

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DO MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS
DIFERENCIADAS *In vitro* DO *Trypanosoma rangeli* E
CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DIFERENCIAIS AO
*Trypanosoma cruzi***

Glauber Wagner

**Florianópolis
2012**

Glauber Wagner

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS
DIFERENCIADAS *In vitro* DO *Trypanosoma rangeli* E
CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DIFERENCIAIS AO
*Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do título de Doutor em Biotecnologia
e Biociências

Orientador: Dr. Edmundo C. Grisard

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wagner, Glauber
ANÁLISE PROTEÔMICA DE FORMAS TRIPOMASTIGOTAS
DIFERENCIADAS "IN VITRO" DO *Trypanosoma rangeli* E
CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS DIFERENCIAIS AO *Trypanosoma*
cruzi [tese] / Glauber Wagner ; orientador, Edmundo Carlos
Grisard - Florianópolis, SC, 2012.
134 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Trypanosoma rangeli*.
3. Proteômica. 4. Antígenos de superfície. I. Grisard,
Edmundo Carlos. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. III. Título.


“Análise proteômica de formas tripomastigotas diferenciadas “in vitro” do *Trypanosoma rangeli* e caracterização de antígenos diferenciais ao *Trypanosoma cruzi*”

por

Glauber Wagner

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 16/PPGBTC/2012) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

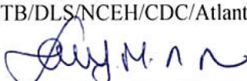
Banca Examinadora:



Prof(a) Dr(a) Edmundo Carlos Grisard
(Presidente/MIP/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Hércules Moura
(ERATB/DLS/NCEH/CDC/Atlanta/Georgia (GA)/USA)



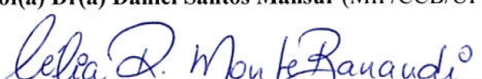
Prof(a) Dr(a) Santuza Maria Ribeiro Teixeira
(Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFMG)



Prof(a) Dr(a) Henrique Bunselmeyer Ferreira
(Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia/UFRGS)



Prof(a) Dr(a) Daniel Santos Mansur (MIP/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Celia Regina Monte Barardi
Coordenadora *por tempore* do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 14 de dezembro de 2012

Dedico este trabalho aos meus pais Almir e Claudete e a minha companheira e esposa Adriana, que entenderam a minha ausência em vários momentos ao longo destes anos e foram minha inspiração para este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Dr. Edmundo Carlos Grisard, pela oportunidade, confiança, paciência e por ter aceito o desafio de me orientar. Obrigado pelos ensinamentos, não apenas técnicos, científicos e didáticos, mas também por aqueles que serão levados para a minha vida profissional e pessoal. Foram 10 anos de convívio onde sempre fui instigado por você a buscar algo a mais, a aprender algo novo, a ter um diferencial, a buscar novos horizontes, onde pouco poderiam buscar, você é um grande mestre. Muito obrigado por tudo.

Ao Dr. Hércules Moura, pela oportunidade de trabalhar no CDC, pela confiança, paciência, amizade e grandes ensinamentos. Espero um dia poder retribuir toda a atenção que tiveste comigo.

A minha esposa Adriana, que sempre esteve perto, me apoiando, incentivando e me acalmando quando em dificuldades. Muito obrigado por ser esta pessoa maravilhosa, paciente e carinhosa, você foi fundamental para que chegasse neste ponto da minha vida, que agora é nossa.

À minha família, meu pai Almir, minha mãe Claudete e meu irmão Willian (*in memorium*) que sempre me apoiaram, incentivaram e entenderam a minha ausência nos momentos festivos ou de dificuldades. Amo vocês, vocês são o segredo de tudo e a iluminação dos meus caminhos.

A minha família de coração, meu sogro Ademar e sogra Getrudes, minhas cunhadas, Denise e Luciana, que sempre nos apoiaram e estiveram dispostas a ajudar nos momentos que mais precisava.

Aos meus familiares, minhas avós, tios, tias, primos e primas, meu irmão de coração Marquinhos. Sempre que precisei de vocês, vocês estenderam a mão. Uma grande pessoa é formada sempre por uma grande e unida família.

Aos professores Dr. Álvaro, Dr. Mário e Dr. André, pela amizade e conselhos durante estes anos de convívio.

A Dra. Patrícia, pela amizade, longas conversas, ensinamentos e pela fundamental ajuda durante este tempo.

Agradeço à minhas colegas de Laboratório e de Doutorado, Débora e Aline. Vocês foram pessoas fundamentais para a realização deste trabalho, pois este é fruto de um trabalho em equipe.

