentes (Frydman *et al.*, 1990). Estes dados são confirmados pela existência de uma alta concentração intracelular de aminoácidos no parasita, aproximadamente, mais da metade, L-alanina, (Williamson 1963). Prolina, glicina e ácido glutâmico também são abundantes (O'Daly *et al.*, 1983).

FATORES ENVOLVIDOS NA DIFERENCIAÇÃO

Cada um dos estágios do processo de diferenciação do *T. cruzi*, foi experimentalmente estabelecido *in vitro*. A transformação de tripomastigotas a amastigotas é possível através de culturas celulares de *Trypanosoma cruzi* (Andrews & Colli 1982), assim como a metaciclogênese pode ser reproduzida em meio líquido sob uma variedade de condições. Neste sentido, a metaciclogênese pode ser induzida em culturas axênicas quimicamente definidas (Contreras *et al.*, 1985), por componentes do soro (Dusanik 1980), stress metabólico (Castellani *et al.*, 1967), por um peptídeo de 10 kDa obtido a partir de intestino de *T. infestans* e cuja seqüência demonstra ser idêntica à da α -D-globina de frango (GDF) (Isola *et al.*, 1986; Fraidenraich *et al.*, 1993), ou cAMP exógeno (Rangel-Aldao *et al.*, 1987; Gonzales-Perdomo *et al.*, 1988), entre outros.

Outros fatores, como proteínas quinase e proteínas fosfatase associadas às mudanças nos padrões de fosforilação de proteínas ao longo do ciclo do parasita também foram identificados (Erondy & Donelson 1991; Ochatt *et al.*, 1993; Oguetta *et al.*, 1994; Bakalara *et al.*, 1995). Recentemente, um grupo de proteínas fosfatase sensíveis à Caliculina A foram envolvidas no processo de diferenciação, *in vitro*, de tripomastigotas a amastigotas (Grellier *et al.*, 1999).

Vários autores propuseram a existência de uma relação entre metabolismo e diferenciação celular em *T. cruzi*. Um meio que se baseia na composição da urina do inseto vetor (TAU - Triatomine Artificial Urine), suplementado com aminoácidos (L-prolina, L-glutamato e L-aspartato), permitiu a diferenciação de epimastigotas de *T. cruzi* a tripomastigotas metacíclicos, após 72 h de cultivo a

28°C (Contreras *et al.*, 1985). Homsy *et al.* confirmaram os resultados obtidos por Contreras e colaboradores mostrando que, para uma cultura de epimastigotas mantidos em meio TAU, a metaciclogênese ocorre, quando se adiciona L-prolina ao meio de cultivo. Outro aminoácido, L-glutamato, também estimulou o processo de diferenciação enquanto L-leucina e L-isoleucina (aminoácidos que bloqueiam o catabolismo de L-prolina) mostraram-se inibidores da diferenciação induzida por este aminoácido (Homsy *et al.*, 1989). Estes resultados sugeriram que a prolina pode ser uma fonte de energia para a transformação, uma vez que muitos tripanossomatídeos, incluindo-se *T. cruzi*, são capazes de catabolizar este aminoácido via prolina oxidase, para suprir suas necessidades energéticas (Evans & Brown 1972; Sylvester & Krassner 1976; Krassner & Flory 1977).

Na diferenciação do *Trypanosoma cruzi*, em cultura de tecido, outros fatores foram descritos como sendo importantes no processo, entre eles a cepa do parasita (Bertelli *et al.*, 1977) e a temperatura (Neva *et al.*, 1961; Brener *et al.*, 1976).

Objetivos

Alguns trabalhos indicam o papel relevante da L-prolina como um fator de diferenciação, *in vitro*, de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*. No entanto, não há dados na literatura, sobre um possível papel deste aminoácido na diferenciação intracelular do parasita.

A caracterização de uma forma intermediária, epimastigota intracelular, durante o processo de diferenciação de amastigotas a tripomastigotas em culturas celulares infectadas por *T. cruzi*, leva-nos a questionar se esta transformação, a exemplo do que ocorre na transformação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos *in vitro*, é influenciada por L-prolina.

Estabeleceram-se como objetivos:

- i. Avaliar o papel da L-prolina sobre o ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi* em culturas de células CHO-K1, infectadas com tripomastigotas do clone CL-14;
- ii. Avaliar a atividade de transporte de L-prolina nos diferentes estágios de desenvolvimento encontrados no hospedeiro vertebrado.
- iii. Determinar as concentrações intracelulares de prolina livre nos estágios intracelulares.

Resultados

EFEITO DA L-PROLINA NO CICLO INTRACELULAR DE *T. cruzi*

Para que se estabelecesse uma correlação entre L-prolina e o desenvolvimento do ciclo intracelular do *T. cruzi*, utilizou-se como sistema experimental, cultura de células CHO-K1 que são auxótroficas para L-prolina, pois não possuem uma das enzimas envolvidas na conversão de ácido glutâmico a glutamato semialdeído (um dos passos iniciais na síntese de L-prolina), requerendo a sua adição ao meio de cultivo para o crescimento celular (Kao & Puck 1967). Nestas condições, acompanhou-se a eclosão de formas tripomastigotas, a forma final no ciclo intracelular do parasita, em culturas de células CHO-K1, infectadas e mantidas em DMEM com 2% SFB sem adição de L-prolina ou suplementado com diferentes concentrações de L-prolina (200 μ M, 20 μ M). O papel da L-prolina no ciclo intracelular do *T. cruzi* pôde ser observado a partir do 6º dia pós-infecção, quando se tornou evidente a presença de tripomastigotas livres no meio de cultivo. Para todas as concentrações de L-prolina observou-se um mesmo perfil de eclosão de tripomastigotas, que se iniciou no 5º dia pós-infecção e atingiu o pico máximo de eclosão no 7º dia pós-infecção (Figura 1-1). A análise do número de tripomastigotas eclodidos, nas diferentes condições, demonstrou que as culturas celulares mantidas na presença de L-prolina 200 μ M apresentaram 2,5 vezes mais formas tripomastigotas eclodidas, quando comparadas às que se mantêm a uma concentração igual a 20 μ M e 3,8 vezes mais tripomastigotas comparadas às que se mantêm na ausência de L-prolina.

Para verificar se a reduzida eclosão de tripomastigotas nas culturas que se mantinham na ausência ou presença de baixas concentrações de L-prolina (20 μ M) não era devido à morte das células hospedeiras, avaliou-se a viabilidade destas células infectadas ou não, em DMEM, suplementado com L-prolina nas três concentrações utilizadas. Independentemente de estarem infectadas ou não, 80% das células CHO-K1, mantinham-se viáveis, após 10 dias em DMEM, quando continham 2% de soro fetal bovino e sem adição de prolina. Praticamente 100% das células encontravam-se viáveis, quando se adicionava prolina em concentrações acima de 20 μ M.

Figura 1-1 Eclosão de tripomastigotas do 5º ao 10º dia pós-infecção de células CHO-K1 infectadas por *T. cruzi* e mantidas em DMEM com 2% de SFB na ausência ou presença de diferentes concentrações de L-prolina. Símbolos: (■) L-prolina 200 µM; (●) L-prolina 20 µM; (★) L-prolina 0 µM. A figura é representativa de três experimentos independentes.

EFEITO DA TEMPERATURA NA ECLOSÃO DE TRIPOMASTIGOTAS

Neva e colaboradores (Neva *et al.*, 1961) demonstraram que a temperatura é uma variável que afeta a infecção por *Trypanosoma cruzi*, nos hospedeiros vertebrados e posteriormente, Brener *et al.* (Brener *et al.*, 1976) estabeleceram que este fenômeno é cepa-dependente. No caso da cepa CL, o processo de diferenciação ocorre em alto percentual nas células infectadas, a uma temperatura de 33°C e não a 37°C. Dessa forma, avaliou-se a termo-sensibilidade deste sistema de infecção para o clone CL-14 (um clone derivado da cepa CL). Quando as células CHO-K1 foram infectadas a uma temperatura de 37°C, mas mantidas a 33°C, observou-se de 7 a 10 vezes mais formas tripomastigotas eclodidas, quando comparada às culturas controle cuja infecção e manutenção foram feitas a 37°C, corroborando o dado presente na literatura para a cepa de que se origina o clone CL-14. A partir deste resultado definiram-se as temperaturas de 33°C e 37°C como permissiva e restritiva para desenvolvimento do ciclo intracelular do *T. cruzi*, respectivamente. Esta observação deve ser levada em consideração pelos grupos que determinam o genoma do clone CL-Brener, este também um clone derivado da cepa CL.

EFEITO DA L-PROLINA NA ECLOSÃO DE TRIPOMASTIGOTAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Como a temperatura é uma variável relevante na diferenciação intracelular do *Trypanosoma cruzi*, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de L-prolina em culturas celulares infectadas e mantidas em estufa nas temperaturas permissiva e restritiva. Em cada caso, acompanhou-se diariamente o número de formas

tripomastigotas eclodidas, a partir do 5º dia pós-infecção, quando a presença destas formas era evidente, até o 10º dia pós-infecção. Confirmando nossos resultados prévios, a eclosão de tripomastigotas mostrou-se dependente da temperatura e da concentração de L-prolina presente no meio de cultivo (Figura 1-2). As culturas mantidas à temperatura de 33°C apresentaram, no mínimo, 4 vezes mais (culturas mantidas sem L-prolina) tripomastigotas eclodidos, comparadas àquelas cuja manutenção foi feita a uma temperatura de 37°C. Considerando-se as diferentes concentrações do aminoácido no meio de cultura, ratificaram-se os resultados prévios, onde se demonstrou uma relação dose-dependente entre eclosão de tripomastigotas e L-prolina. Nas culturas celulares, infectadas e mantidas a 33°C em presença de 200 μM de L-prolina o número de tripomastigotas livres no meio foi aproximadamente 7 vezes maior, quando comparadas àquelas mantidas à mesma temperatura, mas sem adição de L-prolina. Esta diferença é de 1,8 vezes naquelas cuja manutenção foi feita em presença de L-prolina 20 μM (Figura 1-2).

Figura 1-2 Número total de tripomastigotas eclodidos entre o 5º e 10º dia pós-infecção para culturas de células CHO-K1 infectadas e mantidas na ausência ou presença de diferentes concentrações de L-prolina (20 μM e 200 μM) nas temperaturas restritiva (37°C) e permissiva (33°C). Figura representativa de três experimentos independentes.

EFEITO DO CARENCIAMENTO DE L-PROLINA NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS INFECTADAS POR *T. cruzi* EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO

Como foi estabelecido, a eclosão de tripomastigotas está relacionada à L-prolina de maneira dose-dependente, no entanto, as células hospedeiras mantêm uma concentração intracelular de L-prolina livre e metabólitos intermediários relacionados, que poderiam influenciar no ciclo intracelular do parasita. Para que se avaliasse este efeito, as células hospedeiras foram cultivadas por 5 dias em

DMEM contendo 10% SFB (sem a adição de L-prolina livre) e após infecção, as culturas celulares foram mantidas na ausência ou presença de L-prolina (200 μ M) sendo que o número de tripomastigotas eclodidos foi acompanhado diariamente por um período de 10 dias. As formas tripomastigotas extracelulares tornaram-se evidentes a partir do 5º dia pós-infecção em ambas as condições de cultivo. O pré-carenciamento de L-prolina, nas células hospedeiras, reduziu em mais de 90% o número de tripomastigotas eclodidos, quando as culturas foram mantidas a 37°C. Para os cultivos a 33°C houve uma redução de aproximadamente 26% no número de tripomastigotas livres (Figura 1-3).

Figura 1-3 Número total de tripomastigotas eclodidos entre o 5º e 10º dia pós-infecção para culturas de células CHO-K1 pré-carenciadas de L-prolina, infectadas e mantidas na ausência ou presença de 200 μ M de L-prolina, nas temperaturas restritiva (37°C) e permissiva (33°C).

EFEITO DA L-PROLINA NAS FORMAS INTRACELULARES A DIFERENTES TEMPERATURAS

Uma vez verificada a relação entre eclosão de tripomastigotas e concentração de L-prolina presente no meio de cultivo, verificou-se o efeito da ausência e da presença de 200 μ M de L-prolina no número de formas intracelulares (amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas) entre o 5º e 10º dia pós-infecção para culturas mantidas a 33°C ou 37°C

Nas culturas mantidas a 33°C, verificou-se um maior número de formas intracelulares, quando em presença de L-prolina 200 μ M. Estes cultivos apresentaram 7,8 vezes mais formas amastigotas, 6 vezes mais epimastigotas intracelulares e 12 vezes mais tripomastigotas, quando comparados aos cultivos mantidos na mesma temperatura sem L-prolina (Figura 1-4).

O mesmo pode ser observado nas culturas celulares infectadas e mantidas a 37°C, porém os cultivos mantidos em presença de L-prolina apresentaram um maior número de formas intracelulares quando comparados àqueles sem a adição do aminoácido (Figura 1-5).

Figura 1-4 Número total de formas intracelulares entre o 5° e 10° dia pós-infecção para culturas de células CHO-K1 infectadas e mantidas a 33°C na ausência ou presença de L-prolina 200 μM.

Figura 1-5 Número total de formas intracelulares entre o 5° e 10° dia pós-infecção para culturas de células CHO-K1 infectadas e mantidas a 37°C na presença de L-prolina 200 μM ou na ausência de L-prolina.

Quando se analisa o efeito da temperatura em ambas as concentrações de L-prolina, verifica-se que as que se mantiveram à temperatura de 37°C tiveram uma redução no número total de todas as formas intracelulares. O efeito da temperatura é mais pronunciado na transição epimastigotas intracelulares - tripomastigotas intracelulares, dado que a relação amastigotas/epimastigotas intracelulares para uma mesma concentração de L-prolina e diferentes temperaturas mantém-se praticamente inalterada.

EFEITO DA L-PROLINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS ESTÁGIOS INTRACELULARES DE *T. cruzi*

Na tentativa de se determinar qual ou quais estágios intracelulares requerem a presença de L-prolina para completar o processo de divisão ou remodelamento celular, desenvolveu-se um experimento cujo protocolo e resultados estão desenhados no esquema 1-1. As células CHO-K1 foram infectadas e mantidas a 33°C sem a adição de L-prolina até o 2º dia pós-infecção, quando no mínimo 85% das formas intracelulares correspondiam a amastigotas (Figura 1-6 a, d). Neste dia, à metade das culturas, adicionou-se L-prolina a uma concentração final de 200 μ M. As culturas, contendo ou não L-prolina, foram mantidas em estufa, enquanto se permitia que o ciclo intracelular do parasita se desenvolvesse até que, no mínimo, 85 % das formas intracelulares fossem epimastigotas (5º dia pós-infecção) (Figura 1-6 b, e). Neste ponto, 200 μ M de L-prolina foram adicionados à metade das culturas mantidas sem este aminoácido, bem como àquelas que receberam L-prolina no 2º dia pós-infecção. A outra metade das culturas continuou sem a presença de L-prolina. Todas as culturas foram incubadas até que o ciclo intracelular do parasita se completasse com a diferenciação a formas tripomastigotas e posterior eclosão (Figura 1-6 c, f).

Figura 1-6 Formas intracelulares ao longo do ciclo intracelular do *T. cruzi*. (a, d) amastigotas; (b, e) epimastigotas intracelulares; (c, f) tripomastigotas. As imagens d, e, f correspondem às imunofluorescências com anticorpo policlonal α -*Trypanosoma cruzi*, cepa CL. Os núcleos foram corados com rodamina.

Nestas condições, obtiveram-se culturas em que: (a) ambos os estágios intracelulares (amastigotas e epimastigotas) se desenvolveram na presença de L-prolina; (b) somente o estágio epimastigota intracelular esteve em presença de L-prolina; (c) somente o estágio amastigota esteve em presença de L-prolina; (d) nenhum dos estágios intracelulares (amastigotas epimastigotas) esteve em presença de L-prolina (Esquema 1-1).

Esquema 1-1

Em todos os casos, contou-se o número de tripomastigotas extracelulares do 5º ao 10º dia pós-infecção. O pico de eclosão, nas diferentes culturas, ocorreu entre o 7º e 8º dia pós-infecção não havendo, aparentemente, nenhuma relação entre tempo de desenvolvimento do ciclo intracelular e a presença de L-prolina (Figura 1-7). As culturas que se mantiveram em presença de L-prolina ao longo de todo o ciclo intracelular, ou seja, em ambos os estágios intracelulares de desenvolvimento (amastigotas e epimastigotas), mostraram o maior número de formas tripomastigotas eclodidas. Quando se comparou o número de tripomastigotas extracelulares entre os demais cultivos, verificou-se uma maior eclosão naquelas em que as formas epimastigotas intracelulares foram alimentadas com L-prolina.

Figura 1-7 Curva de eclosão (A) e número total de tripomastigotas eclodidos (B) entre o 5º e 10º dia pós-infecção para células CHO-K1 infectadas por *T. cruzi* e mantidas: (■ - a) em presença de L-prolina em ambos os estágios intracelulares (amastigotas e epimastigotas); (● - b) em presença de L-prolina somente em epimastigotas intracelulares; (▲ - d) sem L-prolina em ambos estágios intracelulares (amastigotas e epimastigotas); (★ - c) em presença de L-prolina somente em amastigotas.

TRANSPORTE DE L-PROLINA NOS ESTÁGIOS DO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

A utilização de L-prolina para crescimento, divisão ou diferenciação dos estágios intracelulares, pode ser dependente do transporte deste aminoácido do meio extracelular para o citoplasma. Neste contexto, avaliou-se a atividade de transporte de L-prolina nos três estágios intracelulares, encontrados em culturas celulares infectadas por *T. cruzi*, comparando-os com os dados sobre o transporte de L-prolina em epimastigotas axênicos. Em epimastigotas extracelulares (axênicos), o transporte de prolina mostrou uma curva bifásica que sugere a existência de dois sistemas de transporte, denominados sistemas A e B, com diferentes afinidade e capacidade (Sistema A: $K_m = 0,31 \text{ mM}$, $V_{máx} = 0,012 \text{ nmol}/2 \times 10^7 \text{ céls.min}$; Sistema B: $K_m = 1,36 \text{ mM}$, $V_{máx} = 0,065 \text{ nmol}/2 \times 10^7 \text{ céls.min}$). Estes resultados já foram publicados e uma separata encontra-se anexa a esta tese (Silber *et al.*, 2002). Todos os estágios intracelulares e os tripomastigotas liberados no meio apresentaram um perfil de transporte de L-prolina semelhante aos epimastigotas axênicos, na forma e em valores de K_m , que indicam a presença de ambos os transportadores. Em concentrações de saturação para ambos os sistemas (0,75 mM e 3,0 mM), a atividade de transporte foi maior nos epimastigotas intracelulares, sendo aproximadamente 15 e 23 vezes maior do que em amastigotas e tripomastigotas, respectivamente. A diferença na atividade de transporte entre tripomastigotas e amastigotas é de aproximadamente 0,70 vezes nas duas concentrações (Figura 1-8).

Figura 1-8 Atividade de transporte de L-prolina nos estágios correspondentes ao hospedeiro vertebrado nas concentrações de saturação (0,75 mM e 3,0 mM) descritas para os dois sistemas de transporte de L-prolina em epimastigotas extracelulares.

CONTEÚDO INTRACELULAR DE PROLINA LIVRE

Para que se avalie a existência de uma correlação entre atividade de transporte de L-prolina e o conteúdo intracelular de prolina livre, determinou-se a concentração intracelular deste aminoácido nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita, bem como na célula hospedeira, todos obtidos de cultivos com DMEM com 2% de SFB e suplementado com 200 μ M de L-prolina (Tabela I). Os epimastigotas axênicos, também utilizados nesta análise, possuem a maior concentração de prolina livre, (6,55 mM) quando comparados aos estágios correspondentes ao hospedeiro vertebrado. Quando estes últimos foram comparados, verificou-se que amastigotas apresentam a maior concentração intracelular de prolina, apesar da baixa atividade de transporte deste aminoácido, seguido pelos tripomastigotas. Epimastigotas intracelulares, por outro lado, apresentaram a menor concentração de prolina livre, mesmo tendo a maior capacidade de transportá-lo. As células CHO-K1 apresentaram uma concentração de prolina 0,27 mM, valor próximo ao K_m descrito para o transportador de L-prolina de alta afinidade.

Posteriormente, o conteúdo intracelular de prolina livre foi confirmado por separação dos aminoácidos por cromatografia de troca iônica. Os valores de número de moles obtidos nesta análise foram utilizados na determinação das molaridades empregando-se, para tanto, volumes de água descritos na literatura (Rohloff *et al.*, 2003) que confirmaram os resultados obtidos e apresentados na Tabela 1-1.

Tabela 1-1 Concentração intracelular de prolina livre em diferentes estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* e na célula hospedeira CHO-K1.

	[Pro] (mM)
Amastigotas	6,61 ± 0,01
Epimastigotas Intracelulares	0,73 ± 0,01
Tripomastigotas	2,74 ± 0,01
Epimastigotas Extracelulares	6,55 ± 0,04
CHO-K1	0,27 ± 0,03

Com a separação dos aminoácidos por cromatografia pode-se avaliar o perfil de aminoácidos em diferentes estágios de desenvolvimento. A representação do perfil de aminoácidos nos epimastigotas extracelulares e intracelulares, expresso como percentual dos aminoácidos totais detectados, mostra que os aminoácidos alanina, arginina, glicina, histidina, prolina e ácido glutâmico/glutamina são os aminoácidos mais abundantes em epimastigotas extracelulares. Nos epimastigotas intracelulares, no entanto, são encontradas concentrações significativas de ácido aspártico/asparagina, tirosina, glicina, histidina, lisina e alanina (Figura 1-9).

Figura 1-9 Comparação do perfil de aminoácidos de extratos de epimastigotas extracelulares e intracelulares. Os resultados estão expressos como percentual de abundância de cada aminoácido em relação à concentração total de aminoácidos detectados.

Discussão

A diferenciação de epimastigotas extracelulares a tripomastigotas no tubo digestivo do inseto vetor, a metaciclogênese, é o processo de diferenciação melhor estudado em *T. cruzi*.

Quando a diferenciação foi feita em meio definido, demonstrou-se que este processo é dependente de prolina (Contreras *et al.*, 1985). Homsy *et al.* (Homsy *et al.*, 1989) confirmaram este resultado e sugeriram que prolina seria um combustível para o remodelamento celular.

O clone CL-14 de *T. cruzi* foi utilizado na caracterização de formas intermediárias, as epimastigotas intracelulares, durante a transformação de amastigotas a tripomastigotas (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999) e como se observou em experimento prévio, a existência de um grande número de formas epimastigotas intracelulares nos cultivos, decidiu-se verificar o efeito direto deste aminoácido sobre os estágios de desenvolvimento intracelular.

Para que se investigasse o papel da L-prolina no ciclo intracelular do *T. cruzi*, utilizou-se um sistema de infecção constituído por uma linhagem celular que apresenta uma auxotrofia para prolina. As células CHO-K1 são deficientes em uma das enzimas responsáveis pela conversão de ácido glutâmico a glutamato semialdeído, um dos primeiros passos na via sintética de prolina (Kao & Puck 1967). Portanto, a prolina utilizada por estas células deriva do meio de cultivo ou da degradação proteica intracelular. Emmerson & Phang (Emmerson & Phang 1993) demonstraram que oligopeptídeos que contenham resíduos de prolina ou hidroxiprolina C-terminal (X-Pro) quando clivados por uma prolidase citossólica fornecem concentrações suficientes de prolina para sustentar um crescimento normal das células CHO-K1 (Emmerson & Phang 1993). Também verificou-se em experimentos de viabilidade celular que as células CHO-K1 são capazes de se manter viáveis por um período de 10 dias em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. SFB deve ser o fornecedor de prolina, além da degradação endógena de proteínas.

Assim, pôde-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de L-prolina adicionadas a culturas de células CHO-K1 infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

Nestas condições verificou-se que o número de formas tripomastigotas eclodidos do 5º ao 10º dia pós-infecção é dependente da concentração de L-prolina (Figura 1-1).

Verificou-se também que este clone é temperatura-sensível, uma vez que tripomastigotas eclodem majoritariamente na temperatura permissiva. De fato, avaliou-se a eclosão de formas tripomastigotas, forma final do ciclo intracelular, nas temperaturas de 33°C e 37°C. O número de formas tripomastigotas eclodidas foi maior quando ocorreu a manutenção das culturas a 33°C, o que leva à definição desta temperatura como permissiva para o desenvolvimento do ciclo intracelular e a temperatura de 37°C como restritiva (Figura 1-2 e Figura 1-3). Estes dados confirmam a observação de que a diferenciação intracelular do *Trypanosoma cruzi* da cepa CL, da qual se origina o clone CL-14, completa-se à temperatura de 33°C (Brener *et al.*, 1976; Bertelli *et al.*, 1977). Seria muito interessante saber se o clone CL-Brener escolhido pelo projeto genoma do *Trypanosoma cruzi*, tem o mesmo comportamento. É importante ressaltar que não se observou restrição da temperatura na etapa de invasão das células hospedeiras pelo *T. cruzi*.

Os efeitos de L-prolina e da temperatura foram confirmados, quando se analisava a eclosão de tripomastigotas em culturas mantidas na ausência ou presença de L-Prolina (20 µM e 200 µM) e a diferentes temperaturas de cultivo (33°C ou 37°C) (Figura 1-2). Culturas celulares infectadas, mantidas a 33°C e contendo 200 µM de L-prolina, apresentaram o maior número de formas tripomastigotas eclodidas. Houve uma redução de 87% no número de tripomastigotas eclodidos, quando as culturas que continham a mesma concentração de L-prolina foram incubadas a 37°C. Na ausência de prolina, verificou-se uma diminuição na eclosão, sendo que nas culturas mantidas a 37°C, praticamente não há eclosão.

Também foi analisada a influência da diminuição da concentração intracelular de prolina e metabólitos intermediários sobre a eclosão de tripomastigotas em células hospedeiras carenciadas em L-prolina, previamente à infecção (Figura 1-3). Neste caso verificou-se uma diminuição de aproximadamente 90% no número de tripomastigotas eclodidos em culturas pré-carenciadas e mantidas a 37°C. Para os cultivos a 33°C, houve uma redução de somente 26%, na eclosão de tripomastigotas.

A análise das formas intracelulares entre o 5º e 10º dias pós-infecção mostrou, para as duas temperaturas, um menor número de formas intracelulares nos cultivos

mantidos sem L-prolina. Nas condições experimentais, foi avaliado o número de parasitas intracelulares a partir do 5º dia pós-infecção, explicando a observação de um pequeno número de amastigotas intracelulares, uma vez que estas formas estão presentes majoritariamente entre o 2º e o 3º dias pós-infecção. É interessante que nos cultivos mantidos a 33°C nota-se a existência de formas tripomastigotas intracelulares e a eclosão das mesmas, fato este não observado nos cultivos mantidos a 37°C.

A utilização de prolina como fonte de energia pelo *T. cruzi* está baseada na degradação de proteínas ou na capacidade de transportá-la do meio extracelular para o citoplasma da célula. Portanto, a medida da atividade de transporte é um dado importante do metabolismo deste aminoácido pelo parasita. Todos os estágios intracelulares foram capazes de transportar L-prolina e apresentaram um perfil bifásico de transporte, que sugere a existência de dois sistemas transportadores, assim como o descrito para epimastigotas extracelulares. As formas epimastigotas intracelulares que foram demonstradas anteriormente requerem prolina para completar a diferenciação a tripomastigotas, apresentaram a maior atividade de transporte entre os estágios correspondentes ao hospedeiro vertebrado, enquanto que a menor atividade foi observada nos amastigotas (Figura 1-8).

A partir da observação de diferenças na atividade de transporte de L-prolina entre os estágios, e dos dados na literatura sobre a capacidade de epimastigotas axênicos poderem acumular altas concentrações intracelulares de aminoácidos entre eles L-prolina (Williamson 1963; Silber *et al.*, 2002), considerou-se de interesse avaliar a concentração intracelular de prolina livre nos diferentes estágios. Amastigotas apresentaram a maior concentração de prolina (6,61 mM), seguida por tripomastigotas (2,74 mM) e epimastigotas intracelulares (0,73 mM). Em todos os casos, a concentração intracelular de prolina em *T. cruzi* é maior que a medida na célula CHO-K1 não infectada. Vale salientar que estes valores estão na mesma ordem de grandeza (mM) determinada em epimastigotas de outras cepas como Y, MA e FL onde a concentração intracelular de prolina livre variou de 6 mM a 14 mM (O'Daly *et al.*, 1983). A alta atividade de transporte de prolina e sua baixa concentração intracelular (comparativamente aos outros estágios) sugerem uma grande capacidade de consumo deste aminoácido em epimastigotas intracelulares possivelmente para completar a diferenciação a tripomastigotas. No entanto, a concentração intracelular de prolina nos diferentes estágios e na célula hospedeira

está sendo confirmada por análise cromatográfica e ampliada para os demais aminoácidos.

De acordo com Engel e colaboradores (Engel *et al.*, 1987), amastigotas obtidos, em meio axênico, consomem glicose durante a fase exponencial de crescimento e produzem duas vezes mais succinato e acetato, quando comparados aos epimastigotas cultivados nas mesmas condições. Os amastigotas axênicos não excretam NH_3 para o meio de cultivo e aparentemente a produção de amônia é concomitante à transformação deste estágio para epimastigotas (Engel *et al.*, 1987). A determinação da atividade de citocromos em amastigotas indicou que tanto o ciclo de Krebs quanto a cadeia respiratória, que são necessários à oxidação de aminoácidos, estão reprimidos nos amastigotas. No entanto, estes dados contradizem a observação de Rogerson & Gutteridge (Rogerson & Gutteridge 1979), que demonstram uma cadeia respiratória ativa em amastigotas, obtidos de culturas de células infectadas por *T. cruzi*. As diferenças observadas poderiam ser reflexo dos diversos amastigotas utilizados ou de diferenças na população de parasitas, uma vez que diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam diferentes conteúdos de citocromos (Schawarcs de Tarlovsky *et al.*, 1985). A capacidade das formas epimastigotas de *T. cruzi* metabolizarem aminoácidos já foi descrita por diversos autores (Sylvester & Krassner 1976; Cazzulo 1984) e dados da literatura sugerem que a transformação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos é sustentada pela utilização de proteínas e aminoácidos exógenos e dos provenientes do reservossomo, organelas de reserva de proteínas, contendo ou não lipídeos (tipo I e II, respectivamente) (Soares & De Souza 1988; Soares *et al.*, 1989). Soares e colaboradores confirmaram este dado ao observar o desaparecimento desta organela à medida que epimastigotas diferenciam-se a tripomastigotas metacíclicos (Soares *et al.*, 1992). Ao contrário do observado nos epimastigotas axênicos, epimastigotas intracelulares, aparentemente, não possuem reservossomos, uma vez que esta organela não foi identificada na caracterização deste estágio (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999), eliminando-se uma das fontes de proteínas e aminoácidos. Em células eucarióticas, a maioria das proteínas citossólicas é degradada nos proteassomos. Em *T. cruzi* demonstrou-se que a diferenciação de tripomastigotas a amastigotas em meio axênico, bem como o desenvolvimento intracelular do parasita de tripomastigotas a amastigotas é previnido na presença de inibidores do proteassomo (Gonzalez *et al.*, 1996; de Diego *et al.*, 2001). Proteínas também podem ser incorporadas pelo parasita por pinocitose, através da bolsa flagelar (De

Souza 1984) e parecem suprir as necessidades energéticas do parasita (Avila *et al.*, 1983).

O acidocalcissomo, descrito inicialmente em tripanossomatídeos como uma organela de armazenamento de cálcio (Docampo *et al.*, 1995), foi sugerida como sendo também um reservatório subcelular de osmólitos (como aminoácidos) e íons que seriam mobilizados em resposta a osmoregulação. Isto porque, em *L. major* o stress hipo-osmótico está associado com um aumento nos níveis de cálcio intracelular e cálcio parece ser um dos moduladores da liberação de aminoácidos do acidocalcissomo (Vieira *et al.*, 1997). O *T. cruzi* também está sujeito a flutuações osmóticas ao longo de seu ciclo de vida, decorrentes do estado de alimentação do inseto vetor (Kollien *et al.*, 2001) e também de mudanças ambientais como a saída do fagolisossomo para o citoplasma da célula hospedeira. Portanto, nestes casos aminoácidos do acidocalcissomo, como a prolina, poderiam ser mobilizados para manutenção do volume celular do parasita e poderiam contabilizar na concentração intracelular de L-prolina livre. No entanto Rohloff e colaboradores (Rohloff *et al.*, 2003) demonstraram que arginina e lisina correspondem a 90% do “pool” de aminoácidos do acidocalcissomo e que apesar de prolina estar entre os aminoácidos mobilizados durante a redução do volume celular ele não está presente no acidocalcissomo. Há que ressaltar que entre os aminoácidos, prolina é provavelmente o melhor osmólito, sendo acumulada em eubactérias, protozoários, inveterbrados marinhos e plantas (McCue & Hanson 1990; Delauney & Verma 1993).

Outros autores sugerem que o *T. cruzi* seria capaz de utilizar L-prolina como fonte de carbono, possivelmente através de um intermediário de D-prolina (Barret 1973). Resultados preliminares que se utilizaram um meio de cultura definido, indicaram que tanto os epimastigotas como os tripomastigotas metacíclicos são capazes de metabolizar L- ou D-prolina como única fonte de carbono (Reina-San-Martin *et al.*, 2000). O transporte de D-prolina, no entanto, não deve ser feito eficientemente pelos transportadores de L-prolina descritos (Silber *et al.*, 2002).

Outros tripanossomatídeos utilizam prolina para que seu ciclo de vida seja completado. Os epimastigotas de *T. congolense* diferenciam-se a tripomastigotas metacíclicos em presença de glutamina e prolina, sendo que esta transformação depende da concentração destes aminoácidos (Ross 1987). Em *Herpetomonas roitmani*, um tripanossomatídeo não patogênico, o número de formas promastigotas aumenta desde que as células cresçam em meio onde haja prolina

(Faria-e-Silva *et al.*, 2000). Nestas condições, verificou-se que estas células apresentavam uma mitocôndria maior, com mais cristas e uma maior atividade da succinato-citocromo *c* redutase (Faria-e-Silva *et al.*, 2000). Resultados prévios sugeriram que as condições de cultivo influenciam na composição da superfície de carboidratos e a carga da superfície em *H. roitmani* (Faria-e-Silva *et al.*, 1999) e que essas alterações poderiam estar relacionadas ao estado de diferenciação do parasita (Teixeira *et al.*, 1997). De fato, experimentos com RNAi, demonstraram que *T. brucei* pode “sentir” diferenças nos níveis de glicose do meio e modular a expressão de glicoproteínas de superfície como a prociclina (Morris *et al.*, 2002).

Ainda que a discussão do papel da prolina em *T. cruzi* esteja centrada na sua utilização como fonte de energia, é interessante ressaltar que, recentemente, foi descrita e caracterizada uma prolina racemase em tripomastigotas (Reina-San-Martin *et al.*, 2000), que ao ser secretada pelo parasita, atua como um potente mitógeno para células B, que desempenham um papel importante na evasão e resistência à ativação de linfócitos (Reina-San-Martin *et al.*, 2000). Embora se desconheça outro papel da D-prolina em *T. cruzi*, é preciso ressaltar que proteínas que contenham resíduos de D-aminoácidos são resistentes a proteases eucarióticas (Sela & Zisman 1997) e que em *Listeria monocytogenes* já foi demonstrado que a patogenicidade e a imunogenicidade de uma cepa requer a utilização de um D-aminoácido, a D-alanina (Thompson *et al.*, 1998). Também proteínas ricas em L-prolina podem ser essenciais à diferenciação do *T. cruzi*, que tem sua síntese afetada pelo baixo conteúdo de prolina intracelular.

Capítulo 2

Papel de Fosfatases na Diferenciação Celular de *T. cruzi*

Introdução

Espécies do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* apresentam formas celulares específicas, particulares de cada estágio de desenvolvimento, definidas pela posição do corpo basal, flagelo e cinetoplasto. O citoesqueleto dos tripanossomatídeos é constituído por uma rede altamente organizada de microtúbulos, que se associam entre si e com a membrana plasmática. Algumas das organelas, como a mitocôndria, o cinetoplasto, o corpo basal e o flagelo ocorrem como cópias únicas sendo que a duplicação dessas estruturas e sua mudança de posicionamento, durante o processo de diferenciação celular ao longo do ciclo de vida do parasita, funcionam como marcadores na determinação dos estágios de desenvolvimento (Woodward & Gull 1990).

A maioria das informações a respeito do citoesqueleto dos tripanossomatídeos provém de estudos realizados no tripanossomo africano *T. brucei*. O estudo do citoesqueleto das formas procíclicas de *T. brucei* (presente na mosca tse-tse) serve para ilustrar a organização básica que caracteriza todos os tripanossomatídeos flagelados. O flagelo único sai do bolso flagelar, na porção posterior da célula e está ligado ao corpo celular em toda a sua extensão por um sistema de microtúbulos/filamentos citoplasmáticos que se denomina zona de ligação do flagelo (FAZ – flagellar attachment zone) (Sherwin & Gull 1989). A FAZ é uma estrutura definida e invariável que está presente em um sítio específico, onde um único filamento percorre todo o corpo celular. Neste ponto, as membranas do flagelo e do corpo celular estão em contato e o flagelo está associado ao filamento citoplasmático interno. Além disso, de um lado dos filamentos, visto da porção posterior da célula, está um grupo de quatro microtúbulos associados ao retículo endoplasmático liso, sendo que esta estrutura básica, com algumas variações, pode ser encontrada em todos os tripanossomatídeos.

Durante o ciclo de desenvolvimento do *T. brucei*, a morfogênese do parasita é acompanhada pelas seguintes alterações: (1) alongamento do corpo basal; (2) formação de um novo flagelo no corpo basal posterior; (3) formação de dois novos corpos pró-basais; (4) extensão do flagelo; (5) divisão do cinetoplasto e dos corpos basais; (6) mitose; (7) citocinese (Sherwin & Gull 1989).

Em *T. cruzi*, as transformações morfológicas observadas durante o ciclo de vida também são acompanhadas por alterações no citoesqueleto, que favorecem o remodelamento do parasita e a redistribuição das organelas. Os microtúbulos representam o principal componente do citoesqueleto dos tripanossomatídeos, e a actina, o componente principal dos microfilamentos, já foi identificada em *T. cruzi* por microscopia de imunofluorescência utilizando-se anticorpos específicos para actina heteróloga de mamíferos (De Souza *et al.*, 1983). Os microtúbulos estão distribuídos por todo o corpo celular, exceto na região de ligação do flagelo ao corpo celular e na região do bolso flagelar sofrendo rearranjo durante as mudanças na forma celular.

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, o cinetoplasto também se altera, tanto em estrutura como na sua posição, em relação ao núcleo. O cinetoplasto consiste em uma estrutura altamente organizada de DNA (kDNA), contida no interior da mitocôndria, que pode representar cerca de 30% do DNA total da célula. A ultra-estrutura do cinetoplasto varia de acordo com o estágio do ciclo evolutivo. Nas formas multiplicativas amastigotas e epimastigotas, apresenta-se como um bastão com comprimento de 1 μm e espessura de 0,1 μm . Durante o processo de divisão celular, ocorre replicação do DNA cinetoplástico e, à medida que o processo de divisão prossegue, observa-se um aumento no comprimento da mitocôndria que, posteriormente, se divide ao meio em duas novas estruturas. Quando se inicia o processo de transformação da forma amastigota ou da epimastigota para tripomastigota, ocorrem modificações estruturais no DNA do cinetoplasto, com a rede de DNA que se torna menos compacta e a forma de bastão dá lugar a uma forma arredondada.

Objetivos

A literatura indica a existência de formas intermediárias na transformação de formas tripomastigotas a amastigotas, no interior de células infectadas por *T. cruzi*, que foram descritas como um estágio flagelado com cinetoplasto em forma de bastão, que sugere uma possível passagem, no processo de diferenciação de tripomastigotas a amastigotas, por um estágio semelhante aos epimastigotas encontrados no inseto vetor.

Alguns trabalhos apontam a fosforilação proteica como um fator envolvido no processo de remodelação celular em diversos organismos. Um destes, relatou a transformação de tripomastigotas de *T. cruzi* a amastigotas, na presença de Caliculina A, um inibidor de proteínas fosfatase 1 e 2A, após 4 horas de incubação com a droga.

Estes dados nos levaram a examinar a possível existência de formas semelhantes aos epimastigotas intracelulares, na transformação de tripomastigotas a amastigotas na presença de Caliculina A.

Resultados

Em trabalhos prévios, demonstrou-se, *in vitro*, que a diferenciação de tripomastigotas para amastigotas das cepas Tuhaluen, Y e Berenice de *Trypanosoma cruzi* pode ser induzida por Caliculina A (Grellier *et al.*, 1999). Estes resultados nos levaram a comparar o efeito da Caliculina A sobre tripomastigotas do clone CL-14, uma vez que apresenta, durante o processo de diferenciação intracelular, formas epimastigotas intracelulares. Para que se avaliasse o efeito da Caliculina A sobre tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-14, formas tripomastigotas foram incubadas em DMEM pH 7,4, na ausência ou presença de Caliculina A (1 nM ou 5 nM) por um período de 8 horas a 37°C. As amostras foram analisadas em microscópio de luz e fluorescência com corante DAPI com 0, 4, 6 e 8 horas pós-tratamento com Caliculina A. Ao longo deste período, observou-se o surgimento de formas arredondadas e a diminuição correlativa do percentual de formas tripomastigotas flageladas, de acordo com os dados publicados previamente.

CALICULINA A INDUZ TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DA CEPA Y A FORMAS AMASTIGOTAS-SÍMILE A 37°C

Após diferentes tempos de incubação com Caliculina A 1 nM, avaliou-se a morfologia celular por microscopia de contraste de fase e visualização do DNA em microscópio de fluorescência, após coloração com DAPI. Em meio de cultivo DMEM pH 7,4, Caliculina A 1 nM induz, no período de 8 h de incubação, remodelamento celular das formas tripomastigotas a formas que se assemelham aos amastigotas em tamanho, morfologia e na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (Figura 2-1). A transformação ficou bastante evidente após 6 horas de incubação, quando mais de 40% da população apresentava morfologia semelhante a amastigotas (Figura 2-1c). Nos tripomastigotas de *T. cruzi*, o núcleo e o cinetoplasto estão localizados, respectivamente, no meio da célula e na extremidade posterior do parasita. A coloração com DAPI, em luz U.V., permite visualizar o kDNA como uma coloração esférica na região posterior do parasita e uma coloração alongada do DNA nuclear (Figura 2-1e). Após 8 horas de incubação, o kDNA pôde ser visualizado como uma estrutura de bastão localizado

na porção anterior da célula mais próximo ao núcleo, como o observado para os amastigotas (Figura 1h).

Figura 2-1 Transformação de tripomastigotas da cepa Y a formas amastigotas-símile induzidas por Caliculina A 1 nM (CA) em pH neutro através de microscopia de contraste de fase (a, b, c, d) e fluorescência (e, f, g, h). (a, e) tripomastigotas controle após 8 h de incubação em meio sem CA; (b, f) células tratadas com CA por 4 h; (c, g) células tratadas com CA por 6 h; (d, h) células tratadas com CA por 8 h.

O processo de diferenciação pôde ser detectado após 4 h de tratamento sendo que o número de formas amastigotas aumentou até 8 h, quando aproximadamente 80% dos parasitas apresentaram uma forma arredondada aflagelada, característica do estágio amastigota (Figura 2-2). Ao contrário das células tratadas com Caliculina A, os tripomastigotas controle (Cont t0 e t8h) mantidos pelo mesmo período de tempo em DMEM pH 7,4, na ausência de droga, não apresentaram mudanças morfológicas como o desaparecimento de flagelo e arredondamento celular (Figura 2-2).

As formas tripomastigotas, mantidas em meio que continha Caliculina A 5 nM, apresentaram um menor número de formas amastigotas-símile, quando comparadas às que foram incubadas a uma concentração 5 vezes menor da droga (Figura 2-3). Aproximadamente, 45% da população de tripomastigotas apresentaram morfologia semelhante às formas amastigotas.

Figura 2-2 Transformação de tripomastigotas a formas amastigotas-símile na presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (cepa Y) foram incubadas a 37°C na presença de CA 1 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado. Controles correspondem à mesma população de parasitas mantida em meio de cultivo sem CA no tempo zero (Cont t0) e após 8 h de incubação (Cont t8h).

Figura 2-3 Transformação de tripomastigotas a formas amastigotas-símile em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (cepa Y) foram incubadas a 37°C na presença de CA 5 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado. Controles correspondem à mesma população de parasitas mantida em meio de cultivo sem CA no tempo zero (Cont t0) e após 8 h de incubação (Cont t8h).

CALICULINA A INDUZ TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DO CLONE CL-14 A FORMAS AMASTIGOTAS E EPIMASTIGOTAS-SÍMILE, A 37°C

Formas tripomastigotas do clone CL-14 foram submetidas ao mesmo tratamento com Caliculina A, descrito para a cepa Y. Após 4 horas de incubação, na presença da droga, verificou-se a transformação dos tripomastigotas a formas semelhantes, em tamanho e morfologia, aos epimastigotas intracelulares encontrados durante a diferenciação de tripomastigotas a amastigotas em cultura de tecido (Figura 2-4). Com 6 horas de incubação, mais de 50% dos parasitas estão diferenciados a esta forma e apresentam um cinetoplasto mais denso e próximo ao núcleo (Figura 2-4 c e g). Após 8 horas de incubação, pôde-se identificar uma população heterogênea de formas semelhantes aos epimastigotas e amastigotas (Figura 2-4 d e h).

Figura 2-4 Transformação de tripomastigotas do clone CL-14 a formas amastigotas-símile induzidas por Caliculina A (CA) em pH neutro através de microscopia de contraste de fase (a, b, c, d) e fluorescência (e, f, g, h). (a, e) tripomastigotas controle após 8 h de incubação em meio sem CA; (b, f) células tratadas com CA por 4 h; (c, g) células tratadas com CA por 6 h; (d, h) células tratadas com CA por 8 h.

Diferentemente do que foi observado para a cepa Y, os tripomastigotas do clone CL-14 apresentaram o mesmo perfil de diferenciação em ambas as concentrações de Caliculina A (1nM e 5 nM), como pode ser observado na Figura 2-5 e Figura 2-6. Em ambas as concentrações, mais de 90% dos tripomastigotas diferenciaram-se em outras formas.

Figura 2-5 Transformação de tripomastigotas a outras formas na presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 37°C na presença de CA 1 nM e analisadas o longo do tempo, como indicado. Controles correspondem à mesma população de parasitas mantida em meio de cultivo sem CA no tempo zero (Cont t0) e após 8 h de incubação (Cont t8h).

Figura 2-6 Transformação de tripomastigotas a outras formas em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 37°C na presença de CA 5 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado. Controles correspondem à mesma população de parasitas mantida em meio de cultivo sem CA no tempo zero (Cont t0) e após 8 h de incubação (Cont t8h).

Surpreendentemente, os tripomastigotas do clone CL-14 diferenciaram-se não somente em formas amastigotas, mas também em formas que se assemelham aos epimastigotas intracelulares. Assim, ao se basear em critérios morfológicos, presença de flagelo e sua posição relativa ao núcleo e o cinetoplasto, as formas obtidas da diferenciação de tripomastigotas foram contadas e classificadas em epimastigotas-símile ou amastigotas-símile. Inicialmente, a população de parasitas

constituía-se em 70% de tripomastigotas e aproximadamente 25% de amastigotas. Após 4 h de incubação, na presença de Caliculina A 1 nM ou 5 nM, houve uma diminuição nos tripomastigotas, para aproximadamente 45% da população e um aumento concomitante no percentual de formas epimastigotas-símile, até aproximadamente 30% da população de parasitas. Após 6 h de incubação, mais de 50% da população correspondia a formas epimastigotas-símile e, finalmente, ao final de 8 horas de incubação, todos os tripomastigotas estavam diferenciados a formas amastigotas (57%) ou epimastigotas-símile (45%) (Figura 2-7 e Figura 2-8).