Ao pessoal do Laboratório de Protozoologia, Ane, Thais, Ingrid, Ibeth, Elisa, Carol, Nina, Thaynara Carime, Mariel, Jair, Paula, Maiko e Gustavo, pelas conversas, risadas e discussões científicas. Mas em especial a “minha” IC, Lais, que “colocou a mão na massa” comigo neste trabalho. A todos vocês meu muito obrigado.

Não posso deixar de agradecer pelo apoio, compreensão e amizade dos meus amigos da Unoesc, Geisson, Gerson, Maria Ignez, Máira, Roberto, Rafael, Fernanda, Katiane, Franciele e tantos outros não citados que estenderiam esta lista por páginas.

Um agradecimento especial aos nossos grandes amigos de Atlanta, Renato e Carolina, que nos acolheram nos Estados Unidos de braços abertos e fraternais. Vocês foram importantes nesta fase da nossa vida e espero um dia retribuir todo o carinho que tiveram conosco. Obrigado meus amigos.

Também ao pessoal do Laboratório de Espectrometria de Massas do CDC, JB, Jhon, Yulanda, Dave, Anne, Adrian, Renato, Maribel, e todos os demais que me acolheram e me ensinaram muito durante os sete meses que estive por lá.

Aos amigos do LIDI, LIA e LVA, pelas conversas e ajuda.

De modo todo especial, gostaria de agradecer a Unoesc e seus dirigentes, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. Aristides Cimadon, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade e apoio para que este sonho e trabalho fosse consolidado.

Aos professores e alunos do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Ciências pelos ensinamentos e convívio.

À CAPES, CNPq e FINEP pelo suporte financeiro.

E a todos os amigos e colegas que não pude mencionar aqui, mas que tiveram sua contribuição direta ou indiretamente durante esta jornada.

E por fim, a Associação Chapecoense de Futebol, pelo acesso a série B em 2012.

Muito obrigado a todos vocês.

RESUMO

A distribuição simpátrica e o compartilhamento de hospedeiros e antígenos entre o *Trypanosoma rangeli* e o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas podem levar a erros nos diagnósticos e inferências epidemiológicas destes parasitos. Neste sentido, apresentamos o primeiro estudo proteômico comparativo em grande escala das proteínas solúveis e de superfície da forma tripomastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi*, objetivando a identificação de proteínas com potencial aplicação no diagnóstico diferencial destes parasitos. Neste estudo foram identificadas 137 distintas proteínas solúveis da forma tripomastigota de *T. rangeli* resolvidas no perfil 2-D por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS). Destas, 76% localizadas no citosol ou mitocôndrias e 26% envolvidas no metabolismo energético ou na resposta ao estresse. Além disto, através de ensaios de *immunoblotting* 1-D com estas proteínas solúveis e antissoros de animais experimentalmente infectados com estes parasitos, foi verificado que a reatividade sorológica cruzada existente entre estes dois parasitos não é recíproca, pois o reconhecimento de proteínas da forma tripomastigota de *T. rangeli* é menos intensa do que o reconhecimento de proteínas da forma tripomastigota de *T. cruzi* pelos antissoros heterólogos. Também observamos que proteínas das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* na faixa de 70-80kDa são reconhecidas exclusivamente pelos antissoros homólogos. Nos ensaios de *immunoblotting* 2-D foi observado um forte reconhecimento de proteínas da forma tripomastigota de *T. rangeli* pelo antissoros homólogo na faixa entre 60-100kDa. Apesar disto, não foi possível identificar marcadores específicos destes parasitos com estes ensaios. Porém, a análise proteômica comparativa das proteínas de superfície das formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi* permitiu a identificação de potenciais marcadores específicos de *T. rangeli*. Esta análise foi realizada utilizando duas abordagens, sem (LC-MS-MS/MS) e com o uso de gel (GeLC-ESI-MS/MS), além de ensaios de *immunoblotting* 1-D, que revelaram um padrão de reconhecimento das proteínas de superfície distinto para cada espécie. Com isto foi possível identificar 138 proteínas de *T. rangeli* e 343 proteínas de *T. cruzi*, das quais 42 e 157 proteínas exclusivamente nas formas tripomastigotas de *T.*

rangeli e de *T. cruzi*, respectivamente. Em particular, as análises de MS/MS revelaram pelo menos duas proteínas de *T. rangeli*, GP63-relacionada (~70kDa) e FCaBP (~25kDa), como potenciais alvos para o diagnóstico diferencial com *T. cruzi*. Desta forma, esta análise proteômica em larga escala das proteínas de superfície de *T. rangeli*, revelou diferenças e semelhanças entre as proteínas de superfície destes parasitos, além de permitir a identificação de novas proteínas de *T. rangeli* com potencial aplicação no diagnóstico diferencial com *T. cruzi*.