Figura 2-7 Transformação de tripomastigotas a formas epimastigotas-símile e amastigotas-símile em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 37°C na presença de CA 1 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado.

Figura 2-8 Transformação de tripomastigotas a formas epimastigotas-símile e amastigotas-símile em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 37°C na presença de CA 5 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado.

CALICULINA A INDUZ TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DO CLONE CL-14 A FORMAS AMASTIGOTAS-SÍMILE A 33°C.

Uma vez que o clone CL-14, assim como a cepa da qual se origina, são termosensíveis, verificou-se o efeito da Caliculina A sobre tripomastigotas do clone CL-14 que foram mantidos em presença da droga e incubados a 33°C. Assim como o observado anteriormente para os tripomastigotas incubados a 37°C, após 4 horas de tratamento com Caliculina A (1 nM ou 5 nM), aproximadamente 50% da população de parasitas corresponde a formas diferenciadas e a diferenciação continua progressivamente até 8 horas de incubação (Figura 2-9 e Figura 2-10).

Figura 2-9 Transformação de tripomastigotas a outras formas em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 33°C na presença de CA 1 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado.

Figura 2-10 Transformação de tripomastigotas a outras formas em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 33°C na presença de CA 5 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado.

Após 6 horas de incubação, verificou-se um maior percentual de formas epimastigotas-símile (63%) para as células tratadas com uma concentração de Caliculina A 5 nM, quando comparadas às que se mantiveram na presença de 1 nM da droga (43%). Após 8 h de tratamento, aproximadamente 64% da população de parasitas correspondia a formas amastigotas-símile, independentemente da concentração de Caliculina A (Figura 2-11 e Figura 2-12).

Figura 2-11 Transformação de tripomastigotas a formas epimastigotas-símile e amastigotas-símile em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 33°C na presença de CA 1 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado.

Figura 2-12 Transformação de tripomastigotas a formas epimastigotas-símile e amastigotas-símile em presença de Caliculina A (CA). As formas tripomastigotas (clone CL-14) foram incubadas a 33°C na presença de CA 5 nM e analisadas ao longo do tempo, como indicado.

Deve-se ressaltar que em todos os casos, o tratamento de tripomastigotas de cultivo com Caliculina A resultou na redução da viabilidade celular em aproximadamente 50%. Talvez esse seja um fenômeno mais geral, uma vez que o mesmo ocorre quando a metaciclogênese é feita no meio TAU3AAG (Contreras *et al.*, 1985).

TRATAMENTO DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS DO CLONE CL-14 COM CALICULINA A A 37°C

Formas tripomastigotas metacíclicas obtidas da diferenciação de epimastigotas do clone CL-14 também foram submetidas a tratamento com Caliculina A, sendo que este estágio, no entanto, ao contrário do observado com tripomastigotas derivados de culturas celulares, não apresentaram alterações morfológicas durante o período de 8 h de incubação com Caliculina A 1 nM ou 5 nM. A análise da morfologia celular em microscopia de contraste de fase e a visualização do DNA por microscopia de fluorescência, após coloração com DAPI, revelaram a existência de um núcleo esférico localizado na região posterior da célula, bem como um cinetoplasto alongado no centro do corpo celular, após 8 h de tratamento com CA 1 nM (Figura 2-13 c e g) ou CA 5 nM (Figura 2-13 d e f). Formas tripomastigotas da cepa Y derivadas de culturas celulares infectadas por *T. cruzi*, foram utilizadas como controle e, conforme descrito anteriormente, diferenciaram-se a amastigotas-símile, ao final de 8 h de tratamento com CA (Figura 2-14)

Figura 2-13 Tratamento de formas tripomastigotas metacíclicas com Caliculina A (CA) em pH neutro através de microscopia de contraste de fase (a, b, c, d) e fluorescência (e, f, g, h). (a, e) tripomastigotas metacíclicas no tempo 0 de incubação em meio sem CA; (b, f) tripomastigotas metacíclicas controle após 8 h de incubação em meio sem CA; (c, g) células tratadas com CA 1 nM por 8 h; (d, h) células tratadas com CA 5 nM por 8 h.

Figura 2-14 Transformação de tripomastigotas da cepa Y a formas amastigotas-símile induzidas por Caliculina A (CA) em pH neutro através de microscopia de contraste de fase (a, b) e fluorescência (c, d). (a, c) tripomastigotas controle após 8 h de incubação em meio sem CA; (b, d) células tratadas com CA 1 nM por 8 h.

Discussão

O tratamento de tripomastigotas (cepa Y) com Caliculina A 1 nM desencadeia, a partir de 4 horas de tratamento, a diferenciação deste estágio a formas arredondadas, não flageladas, que ao serem coradas com DAPI e analisadas sob microscópio de fluorescência, foram consideradas como formas amastigotas-símile. Dentro do período de incubação avaliado (até 8 horas), o percentual de formas amastigotas-símile aumentou linearmente com a concomitante diminuição no número de tripomastigotas. O tratamento com uma maior concentração de Caliculina A (5 nM) resultou, dentro do mesmo período, em um menor percentual de diferenciação, que confirmou o que já havia sido descrito na literatura para esta cepa de *Trypanosoma cruzi* (Grellier *et al.*, 1999), cuja transformação a formas amastigotas é induzida a baixas concentrações de Caliculina A (0,25 - 1 nM). Esses valores encontram-se na mesma ordem de grandeza necessária para inibição de fosfatases 1 e 2A de células eucarióticas.

Ao contrário do observado para a cepa Y, 100% dos tripomastigotas do clone CL-14 sofreram diferenciação, após 8 horas de tratamento, com ambas as concentrações de Caliculina A (1 nM e 5 nM) utilizadas. Ao término do período de incubação, observou-se uma população heterogênea de parasitas diferenciados, contendo formas amastigotas símile, e formas semelhantes aos epimastigotas intracelulares.

O tratamento das formas tripomastigotas de cultivo da cepa Y e do clone CL-14 resultou, após 8 horas de incubação, em uma redução de aproximadamente 50% (em números absolutos) no número de parasitas totais, fato este não observado nos controles, indicando, portanto, que Caliculina A está relacionada também com a mortalidade deste parasitas. É interessante notar que tripomastigotas metacíclicos, além de serem insensíveis a Caliculina A, em termos de alterações morfológicas, mantiveram-se viáveis ao longo de todo o período de tratamento com a droga.

De acordo com o proposto por Almeida-de-Faria e colaboradores (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999), as formas epimastigotas intracelulares aparecem, de maneira transiente, no processo de diferenciação celular de amastigotas a tripomastigotas em culturas infectadas por *Trypanosoma cruzi* do clone CL-14. Os autores

sugeriram que a via de diferenciação no *T. cruzi* ocorreria de maneira cíclica, no sentido amastigota - epimastigota intracelular – tripomastigota, no entanto, a partir dos dados obtidos, verificou-se que tripomastigotas do clone CL-14 submetidos a tratamento com Caliculina A, diferenciam-se em formas semelhantes aos epimastigotas intracelulares, antes da transformação a amastigotas, o que corresponderia ao inverso do processo de diferenciação proposto. Esses dados sugerem, portanto, que o ciclo do parasita neste clone é cíclico e que pode evoluir nos dois sentidos: amastigotas ↔ epimastigotas ↔ tripomastigotas (Esquema 2-1). A reversibilidade da transformação amastigota-epimastigotas, foi sugerida também por Tyler e Engman, tendo como base os resultados observados a partir da transformação de amastigotas a epimastigotas, *in vitro*, que é dependente da concentração de glicose (Tyler & Engman 2000; Tyler & Engman 2001). A estes resultados, falta ainda a demonstração de que os estágios morfológicamente semelhantes a amastigotas e epimastigotas intracelulares correspondem imunologicamente e bioquimicamente aos amastigotas e epimastigotas intracelulares.

Esquema 2-1

Outros trabalhos na literatura corroboram a existência de formas intermediárias, durante o processo de transformação de tripomastigotas a amastigotas *in vitro*. Baixo pH acelera a transformação extracelular de tripomastigotas a formas arredondadas semelhantes aos amastigotas (Kambara *et al.*, 1990), caracterizados posteriormente por microscopia eletrônica, análise antigênica e medida de replicação de DNA (Tomlinson *et al.*, 1995). Neste trabalho, durante o processo de diferenciação de tripomastigotas (cepa Y) em pH ácido, descreveram-se formas intermediárias semelhantes aos amastigotas, mas que possuem um pequeno flagelo.

Estas formas apareceram dentro da primeira hora de incubação em meio ácido e corresponderam, após 2 horas, a mais de 50% da população de parasitas (Tomlinson *et al.*, 1995).

Estágios intermediários, que possuem um cinetoplasto com estrutura de bastão, já foram descritos como formas de transição, durante a maturação intracelular de tripomastigotas a amastigotas de *T. cruzi* (Meyer 1969), sendo que estas formas também já foram observadas em *T. cruzi* e *T. dionisii*, logo após a invasão de células hospedeiras (Sanabria 1971; Glauert *et al.*, 1982), e ocasionalmente entre tripomastigotas extracelulares (Meyer 1958; Brack 1968; Simpson 1972; De Souza 1984). Poder-se-ia assumir que, assim como ocorre no hospedeiro invertebrado, os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas, dependendo do meio, que influenciaria diretamente o processo de diferenciação. Na verdade, pouco se sabe sobre quais são os fatores presentes no estômago e no intestino do hospedeiro invertebrado que desencadeiam a divisão e transformação do *T. cruzi* e menos ainda o que desencadeia a transformação intracelular deste parasita.

A fosforilação proteica é um dos mecanismos de regulação dos processos celulares. Os eventos catalisados por milhares de proteínas quinase, codificadas no genoma humano, são revertidas pela ação de um número reduzido de proteínas fosfatase que se dividem em dois grandes grupos, de acordo com o fosfoamino ácido que hidrolisam. As serina/treonina fosfatase (PPs) atacam fosfoserina/treonina e as proteínas tirosinas fosfatase (PTPs) hidrolisam fosfotirosina. Com fundamento na especificidade do substrato, propriedade catalítica e sensibilidade a vários inibidores e ativadores, as proteínas fosfatase podem ser classificadas em quatro tipos 1, 2A, 2B e 2C (PP1, PP2A, PP2B e PP2C, respectivamente) (Cohen 1989). Um dos membros que apresenta melhor estudo desta classe é a proteína fosfatase do tipo 2A (PP2A), que está envolvida na modulação de uma série de eventos, incluindo-se regulação metabólica (Cohen 1989), replicação de DNA (Virshup *et al.*, 1993), transcrição (Alberts *et al.*, 1993; Wadzinski *et al.*, 1993), tradução (Ballou *et al.*, 1988) e progressão do ciclo celular (Felix *et al.*, 1990; Healy *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 1993). O seu papel na regulação do crescimento celular foi sugerido por diversas observações, por exemplo, em oócitos de *Xenopus*, o que demonstrou que a PP2A é um regulador negativo do fator promotor de maturação, um complexo ciclina-dependente de quinase, essencial para o ciclo celular (Lee 1995). Apesar do seu papel como um regulador negativo do crescimento celular, as PP2A são expressas em altos níveis e parecem essenciais à viabilidade celular. A

inativação genética de PP2A em levedura (Ronne *et al.*, 1991) e inibição por ácido okadaico em células de mamífero (Schönthal 1992) afeta severamente o crescimento celular e a sobrevivência destas células. Evidências indicam que PP1 também pode ser regulador negativo do complexo p34^{cdc2}/ciclina quinase e da entrada em mitose em *Drosophila melanogaster* (Baksa *et al.*, 1993), *Saccharomyces pombe* (Booher & Beach 1989) e *Aspergillus nidulans* (Doonan & Morris 1989).

Enquanto numerosos estudos têm demonstrado o envolvimento das proteínas fosfatase no ciclo celular de eucariotos superiores, pouco se sabe sobre o papel das fosfatases nos tripanossomatídeos. Em tripanossomos vários genes homólogos a PP1 e 2A foram clonados (Erondy & Donelson 1991) e da mesma maneira o gene de uma PP2C e PP5 foi caracterizado em *Leishmania chagasi* (Burns *et al.*, 1993) e *Trypanosoma brucei* (Chaudhuri 2001). Em *T. cruzi*, duas proteínas foram clonadas utilizando-se oligonucleotídeos degenerados contra serina/treonina fosfatases 1, 2A e 2B sendo que as proteínas codificadas por estes genes foram denominadas de TcPP1a e TcPP1b por apresentarem homologia com a subunidade catalítica da proteína fosfatase humana do tipo-1. A proteína recombinante TcPP1 expressa em *E. coli* mostrou ser inibida preferencialmente por Caliculina A a ácido okadaico (Orr *et al.*, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que a transformação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* a amastigotas em meio axênico pH 5,0 é inibida por ácido okadaico, sugerindo um papel importante das PP1 e PP2A, durante o ciclo de vida do parasita (González *et al.*, 2003). No entanto, este resultado contradiz o que foi descrito previamente na literatura por Grellier *et al.* (Grellier *et al.*, 1999). Grellier e colaboradores sugeriram o envolvimento das proteínas fosfatase ao observar que formas tripomastigotas diferenciam-se, *in vitro*, a amastigotas na presença de Caliculina A, um inibidor de proteínas fosfatase 1 e 2A. Posteriormente, Orr e colaboradores (Orr *et al.*, 2000) demonstraram que Caliculina A, mas não ácido okadaico, tem efeito na replicação, *in vitro*, e na morfologia de formas epimastigotas da cepa HO 3/15. Estudos de microscopia eletrônica com epimastigotas tratados com concentrações de 5 nM e 10 nM de Caliculina A, mostraram que estes organismos duplicam suas organelas, incluindo o flagelo, o cinetoplasto e o núcleo, mas são incapazes de se dividir. Em concentrações de Caliculina A acima de 10 nM por 1 dia ou quando incubados por 7 dias em presença de Caliculina A 1 nM, os epimastigotas perdem suas características

morfológicas e adquirem uma forma mais arredondada (Orr *et al.*, 2000). Em *T. brucei*, foi demonstrado que o tratamento de formas procíclicas com ácido okadáico dá origem a células com múltiplos núcleos, uma única mitocôndria, mas incapazes de completar a citocinese. Portanto, o papel de proteínas fosfatase 1 e 2A, neste tripanossomatídeo, estaria relacionado com a coordenação da mitose, da divisão do DNA mitocondrial e da citocinese, não tendo sido observado nenhuma relação entre fosfatases e diferenciação celular (Arpita *et al.*, 1994).

Outros trabalhos mostram a relação entre fosforilação de proteínas e morfologia celular ao se demonstrar mudanças morfológicas em vários tipos de células, resultantes da modificação da estrutura do citoesqueleto pela ação de inibidores de proteínas fosfatase como a Caliculina A, o ácido Okadáico e a Tautomicina (Eriksson & Goldman 1993; Kasahara *et al.*, 1993). Nos tripanossomos, praticamente nada se sabe sobre os filamentos espessos e intermediários que constituem o citoesqueleto, no entanto, os microtúbulos têm sido bastante estudados e representam o principal componente do citoesqueleto dos tripanossomatídeos. Eles estão distribuídos por todo o corpo celular, imediatamente abaixo da membrana plasmática, por isso são denominados microtúbulos subpeliculares. Os microtúbulos estão ligados entre si pelas MAPs (microtubule-associated proteins) e conectados à membrana plasmática (Vikerman 1985), sendo esta interação entre as MAPs e os microtúbulos modulada pelo estado de fosforilação (Avila *et al.*, 1994). Logo, os tripanossomatídeos são organismos cuja forma é dirigida, em parte, pela estrutura subpelicular de microtúbulos em "cross-linking" entre si e a membrana plasmática através das MAPs portanto, as diferenças de mobilidade e morfologia entre os estágios tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, seriam oportunas no estudo dos mecanismos de controle morfológico dependentes de microtúbulos (Kohl & Gull 1998; Tyler & Engman 2001).

Grande parte da informação sobre a amastigotogênese, *in vitro* e *in vivo*, foi obtida através do estudo da diferenciação de tripomastigotas derivadas de culturas celulares infectadas por *T. cruzi* (Nogueira & Cohn 1976; Milder *et al.*, 1977; Ley *et al.*, 1988; Burleigh & Andrews 1995), mas pouco se sabe sobre os fatores que desencadeariam a diferenciação de tripomastigotas metacíclicos a amastigotas. Recentemente, foi demonstrado por Contreras *et al.* (2002) através de microscopia de luz, SDS-PAGE e Western-blot que a incubação prévia de formas tripomastigotas metacíclicos a 37°C em meio MEM-TAU desencadeia, dentro de

24 horas, diferenciação macromolecular a amastigotas, mas sem mudanças morfológicas perceptíveis. O remodelamento celular só ocorreu após mudança do meio de cultivo (Contreras *et al.*, 2002). Posteriormente demonstrou-se por microscopia eletrônica de varredura (SEM) padrões morfológicos distintos durante a diferenciação de tripomastigotas de cultivo e tripomastigotas metacíclicos a amastigotas em meio MEM-TAU a 37°C (Navarro *et al.*, 2003). Apesar das formas tripomastigotas de cultivo e tripomastigotas metacíclicos parecerem morfológicamente semelhantes e compartilharem algumas propriedades biológicas, já havia sido demonstrado por Brener (Brener 1973) que tripomastigotas de cultivo são capazes de se transformar em epimastigotas a 27°C tanto no sangue como em meio axênico, uma propriedade ausente nos tripomastigotas metacíclicos. Juntamente com estes dados, os resultados apresentados da ausência de remodelamento celular quando tripomastigotas metacíclicos são tratados com Caliculina A reforçam a pergunta se a amastigotogênese a partir de tripomastigotas de cultivo e metacíclicos ocorre através de mecanismos de diferenciação distintos ou semelhantes.

Os resultados, aqui apresentados, indicam que para a cepa Y, a Caliculina A induz transformação direta de tripomastigotas a amastigotas, ao contrário do observado para o clone CL-14, cuja diferenciação de tripomastigotas a amastigotas induzida por Caliculina A ocorre através da passagem por uma forma epimastigota-símile intermediária, que nos permite sugerir uma intertransformação cíclica do parasita. Além disso, demonstrou-se que apesar das semelhanças morfológicas, tripomastigotas metacíclicos, ao contrário do observado para tripomastigotas de cultivo, não sofrem remodelamento celular, quando tratados com Caliculina A, desde que se julgue pela observação, por coloração com DAPI e microscopia de fluorescência, a manutenção da posição entre núcleo e cinetoplasto ao longo de diferentes tempos de incubação com a droga. Neste sentido, tripomastigotas metacíclicos utilizariam diferentes mecanismos de diferenciação a amastigotas comparativamente a tripomastigotas de cultivo.

Capítulo 3

Estudo Comparativo da Expressão de Proteínas nos Diferentes Estágios Evolutivos do *T. cruzi*

Introdução

A superfície celular dos tripanossomatídeos é bastante variável, dependendo da espécie do parasita. Estudos bioquímicos têm mostrado a presença de algumas proteínas, a maioria glicoproteínas, que estão associadas à membrana plasmática de diferentes estágios evolutivos, sendo que algumas já foram caracterizadas como estágio-específicas.

Em relação aos epimastigotas, o primeiro trabalho que descreve proteínas da superfície deste estágio é de Alves e Colli (1975), onde foram identificados três componentes como mucinas aceptoras de ácido siálico e um glicoconjugado, lipopeptideofosfoglicano (LPPG) (Alves & Colli 1975). Mucinas foram amplamente estudadas na literatura, principalmente por seu papel na interação do parasita com o hospedeiro, incluindo o processo de invasão (Schenkman *et al.*, 1993; Ferguson 1997; Yoshida *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 1999; Acosta-Serrano *et al.*, 2001).

Outra molécula de superfície de epimastigotas é a Gp72, que representa cerca de 0,04% das proteínas totais da célula estando suas cadeias sacarídicas ligadas via asparagina a resíduos de serina/treonina. A Gp72 foi descrita inicialmente como sendo uma molécula que participa da metaciclogênese, uma vez que o anticorpo monoclonal WIC29.26, que reconhece um epitopo de açúcar na Gp72, inibe a diferenciação, *in vitro*, do parasita (Snary *et al.*, 1981). Posteriormente, Ribeiro de Jesus e colaboradores (1993) demonstraram que parasitas mutantes cujo gene da Gp72 havia sido deletado, eram capazes de completar a metaciclogênese, sendo este fato evidenciado pela expressão de alguns marcadores biológicos, apesar de sofrerem uma mudança morfológica incompleta (de Jesus *et al.*, 1993).

Recentemente, o comportamento infectivo de um clone mutante de *Trypanosoma cruzi*, que carregava uma deleção pontual do gene da Gp72, foi estudado em *T. infestans* e camundongos imunodeficientes, sugerindo um papel da Gp72 na sustentação de uma infecção latente (Basombrio *et al.*, 2002).

Uma outra proteína bastante abundante em epimastigotas é uma cisteína proteinase de 51 kDa, conhecida como cruzipaina. Apesar de ser uma proteína endossomal, concentrada no reservossomo, pode também ser encontrada na superfície de epimastigotas, bem como tripomastigotas e amastigotas (Scharfstein *et al.*, 1986; Souto-Padron *et al.*, 1990). A cruzipaina em tripomastigotas está envolvida com a invasão de células pelo parasita (Engel *et al.*, 1998); revisto em (Burleigh & Woolsey 2002).

O trabalho de Andrews e colaboradores descreve uma série de epitopos específicos para amastigotas identificados através de anticorpos monoclonais (Mab). Designou-se de Ssp-4 (stage-specific protein 4) um componente da superfície de amastigotas de 84 kDa, ancorado à membrana via âncora de GPI que é reconhecido pelo anticorpo monoclonal 2C2 (Andrews *et al.*, 1987; Bertello *et al.*, 1996). De acordo com este estudo, o epitopo definido pelo Mab 2C2 está homogeneamente distribuído na superfície dos amastigotas, ao longo de todo o ciclo intracelular, até ser liberado através de um mecanismo dependente de fosfolipase, durante a transformação a tripomastigotas (Andrews *et al.*, 1987; Andrews *et al.*, 1988). Posteriormente, Barros e colaboradores demonstraram que as formas amastigotas de *T. cruzi* também podem liberar fragmentos de membrana que contenham Ssp-4, através do isolamento de uma série de Mab reativos contra amastigotas. Alguns desses anticorpos reconhecem epitopos de carboidratos diferentes dos reconhecidos pelo Mab 2C2, sendo também específicos para amastigotas (Barros *et al.*, 1997).

Além da Ssp-4 as formas amastigotas de *T. cruzi* possuem em sua superfície uma família de glicoproteínas denominadas de amastina, cujo nível de mRNA é aproximadamente 50 vezes maior neste estágio, quando comparado aos epimastigotas e tripomastigotas (Teixeira *et al.*, 1994). A sequência de 174 aminoácidos da proteína nascente apresenta quatro domínios hidrofóbicos distintos, sugerindo que estas proteínas atravessem a membrana. A amastina é abundante na membrana plasmática, mas sua função é desconhecida.

Na tentativa de se compreender o processo de invasão por *T. cruzi*, uma série de grupos têm se dedicado ao estudo de proteínas de superfície das formas

tripomastigotas. Além das proteínas mencionadas acima, proteínas da superfície do parasita de massa molecular entre 82 – 90 kDa, foram descritas como envolvidas na invasão de células hospedeiras pelo *T. cruzi* (Ouaisi *et al.*, 1990; Araya *et al.*, 1994). Colli e colaboradores foram os primeiros a descrever uma glicoproteína de superfície de 85 kDa, específica de tripomastigotas como envolvida no processo de invasão do parasita em células de cultura de tecido (Katzin & Colli 1983; Alves *et al.*, 1986; Abuin *et al.*, 1989; Giordano *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 1999). Estas proteínas, coletivamente denominadas de Tc-85, formam uma população heterogênea de glicoproteínas de superfície, ancoradas via glicosilfosfatidilinositol (GPI) e apresentam massas moleculares semelhantes e diferentes pontos isoelétricos (Katzin & Colli 1983; Andrews *et al.*, 1984; Abuin *et al.*, 1989). As proteínas da Tc-85, pertencem à superfamília das Gp85/trans-sialidases (Colli 1993; Cross & Takle 1993), mas não apresentam atividade de trans-sialidase. O envolvimento de pelo menos um dos membros da família da Tc-85, na invasão, é indicado pela observação que o anticorpo monoclonal H1A10, dirigido contra Tc-85, causa uma inibição de 46% – 96 % na invasão de células de cultura de tecidos pelas formas tripomastigotas de diferentes cepas e clones (Abuin *et al.*, 1989). Um componente ácido da família da Tc-85 (Tc85-11) e a proteína de fusão ligam-se à laminina e células intactas (Giordano *et al.*, 1994; Giordano *et al.*, 1999). Recentemente, Magdesian *et al.* (Magdesian *et al.*, 2001) demonstraram que a sequência conservada VTVXNVFLYNR da superfamília das gp85/trans-sialidases é um domínio de ligação a células de mamífero. O receptor deste motivo na célula hospedeira LLC-MK₂, foi purificado e caracterizado como citoqueratina 18 (CK18). Como a Tc-85 também se liga a laminina, sugere-se que a família da Tc-85 seja composta por glicoproteínas multiadesivas que se ligam a diferentes receptores tanto na superfície da célula hospedeira como na matriz extracelular (Magdesian *et al.*, 2001).

Também uma proteína de 60 kDa que se liga a heparina, e que foi chamada de penetrina, foi relacionada com o processo de invasão de células pela forma tripomastigota do *T. cruzi* (Ortega-Barria & Pereira 1991).

Outros três grupos foram identificados na superfície de tripomastigotas, o Ssp-1, Ssp-2 e Ssp-3. Estas glicoproteínas que são O-glicosiladas, possuem massa molecular entre 60 – 200 kDa, enquadrando-se no grupo das mucinas que atuam como aceptores de ácido siálico (Ssp-3) em reação mediada pela trans-sialidase (Briones *et al.*, 1994).

Nos estágios tripomastigotas metacíclicos, as duas principais proteínas de superfície que não estão presentes em tripomastigotas de cultivo ou sanguícolas, possuem massa molecular de aproximadamente 82 – 90 kDa (Teixeira & Yoshida 1986). Estas glicoproteínas estágio-específicas de metacíclicos, também referidas como MTS-gp90 e MTS-gp82, estão envolvidas no processo de invasão de células hospedeiras, uma vez que foi demonstrada a inibição da invasão do parasita em células de mamíferos, na presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra estas proteínas ou antígenos purificados (Araguth *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1990; Ramirez *et al.*, 1993).

Objetivos

O primeiro trabalho a mostrar reatividade de um anticorpo monoclonal com formas intracelulares intermediárias, na transformação de amastigotas a tripomastigotas, é de Faucher e colaboradores (Faucher *et al.*, 1995). Posteriormente, Almeida-de-Faria *et al.* confirmaram a existência de uma forma intracelular “epimastigote-like”, utilizando um anticorpo monoclonal (Mab 3C5C1) dirigido contra formas epimastigotas obtidas de cultivo axênico (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999). Estes resultados sugeriram que a semelhança entre epimastigotas intracelulares e epimastigotas de meio axênico vão além da morfologia, podendo ser estendida a pelo menos parte dos polipeptídeos que compõem o perfil antigênico.

A maioria dos trabalhos sobre antígenos do *Trypanosoma cruzi*, publicados na literatura, referem-se a proteínas estágio-específicas de amastigotas, epimastigotas axênicos e tripomastigotas. Por ser uma forma transiente de difícil obtenção e só recentemente caracterizada, não há trabalhos na literatura sobre antígenos específicos deste estágio e seu envolvimento na patologia da doença de Chagas.

Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo:

- i. Comparar o perfil polipeptídico de formas epimastigotas intracelulares, obtidas de culturas celulares infectadas com o clone CL-14, com os demais estágios, incluindo os epimastigotas de meio axênico.
- ii. Comparar o perfil polipeptídico de epimastigotas intracelulares em culturas celulares, mantidas a 37°C (temperatura restritiva) àquelas cuja manutenção foi feita a 33°C (temperatura permissiva).
- iii. Comparar o perfil polipeptídico de epimastigotas intracelulares, quando da manutenção das culturas de tecido infectadas, na ausência ou presença de diferentes concentrações de L-prolina.

Resultados

Para as análises computacionais, foram utilizadas as imagens das autoradiografias dos géis bidimensionais de cada estágio, convertidas a 8 bits/pixel e calibradas. O primeiro passo na análise foi detectar os polipeptídeos, isto é, localizá-los nas imagens, definindo-se forma e calculando-se medidas de volume e área. No método de detecção do programa ImageMaster constrói uma matriz (ou operador) ao redor de cada pixel na imagem, permitindo a comparação dos valores de intensidade do centro do operador com os valores de intensidade das pontas. Os pixels, fora da matriz, que apresentam altos valores de intensidade, comparados aos pixels das pontas do operador, são considerados como parte de um polipeptídeo. Este processo é repetido para cada pixel na imagem, e a partir destas informações o programa constrói um mapa dos polipeptídeos que compõem o gel. A detecção é controlada por alguns parâmetros como: sensibilidade, “background” e tamanho do operador, que foram determinados empiricamente.

A partir deste trabalho inicial, o programa fornece uma tabela com todos os polipeptídeos detectados em cada gel experimental, a partir dos parâmetros de detecção determinados pelo usuário. No caso deste trabalho, para cada tipo celular foram feitas duplicatas ou triplicatas dos géis experimentais das frações citossólica e membranas, separadamente. Cada gel foi submetido à análise de detecção utilizando-se os parâmetros de detecção pré-determinados. O número de polipeptídeos detectados em cada gel experimental das frações citossólica e membranas de cada célula, mostra-se na Tabela I e Tabela II, respectivamente.

Tabela I Número de polipeptídeos detectados na fração citossólica de diferentes estágios evolutivos de *T. cruzi*. Cada gel corresponde a experimentos independentes.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Média ± Erro
Amastigotas	571	530	ND	551 ± 21
Epimastigotas Intracelulares de 33°C	654	598	614	622 ± 17
Epimastigotas intracelulares de 37°C	380	434	451	422 ± 21
Tripomastigotas	506	579	543	543 ± 21
Epimastigotas Extracelulares	461	428	ND	465 ± 17

Tabela II Número de polipeptídeos detectados na fração membrana de diferentes estágios evolutivos de *T. cruzi*. Cada gel corresponde a experimentos independentes

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Média ± Erro
Amastigotas	441	367	ND	404 ± 37
Epimastigotas Intracelulares de 33°C	649	650	582	627 ± 23
Epimastigotas intracelulares de 37°C	334	384	311	343 ± 22
Tripomastigotas	277	296	250	274 ± 13
Epimastigotas Extracelulares	516	468	ND	492 ± 24

Assim como ocorre em todo procedimento eletroforético, as imagens apresentaram um sinal mínimo de intensidade (“background”), independente dos polipeptídeos detectados. Como estas intensidades não estavam uniformemente distribuídas nas imagens, podendo afetar a quantificação dos polipeptídeos, o valor de “background”, calculado como um valor médio da intensidade de pixels ao redor de cada polipeptídeo, foi subtraído de cada polipeptídeo detectado. É interessante ressaltar que a subtração do valor de “background” não altera o número de polipeptídeos detectados.

CONSTRUÇÃO DE GEL MÍNIMO REPRESENTATIVO

Dada as dificuldades na comparação entre as imagens dos géis experimentais, uma vez que, para cada um dos estágios foram feitos géis experimentais em triplicatas ou duplicatas das frações citossólica e membrana, optou-se por fazer uma análise comparativa a partir de géis mínimos representativos, ou seja, géis que contenham somente os polipeptídeos presentes em todas as triplicatas ou duplicatas independentes de cada estágio e fração. Os géis mínimos representativos foram construídos a partir de combinação estatística dos vários géis experimentais de cada um dos estágios e frações. Neste gel, os valores de intensidade, área, volume e “background” dos polipeptídeos são calculados como um valor médio de cada polipeptídeo utilizado para sua construção, sendo fornecidas também informações dos erros para cálculos de variação entre os valores médios.

O primeiro passo na construção de um gel mínimo representativo é a análise de polipeptídeos coincidentes (análise de “matching”) entre os géis experimentais de um mesmo estágio e de uma fração (Esquema 3-1). Para tanto, adotou-se um dos géis experimentais do estágio em análise (aquele com o maior número de polipeptídeos detectados) como gel de referência. As imagens dos demais géis

experimentais deste estágio foram então comparadas ao gel de referência, mapeando-se polipeptídeos comuns aos dois géis (experimental e referência) como pode ser visto na Figura 3-1 para epimastigotas intracelulares de 33°C.

Esquema 3-1

Figura 3-1 Mapas de coincidências na fração citossólica de epimastigotas intracelulares de 33°C para os géis experimentais 2 (A) e gel experimental 3 (B). Em vermelho estão representados os polipeptídeos correspondentes ao gel de referência e em laranja estão mostrados os vetores indicadores dos polipeptídeos comuns a ambos os géis.

Os polipeptídeos presentes no gel de referência que também estavam em todos os demais géis experimentais do estágio em análise, foram denominados polipeptídeos representativos, sendo utilizados na construção do gel mínimo representativo. Assim, como pode ser observado na Tabela III há uma redução de aproximadamente 50% no número de polipeptídeos que compõe o gel mínimo representativo das frações citossólica ou membranar de cada estágio. No caso da fração citossólica de epimastigotas extracelulares e na fração membranar das formas epimastigotas intracelulares, verificou-se uma redução de 62% e 71%, respectivamente, no número de polipeptídeos constantes do gel mínimo representativo, quando comparados à média de polipeptídeos dos géis experimentais de cada estágio.

Tabela III Número de polipeptídeos presentes nos géis mínimos representativos para as frações citossólicas e membranares dos diferentes estágios de *T. cruzi*.

	Fração citossólica	Fração Membranar
Amastigotas	295	187
Epimastigotas Intracelulares de 33°C	290	182
Epimastigotas Intracelulares de 37°C	203	98
Tripomastigotas	288	120
Epimastigotas Extracelulares	290	282

Foram feitas análises comparativas entre os géis mínimos representativos das frações citossólicas e membranares para cada uma das células em estudo. Como pode ser visto na Tabela IV, alguns polipeptídeos foram identificados como presentes nas duas frações, quer seja pela existência de polipeptídeos comuns a ambas as frações, quer seja pela contaminação entre as frações durante a purificação. Também erros provenientes da análise comparativa em si podem ter contribuído para esse resultado. Para epimastigotas extracelulares, 30% dos polipeptídeos presentes na fração citossólica foram comuns à fração membranar. Em epimastigotas intracelulares de 33°C o percentual de polipeptídeos presentes na fração citossólica e comuns à fração membranar foi de 20%, em tripomastigotas 16%, em epimastigotas intracelulares de 37°C 8% e em amastigotas 5%.

Tabela IV Número de polipeptídeos comuns às frações citossólica e membranar nos géis mínimos representativos de cada estágio evolutivo do *T. cruzi*.

	Fração citossólica	Fração Membranar	Comuns
Amastigotas	295	187	15
Epimastigotas Intracelulares de 33°C	290	182	57
Epimastigotas Intracelulares de 37°C	203	98	17
Tripomastigotas	288	120	47
Epimastigotas Extracelulares	290	282	85

ANÁLISE COMPARATIVA

Para que se facilitassem as análises comparativas entre todas as células em estudo, uma vez que para cada estágio havia um gel mínimo representativo da fração citossólica e um gel mínimo representativo da fração membranar, optou-se pela criação de um gel de referência, denominado Referência Total, contendo todos os polipeptídeos de cada tipo celular.

Para a construção do gel de referência total, escolheu-se o gel mínimo representativo do estágio, que contivesse o maior número de polipeptídeos (gel de Referência). Cada um dos géis mínimos representativos foi então comparado à Referência, mapeando-se polipeptídeos comuns aos dois géis. Os polipeptídeos presentes no gel mínimo representativo, mas ausentes na Referência foram então sendo adicionados para a construção da Referência. Ao final do processo, todos os polipeptídeos não coincidentes com a referência para os diferentes estágios do *T. cruzi*, bem como da célula hospedeira CHO-K1, foram adicionados, constituindo o chamado gel de Referência Total. Logo, este gel de referência não é a somatória de todos os polipeptídeos presentes no gel mínimo representativo de cada tipo celular, pois não há polipeptídeos repetidos. Para cada fração foi construído um único gel de Referência Total, como pode ser visto na Figura 3-2. O número de polipeptídeos presentes na referência total para a fração citossólica foi de 900 e para a fração membranar foi de 702.

Após a construção da Referência Total, passou-se à análise comparativa entre os géis mínimos representativos de cada estágio e a referência total, mapeando-se polipeptídeos comuns a todas as células (Esquema 3-2). A partir desta análise, o programa ImageMaster gera uma tabela para cada célula, onde informa se um determinado polipeptídeo é ou não comum à Referência Total. Caso um

determinado polipeptídeo tenha sido comum à Referência Total, ele indicará sua presença também em outro tipo celular. Portanto, consegue-se identificar assim, se um polipeptídeo está presente em uma célula ou em mais de um tipo celular.

Figura 3-2 Mapas das referências totais para as frações citossólica (A) e membranar (B).

Esquema 3-2

CONSTRUÇÃO DE BANCO DE DADOS

Os resultados obtidos na análise comparativa entre géis mínimos representativos e os géis da Referência Total, foram utilizados na criação de um banco de dados de filtros (Figura 3-3) que facilitou a interpretação dos resultados obtidos através da

comparação dos géis mínimos experimentais com a Referência Total, compilando e organizando as informações geradas para cada tipo celular em uma única planilha.

Ref. Spt	Ama		CHO		Epi33		Epi37		LIT		Tripo	
Spot	Spot	2nd	Spot	MW	Spot	MW	Spot	MW	Spot	MW	Spot	MW
10	-	-	-	-	-	-	-	-	10	139,984	3	136,807
11	-	-	-	-	-	-	-	-	11	139,463	5	134,750
12	6	115,143	-	-	-	-	-	-	12	135,363	6	132,085
14	7	111,333	-	-	-	-	-	-	14	130,164	8	128,502
25	10	109,476	-	-	-	-	-	-	25	126,338	10	124,716
58	-	-	-	-	-	-	-	-	58	100,067	26	96,172
66	22	87,479	-	-	176	95,712	-	-	66	103,676	27	97,984
76	-	-	-	-	192	90,712	18	86,249	76	96,045	28	89,251
81	-	-	68	99,620	191	90,670	-	-	81	95,687	30	88,630
82	-	-	-	-	198	88,362	-	-	82	95,153	32	89,855
97	-	-	88	91,597	-	-	-	-	97	90,819	38	87,806
103	-	-	-	-	-	-	-	-	103	89,808	40	86,286
109	43	75,329	-	-	-	-	-	-	109	83,976	42	79,724
115	52	70,164	-	-	-	-	-	-	115	79,704	44	79,223
129	-	-	-	-	-	-	-	-	129	82,118	47	77,612
137	64	65,354	-	-	207	84,952	-	-	137	73,562	50	74,159
144	-	-	-	-	-	-	-	-	144	78,377	53	73,070
155	-	-	-	-	-	-	-	-	155	71,934	54	70,469
166	-	-	147	69,364	-	-	-	-	166	68,785	57	65,511
177	81	57,661	-	-	-	-	-	-	177	64,921	61	61,739
179	82	56,699	-	-	629	75,606	-	-	179	64,559	62	63,656
199	-	-	167	66,079	-	-	-	-	199	62,195	68	69,553
222	-	-	-	-	-	-	-	-	222	35,878	115	35,681
227	100	48,733	-	-	-	-	-	-	227	54,788	78	55,192
233	-	-	-	-	-	-	-	-	233	57,725	75	55,436
272	-	-	-	-	-	-	-	-	272	48,714	86	47,971
275	-	-	-	-	-	-	-	-	275	47,106	97	42,011
301	123	38,292	-	-	-	-	-	-	301	42,593	101	40,951
312	-	-	-	-	-	-	-	-	312	40,881	105	39,744
320	125	36,475	-	-	-	-	115	38,347	320	38,585	114	36,038
331	-	-	-	-	-	-	-	-	331	36,758	111	36,085
333	-	-	-	-	-	-	-	-	333	35,479	118	32,701
348	-	-	-	-	-	-	-	-	348	33,237	120	32,742
355	-	-	-	-	-	-	-	-	355	30,963	123	30,629
360	-	-	-	-	-	-	-	-	360	33,361	121	31,362
377	-	-	-	-	-	-	-	-	377	30,505	124	27,756
380	-	-	-	-	-	-	-	-	380	31,546	122	30,574
389	177	28,500	-	-	633	28,226	168	33,376	389	27,428	163	29,049
390	178	26,054	-	-	-	-	169	31,209	390	25,791	164	26,505
397	-	-	-	-	478	32,796	-	-	397	26,375	125	24,275
401	-	-	-	-	-	-	-	-	401	28,312	131	26,658
434	-	-	-	-	-	-	-	-	434	23,018	137	22,540
460	-	-	-	-	577	21,200	-	-	460	20,013	144	19,580
477	-	-	-	-	-	-	-	-	477	18,029	157	17,233
480	164	19,574	-	-	596	18,824	-	-	480	17,895	153	18,034
492	167	18,232	-	-	-	-	-	-	492	16,516	158	17,114
509	-	-	-	-	-	-	-	-	509	69,171	56	66,209
511	5	116,441	-	-	-	-	-	-	511	135,616	7	132,322

Figura 3-3 Banco de dados excel para análise combinatória dos polipeptídeos coincidentes entre todos os estágios de desenvolvimento do parasita e da célula hospedeira CHO-K1.

ANÁLISE DOS POLIPEPTÍDEOS AO LONGO DO CICLO INTRACELULAR

Interessados em identificar polipeptídeos estágio-específicos ou polipeptídeos comuns, mas com diferentes perfis de expressão nos estágios correspondentes ao hospedeiro vertebrado, foram feitas análises comparativas combinatórias ($C_{3,2}$) entre amastigotas intracelulares, epimastigotas intracelulares e tripomastigotas.

Como pode ser visto na Figura 3-5, a análise dos estágios comparados dois-a-dois revelou um pequeno número de polipeptídeos comuns entre os estágios. Para a fração citossólica, praticamente não houve variação no número de polipeptídeos comuns, nas diferentes combinações dois-a-dois, entre os três estágios. Aproximadamente, 4% dos polipeptídeos presentes na fração citossólica dos géis mínimos representativos de cada estágio foram comuns a pelo menos duas células (Figura 3-4 A). Apenas 1% dos polipeptídeos foram comuns entre tripomastigotas e amastigotas para a fração membranas. Este valor é inferior a 1% são quando

comparadas as frações membranares de tripomastigotas e epimastigotas intracelulares. Amastigotas e epimastigotas intracelulares apresentaram o maior número de coincidências nesta fração, correspondendo a aproximadamente 4% dos polipeptídeos dos géis mínimos representativos (Figura 3-4 B).

Figura 3-4 Número de polipeptídeos comuns aos estágios de *T. cruzi* correspondentes ao hospedeiro vertebrado. A) Fração citossólica, B) Fração membranar. Números dentro dos setores representam polipeptídeos exclusivos ou comuns a dois estágios de desenvolvimento.

O mesmo tipo de análise foi feito comparando-se os estágios correspondentes ao hospedeiro vertebrado e epimastigotas extracelulares. Para a fração citossólica, tripomastigotas e epimastigotas extracelulares tiveram o maior número de polipeptídeos coincidentes (11%), seguidos pelos epimastigotas extracelulares e intracelulares (9%) e amastigotas e epimastigotas extracelulares (6%) (Figura 3-5 B). Na fração membranar tripomastigotas e epimastigotas extracelulares, mantiveram a situação de estágios com maior número de polipeptídeos comuns (23 polipeptídeos), como o observado para a fração citossólica. Na média, amastigotas, epimastigotas intracelulares e epimastigotas extracelulares apresentaram números próximos de polipeptídeos coincidentes (Figura 3-5 B).

Figura 3-5 Número de polipeptídeos comuns aos estágios de *T. cruzi* correspondentes ao hospedeiro vertebrado e epimastigotas extracelulares para as frações citossólica (A) e membranar (B).

A última etapa da análise comparativa foi a identificação de polipeptídeos comuns entre o parasita e a célula hospedeira, sendo que para as duas frações, o número de polipeptídeos coincidentes entre amastigotas intracelulares, epimastigotas intracelulares e a CHO-K1, foi maior quando comparado aos polipeptídeos coincidentes com os tripomastigotas (Figura 3-6).

Esta última análise, a análise combinatória entre todos os estágios e a célula hospedeira CHO-K1, juntamente com as anteriores permitiu a determinação de polipeptídeos exclusivos de cada tipo celular. Como pode ser observado na Tabela V, os epimastigotas intracelulares apresentaram, no final de todo o processo, o menor número de polipeptídeos exclusivos para a fração citossólica, seguidos dos epimastigotas extracelulares. Para a fração membranar, o menor número de polipeptídeos exclusivos pode ser observado em tripomastigotas.

Figura 3-6 Número de polipeptídeos comuns aos diferentes estágios do *T. cruzi* e à célula hospedeira CHO-K1. A) Fração citossólica, B) Fração membranar.

Tabela V Número de polipeptídeos exclusivos nos estágios correspondentes ao hospedeiro vertebrado de *T. cruzi* para as frações citossólica e membranar.

	Fração citossólica	Fração membranar
Amastigotas	108	84
Epimastigotas Intracelulares	68	77
Tripomastigotas	100	29
Epimastigotas Extracelulares	83	141
CHO-K1	164	147

Análise da variação de expressão

Através da análise comparativa combinatória, pôde-se verificar a existência de variação na expressão de alguns dos polipeptídeos presentes em mais de um dos estágios de *T. cruzi*. Estes polipeptídeos apresentaram uma variação igual ou superior a duas vezes nos volumes normalizados e, portanto, poderiam ser importantes na identificação do estágio onde se apresenta, assim como, no esclarecimento dos fatores que influenciariam o aumento da sua expressão. Originalmente, polipeptídeos classificados como exclusivos de um estágio, assim como polipeptídeos com diferenças de no mínimo duas vezes na expressão seriam identificados por espectrometria de massa. No entanto, por se estar trabalhando com géis bidimensionais com ampla faixa de pH (3,0 a 10,0) e conseqüentemente

de pouca resolução, optou-se pela identificação de alguns polipeptídeos de interesse para o laboratório por Western-blot. Essa análise foi iniciada com as proteínas da superfamília das gp85/trans-sialidases, particularmente da Tc-85. As proteínas contidas na superfamília das gp85/trans-sialidases formam uma população heterogênea de glicoproteínas de superfície com pesos moleculares similares, mas com diferentes pontos isoeletricos. Pelo menos um membro da família das Tc85 já foi descrito por estar envolvido na interação parasita-célula hospedeira. O perfil de polipeptídeos das frações citossólica e membranal de tripomastigotas está na Figura 3-9 A e B, respectivamente. Como pôde ser visto na Figura 3-9 C e D, em ambas as frações o anticorpo monoclonal H1A10 mostrou reatividade com uma seqüência de polipeptídeos de massa molecular aproximada de 85 kDa. Como esperado, nos demais estágios analisados, o Mab H1A10 não reconheceu qualquer polipeptídeo (não mostrado).

Figura 3-9. Perfil de polipeptídeos da fração membranal (A, C) e citossólica (B, D) de tripomastigotas. Em (C) e (D) estão mostrados os polipeptídeos de 85 kDa identificados por Western blot com Mab H1A10.