Palavras Chave: *Trypanosoma rangeli*, Proteômica, Antígenos de superfície.

ABSTRACT

Sympatric distribution and sharing of hosts and antigens by *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* the etiological agent of Chagas' disease, often incur in misdiagnosis and improper epidemiological inferences. In order to identify differential antigens with potential application in serological diagnosis we performed the first high-throughput proteomic analysis of soluble and surface proteins (SP) of *T. rangeli* and *T. cruzi* trypomastigotes. In this work, 137 non-redundant *T. rangeli* trypomastigote soluble proteins resolved in 2-D profile were identified by mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Within these 137 non-redundant proteins, 76% are cytosolic or mitochondrial and 26% are involved in energy metabolism or response to stress. Furthermore, 1-D immunoblotting assays with soluble proteins and antisera from animals experimentally infected showed a less intense recognition of *T. rangeli* trypomastigotes soluble proteins than *T. cruzi* trypomastigotes proteins by heterologous antisera indicating that serological cross-reactivity between these parasites is not reciprocal. In addition, *T. rangeli* and *T. cruzi* trypomastigotes soluble proteins between ~70-80 kDa were exclusively recognized by homologous antisera suggesting specie-specific antigens among the trypomastigote proteins. We also observed a strong recognition of *T. rangeli* trypomastigotes proteins by homologous antiserum between ~60-100kDa in 2-D immunoblotting tests. Unfortunately, we were not able to identify specific markers of these parasites through these trials. On the other hand, the comparative proteomic analysis of *T. rangeli* and *T. cruzi* epimastigote and trypomastigote SP pointed out potential *T. rangeli* specific-markers, using gel-free (LC-ESI-MS/MS) and gel-based (GeLC-ESI-MS/MS) proteomic approaches. Besides, immunoblotting revealed distinct recognition profiles of SP for each species. A total of 138 *T. rangeli* proteins and 343 *T. cruzi* proteins were identified, of which, 42 and 157 proteins were exclusively identified in *T. rangeli* or *T. cruzi* trypomastigotes, respectively. MS/MS analysis of *T. rangeli* exclusive bands revealed two unique proteins, GP63-related (~70kDa) and flagellar calcium-binding protein (FCaBP) (~25kDa), as potential markers. This highly sensitive proteomic assessment of surface proteins characterized the *T. rangeli* surfaceome, revealing several differences and similarities

between these two parasites and new *T. rangeli*-specific proteins with promising use in differential diagnosis from *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*, proteomic, surface antigens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (aumento de 1.000X). 9
- Figura 2:** Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A – Ingestão das formas tripomastigotas de *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, B – Formas tripomastigotas e epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo, C – Parasitos alcançam a ampola retal e formas epimastigotas e tripomastigotas podem ser excretadas juntamente com as fezes e urina, D – Adesão de formas epimastigotas do parasito ao epitélio intestinal e transposição para a hemocele onde se multiplicam, E – Invasão pelo *T. rangeli* das glândulas salivares do triatomíneo e diferenciação para formas infectivas (metatripanosomas), as quais são inoculadas com a saliva (F) durante o repasto sanguíneo. ... 11
- Figura 3:** Distribuição geográfica da doença de Chagas humana causada pelo *Trypanosoma cruzi* (área sombreada) nas Américas e locais onde já foram descritos casos de *Trypanosoma rangeli* (pontos). 13
- Figura 4:** Esquema da metodologia para obtenção da fração enriquecida com proteínas de superfície (SEP) utilizando o Triton X-114. 29
- Figura 5:** Perfis 2-D representativos da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* oriundos de três diferentes replicatas biológicas. Os spots destacados em diferentes cores representam spots com pI e MW similares e com a mesma proteína identificada por espectrometria de massas, demonstrando a reprodutibilidade dos perfis obtidos no Laboratório de Protozoologia. Setas: vermelhas (HSP70), verdes (beta tubulina), azuis (tirosina aminotransferase) e amarelas (proteína 14-3-3). Foram focalizadas 2,0 mg de proteína nos géis A e B, e 2,5mg no gel C e a segunda dimensão foi realizada em SDS-Page 10% e corados com Azul de Coomassie R-250. 42
- Figura 6:** Perfil 2-D das proteínas solúveis (2,0 mg) da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* (cepa Choachi) diferenciada *in vitro*. Para a primeira dimensão foram utilizadas com tiras de 13cm com pI 3-10 e para segunda dimensão gel SDS-PAGE 10% corado com Azul de Coomassie R-250. Os códigos de identificação dos spots correspondem aos Id no Apêndice A. 44
- Figura 7:** Perfil 2-D das proteínas solúveis (2,0 mg) da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) obtidas a partir de infecção de células Vero. Para a primeira dimensão foram utilizadas