PERFIL POLIPEPTÍDICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Este trabalho inicial teve por objetivo, além de identificar polipeptídeos estágio-específicos ou polipeptídeos comuns entre os diferentes estágios, estabelecer um padrão do perfil de proteínas, nos diferentes estágios de desenvolvimento. Isto porque, posteriormente, estes padrões seriam comparados ao perfil de expressão de proteínas nos diferentes estágios do parasita obtidos de culturas celulares infectadas e mantidas em diferentes condições experimentais. Neste ponto, deve-se salientar que os parasitas utilizados, nas análises bidimensionais descritas, foram obtidos de culturas celulares infectadas com *T. cruzi* e mantidas na presença de L-prolina 200 μ M a uma temperatura de 33°C, a não ser quando especificada uma outra condição. Como já descrito no Capítulo I desta tese, temperatura e L-prolina funcionam como um fator de diferenciação nos estágios intracelulares de *T. cruzi* e, conseqüentemente, seria interessante verificar o efeito da ausência ou presença deste aminoácido não só como uma fonte energética, mas também como um possível sinalizador de diferenciação. O mesmo vale para as duas temperaturas de 33°C (permissiva) e de 37°C (restritiva) de diferenciação.

Polipeptídeos de epimastigotas intracelulares obtidos de culturas mantidas a 33°C ou 37°C

A influência da temperatura, na diferenciação intracelular da cepa CL de *T. cruzi*, foi descrita por Neva *et al.* (Neva *et al.*, 1961) e posteriormente, confirmada por Brener (Brener *et al.*, 1976). Como demonstrado no Capítulo I desta tese, a temperatura também exerce influência sobre o ciclo intracelular do clone CL-14 de *T. cruzi*. Nestas condições, verificou-se que culturas celulares infectadas por tripomastigotas e mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C, apresentavam um menor número de formas tripomastigotas eclodidas, quando comparadas àquelas cuja manutenção fora feita a uma temperatura de 33°C. Assim sendo, analisou-se o perfil de expressão protéico entre epimastigotas intracelulares obtidos de culturas mantidas a 33°C ou 37°C, na tentativa de se identificar polipeptídeos, diferencialmente expressos neste estágio, quando submetidos a diferentes temperaturas de cultivo.

Nessa análise o número de polipeptídeos comuns a epimastigotas intracelulares foi bastante reduzido em ambas as frações. Como pode ser observado na Figura 3-10, apenas 3 polipeptídeos foram comuns a estes estágios, para a fração citossólica e

somente 1 polipeptídeo foi comum na fração membrana. Ao se comparar as formas epimastigotas (intracelulares e extracelulares) verifica-se que o maior número de coincidências ocorre entre epimastigotas intracelulares de 33°C e epimastigotas extracelulares.

Figura 3-10 Número de polipeptídeos comuns a epimastigotas extracelulares e epimastigotas intracelulares obtidos de culturas celulares mantidas a 33°C ou 37°C. (A) Fração citossólica, (B) Fração membrana.

Posteriormente, epimastigotas intracelulares de 37°C e células CHO-K1 também foram comparadas à procura de polipeptídeos coincidentes, entre estes dois tipos celulares (Figura 3-11).

Figura 3-11 Número de polipeptídeos comuns a epimastigotas intracelulares de 37°C e a célula CHO-K1. (A) Fração citossólica, (B) Fração membrana.

A partir destes resultados, identificaram-se 53 polipeptídeos na fração citossólica e 33 polipeptídeos na fração membranar, presentes exclusivamente em epimastigotas intracelulares de 37°C.

O interesse inicial desta etapa do projeto era identificar polipeptídeos presentes nos epimastigotas intracelulares que tivessem diferentes perfis de expressão, quando estas formas eram obtidas de culturas mantidas a 33°C ou 37°C e que, portanto, poderiam estar relacionadas à não diferenciação dos epimastigotas intracelulares a tripomastigotas à temperatura de 37°C. Devido às dificuldades encontradas ao longo do desenvolvimento do trabalho, optou-se pela procura de polipeptídeos diferencialmente expressos, através da análise por Western-blot.

Para epimastigotas intracelulares, obtidos de culturas mantidas a diferentes temperaturas de incubação (33°C ou 37°C) iniciou-se a análise comparativa, procurando-se diferenças na expressão de proteínas de choque térmico como a HSP70, já descrita em *T. cruzi*. Como pode ser visto na Figura 3-12, o anticorpo monoclonal α -HSP70 reage com polipeptídeos presentes na fração citossólica de epimastigotas extracelulares (Figura 3-12 A) e epimastigotas intracelulares obtidos de culturas mantidas a 33°C (Figura 3-12 B). Na fração citossólica de epimastigotas intracelulares, obtidos de culturas mantidas a 37°C, não foi possível identificar reatividade do anticorpo α -HSP70 (não mostrado).

Figura 3-12 Perfil de polipeptídeos da fração citossólica de epimastigotas extracelulares (A) e epimastigotas intracelulares obtidos de culturas mantidas a 33°C (B). Dentro do círculo vermelho estão polipeptídeos reconhecidos pelo anticorpo α -HSP70 e revelados por quimioluminescência em análise por Western blot.

Poli-peptídeos de epimastigotas intracelulares em culturas mantidas na presença ou ausência de L-prolina

Inicialmente, optou-se pela determinação de poli-peptídeos diferencialmente expressos em parasitas obtidos de culturas cujas células hospedeiras foram carenciadas de L-prolina previamente à infecção (Figura 3-13).

Figure 3-13 Perfil de expressão de proteínas em epimastigotas intracelulares obtidos de culturas mantidas em presença de L-prolina 200 μ M a 33°C para as frações citossólica (A) e membranar (C). Perfil de expressão de proteínas de epimastigotas intracelulares obtidos de culturas cujas células hospedeiras foram pré-carenciadas de L-prolina anteriormente à infecção (B) fração citossólica (D) fração membranar.

Embora esta análise não tenha sido completada, a comparação entre o proteoma das frações de epimastigotas intracelulares cultivadas com e sem L-prolina, parecem as mais promissoras para a identificação de poli-peptídeos, devido à boa variação de poli-peptídeos entre as frações.

Discussão

Nos últimos anos, a eletroforese bidimensional (2D) tem sido a principal ferramenta na análise da composição protéica celular, assim como no estudo do perfil global da expressão gênica, ou seja, no proteoma. A técnica descrita, originalmente, por O'Farrel (O'Farrel 1975) e Klose (Klose 1975), permite alta eficiência na separação de proteínas (500 a 2000 que podem ser identificadas em um único gel) por combinar dois sistemas distintos de separação eletroforética: focalização isoeletrica e eletroforese em gel de poliacrilamida. Por quase duas décadas o protocolo de eletroforese bidimensional baseou-se no uso de anfólitos solúveis no estabelecimento do gradiente de pH dos géis (Klose 1975; O'Farrel 1975; O'Farrel *et al.*, 1977). No entanto, esta técnica mostrou-se bastante trabalhosa e devido à ausência de reprodutibilidade, necessária na análise de proteoma, acabou sendo substituída pela introdução do gradiente de pH imobilizado ou IPG (Bjellqvist *et al.*, 1982; Görg *et al.*, 1988; Görg *et al.*, 1998). IPGs, que são partes integrantes da matriz de poliacrilamida, permitem a obtenção de padrões reprodutíveis de gradiente de pH, permitindo que grandes quantidades de amostra possam ser resolvidas.

Em vista do descrito acima, houve uma tendência muito grande de se assumir que os géis bidimensionais poderiam servir como uma ferramenta de análise global da expressão de proteínas, baseado principalmente na possibilidade de se visualizar, identificar e quantificar centenas de proteínas em um único gel. No entanto, os géis bidimensionais não representam todos os polipeptídeos presentes. Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado que algumas classes de proteínas são excluídas ou estão sub-representadas nos padrões obtidos pela técnica. Incluem-se: proteínas muito ácidas ou básicas, que normalmente estão fora da faixa de separação dos géis disponíveis comercialmente; proteínas pouco solúveis, tais como proteínas de membrana que correspondem a 30% das proteínas anotadas nos bancos de dados (Paulsen *et al.*, 1998) e proteínas pouco abundantes. Estas últimas compõem um grupo importante de proteínas que engloba receptores, transdutores de sinal, fatores de transcrição e proteínas regulatórias. É interessante notar que foi descrita uma relação entre concentração da proteína e valores de códon bias. O códon bias é uma medida da probabilidade de um determinado organismo utilizar seletivamente determinados códons (existem 61 possibilidades de códons que codificam para os

20 aminoácidos), o que resultaria na incorporação do mesmo resíduo de aminoácido na cadeia polipeptídica em crescimento. Foi sugerido que os valores de códon bias de um gene podem servir como medida da abundância da proteína codificada pelo gene, pois proteínas abundantemente expressas possuem altos valores de códon bias (Kurland 1991). No entanto, essa interpretação é contestada por (Fey & Larsen 2001) que apontam problemas na tecnologia utilizada por estes grupos, isto porque ao se investigar a função de genes desconhecidos de levedura verificou-se uma preponderância de proteínas pouco abundantes, normalmente com valores de códon bias inferiores a 0,2, nas preparações.

Algumas tentativas foram feitas no sentido de melhorar a representação das proteínas pouco abundantes nos géis de 2D: fracionamento por solubilização diferencial (Molloy *et al.*, 1998; Santoni *et al.*, 1999), extração com solventes orgânicos (Molloy *et al.*, 1999) ou focalização isoeletrica em solução previamente à separação eletroforética (Zuo & Speicher 2000). No entanto, o pré-fracionamento da amostra pode introduzir mudanças adicionais aos resultados tornando questionável a reprodutibilidade da técnica. Além disso, no caso particular da extração diferencial por detergentes, um dos fatores de erro origina-se da necessidade de efetuar toda a separação por 2D, na presença do detergente de extração. Alguns detergentes distorcem as proteínas nos géis e impossibilitam a comparação entre géis de frações diferentes. Além das limitações da técnica, que podem ser superadas, desde que se otimize o preparo da amostra, existe ainda o problema da visualização das proteínas nos géis 2D, principalmente, daquelas presentes em baixa concentração. Para proteínas pouco abundantes, o método de detecção pode ser combinado com a técnica de immunoblotting (facilitada por anticorpos comercialmente disponíveis para uma série de classes de proteínas) que associadas à detecção, por métodos quimioluminescentes, permite a visualização de 100-500 moléculas por célula em extratos celulares não fracionados (Celis *et al.*, 1995). Um método de detecção amplamente utilizado é a marcação metabólica radioisotópica, que apresenta algumas limitações como a não marcação de proteínas com baixo turn-over ou com baixo conteúdo do isótopo utilizado. Como alternativa à marcação radioativa, alguns métodos de marcação são descritos na literatura, como por exemplo a marcação por alquilação (Vuong *et al.*, 2000) e por compostos fluorescentes pré ou pós separação (Patton 2000).

Em todos os casos, deve-se ter em conta que os projetos proteomas convencionais comparam as quantidades de proteínas das células obtidas de diferentes estados ou

condições. Não representam uma medida da dinâmica do proteoma nos diferentes estados biológicos que estão sendo comparados e tampouco dão informação sobre os mecanismos que controlam as mudanças de um estado a outro. No estado estacionário, o balanço entre a velocidade de síntese e velocidade de degradação determina a concentração de uma proteína (Gottesman & Maurizi 1992; Hochstrasser *et al.*, 1999; Benaroudj *et al.*, 2001), ou seja, um aumento no nível de expressão de uma proteína pode ser atingido por um aumento na velocidade de síntese ou pela diminuição da velocidade de degradação da mesma. Apesar de sua importância, o papel do turn-over das proteínas não é considerado na análise de proteoma. Recentemente, estão surgindo artigos que tratam da dinâmica do turn-over de proteínas nos projetos proteoma (Pratt *et al.*, 2002).

Com o objetivo de substituir-se a eletroforese em géis bidimensionais nas análises de proteoma, métodos alternativos de separação estão sendo integrados com a espectrometria de massa, tais como, separação prévia das proteínas por focalização isoeletrica e medidas de massa por MALDI-MS (Loo *et al.*, 1999), fracionamento de lisado celular por HPLC prévio à separação por SDS-PAGE (Oda *et al.*, 1999), análise de peptídeos gerados por digestão de misturas de proteínas que não são separadas por cromatografia líquida (LC)-MS/MS (Clauser *et al.*, 1995) ou marcação isotópica (Gygi *et al.*, 1999). Mais recentemente, inúmeros pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de "microarrays" de proteínas como uma ferramenta alternativa ao uso dos chips de DNA (Lopez & Pluskal 2003).

O estudo da expressão gênica dos tripanossomatídeos revelou que os genes de proteínas estão organizados em unidades transcricionais policistrônicas, estando os transcritos sujeitos a processamento através de trans-splicing e editoração do RNA. Como a regulação da expressão destes genes é independente da atividade de transcrição, ela está controlada ao nível de estabilidade e processamento do mRNA e ao nível da tradução e turn-over das proteínas. Uma vez que nem sempre existe uma relação direta entre mRNA e abundância de proteínas, a informação que pode ser tirada do genoma é limitada. Em consequência disso, o proteoma torna-se uma ferramenta importante no estudo dos parasitas, de doenças associadas e da interação parasita-célula.

Recentemente, surgiram os primeiros trabalhos na literatura do proteoma de *L. major* (Drummelsmith *et al.*, 2003) *L. donovani infantum* (El Fakhry *et al.*, 2002) *L. viannia guyanensis* (Acestor *et al.*, 2002) e *T. gondii* (Cohen *et al.*, 2002)

utilizando-se de géis bidimensionais e espectrometria de massa para identificação das proteínas. A análise proteômica de quatro estágios do *Plasmodium falciparum*, parasita causador da malária, também foi descrita, com uma abordagem baseada unicamente na análise por espectrometria de massa de proteínas, diferencialmente, extraídas e separadas por gel unidimensional (Florens *et al.*, 2002; Lasonder *et al.*, 2002). A análise revelou 1.289 proteínas, correspondentes a aproximadamente 23% do predito para o proteoma, das quais 714 foram identificadas, nos estágios assexuados, 931 nos gametócitos e 645 nos gametas (Lasonder *et al.*, 2002). Em *T. brucei*, foi publicado o primeiro trabalho metodológico que descreve um protocolo reprodutível para separação de proteínas por géis bidimensionais (van Deursen *et al.*, 2003). No caso de *T. cruzi*, o projeto genoma do parasita está incompleto, (<http://www.ebi.ac.uk/parasites/proteomes.html>), dificultando a análise do proteoma. A existência do genoma seqüenciado do parasita possibilitará identificar mais rapidamente polipeptídeos específicos de determinado estágio ou condição metabólica ou mesmo polipeptídeos com função desconhecida.

Para se determinar polipeptídeos presentes, exclusivamente em estágios epimastigotas intracelulares (polipeptídeos estágio-específicos), utilizou-se como ferramenta de análise a eletroforese em géis bidimensionais. Na tentativa de facilitar a análise foram feitos géis bidimensionais de fração citossólica e da fração enriquecida em membranas dos diferentes estágios de desenvolvimento: amastigotas, epimastigotas intracelulares, tripomastigotas e epimastigotas axênicos além da célula hospedeira. Para cada estágio, foram feitas duplicatas (amastigotas e epimastigotas axênicos) ou triplicatas independentes dos géis experimentais de cada uma das frações e os géis submetidos a um processo de detecção de polipeptídeos com o auxílio do programa ImageMaster. Nesta análise, os polipeptídeos foram detectados automaticamente pelo programa, a partir de parâmetros estabelecidos empiricamente. Os critérios utilizados, no estabelecimento destes parâmetros, visaram a detecção do maior número possível de polipeptídeos, sem a necessidade de edição manual. Isto porque o método de cálculo de volume e área dos polipeptídeos é feito tratando-se a imagem do gel como um mapa tridimensional, onde os polipeptídeos são vistos como “montanhas” e o “background” como “vales” e uma alteração na forma destas superfícies por qualquer processo de edição manual influencia a determinação de valores de área e volume, o que invalidaria a quantificação do nível de expressão entre polipeptídeos editados e não editados.

Uma vez detectados o maior número possível de polipeptídeos, passou-se à análise comparativa do perfil protéico dos diferentes estágios. Neste sentido, foram construídos géis representativos mínimos, contendo todos os polipeptídeos presentes em todas as duplicatas ou triplicatas de cada estágio e fração. Estes géis, por apresentarem um menor número de polipeptídeos, comparados aos géis experimentais, permitiram uma análise de coincidências entre estágios com menos incertezas, maior confiabilidade e menos dependente das condições fisiológicas de cada estágio, no momento da preparação dos extratos. A redução de aproximadamente 50% no número de polipeptídeos é quase a mesma obtida por outros grupos que realizam análises com esta mesma metodologia (R.E. Desjardins, comunicação pessoal).

Os géis representativos mínimos foram utilizados para a construção de um gel de referência (referência total), para cada fração, contendo todos os polipeptídeos mínimos representativos de cada tipo celular e então utilizado nas análises comparativas.

Aproximadamente, 40% dos polipeptídeos presentes na referência total da fração citossólica e 27% dos polipeptídeos da fração membranar foram comuns a todas as células em estudo. Esperava-se que a grande maioria dos polipeptídeos representados em cada gel, especialmente os dos géis da fração citossólica, fossem comuns a todas as células analisadas. Isto porque, possivelmente entre estes polipeptídeos estejam representadas, especialmente na fração citossólica, proteínas de “house keeping”.

Na análise comparativa entre os estágios, observou-se um maior número de coincidências entre os estágios amastigotas e epimastigotas intracelulares que pode ser decorrente de uma contaminação na amostra de epimastigotas intracelulares por formas amastigotas (amostras biológicas são raramente puras e sincrônicas), pela expressão destes polipeptídeos nas duas formas ou por esses polipeptídeos estarem melhor representados em amastigotas e epimastigotas intracelulares, facilitando a detecção.

Quando se comparam os perfis de expressão dos estágios intracelulares com o de epimastigotas extracelulares, o maior número de polipeptídeos comuns com epimastigotas extracelulares se encontra nos tripomastigotas seguido de epimastigotas intracelulares e amastigotas. Como descrito por nosso grupo, formas epimastigotas intracelulares e epimastigotas extracelulares compartilham algumas

semelhanças, tais como a carga da superfície, suscetibilidade a lise pelo sistema de complemento e reatividade com algumas lectinas (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999). Em vista do descrito esperava-se um maior número de coincidências entre epimastigotas intracelulares e epimastigotas extracelulares especialmente quanto a polipeptídeos de membrana.

Apesar das populações de parasitas conterem menos de 5% de células hospedeiras, é provável que se devam algumas coincidências à contaminação das preparações com células CHO-K1. Para os tripomastigotas, que são encontrados livres no meio de cultivo e portanto têm pouca ou nenhuma contaminação com a célula hospedeira, o número de polipeptídeos coincidentes com CHO-K1 foi menor, quando comparado ao número de coincidências entre CHO-K1 e as formas amastigotas e epimastigotas intracelulares. Esses dados talvez reflitam, pelo menos em parte, a ausência de contaminação com CHO-K1. Para epimastigotas extracelulares, as coincidências provavelmente representam polipeptídeos comuns, já que estas formas do parasita são obtidas de culturas axênicas. Ao se analisar as coincidências entre os quatro estágios do parasita e a célula CHO-K1, nenhum polipeptídeo comum foi detectado na fração membranar e apenas 5 foram identificados na fração citossólica. Entretanto estes últimos podem ser considerados comuns a todas as células, desde que se leve em conta o fato de estarem presentes também nos epimastigotas extracelulares.

Os epimastigotas intracelulares apresentaram um número reduzido de coincidências quando os perfis obtidos nas duas temperaturas são comparados. Vários fatores devem estar contribuindo para esse resultado. Entre eles, o fato de que alguns polipeptídeos teriam sua síntese diminuída devido a um aumento na expressão e representação de proteínas de choque térmico ou influência da expressão destas proteínas. Sabe-se que proteínas de choque térmico estão relacionadas com a diminuição na atividade catalítica das proteínas quinases e aumento da atividade de proteínas fosfatases, o que leva a variação do perfil de fosforilação/desfosforilação descrita em uma série de linhagens celulares (Chretien & Landry 1988; Maher & Pasquale 1989). De fato, de Carvalho e colaboradores sugerem que à temperatura de 37°C a regulação do gene da HSP 70 envolve o acúmulo seletivo de mRNA e sua expressão preferencial (De Carvalho *et al.*, 1990). A HSP 60 é outra proteína de choque térmico que apresenta níveis de mRNA 6 vezes maior a 37°C que a 28°C. Esta proteína mantém níveis constantes de expressão em várias temperaturas, no entanto, apresenta múltiplas isoformas

cuja abundância relativa é controlada pela temperatura (Sullivan *et al.*, 1994). No caso específico, só foi detectada a HSP70 nos epimastigotas intracelulares cultivados a 33°C e não a 37°C.

Os resultados obtidos na análise do perfil protéico descrito nesta Tese são de certa forma dados quase exploratórios. Há mudanças metodológicas a serem feitas, além da restrição do sistema a ser comparado.

Modificações pós-traducionais tais como fosforilação, glicosilação, metilação são uma fonte de variação e os polipeptídeos precisam ser identificados para a análise e comparação dos proteomas. A análise feita nesta Tese permitiu no entanto mostrar mudanças fisiológicas marcantes entre epimastigotas intracelulares provenientes de culturas mantidas em diferentes temperaturas e presença ou ausência de L-prolina, ambos importantes para a diferenciação intracelular de epimastigotas para tripomastigotas e que devem ser exploradas em um futuro próximo.

Discussão Final

Em tripanossomatídeos, supõe-se que exista, na produção de energia, um balanço entre o catabolismo de glicose e de aminoácidos. A utilização preferencial de um ou outro metabólito tem exemplos claros na literatura.

Prolina é um componente essencial no crescimento em meio semi-definido de *T. gambiense* (Vaucel 1968) e no meio de diferenciação de *T. cruzi* (TAU, (Contreras *et al.*, 1985). A atividade de prolina oxidase foi descrita em uma série de tripanossomatídeos (Srivastava & Bowmwn 1971; Krassner *et al.*, 1973; Sylvester *et al.*, 1974; Krassner & Flory 1977), que incluem o *Trypanosoma cruzi* (Sylvester & Krassner 1976). Deve-se ressaltar, no complexo ciclo de vida, que há a passagem por um vetor invertebrado que apresenta alta concentração de aminoácidos tanto na hemolinfa, como nos tecidos dos insetos (Schoffeniels 1970). Há a possibilidade de que exista uma dependência do metabolismo desse aminoácido nos insetos e como consequência também nos estágios do parasita, presentes no vetor. De fato, em alguns tripanossomatídeos como em *Leishmania tarentolae* e *T. scelopori*, demonstrou-se que L-prolina é completamente metabolizada, preferencialmente a D-glicose, a julgar pela maior quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ derivado de L-prolina, quando comparado ao que é produzido a partir da D-glicose (Blum 1994). O oposto foi observado em *Leishmania donovani*, onde a glicose parece ser consumida preferencialmente (Cazzulo 1992).

O mecanismo de utilização da glicose em tripanossomatídeos tem sido bastante estudado (Von Brand 1967; Southworth & Read 1969; Schaefer *et al.*, 1974; Gruenberg *et al.*, 1978; Eienthal *et al.*, 1989). Enquanto um sistema de transporte ativo foi encontrado em formas promastigotas de *Leishmania spp.* (Schaefer *et al.*, 1974; Schaefer & Mukkada 1976; Zilberstein & Dwyer 1984; Zilberstein & Dwyer 1985), em *Trypanosoma brucei*, foi sugerido um mecanismo de difusão facilitada (Gruenberg *et al.*, 1978; Game *et al.*, 1986; Eienthal *et al.*, 1989). Em *T. cruzi*, o gene que codifica para um membro da superfamília dos transportadores de glicose, TcrHT1, já foi clonado e caracterizado como um transportador de difusão facilitada, com alta afinidade por D-glicose e também capaz de transportar D-frutose, o que o distingue do transportador de glicose GLUT1, presente nos eritrócitos humanos, (Tetaud *et al.*, 1994). Glicose é a principal fonte de carbono e

de energia em alguns tripanossomatídeos, podendo-se incluir os epimastigotas de *T. cruzi*. Nestas formas, acredita-se que o crescimento seja sustentado por D-glicose, na fase exponencial, enquanto os aminoácidos seriam utilizados na fase estacionária de crescimento (Cazzulo 1984).

Em tripanossomatídeos, a via glicolítica está contida até gliceraldeído-1,3-bisfosfato (G-1,3-BP), no glicossomo (Opperdoes & Borst 1977), com dois "pools" de ATP e sem um mecanismo de inibição por "feedback" das enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase (Bakker *et al.*, 1995). O fluxo da via glicolítica pode ser então controlado: 1) pelo transportador de glicose presente na membrana plasmática, 2) pela entrada de glicose no glicossomo e 3) por fosforilação da hexoquinase. Em muitos organismos, o passo limitante no metabolismo de glicose é o transporte (D'Amore & Lo 1986). Em tripanossomatídeos, no entanto, há poucas informações sobre o transporte pela membrana glicossomal que é impermeável à maioria dos intermediários da via glicolítica (Opperdoes 1987) e, portanto, não permite a difusão facilitada de metabólitos. Neste sentido, a compartimentalização da via, dentro do glicossomo, permitiria um controle do fluxo da glicólise por qualquer um dos dois mecanismos de transporte, anteriores à ação da hexoquinase. De fato, alguns autores demonstraram, por análise de controle de fluxo, que em *T. brucei* o controle da via glicolítica está relacionada à sua compartimentalização e conseqüentemente à disponibilidade de glicose. Posteriormente, este resultado foi confirmado, ao se demonstrar um acúmulo extremo de hexose-6-fosfato, através de um modelo cinético de via glicolítica, onde a membrana do glicossomo era removida, pois não havia inibição direta pelo produto (Teusink *et al.*, 1998).

Pouco se sabe sobre o metabolismo energético durante a fase intracelular do parasita e se é afetado pelas profundas mudanças que ocorrem na célula hospedeira ao longo desse ciclo. Dentro deste panorama, demonstra-se, no Capítulo I desta Tese, a importância de L-prolina como um dos fatores de diferenciação intracelular do clone CL-14 de *Trypanosoma cruzi*. Para compreender melhor o sistema, mediu-se a atividade de transporte de L-prolina, nos diferentes estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*, na tentativa de relacioná-la à concentração intracelular de prolina livre. Paralelamente, e com resultados não incluídos nesta tese, estudou-se também o transporte de glicose (A.M. Silber, R.R. Tonelli).

Quando se compara a atividade específica de transporte entre os quatro estágios de desenvolvimento avaliados, observa-se que os epimastigotas obtidos de cultivo axênico apresentam uma atividade de transporte de glicose 20 vezes maior que os

tripomastigotas e aproximadamente 80 vezes maior que os epimastigotas intracelulares. Analisando-se os estágios correspondentes ao hospedeiro mamífero, observa-se uma atividade de transporte aproximadamente, 4 vezes maior nos tripomastigotas, ao compará-la aos epimastigotas intracelulares, enquanto a atividade de transporte de glicose nos amastigotas intracelulares, quando acontece, está abaixo da sensibilidade do método empregado (A.M. Silber, R.R. Tonelli, manuscrito em preparação).

Uma vez que os tripomastigotas são a forma circulante do parasita e, portanto, estão acessíveis à glicose do sangue, sugerir-se-ia como hipótese neste estágio, que o transportador de glicose fosse ativado, ou sintetizado, para que se explicasse a maior atividade de transporte de glicose em tripomastigotas em relação às demais formas de desenvolvimento encontradas no hospedeiro vertebrado. Nestas condições, os tripomastigotas poderiam utilizar a glicose como fonte de carbono ou de energia para completar a diferenciação para amastigotas intracelulares, uma vez que em tripomastigotas, praticamente, não há transporte de prolina. O aumento da atividade de transporte de prolina iniciar-se-ia, concomitantemente, com a transformação de tripomastigotas a amastigotas intracelulares. Neste caso, não haveria expressão do transportador de glicose em amastigotas, a julgar pela ausência de transporte de glicose neste estágio. A expressão do transportador de glicose começaria em epimastigotas intracelulares, até tripomastigotas, então equipados com transportadores de glicose, o que lhes permitiria incorporar e metabolizar este açúcar, presente em altas concentrações no meio extracelular. Esses resultados estão esquematizados na Figura DF-1.

Figura DF-1 Variações no transporte de glicose e prolina e da concentração de prolina intracelular livre ao longo do ciclo de diferenciação intracelular do *Trypanosoma cruzi*.

A adaptação a variações, nas condições ambientais, é um fenômeno comum e bem estudado em organismos unicelulares, como por exemplo as leveduras. Durante o jejum nutricional, são capazes não só de detectar a presença ou ausência de nutrientes, mas também, dependendo da fonte de carbono disponível, ativar diferentes vias metabólicas (revisto em (Rolland *et al.*, 2002). No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, foram descritos dois receptores (sensores) de glicose extracelular (Ozcan *et al.*, 1998). Em *T. cruzi*, não há dados na literatura sobre a possível existência de sensores de fonte de carbono. Sua presença, por hipótese, seria importante, desde que se leve em conta a ausência de reserva de glicogênio no parasita (Cazzulo 1992) e, portanto, a dependência direta do transporte para o consumo de glicose.

O transportador ou receptor de glicose poderia funcionar como um sensor da presença ou ausência de glicose, bem como um dos mecanismos de controle da via glicolítica, induzindo ou não sua expressão e modulando talvez a expressão de outros transportadores, como o de prolina. Alternativamente, o organismo poderia reconhecer a presença de prolina ou de glicose produzindo respostas independentes.

No caso específico de aminoácidos, além do transporte, deve-se considerar a degradação de proteínas endógenas e exógenas e a presença de reservossomos, organelas de reserva de proteínas, como fonte de carbono. Essas organelas têm seu volume drasticamente diminuído quando os parasitas são cultivados em meio

pobre, por exemplo, durante a diferenciação, *in vitro*, de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos. Reservossomos não foram detectados nas formas tripomastigotas (Soares *et al.*, 1989) ou epimastigotas intracelulares (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999). Para completar a análise das fontes de carbono preferenciais, seria importante que se verificasse a capacidade endocítica de proteínas/peptídios bem como diferenças na atividade proteolítica de cada estágio intracelular. Vale ressaltar que, em *Lactococcus lactis*, prolina livre entra na célula por simples difusão, mas há transporte ativo de di- e tripeptídios, que representam a maior fonte de prolina para esse organismo, (Smid & Konings 1990) porém esse transporte não foi analisado em *T. cruzi*.

Gonzalez e colaboradores (Gonzalez *et al.*, 1996) demonstraram que a transformação, em meio axênico, de formas tripomastigotas de *T. cruzi* a formas amastigotas e o desenvolvimento intracelular de amastigotas a tripomastigotas é inibido por lactacistina, um inibidor da função do proteassomo, que sugere a importância de aminoácidos e peptídeos no processo de remodelamento celular. Amastigotas poderiam acumular prolina, provavelmente através da degradação de proteínas responsáveis pela manutenção da antiga morfologia, como elementos de citoesqueleto e outras proteínas, pois, neste estágio, há uma baixa atividade de transporte de prolina. Além disso, a hidrólise de proteínas regulatórias pelo proteassomo seria um dos mecanismos que iniciaria mudanças estágio-específicas (Palombella *et al.*, 1994). Posteriormente, os epimastigotas intracelulares utilizariam a prolina acumulada em amastigotas, para completar o processo de transformação a tripomastigotas e finalmente, tripomastigotas liberados para o ambiente extracelular reestabeleceriam a concentração intracelular de prolina, utilizando a glicose como principal fonte de energia e carbono.

É possível que L-prolina aja como um sinalizador de diferenciação, especialmente de epimastigotas intracelulares a tripomastigotas, além de funcionar como uma fonte de energia. Neste sentido, diferentes perfis de proteínas deveriam ser obtidos quando ocorresse a diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas em presença de diferentes concentrações de L-prolina. Assim, optou-se por uma análise do perfil proteico, por eletroforese bidimensional, dos diferentes estágios de desenvolvimento intracelular (amastigotas e epimastigotas) e tripomastigotas de cultivo, procurando-se diferenças de expressão decorrentes da manutenção das culturas em diferentes concentrações de L-prolina ou na ausência deste aminoácido, condição em que se demonstrou não haver praticamente eclosão de formas

tripomastigotas. Inicialmente, identificou-se o perfil de proteínas dos diferentes estágios em condições padrão de cultivo, ou seja, em meio de cultura, contendo L-prolina 200 μ M e 2% de SFB. A análise destes perfis comparativamente a epimastigotas extracelulares e as células hospedeiras CHO-K1 permitiu a classificação de alguns polipeptídeos como candidatos a proteínas estágio-específicas. Posteriormente, verificou-se o efeito do pré-carenciamento de L-prolina, nas células hospedeiras sobre o perfil proteico nos estágios correspondentes ao hospedeiro vertebrado. A partir destas análises, no entanto, não foi possível ainda identificar proteínas que estivessem relacionadas ao papel da prolina na diferenciação. Prolina já foi descrita como um dos principais resíduos da estrutura primária de ligantes na interação proteína-proteína. Em particular, domínios SH3, WW, e vários outros domínios de interação com proteínas preferem seqüências ricas em prolina (revisto em (Williamson 1994). Proteínas ricas em regiões de prolina parecem também participar de outros sistemas como na endocitose de vesículas sinápticas (McPherson 1999). A fosforilação de proteínas é um mecanismo comum de regulação da função proteica e é utilizado extensivamente no contexto de proteínas, que contenham regiões ricas em prolina, (Pelech & Sanghera 1992) isto porque, freqüentemente regiões ricas em prolina contêm resíduos de serina ou treonina como resíduo precedente a prolina.

Em eucariotos superiores, a fosforilação reversível de proteínas em resíduos de serina, treonina e tirosina, desempenha papel primordial na integração de sinais relacionados à proliferação e diferenciação celular (Cohen 1989; Cohen 1992). É possível que as mesmas vias regulatórias existam em *T. cruzi* e estejam relacionadas às várias transformações que sofre o parasita, no entanto, são poucas as informações sobre estas vias. O cAMP, um segundo mensageiro importante em eucariotos superiores, já foi descrito como envolvido tanto na diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos dentro do inseto vetor (Gonzales-Perdomo *et al.*, 1988) como no controle da proliferação e diferenciação de amastigotas (de Castro *et al.*, 1987). Algumas serina/treonina proteínas quinase, incluindo-se a proteína quinase A (Ulloa *et al.*, 1988; Ochatt *et al.*, 1993), a proteína quinase C (Gomez *et al.*, 1989), e uma proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina (Oguetta *et al.*, 1996), foram descritas em epimastigotas de *T. cruzi*. Trabalho de Grellier e colaboradores (Grellier *et al.*, 1999) demonstrou que epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* quando tratados com Caliculina A, um inibidor de PP1 e PP2A, perdem sua característica alongada e adquirem uma morfologia arredondada. No Capítulo 3 desta Tese, demonstra-se que formas tripomastigotas

tratadas do clone CL-14 quando tratadas com Caliculina A, diferenciam-se a formas semelhantes aos epimastigotas intracelulares já descritos para este clone (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999). Posteriormente, estas últimas transformam-se em formas morfológicamente semelhantes aos amastigotas. Esses resultados, no entanto, não foram observados com a cepa Y ou com tripomastigotas metacíclicos do clone CL-14. De qualquer forma, são ainda necessários estudos bioquímicos e imunoquímicos que confirmem se as formas observadas são verdadeiramente epimastigotas intracelulares e amastigotas.

Em resumo, os dados apresentados nesta Tese contribuem para o conhecimento da fonte de carbono preferencial, utilizada pelos estágios intracelulares de *T. cruzi*, com ênfase na diferenciação dos epimastigotas intracelulares para tripomastigotas e sua dependência de prolina. Estabelecem ainda as condições para que se inicie o proteoma de epimastigotas intracelulares, nas condições fisiológicas que permitem ou não complementar o ciclo intracelular do parasita.

Material & Métodos

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Células da linhagem CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) foram cultivadas a 37°C em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL), 0.15% (m/v) NaHCO₃, 100 unidades mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, sob atmosfera úmida de 5% CO₂.

EPIMASTIGOTAS EXTRACELULARES

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* clone CL-14, foram cultivadas a 28°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL) como descrito na literatura (Camargo 1964).

TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS

Os tripomastigotas metacíclicos foram obtidos pela diferenciação de epimastigotas extracelulares (5 x 10⁶.mL⁻¹) mantidos a 28°C em meio TAU-3AAG (Triatomine Artificial Urine) contendo 10 mM de L-prolina, L-glutamato e L-aspartato (Contreras *et al.*, 1985).

AMASTIGOTAS E EPIMASTIGOTAS INTRACELULARES

As formas intracelulares amastigotas e epimastigotas foram obtidas de células CHO-K1 infectadas com tripomastigotas do clone CL-14. Para tanto, garrafas de cultivo de 125 cm² de células CHO-K1 foram infectadas com 7,5 x 10⁷ tripomastigotas em 20 mL de meio RPMI 1640 (Gibco BRL) acrescido de 2% de SFB por 3 horas a 37°C. Após as 3 horas de infecção as culturas foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato pH 7,4 (PBS), 1 vez com meio de cultivo RPMI e mantidas a 33°C em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) acrescido de 2% de soro fetal bovino (Gibco BRL). Nestas condições de infecção o ciclo intracelular do parasita era sincrônico com formas amastigotas entre o 2º-3º dias pós-infecção e formas epimastigotas intracelulares entre o 4º e 5º dias pós-infecção.

Outras formas epimastigotas intracelulares foram obtidas de células CHO-K1 infectadas nas mesmas condições mas mantidas em estufa a 37°C.

TRIPOMASTIGOTAS DE CULTIVO

As formas tripomastigotas foram obtidas de células CHO-K1 infectadas, cultivadas a 33°C em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) acrescido de 2% de soro fetal bovino (Gibco BRL), entre 6º-10º dia pós-infecção. Os parasitas obtidos foram coletados, contados em câmara de Neubauer e utilizados para experimentos posteriores.

PURIFICAÇÃO DE FORMAS INTRACELULARES

Células infectadas contendo os parasitas no estágio de interesse foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato pH 7,4 (PBS) e removidas com auxílio de "rubber" na presença de 10 mL de meio RPMI sem soro. O meio contendo parasitas livres, resíduos celulares e células intactas foi passado por um homogenizador potter, centrifugado a 480 x g durante 5 minutos para eliminar os resíduos celulares, depositados sobre 5 mL de um colchão de "Lymphoprep" e centrifugados a 4.300 x g durante 10 minutos (McCabe *et al.*, 1984). Os parasitas foram coletados da interfase Lymphoprep - RPMI sem remoção do meio de cultivo, lavados com meio RPMI sem soro, contados em câmara de Neubauer e utilizados para experimentos posteriores.

PURIFICAÇÃO DE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS

Os tripomastigotas metacíclicos obtidos da diferenciação de epimastigotas em meio LIT foram purificados em coluna de troca iônica DEAE-celulose. Para tanto, a população heterogênea de parasitas, contendo formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, foi lavada 2 vezes com PBS suplementando com 2% de glicose e ressuspendida em aproximadamente 2 mL da mesma solução. Este volume foi adicionado ao topo da coluna de DEAE-celulose previamente empacotada e equilibrada com 5 volumes de coluna de PBS-2% glicose. A saída dos tripomastigotas metacíclicos foi acompanhada por microscopia de luz, analisando-se alíquotas de aproximadamente 1 mL coletadas a partir do momento da aplicação do material à coluna. Os tripomastigotas metacíclicos purificados foram então contados e utilizados para experimentos posteriores.

MARCAÇÃO METABÓLICA COM ^{35}S -METIONINA

Os parasitas e células hospedeiras foram incubados em meio RPMI incompleto (sem metionina) contendo 5% de soro fetal bovino por 30 min na temperatura desejada, a uma concentração de 1×10^8 parasitas.mL⁻¹. Após este tempo, foram acrescentados 50 μCi de ^{35}S -metionina para mL de meio de cultura. Após três horas de incubação com agitação esporádica, os parasitas foram centrifugados a 480 x g durante 10 min e lavados 3 vezes com meio incompleto sem soro para remoção do material radioativo não incorporado.

OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM MEMBRANAS E PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Aproximadamente 5×10^7 células foram ressuspensas em 1 mL de tampão contendo 400 mM manitol, 10 mM HCl, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES/KOH pH 8,0, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptina, 0,15mg mL⁻¹ inibidor de tripsina, 1 mM PMSF, 0,1mM TLCK e sonificados 3 x 10 pulsos com intervalos de 1 minuto a 4°C. O material obtido da sonicação foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos para remoção de células intactas, o pellet obtido foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 100.000 x g por 1 hora a 4°C. Ao sobrenadante da centrifugação a 100.000 x g foi adicionado 1 mL de solução TCA 20% e incubado 1 h à temperatura ambiente. As proteínas precipitadas assim como o pellet da centrifugação 100.000 x g (correspondente a uma fração enriquecida em membranas) foram ressuspensas em tampão de lise.

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi feita em duplicata pelo método de Bradford (1976), utilizando-se uma solução de BSA como padrão.

EFEITO DA L-PROLINA NA ECLOSÃO DE TRIPOMASTIGOTAS

Células CHO-K1 cultivadas em garrafas de cultivo de 25 cm² a 37°C em meio RPMI (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, foram infectadas com $2,5 \times 10^7$ tripomastigotas em 5 mL de meio RPMI contendo 2% de soro fetal bovino a 37°C. Após três horas de incubação as células foram lavadas três vezes com PBS, 1 vez com meio de cultivo sem soro e incubadas com 5 mL de DMEM (Gibco BRL), suplementado com diferentes concentrações de L-prolina (200 μM , 20 μM) em estufa a 33°C ou 37°C. As formas tripomastigotas extracelulares foram

colhidas diariamente e contadas em câmara de Neubauer. O número de tripomastigotas foi determinado para um volume final de 5 mL de meio de cultivo.

EFEITO DA L-PROLINA NOS ESTÁGIOS INTRACELULARES

Células CHO-K1 cultivadas em garrafas de cultivo de 25 cm² a 37°C em meio RPMI (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, foram infectadas com $2,5 \times 10^7$ tripomastigotas em 5 mL de meio RPMI contendo 2% de soro fetal bovino a 37°C. Após três horas de incubação as células foram lavadas três vezes com PBS, 1 vez com meio de cultivo e incubadas com 5 mL de DMEM (Gibco BRL), na ausência ou presença de 200 µM de L-prolina em estufa a 33°C. As formas intracelulares (amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas) foram purificadas diariamente como descrito e contadas em câmara de Neubauer. O número de parasitas intracelulares foi determinado para um volume final de 5 mL de meio de cultivo.

VIABILIDADE DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Células CHO-K1 foram semeadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, previamente tratadas por no mínimo 12 horas em solução de NaOH 0,1 M, em placas de 24 poços na proporção de 20.000 células por poço. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco BRL) contendo 10% de SFB por 48 horas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após incubação metade das culturas celulares foram infectadas por *T. cruzi* na proporção de 50 parasitas por célula. As culturas infectadas ou não por *T. cruzi* foram mantidas na ausência ou presença de meio DMEM 2% SFB contendo diferentes concentrações de L-prolina (200 µM, 20 µM) por 10 dias. Ao longo deste período, foram feitos diariamente testes de viabilidade celular incubando-se as células semeadas nas lamínulas em estufa a 37°C por 30 minutos com Calceína AM (células não infectadas) ou com Homodímero de Etídio (células infectadas com *T. cruzi*), ambos da Molecular Probes, diluídos 1:1000 em PBS. Após incubação as células foram lavadas 2 vezes com PBS e as lâminas de microscopia montadas utilizando-se solução de PBS:glicerol (1:1) pH 8,5. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência com auxílio do sistema de análise de imagens Image-Pro Plus.

IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

A imunofluorescência indireta foi realizada de acordo com o descrito na literatura (Bongertz & Galvão Castro 1983). Parasitas e células CHO-K1 infectadas ou não

com *T. cruzi*, foram lavadas 3 vezes com meio RPMI sem soro e fixadas em solução tamponada 4% de paraformaldeído em PBS pH 7,4, por uma hora à temperatura ambiente. Depois de fixadas, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo primário por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, os materiais foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após este período as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com corante rodamina (Molecular Probes) na diluição de 1:1000 em PBS. As amostras foram lavadas três vezes com PBS e as lâminas de microscopia montadas utilizando-se solução de PBS:glicerol (1:1) pH 8,5. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência com auxílio do sistema de análise de imagens Image-Pro Plus.

ENSAIOS DE TRANSPORTE

Os parasitas foram lavados três vezes por centrifugação e ressuspendidos com PBS pH 7,4. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustados com PBS a uma concentração final de 2×10^8 células/mL e distribuídos em alíquotas de 100 μ L (contendo 2×10^7 células cada). Os ensaios de transporte foram iniciados pela adição aos tubos de ensaio de 100 μ L da diluição desejada de L-prolina em PBS na presença de 0,5 μ Ci de L-prolina [3 H]. V_0 foi medido a 28°C por 30 s pela incorporação de L-prolina radioativa em duas concentrações: 0,75 mM ou 3,0 mM. Em todos os casos, o transporte foi interrompido pela adição de 800 μ L de prolina 50 mM em PBS gelado, e por uma rápida lavagem por centrifugação a 10.000 x g por 60 s (Silber *et al.*, 2002).

DOSAGEM DE PROLINA INTRACELULAR LIVRE

Preparo de conteúdo intracelular

Células CHO-K1, assim como diferentes estágios do parasita foram lavados 2 com tampão fosfato pH 7,4 (PBS), ressuspensos em solução contendo 10 μ g/mL leupeptina, 0,15 mg/mL inibidor de tripsina, 1 mM PMSF, 0,1mM TLCK e sonificados a 4°C com 10 pulsos de 15 segundos com intervalos de um minuto entre cada pulso. O material foi ultracentrifugado a 100.000 x g por 1 hora a 4°C. Ao sobrenadante da ultracentrifugação foi adicionado igual volume de uma solução TCA 20% e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação o

material foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para dosagem do conteúdo intracelular de diferentes metabólitos.

Determinação de conteúdo de água

O conteúdo de água foi medido por método gravimétrico. Células (1×10^8) foram lavadas em PBS e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 15 min. Os pellets foram pesados, liofilizados por 12 horas e pesados novamente. As diferenças em massa antes e após a liofilização foram consideradas como correspondentes à perda de água. Uma vez que a massa foi determinada à temperatura ambiente, a equivalência $1 \text{ g} = 1 \text{ mL}$ foi utilizada como aproximação.

Dosagem de prolina

A determinação da concentração de prolina livre foi feita pelo método de Bates (1973). Aproximadamente $200 \mu\text{L}$ de amostra foram incubados com $200 \mu\text{L}$ de ácido acético glacial e $200 \mu\text{L}$ de uma solução ácida de ninhidrina (0,25 g ninhidrina em 6 mL de ácido acético glacial e 4 mL de ácido fosfórico 6 M) por 1 hora a 100°C . Os tubos foram então transferidos para um banho de gelo e a mistura de reação foi extraída com $400 \mu\text{L}$ de tolueno. A fase contendo o cromóforo foi separada da fase aquosa, aquecida à temperatura ambiente e as absorbâncias lidas a 520 nm. As reações foram feitas utilizando-se água destilada como branco. A concentração de prolina foi determinada a partir de uma curva padrão.

EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS COM SOLUÇÃO TAMPONADA DE ETANOL FERVENTE

A extração de metabólitos foi feita como descrito na literatura (Gonzalez *et al.*, 1997). Previamente à extração, os parasitas ou células hospedeiras foram centrifugados e ressuspensos em PBS na proporção de 2 mg de proteínas totais/mL. Esta solução foi então adicionada em um erlenmeyer de 100 mL contendo 21 mL de etanol absoluto fervente tamponado com 2 mL de HEPES 1 M pH 7,5. Após 3 minutos de incubação a 100°C o material foi esfriado em gelo e rotaevaporado a 45°C . O resíduo final foi ressuspensionado em 1 mL de água bidestilada e passada em filtro de $0,22 \mu\text{m}$ para remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante foi mantido a -80°C até a hora do uso.

ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA

O pH do material obtido da extração com solução tamponada de etanol fervente, foi ajustado para 8,0 com solução de HCl 6 M. Em seguida 100 μL desta solução foram secos em speed-vac e ressuspensos em 300 μL de uma solução de citrato de sódio pH 2,2 e passada em filtro de 0,45 μm . A detecção foi feita por monitoração colorimétrica a 570 nm e 440 nm após reação com ninhidrina, em dois sistemas de eluição (47 min e 80 min).

DIFERENCIAÇÃO CELULAR COM CALICULINA A

Experimentos foram feitos com populações de parasitas contendo mais de 90% de formas tripomastigotas e demais assemelhando-se a formas amastigotas. Os parasitas obtidos de células CHO-K1 ou LLC-MK₂ infectadas, respectivamente, com *T. cruzi* clone CL-14 e cepa Y foram ressuspensos em meio de cultura DMEM 2% de SFB a uma densidade de $2 - 4 \times 10^6$ parasitas.mL⁻¹ e mantidos em placas de 24 poços (500 μL de suspensão de células por poço). Quinhentos microlitros de meio de cultura contendo o dobro da concentração final de Caliculina A desejada foram adicionados em cada poço. Aos controles foi adicionado meio de cultura contendo a mesma concentração de DMSO, solvente utilizado na solução de Caliculina A. As placas foram incubadas a 37°C ou 33°C sob atmosfera úmida de 5% de CO₂ e alíquotas foram tiradas após diferentes tempos de incubação para contagem dos parasitas em câmara de Neubauer.

COLORAÇÃO COM DAPI

A morfologia celular foi estudada em células fixadas em paraformaldeído 2% (m/v) em tampão fosfato pH 7,4. Para coloração do DNA, as células foram lavadas em PBS (4.000 x g, 5 min), incubadas por 10 minutos com 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de DAPI em PBS, lavadas novamente e ressuspensas em PBS:glicerol (1:1), pH 8,5. As células foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência com auxílio do sistema de análise de imagens Image-Pro Plus.

ANÁLISE ELETROFORÉTICA

Eletroforese unidimensional – SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli 1970) foi realizada de acordo com o descrito na literatura. A separação das proteínas foi feita em gel de 9% de poliacrilamida com dimensões de 9 x 5,5 x 0,75 cm e o gel de empilhamento foi

preparado na concentração de 3% de poliacrilamida. A corrida foi feita a voltagem constante de 120V até que o corante marcador azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel. Em seguida o gel foi fixado e corado em uma solução aquosa contendo 30% etanol, 7% ácido acético e 0,03% azul de Coomassie, durante uma hora à temperatura ambiente. Em seguida o gel foi descorado em uma solução aquosa contendo 30% etanol, 7% ácido acético, sob agitação à temperatura ambiente. Para a determinação das massas moleculares foram utilizados como marcadores de massa molecular, padrões de proteínas (Sigma). Esses marcadores foram separados por eletroforese e a relação linear entre migração relativa das bandas de proteínas e o logaritmo do peso molecular das mesmas foi utilizado para a determinação das massas moleculares desconhecidas (Shapiro *et al.*, 1967). A quantidade de amostra aplicada em cada canaleta do gel foi de aproximadamente 20 μ g de proteínas.

Eletroforese bidimensional – 2D

Immobiline Drystrips (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) foram rehidratados com 125 μ L de tampão de rehidratação (8 M Uréia, 2% Chaps, 2% IPG Buffer, 2,8 mg/mL DTT, azul de bromofenol) contendo 500.000 cpm de amostra (aproximadamente 10 μ g de proteína) a 25°C por 24 h. A focalização isoeletrica foi feita no sistema MultiPhor II com aumento linear da voltagem nas seguintes condições: 200V 2mA 5W 0:01h, 3500V 2mA 5W 1:30h, 3500V 2mA 5W 3:05h. Antes da segunda dimensão as tiras foram equilibradas por 15 min em tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Uréia, 30 % (v/v) Glicerol, 2% (v/v) SDS, 10 mg/mL DTT, azul de bromofenol) e mais 15 min em outra solução de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M Uréia, 30% (v/v) Glicerol, 2% (v/v) SDS, 25 mg/mL Iodoacetamida, azul de bromofenol). A segunda dimensão horizontal foi feita em gel gradiente 8% a 18% de poliacrilamida (ExcelGel SDS-Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) nas condições de 600V, 20 mA por 0:30h e 600V, 50mA por 1:30h, até que a frente do corante azul de bromofenol atingisse o tampão anódico.

Secagem e radioautografia

O gel de poliacrilamida contendo proteínas marcadas radioisotopicamente, foi incubado por 45 minutos em solução amplificadora "Amplify" (Amersham) à temperatura ambiente. Após incubação o gel foi seco em papel de filtro sob vácuo por 1 hora a 80°C e exposto em contato com filme raio-X (Kodak), a - 80°C por um período variável de dias de acordo com os níveis de radioatividade de cada gel.

ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

As imagens das autoradiografias dos géis bidimensionais foram convertidas a 8 bits/pixel e importadas para o programa ImageMaster 2D software (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Em cada uma das imagens, após um procedimento de calibração, foi feita a localização dos spots (detecção), definição da forma dos polipeptídeos e cálculo de área e volume. As proteínas que não foram detectadas automaticamente pelo programa, foram editadas manualmente. Os parâmetros de detecção foram os mesmos para cada uma das imagens. A subtração de background foi feita automaticamente para cada um dos polipeptídeos. Em cada caso, a intensidade do background ao redor de cada proteína foi calculado como um valor médio de pixels e descontado de cada spot. O processo de comparação das proteínas ("match") foi feito selecionando-se uma das imagens como gel de referência e fazendo-se comparação utilizando-se como ponto de referência proteínas que visivelmente se encontravam em ambos os géis.

WESTERN BLOT

Após separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose por 12 horas a 4°C, em voltagem constante de 20 V na presença de solução tampão de transferência contendo 130 mM glicina, 25 mM Tris, 20% (v/v) metanol. As membranas foram coradas com uma solução aquosa contendo 0,2% Ponceau. Posteriormente as membranas foram lavadas com TBS e bloqueadas com 1% BSA em TBS-TT (tampão 50 mM Tris pH 8.6, 150 mM NaCl, 0.03% Tween-20, 0.05% Triton X-100), por no mínimo 30 min à temperatura ambiente, seguido por 18 h de incubação a 4°C com o anticorpo de interesse. Após este período as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-TT e incubadas por mais 2 horas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase em TBS-TT à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas e a marcação foi revelada por quimioluminescência com o kit ECL (Amersham). Após a utilização, as membranas foram re-utilizadas depois de incubadas com uma solução contendo 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS e 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, a 60°C por 30 minutos e lavadas 2 vezes com TBS-TT por 10 minutos.

Referências Bibliográficas

- Abuin, G., W. Colli, W. De Souza and M. J. M. Alves (1989). "A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution." *Molecular and Biochemical Parasitology* **35**: 229-238.
- Acestor, N., S. Masina, J. Walker, N. Saravia, N. Fasel and M. Quadroni (2002). "Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes." *Proteomics* **2**(7): 877-879.
- Acosta-Serrano, A., I. C. Almeida, L. H. Freitas-Junior, N. Yoshida and S. Schenkman (2001). "The mucin-like super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles." *Molecular and Biochemical Parasitology* **114**(2): 143-150.
- Alberts, A. S., T. Dent, A. Lin, J. L. Meinkoth, A. Schöenthal, M. C. Mumby, M. Karin and J. R. Feramisco (1993). "Protein phosphatase 2A potentiates activity of promoters containing AP-1-binding elements." *Molecular and Cellular Biology* **13**: 2104-2112.
- Almeida, I. C., R. Gazzinelli, M. A. Ferguson and L. R. Travassos (1999). "*Trypanosoma cruzi* mucins: potential functions of a complex structure." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**(1): 173-176.
- Almeida-de-Faria, M., E. Freymüller, W. Colli and M. J. M. Alves (1999). "*Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form." *Experimental Parasitology* **92**: 263-274.
- Alves, M. J. M. and W. Colli (1975). "Glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*." *FEBS Letters* **52**: 188-190.
- Alves, M. J. M., G. Abuin, V. Y. Kuwajima and W. Colli (1986). "Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* **21**: 75-82.
- Andrews, N. W. and W. Colli (1982). "Adhesion and internalization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells." *Journal of Protozoology* **29**(2): 264-269.
- Andrews, N. W., A. M. Katzin and W. Colli (1984). "Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with cell invasion capacity." *European Journal of Biochemistry* **140**: 599-606.
- Andrews, N. W., E. S. Robbins, V. Ley, K. Hong and V. Nussenzweig (1988). "Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." *Journal of Experimental Medicine* **167**: 300-314.
- Andrews, N. W., K. Hong, E. S. Robbins and V. Nussenzweig (1987). "Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*." *Experimental Parasitology* **64**: 474-484.
- Araguth, M. F., M. M. Rodrigues and N. Yoshida (1988). "*T. cruzi* metacyclic trypomastigotes: neutralization by the stage-specific monoclonal antibody 1G7 and immunogenicity of 90 kDa surface antigen." *Parasite Immunology* **10**: 707-712.

- Araya, J. E., M. I. Cano, N. Yoshida and J. Franco da Silveira (1994). "Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82 kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**: 161-169.
- Arpita, D., M. Gale, V. Carter and M. Parsons (1994). "The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces defects cytokinesis and organellar genome segregation in *Trypanosoma brucei*." *Journal of Cell Science* **107**: 3477-3483.
- Avila, J. L., R. Perez-Kepp and A. Bretana (1983). "A minimal medium for the cultivation of infective *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." *Journal of General Microbiology* **129**(2): 285-291.
- Avila, J., J. Dominguez and J. Diaz-Nido (1994). "Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development." *International Journal of Developmental Biology* **38**: 13-25.
- Bakalara, N., A. Seyfang and C. Davis (1995). "*Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: life cycle-regulated protein tyrosine phosphatase activity." *Experimental Parasitology* **81**: 302-312.
- Bakker, B., H. Westerhoff and P. Michels (1995). "Regulation and control of compartmentalized glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **27**(5): 513-525.
- Baksa, K., H. Morawietz, V. Dombrádi, M. axton, H. Taubert, G. Szabó, I. Török, A. Udvardy, H. Gyrkovics, B. Szöör, D. Glover, G. Reuter and J. Gauz (1993). "Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position-effect variegation and mitosis in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **135**: 117-125.
- Ballou, L. M., P. Jeño and G. Thomas (1988). "Protein phosphatase 2A inactivates the mitogen-stimulated S6 kinase from swiss mouse 3T3 cells." *Journal of Biological Chemistry* **263**: 1188-1194.
- Barret, F. M. (1973). "Changes in the concentration of free amino acids in the haemolymph of *Rodnius prolixus* during the fifth instar." *Comparative Biochemistry and Physiology* **48**: 241-250.
- Barros, H. C., N. V. Verbisck, S. da Silva, M. F. Araguth and R. A. Mortara (1997). "Distribution of epitopes of *Trypanosoma cruzi* amastigotes during the intracellular life cycle within mammalian cells." *Journal of Eukaryotic Microbiology* **44**(4): 332-344.
- Basombrio, M., L. Gomez, A. Padilla, M. Ciaccio, T. Nozaki and G. Cross (2002). "Targeted deletion of the gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors." *J Parasitol* **88**(3): 489-493.
- Bates, L. S. (1973). "Rapid determination of free proline for water-stress studies." *Plant and Soil* **39**: 205-207.
- Behbehani, K. (1973). "Developmental cycles of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas 1909) in mouse peritoneal macrophages *in vitro*." *Parasitology* **66**: 343-353.
- Benaroudj, N., E. Tarcsa, P. Cascio and A. Goldberg (2001). "The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes." *Biochimie* **83**(3-4): 311-318.
- Bertelli, M. S. M., R. R. Golgher and Z. Brener (1977). "Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture." *Journal of Parasitology* **63**: 434-437.

- Bertello, L. E., N. W. Andrews and R. M. Lederkremer (1996). "Developmentally regulated expression of ceramide in *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* **79**: 143-151.
- Besteiro, S., M. Miran, N. Biteau, V. Coustou, T. Baltz, P. Canioni and F. Bringaud (2002). "Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase." *Journal of Biological Chemistry* **227**(41): 38001-38012.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Görg, R. Westermeier and W. Postel (1982). "Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **6**: 317-339.
- Blum, J. J. (1994). "Energy metabolism in *Leishmania*." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**(2): 147-219.
- Bonaldo, M. C., L. N. d'Escoffier, J. M. Salles and S. Goldenberg (1991). "Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." *Experimental Parasitology* **73**(1): 44-51.
- Bongertz, V. and B. Galvão Castro (1983). "Immunofluorescence. In: Morel, C.M." Genes and antigens of parasites: 401-412.
- Booher, B. and D. Beach (1989). "Involvement of a type 1 protein phosphatase encoded by *bws1+* in fission yeast mitotic control." *Cell* **57**: 1009-1016.
- Brack, C. (1968). "Elektronmikroskopische untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*." *Acta Tropica* **25**: 289-356.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brener, Z. (1973). "Biology of *Trypanosoma cruzi*." *Annual Review of Microbiology* **27**: 347-382.
- Brener, Z., R. Golgher, M. S. Bertelli and J. A. Teixeira (1976). "Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture." *Journal of Protozoology* **23**(1): 147-150.
- Brener, Z., Z. A. Andrade and M. Barral-Neto (2002). "*Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas." Guanabara Koogan: 1-431.
- Briones, M. R., C. M. Egima, A. Acosta and S. Schenkman (1994). "Trans-sialidase and sialic acid acceptors from insect to mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*." *Experimental Parasitology* **79**: 211-214.
- Burleigh, B. A. and A. M. Woolsey (2002). "Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion." *Cell Microbiology* **4**(11): 701-711.
- Burleigh, B. A. and N. W. Andrews (1995). "The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells." *Annual Review of Microbiology* **49**: 175-200.
- Burns, J. M. J., M. Parsons, D. E. Rosman and S. G. Reed (1993). "Molecular cloning and characterization of a 42-kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*." *Journal of Biological Chemistry* **268**: 17155-17161.
- Camargo, E. P. (1964). "Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **6**: 93-100.

- Cannata, J. J. B. and J. J. Cazzulo (1984). "The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*." *Comparative Biochemistry and Physiology* **79B**: 297-308.
- Carvalho, R. M. G., M. N. L. Meirelles, W. De Souza and W. Leon (1981). "Isolation of the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with mouse macrophages *in vitro*." *Infection and Immunity* **33**: 546-554.
- Carvalho, T. U. and W. De Souza (1987). "Cytochemical localization of NADH oxidase during interaction of *Trypanosoma cruzi* with activated macrophages." *Parasitology Research* **73**: 213-217.
- Castellani, O., L. V. Ribeiro and J. F. Fernandes (1967). "Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture." *Journal of Protozoology* **4**: 447-451.
- Cazzulo, J. J. (1984). "Protein and amino acid catabolism in *Trypanosoma cruzi*." *Comparative Biochemistry and Physiology* **79(3)**: 309-320.
- Cazzulo, J. J. (1992). "Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids." *The FASEB Journal* **6**: 3153-3161.
- Cazzulo, J. J., B. F. De Cazzulo, J. C. Engel and J. J. B. Cannata (1985). "End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids." *Molecular and Biochemical Parasitology* **16**: 329-343.
- Celis, J. E., H. H. Rasmussen, P. Gromov, E. Olsen, P. Madsen, H. Leffers, B. Honore, K. Dejgaard, H. Vorum and D. B. Kriestensen (1995). "The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways." *Electrophoresis* **16**: 2177-2240.
- Chagas, C. (1909). "Nova tripanomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1**: 159-218.
- Chaudhuri, M. (2001). "Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase type 5 from *Trypanosoma brucei*." *Gene* **266(1-2)**: 1-13.
- Chretien, P. and J. Landry (1988). "Enhanced constitutive expression of the 27-kDa heat shock proteins in heat-resistant variants from Chinese hamster cells." *Journal of Cellular Physiology* **137(1)**: 157-166.
- Clarke, P. R., I. Hoffman, G. Daraetta and E. Karsenti (1993). "Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts." *Molecular Biology of the Cell* **4**: 397-411.
- Clauser, K. R., S. C. Hall, D. M. Smith, J. W. Webb, L. E. Andrews, H. M. Tran, L. B. Epstein and A. L. Burlingame (1995). "Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by two-dimensional PAGE." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5072-5076.
- Cohen, A., K. Rumpel, G. Coombs and J. Wastling (2002). "Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*." *International Journal of Parasitology* **32(1)**: 39-51.
- Cohen, P. (1989). "The structure and regulation of protein phosphatases." *Annual Review of Biochemistry* **58**: 453-508.
- Cohen, P. (1992). "Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates." *Trends in Biochemical Science* **17(10)**: 408-413.

- Colli, W. (1993). "Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*." *FASEB Journal* **7**(13): 1257-1264.
- Contreras, V. T., J. M. Salles, N. Thomas, C. M. Morel and S. Goldenberg (1985). "In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions." *Molecular and Biochemical Parasitology* **16**: 315-327.
- Contreras, V. T., M. C. Navarro, A. R. De Lima, F. Duran, R. Arteaga and Y. Franco (2002). "Early and late molecular and morphologic changes that occur during the *in vitro* transformation of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to amastigotes." *Biological Research* **35**(1): 47-58.
- Cross, G. A. M. and G. B. Takle (1993). "The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*." *Annual Review of Microbiology* **46**: 385-411.
- D'Amore, T. and T. Lo (1986). "Hexose transport in L6 rat myoblasts. I. Rate-limiting step, kinetic properties, and evidence for two systems." *Journal of Cellular Physiology* **127**(1): 95-105.
- De Carvalho, E. F., F. T. De Castro, E. Rondinelli, C. M. Soares and J. F. Carvalho (1990). "HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels." *Journal of Cellular Physiology* **143**(3): 439-444.
- De Castro, S., M. N. Meirelles and M. Oliveira (1987). "*Trypanosoma cruzi*: adrenergic modulation of cyclic AMP role in proliferation and differentiation of amastigotes *in vitro*." *Experimental Parasitology* **64**(3): 368-375.
- De Diego, J., J. Katz, P. Marshall, B. Gutierrez, J. Manning, V. Nussenzweig and J. Gonzalez (2001). "The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling." *Biochemistry* **40**(4): 1053-1062.
- De Jesus, A., R. Cooper, M. Espinosa, J. Gomes, E. Garcia, S. Paul and G. Cross (1993). "Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle." *Journal of Cell Science* **106**(4): 1023-1033.
- De Souza, W. (1984). "Cell biology of *Trypanosoma cruzi*." *International Review of Cytology* **86**: 197-283.
- De Souza, W., I. Merza, A. Martinez-Palomo, M. Sabanero, T. Souto-Padron and M. Meirelles (1983). "*Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labelled tubulin and actin in epimastigotes." *Journal of Parasitology* **69**: 138-142.
- Delauney, A. J. and D. P. S. Verma (1993). "Proline biosynthesis and osmoregulation in plants." *Plant Journal* **4**: 215-223.
- Díaz, J. C. P. (1979). "Mecanismos de transmissão. Em: Brener Z, Andrade ZA (eds) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas." Guanabara Koogan: 152-174.
- Docampo, R., D. A. Scott, A. E. Vercesi and S. N. J. Moreno (1995). "Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisome of *Trypanosoma cruzi*." *Biochemical Journal* **310**: 1005-1012.
- Doonan, J. H. and N. R. Morris (1989). "The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1." *Cell* **57**: 987-996.
- Drummelsmith, J., V. Brochu, I. Girard, N. Messier and M. Ouellette (2003). "Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms." *Molecular and Cellular Proteomics* **2**(3): 146-155.

Dusanik, D. G. (1980). "In vivo production of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*." *Journal of Parasitology* **66**: 1046-1049.

Eisenthal, R., S. Game and G. Holman (1989). "Specificity and kinetics of hexose transport in *Trypanosoma brucei*." *Biochimica and Biophysica Acta* **985**(1): 81-89.

El Fakhry, Y., M. Ouellette and B. Papadopoulou (2002). "A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*." *Proteomics* **2**(8): 1007-1017.

Emmerson, K. S. and J. M. Phang (1993). "Hydrolysis of proline dipeptides completely fulfills the proline requirement in a proline-auxotrophic Chinese hamster ovary cell line." *Journal of Nutrition* **123**(5): 909-914.

Engel, J. C., B. F. De Cazzulo, A. O. M. Stoppani, J. J. B. Cannata and J. J. Cazzulo (1987). "Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes." *Molecular and Biochemical Parasitology* **26**: 1-10.

Engel, J. C., P. S. Doyle, I. Hsieh and J. H. McKerrow (1998). "Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection." *Journal of Experimental Medicine* **188**(4): 725-734.

Eriksson, J. F. and R. D. Goldman (1993). "Protein phosphatase inhibitors alter cytoskeleton structure and cellular morphology." *Advances in Protein Phosphorylation* **7**: 335-357.

Erondy, N. E. and J. E. Donelson (1991). "Characterization of trypanosome protein phosphatase 1 and 2A catalytic subunits." *Molecular and Biochemical Parasitology* **49**: 303-314.

Evans, D. A. and R. C. Brown (1972). "The utilization of glucose and proline by culture forms of *Trypanosoma brucei*." *Journal of Protozoology* **16**: 686-689.

Faria-e-Silva, P. M., F. C. Silva-Filho and W. De Souza (1999). "Cell surface composition of promastigotes and opisthomorph forms of *Herpetomonas roitmani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)." *Parasitology Research* **85**: 719-725.

Faria-e-Silva, P. M., M. Attias and W. De Souza (2000). "Biochemical and ultrastructural changes in *Herpetomonas roitmani* related to energy metabolism." *Biology of the Cell* **92**: 39-47.

Faucher, J. F., T. Baltz and K. G. Petry (1995). "Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*." *Parasitology Research* **81**: 441-443.

Felix, M. A., P. Cohen and E. Karsenti (1990). "Cdc2 H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in *Xenopus* early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid." *EMBO Journal* **9**: 675-683.

Ferguson, M. A. J. (1997). "The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **352**(1359): 1295-1302.

Fey, S. J. and P. M. Larsen (2001). "2D or not 2D." *Current Opinion in Chemical Biology* **5**: 26-33.

Florens, L., M. Washburn, J. Raine, R. Anthony, M. Grainger, J. Haynes, J. Moch, N. Muster, J. Sacci, D. Tabb, A. Witney, D. Wolters, Y. Wu, M. Gardner, A. Holder, R. Sinden, J. Yates and D. Carucci (2002). "A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle." *Nature* **419**(6906): 520-526.

- Fraidenraich, D., C. Peña, E. L. Isola, E. M. Lammel, O. Coso, A. Diaz Afel, S. Pongor, F. Baralle and H. N. Torres (1993). "Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an α D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: effect on differentiation of epimastigote o trypomastigote." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 10140-10144.
- Frydman, B., C. d. I. Santos, J. J. B. Cannata and J. J. Cazzulo (1990). "Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1- 13 C] glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*." *European Journal of Biochemistry* **192**: 363-368.
- Game, S., G. Holman and R. Eiseenthal (1986). "Sugar transport in *Trypanosoma brucei*: a suitable kinetic probe." *FEBS Letters* **194**(1): 126-130.
- Giordano, R., D. L. Fouts, D. S. Tewari, W. Colli, J. E. Manning and M. J. M. Alves (1999). "Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin." *Journal of Biological Chemistry* **274**(6): 3461-3468.
- Giordano, R., R. Chamas, S. S. Veiga, W. Colli and M. J. M. Alves (1994). "An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein." *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**: 85-94.
- Glauert, A. M., J. Baker and L. F. Selden (1982). "Mechanism of entry and development of *Trypanosoma dionisii* in non-phagocytic cells." *Journal of Cell Science* **56**: 371-387.
- Gomez, M., L. Erijman, S. Arauzo, H. Torres and M. Tellez-Inon (1989). "Protein kinase C in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: partial purification and characterization." *Molecular and Biochemical Parasitology* **36**(2): 101-108.
- Gonzales-Perdomo, M., P. Romero and S. Goldenberg (1988). "Cyclic AMP and adenylate cyclase stimulators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation." *Experimental Parasitology* **62**: 329-335.
- Gonzalez, B., J. Francois and M. Renaud (1997). "A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol." *Yeast* **13**(14): 1347-55.
- González, J., A. Cornejo, M. R. M. Santos, E. M. Cordero, B. Gutiérrez, P. Porcile, R. A. Mortara, H. Sagua, J. Franco da Silveira and J. E. Araya (2003). "A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*." *Biochemical Journal*. (in press).
- Gonzalez, J., F. J. Ramalho-Pinto, U. Frevert, J. Ghiso, S. Tomlinson, J. Scharfstein, E. J. Corey and V. Nussenzweig (1996). "Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite." *Journal of Experimental Medicine* **184**: 1909-1918.
- Görg, A., G. Boguth, C. Obermaier and W. Weiss (1998). "Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilised pH 4-12 gradient." *Electrophoresis* **19**: 1516-1519.
- Görg, A., W. Postel and S. Günther (1988). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis* **9**: 531-546.
- Gottesman, S. and M. Maurizi (1992). "Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets." *Microbiology Review* **56**(4): 592-621.
- Grellier, P., J. Blum, J. Santana, E. Bylèn, E. Mouray, V. Sinou, A. R. L. Teixeira and J. Schrével (1999). "Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes." *Molecular and Biochemical Parasitology* **98**: 239-252.

Gruenberg, J., P. Sharma and J. Deshusses (1978). "D-Glucose transport in *Trypanosoma brucei*. D-Glucose transport is the rate-limiting step of its metabolism." *European Journal of Biochemistry* **89**(2): 461-469.

Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb and R. Aebersold (1999). "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags." *Nature Biotechnology* **17**: 994-999.

Healy, A. M., S. Zolnierowicz, E. Stapleton, M. Goebi and A. A. DePaoli-Roach (1991). "CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase." *Molecular and Cellular Biology* **11**: 5767-5780.

Hoare, C. A. (1966). "The classification of mammalian trypanosomes" *Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und Experimentellen Therapie* **39**: 43-57.

Hochstrasser, M., P. Johnson, C. Arendt, Amerik AYu, S. Swaminathan, R. Swanson, S. Li, J. Laney, R. Pals-Rylaarsdam, J. Nowak and P. Connerly (1999). "The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **354**(1389): 1513-22.

Homsy, J. J., B. Granger and S. M. Krassner (1989). "Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*." *Journal of Protozoology* **36**(2): 150-153.

Hudson, L., D. Snary and S. J. Morgan (1984). "*Trypanosoma cruzi*: continous cultivation with murine cell lines." *Parasitology* **88**: 283-294.

Isola, E. L., E. M. Lammel and S. M. González Cappa (1986). "*Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate." *Experimental Parasitology* **62**: 329-335.

Kambara, H., H. Uemura, S. Nakazawa and T. Fukama (1990). "Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote." *Japanese Journal of Parasitology* **39**: 226-228.

Kao, F. T. and T. T. Puck (1967). "Genetics of somatic cells. IV. Properties of chinese hamster cell mutants with respect to the requirement for proline." *Genetics* **55**: 513-524.

Kasahara, K., T. Kartasova, X. Q. Ren, T. Ikuta, K. Chida and T. Kuroki (1993). "Hyperphosphorylation of keratins by treatment with okadaic acid of BALB/MK-2 mouse keratinocytes." *Journal of Biological Chemistry* **268**: 23531-23537.

Katzin, A. M. and W. Colli (1983). "Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*. An N-acetyl-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific form trypomastigote stage." *Biochimica et Biophysica Acta* **727**: 403-411.

Klose, J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced mutations in mammals." *Humangenetik* **26**: 213-243.

Kohl, L. and K. Gull (1998). "Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton." *Molecular and Biochemical Parasitology* **93**(1): 1-9.

Kollien, A. H., T. Grospietsch, T. Kleffman, I. Zerbst-Boroffka and G. A. Schaub (2001). "Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*." *Journal of Insect Physiology* **47**: 739-747.

Krassner, S. M. and B. Flory (1977). "Physiologic interactions between L-proline and D-glucose in *Leishmania tarentolae*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma scelopari* culture forms." *Acta Tropica* **34**: 157-161.

- Krassner, S., D. Sylvester and K. Munson (1973). "Proline metabolism in *Trypanosoma seelipori*." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **67**(2): 258.
- Kurland, C. G. (1991). "Codon bias and gene expression." *FEBS Letters* **285**: 165-169.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Lasonder, E., Y. Ishihama, J. S. Andersen, A. M. W. Vermut, A. Pain, R. W. Sauerwein, W. M. C. Eling, N. Hall, A. P. Waters, H. G. Stunnenberg and M. Mann (2002). "Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteoma by high-accuracy mass spectrometry." *Nature* **419**(3): 537-542.
- Lee, T. H. (1995). "The role of protein phosphatase type-2A in the *Xenopus* cell cycle: initiation of the G2/M transition." *Seminars in Cancer Biology* **6**(4): 203-209.
- Lent, H. and P. Wygodzinsky (1979). "Revision of the Triatomine (Hemiptera Reduviidae) and their significance as vector of Chaga's disease." *Bulletin of the American Museum of Natural History* **163**(3520).
- Ley, V., N. Andrews, E. Robbins and V. Nussenzweig (1988). "Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells." *Journal of Experimental Medicine* **168**(2): 649-659.
- Ley, V., N. W. Andrews, E. S. Robbins and V. Nussenzweig (1990). "Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells." *Journal of Experimental Medicine* **168**: 649-659.
- Loo, J. A., J. Brown, G. Critchley, C. Mitchell, P. C. Andrews and R. R. Ogorzalek Loo (1999). "High sensitivity mass spectrometric methods for obtaining intact molecular weights from gel separated proteins." *Electrophoresis* **20**: 743-748.
- Lopez, M. and M. Pluskal (2003). "Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* **787**(1): 19-27.
- Magdesian, M. H., R. Giordano, H. Ulrich, M. A. Juliano, L. Juliano, R. I. Schumacher, W. Colli and M. J. M. Alves (2001). "Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor." *Journal of Biological Chemistry* **276**(22): 19382-19389.
- Maher, P. and E. Pasquale (1989). "Heat shock induces protein tyrosine phosphorylation in cultured cells." *Journal of Cell Biology* **108**(6): 2029-2035.
- McCabe, R. E., J. S. Remington and F. G. Araújo (1984). "Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*." *Infection and Immunity* **45**: 372-376.
- McCue, K. F. and A. D. Hanson (1990). "Drought and salt tolerance: towards understanding and application." *Trends in Biotechnology* **8**: 338-362.
- Meyer, H. (1958). "The fine structure of the flagellum and the kinetoplast-chondriome of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in tissue culture." *Journal of Protozoology* **15**: 614-621.
- Meyer, H. (1969). "Further studies on the fine structure of the kinetoplast-chondriome of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in thin sections of infected tissue cultures." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **11**: 48-56.

Meyer, H. and M. X. De Oliveira (1948). "Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: a four year study." *Parasitology* **39**: 91-94.

Meyer, H. and W. De Souza (1976). "Eletron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue culture. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle." *Journal of Protozoology* **23**(3): 385-390.

Milder, R., J. Kloetzel and M. Deane (1977). "Observation on the interaction of peritoneal macrophages with *Trypanosoma cruzi*. II. Intracellular fate of bloodstream forms." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **19**(5): 313-322.

Molloy, M. P., B. R. Herbert, B. J. Walsh, M. I. Tyler, M. Traini, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams and A. A. Gooley (1998). "Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis." *Electrophoresis* **19**: 837-844.

Molloy, M. P., B. R. Herbert, K. L. Williams and A. A. Gooley (1999). "Extraction of *Escherichia coli* proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis." *Electrophoresis* **20**: 701-704.

Moraes-Rêgo, S. F. (1956). "Sobre o encontro de formas tissulares do *Trypanosoma cruzi* no sangue circulante do camundongo branco (*Mus musculus*)." *Folia Clinica et Biologica* **26**: 17-44.

Morris, J. C., Z. Wang, M. E. Drew and P. T. Englund (2002). "Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library." *The EMBO Journal* **21**(17): 4429-4438.

Mortara, R. A. (1991). "*Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells." *Experimental Parasitology* **73**: 1-14.

Navarro, M. C., A. R. De Lima, J. Skue and V. T. Contreras (2003). "Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**(1): 83-91.

Neva, F. A., M. F. Malone and B. R. Myers (1961). "Factors influencing the intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **10**: 140-144.

Nisida, I. V., V. Amato Neto, L. M. Braz, M. I. Duarte and E. S. Umezawa (1999). "A survey of congenital Chaga's disease, carried out at three health institutions in São Paulo City, Brazil." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **41**(5): 305-311.

Nogueira, N. and Z. Cohn (1976). "*Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells." *Journal of Experimental Medicine* **143**: 1402-1420.

O'Daly, J. A., L. E. Serrano and M. B. Rodríguez (1983). "Free amino acid pool and proteolytic enzymes in *Trypanosoma cruzi* cultured in vitro." *International Journal for Parasitology* **13**(5): 433-440.

O'Farrel, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *The Journal of Biological Chemistry* **250**(10): 4007-4021.

O'Farrel, P. Z., H. M. Goodman and P. H. O'Farrel (1977). "High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins." *Cell* **12**: 1133-1141.

Ochatt, C. M., R. M. Ulloa, H. N. Torres and M. T. Téllez-Iñón (1993). "Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase." *Molecular and Biochemical Parasitology* **57**: 73-82.

- Oda, Y., K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn and B. T. Chait (1999). "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6591-6596.
- Oguetta, S. B., A. Solari and M. T. Téllez-Iñon (1994). "Trypanosoma cruzi epimastigote forms possess a Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase." *FEBS Letters* **337**: 293-297.
- Oguetta, S. B., G. Mac Intosh and M. T. Téllez-Iñon (1996). "Regulation of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase from *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* **78**: 171-183.
- Oppenheimer, F. (1987). "Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*." *Biochemical Society Symposia* **53**: 123-129.
- Oppenheimer, F. R. and P. Borst (1977). "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome." *FEBS Letters* **80**(2): 360-364.
- Orr, G. A., C. Werner, M. Bennett, L. M. Weiss, P. Takvorkan, H. B. Tanowitz and M. Wittner (2000). "Identification of novel serine/threonine protein phosphatases in *Trypanosoma cruzi*: a potential role in control of cytokinesis and morphology." *Infection and Immunity* **68**(3): 1350-1358.
- Ortega-Barria, E. and M. E. A. Pereira (1991). "A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells." *Cell* **65**: 1117-1125.
- Ouaissi, M. A., A. Taibi, J. Cornette, P. Velge, B. Marty, M. Loyens, M. Esteva, F. S. Rizvi and A. Capron (1990). "Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen." *Parasitology* **100**: 115-124.
- Ozcan, S., J. Dover and M. Johnston (1998). "Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *The EMBO Journal* **17**(9): 2566-2573.
- Palombella, V., O. Rando, A. Goldberg and T. Maniatis (1994). "The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B." *Cell* **78**(5): 773-785.
- Pan, S. C. T. (1978). "*Trypanosoma cruzi*: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle." *Experimental Parasitology* **45**: 274-286.
- Patton, W. F. (2000). "A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics." *Electrophoresis* **21**: 1123-1144.
- Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski, B. Nelissen, A. Goffeau and M. H. Saier (1998). "Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Letters* **430**: 116-125.
- Pelech, S. I. and J. S. Sanghera (1992). "Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signalling." *Trends in Biochemical Sciences* **17**: 233-238.
- Piras, M. M., R. Piras, D. Henriquez and S. Negri (1982). "Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* **6**(2): 67-81.

B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

- Pratt, J. M., J. Petty, I. Riba-Garcia, D. H. L. Robertson, S. J. Gaskell, S. G. Oliver and R. J. Beynon (2002). "Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics." *Molecular and Cellular Proteomics* **1**(8): 579-591.
- Ramirez, M. I., R. C. Ruiz, J. E. Araya and J. Franco da Silveira (1993). "Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion." *Infection and Immunity* **61**: 3636-3641.
- Rangel-Aldao, R., O. Allende, F. Triana, R. Piras, D. Henriquez and M. Piras (1987). "Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* **22**: 39-43.
- Reina-San-Martin, B., W. Degraeve, C. Rougeot, A. Cosson, N. Chamond, A. Cordeiro-da-Silva, M. Arala-Chaves, A. Coutinho and P. Minoprio (2000). "A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase." *Nature Medicine* **6**(8): 890-897.
- Remme, J. H., P. De Raadt and T. Godal (1993). "The burden of tropical disease." *Medical Journal of Australia* **158**(7): 465-469.
- Rodriguez, F., J. L. Ramirez and R. Rangel-Aldao (1990). "Abstracts." VI Congresso PAABS, São Paulo, Brasil: 70.
- Rogerson, G. W. and W. E. Gutteridge (1979). "Oxidative metabolism in mammalian and culture forms of *Trypanosoma cruzi*." *International Journal of Biochemistry* **10**: 1019-1023.
- Rohloff, P., C. O. Rodrigues and R. Docampo (2003). "Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium." *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**: 219-230.
- Rolland, F., J. Winderickx and J. Thevelein (2002). "Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast." *FEM Yeast Research* **2**(2): 183-201.
- Romaña, C. and H. Meyer (1942). "Estudo do ciclo evolutivo de "*Schizotrypanum cruzi*" em cultura de tecidos e embrião de galinha." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **37**: 19-27.
- Ronne, H., M. Carlberg, G. Z. Hu and J. O. Hehlin (1991). "Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis." *Molecular and Cellular Biology* **11**(10): 4876-4884.
- Ross, C. A. (1987). "*Trypanosoma congolense*: differentiation to metacyclic trypanosomes in culture depends on the concentration of glutamine or proline." *Acta Tropica* **44**: 293-301.
- Sanabria, A. (1971). "Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse liver." *FEBS Letters* **295**: 31-34.
- Santoni, V., T. Rabilloud, P. Doumas, D. Rouquié, M. Mansion, S. Kieffer, J. Garin and M. Rossignol (1999). "Toward the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gel." *Electrophoresis* **20**: 705-711.
- Schaefer, F. and A. Mekkada (1976). "Specificity of the glucose transport system in *Leishmania tropica* promastigotes." *Journal of Protozoology* **23**(3): 446-449.
- Schaefer, F., E. Martin and A. Mekkada (1974). "The glucose transport system in *Leishmania tropica* promastigotes." *Journal of Protozoology* **21**(4): 592-596.
- Scharfstein, J., M. Schechter, M. Senna, J. M. Peralta, L. Mendonça-Previato and M. A. Miles (1986). "*Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51 000 m.w.

surface glucoprotein (Gp57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes." *Journal of Immunology* **137**: 1336-1341.

Schawarcs de Tarlovsky, M. N., J. L. Affranchino, A. O. M. Stopani, E. L. Isola and S. M. Gonzales Cappa (1985). "Citocromos en diferentes estadios, cepas y poblaciones de *Trypanosoma cruzi*." *Revista Argentina de Microbiologia* **17**: 121-130.

Schenkman, R. P., F. Vandekerckhove and S. Schenkman (1993). "Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*." *Infection and Immunity* **61**: 898-902.

Schenkman, S., M. S. Jiang, G. W. Hart and V. Nussenzweig (1991). "A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion mammalian cells." *Cell* **65**: 1117-1125.

Schoffeniels, E. (1970). "Isosmotic intracellular regulation in "Maja squinado" Risso and "Penaeus aztecus" Yves." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **78**(3): 461-466.

Schönthal, A. (1992). "Okadaic acid - a valuable new tool for the study of signal transduction and cell cycle regulation?" *Biochemical Journal* **256**: 283-290.

Sela, M. and E. Zisman (1997). "Different roles of D-amino acids in immune phenomena." *FASEB Journal* **11**: 449-456.

Shapiro, A. L., E. Vinuela and J. V. Maizel (1967). "Molecular weight stimation of polypeptide chain by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **28**: 815-820.

Sherwin, T. and K. Gull (1989). "The cell-division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **323**: 573-588.

Silber, A. M., R. R. Tonelli, M. Martinelli, W. Colli and M. J. M. Alves (2002). "The L-proline uptake in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: characterization of two active transport systems." *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**(6): 441-446.

Simpson, L. (1972). "The kinetoplast of the hemoflagellates." *International Review of Cytology* **32**: 139-207.

Smid, E. J. and W. N. Konings (1990). "Relationship between utilization of proline and proline-containing peptides and growth of *Lactococcus lactis*." *Journal of Bacteriology* **172**(9): 5286-5292.

Snary, D., M. A. J. Ferguson, M. T. Scott and A. K. Allen (1981). "Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein." *Molecular and Biochemical Parasitology* **3**(6): 343-356.

Soares, M. and W. De Souza (1988). "Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study." *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* **20**(2): 349-361.

Soares, M. J., T. Souto-Pradon and W. De Souza (1992). "Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*." *Journal of Cell Science* **102**: 157-167.

Soares, M. J., T. Souto-Pradón, M. C. Bonaldo, S. Goldenberg and W. De Souza (1989). "A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*." *Parasitology Research* **75**: 522-527.

Southworth, G. and C. Read (1969). "Carbohydrate transport in *Trypanosoma gambiense*." *Journal of Protozoology* **16**(4): 720-723.

Souto-Padron, T., O. E. Campetella, J. J. Cazzulo and W. De Souza (1990). "Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite host-cell interaction." *Journal of Cell Science* **96**: 485-490.

Srivastava, H. K. and I. B. R. Bowmwn (1971). "Adaptation in oxidative metabolism in *Trypanosoma rhodesiense* during transformation in culture." *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology* **40**: 973-981.

Sullivan, M. A., C. L. Olson, A. G. Winquist and D. M. Engman (1994). "Expression and localization of *Trypanosoma cruzi* HSP 60." *Molecular and Biochemical Parasitology* **68**(2): 197-208.

Sylvester, D. and S. M. Krassner (1976). "Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." *Comparative Biochemistry and Physiology* **55B**: 443-447.

Sylvester, D., S. Krassner and K. Munson (1974). "Proline metabolism in *Trypanosoma scelopori* epimastigotes." *Comparative Biochemistry and Physiology B* **48**(3): 401-409.

Tardieux, I., M. H. Nathanson and N. W. Andrews (1994). "Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi* induced cytosolic free Ca^{2+} -transients." *Journal of Experimental Medicine* **179**: 1017-1022.

Tardieux, I., P. Webster, J. Ravesloot, W. Boron, J. A. Lunn, J. E. Heuser and N. W. Andrews (1992). "Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells." *Cell* **71**: 1117-1130.

Teixeira, M. M. G. and N. Yoshida (1986). "Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies." *Molecular and Biochemical Parasitology* **18**: 271-282.

Teixeira, M. M. G., C. S. A. Takata, I. Conchon, M. Campaner and E. P. Camargo (1997). "Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herptomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies." *Journal of Parasitology* **83**: 58-65.

Teixeira, S. M. R., D. G. Russel, L. V. Kirchoff and J. E. Donelson (1994). "A differentially expressed gene family encoding amastin, a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes." *Journal of Biological Chemistry* **269**: 20509-20516.

Tetaud, E., F. Binguad, S. Chabas, M. Barrett and T. Baltz (1994). "Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(17): 8278-8282.

Teusink, B., M. Walsh, K. van Dam and H. Westerhoff (1998). "The danger of metabolic pathways with turbo design." *Trends in Biochemical Science* **23**(5): 162-169.

Thompson, R. J., H. G. Bouwer, D. A. Portnoi and F. R. Frankel (1998). "Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain requires D-alanine for growth." *Infection and Immunity* **66**(8): 3552-3561.

Tomlinson, S., F. Vandekerckhove, U. Frevet and V. Nussenzweig (1995). "The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH." *Parasitology* **110**: 547-554.

Tyler, K. M. and D. M. Engman (2000). "Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation." *Cell Motility and the Cytoskeleton* **46**: 269-278.

Tyler, K. M. and D. M. Engman (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." *International Journal for Parasitology* **31**: 472-481.

Ulloa, R., E. Mesri, M. Esteva, H. Torres and M. Tellez-Inon (1988). "Cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi*." *Biochemical Journal* **255**(1): 319-326.

Umezawa, E. S., R. V. Milder and I. A. Abrahamsohn (1985). "*Trypanosoma cruzi* amastigotes: development *in vitro* and infectivity *in vivo* of the forms isolated from spleen and liver." *Acta Tropica* **42**: 25-32.

van Deursen, F., D. Thornton and K. Matthews (2003). "A reproducible protocol for analysis of the proteome of *Trypanosoma brucei* by 2-dimensional gel electrophoresis." *Molecular and Biochemical Parasitology* **128**(1): 107-110.

Vaucel, M. (1968). "[Trypanosomiasis and zoonoses]." *Med Klin* **63**(34): 1351-1354.

Vieira, L. L., E. Lafuente, J. Blum and Z. I. Cabantchik (1997). "Modulation of the swelling-activated amino acid channel of *Leishmania major* promastigotes by protein kinases." *Molecular and Biochemical Parasitology* **90**: 449-461.

Vikerman, K. (1985). "Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes." *British Medical Bulletin* **41**: 105-114.

Villalta, F. and F. Kierszenbaum (1982). "Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium." *Journal of Protozoology* **29**: 570-576.

Virshup, D. M., A. Cegielska, A. Russo, T. J. Kelly and S. Shaffer (1993). "The initiation of SV40 DNA replication is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle." *Advances in Protein Phosphorylation* **7**: 271-293.

Von Brand, T. (1967). "The metabolism of parasites. Its relations to the pathogenesis and chemotherapy of parasitic infections." *Naturwissenschaften* **54**(22): 580-585.

Von Brand, T. and M. Agosin (1955). "The utilization of Krebs cycle intermediates by the culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania tropica*." *Journal of Infectious Diseases* **97**: 274-279.

Vuong, G. L., S. M. Weiss, W. Kammer, M. Priemer, M. Vingron, A. Nordheim and M. A. Cahill (2000). "Improved sensitivity proteomics by post-harvested alkylation and radioactive labelling proteins." *Electrophoresis* **21**: 2594-2605.

Wadzinski, B. E., W. H. Wheat, S. Jaspers, L. F. Peruski, R. L. Lickteig, G. L. Johnson and D. J. Klemm (1993). "Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation." *Molecular and Cellular Biology* **13**: 2822-2834.

WHO (1997). Tropical Disease Research: Progress Report 95-96. Geneva, 134 pp.

Williamson, J. (1963). The chemical composition of trypanosomes. Proceedings of the 16th International Congress of Zoology, Washington, D.C.

Williamson, M. P. (1994). "The structure and function of proline-rich regions in proteins." *Biochemical Journal* **297**: 249-260.

Woodward, R. and K. Gull (1990). "Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*." *Journal of Cell Science* **95**: 49-57.

Yoshida, N., M. L. Dorta, A. T. Ferreira, M. E. Oshiro, R. A. Mortara, A. Acosta-Serrano and S. Favoreto Junior (1997). "Removal of sialic from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction." *Molecular and Biochemical Parasitology* **84**(1): 57-67.

Yoshida, N., S. A. Blanco, M. F. Araguth, M. Russo and J. Gonzales (1990). "The stage-specific 90-kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* **39**: 39-46.

Zilberstein, D. and D. Dwyer (1984). "Glucose transport in *Leishmania donovani* promastigotes." *Molecular and Biochemical Parasitology* **12**(3): 327-36.

Zilberstein, D. and D. Dwyer (1985). "Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(6): 1716-1720.

Zuo, X. and D. W. Speicher (2000). "A method for global analysis of complex proteomes using sample prefractionation by solution isoelectrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis." *Analytical Biochemistry* **284**: 266-278.