com tiras de 13cm com pl 3-10 e para segunda dimensão gel SDS-PAGE 10% corado com Azul de Coomassie R-250. Os códigos de identificação dos *spots* correspondem aos Id na Tabela Suplementar 4. 46

Figura 8: Gráfico com as diferentes localizações celulares previstas pelo programa *Wolf-PSort* das 139 proteínas de *Trypanosoma rangeli* identificadas no presente estudo. 50

Figura 9: Proporção de proteínas distintas de *Trypanosoma rangeli* com anotação funcional segundo o *Gene Ontology* (GO). Proteínas sem anotação ou com pelo menos uma anotação (Superior esquerdo) e distribuição das principais categorias nas três ontologias do GO: Componente Celular (Superior direito), Processo Biológico (Inferior Esquerdo) e Função Molecular (Inferior direito). 53

Figura 10: *Immunoblotting* unidimensional com 29 µg proteínas solúveis das formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*. (A) Perfil unidimensional Nu-Page 4-12% das proteínas solúveis corado com Azul de Coomassie G-250; (B) Antissoro anti- *T. rangeli* (1/1000); (C) anti-*T. cruzi* (1/320). Linhas: 1 - Epimastigota de *T. rangeli*; 2 - Tripomastigota de *T. rangeli*; 3 - Epimastigota de *T. cruzi*; 4 - Tripomastigota de *T. cruzi*. Setas indicam proteínas reconhecidas exclusivamente pelos antissoros homólogos. 60

Figura 11: *Immunoblotting* 2-D das formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*. Os perfis 2-D foram resolvidos com 500 µg de proteínas solúveis das forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Y) obtidas a partir de infecção em células Vero; forma tripomastigota de *T. rangeli* (cepa Choachí) diferenciadas *in vitro*; e de células Vero. Para tal, as proteínas foram focalizadas em tiras de pH 3-10 de 7cm e resolvidas em gel SDS-PAGE 12%, em seguida incubadas com antissoros de animais experimentalmente infectados. Os antissoros foram diluídos na proporção de 1:400 e as membranas expostas ao reagente ECL por: 3 minutos (B, C, F), 1 minuto (A, D), 30 segundos (E). 63

Figura 12: Análise das frações obtidas durante o processo de extração de proteínas de superfície (SEP) utilizando Triton X-114 (Item 4.4) da forma tripomastigota de uma linhagem de *Trypanosoma rangeli* transfectado com os genes da GP82 de *T. cruzi* e GFP. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) com 20 µg de proteínas corados com Azul de Coomassie R-250. *Western blot* utilizando anticorpos: (B) monoclonal murino anti-beta Tubulina (1:5.000); (C) monoclonal murino anti-GFP (1:5.000); (D) monoclonal murino anti-GP82 (1:1.000); MW: massa molecular relativa (Mr) em kDa. Legenda das frações são correspondentes às frações demonstradas na figura 4. 66

Figura 13: Esquema com o desenho experimental da análise proteômica comparativa das proteínas de superfície (SP) das formas epimastigota e tripomastigota de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i>	68
Figura 14: Perfil eletroforético (NuPage 4-12%) com 30 µg de proteínas das frações obtidas durante o procedimento de extração de proteínas por Triton-X114 das forma epimastigota (A) e tripomastigota (C) de <i>Trypanosoma rangeli</i> (cepa Choachi). (A) coradas com Azul de Coomassie G-250. Frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP) da forma epimastigota (B) e tripomastigota (D) coradas com prata. MW: massa molecular relativa em kDa. Legenda das frações são correspondentes às frações demonstradas na figura 4.....	69
Figura 15: Comparação entre os perfis das frações SEP das formas epimastigota (E) e tripomastigotas (T) de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i> . 30 µg de proteínas foram resolvidas em gel NuPage 4-12% e corados com Azul de Coomassie G-250.....	70
Figura 16: Perfil eletroforético (NuPage 4-12%) com 30 µg das frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP) das formas epimastigota (1) e tripomastigota (2) de <i>Trypanosoma rangeli</i> () e tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> (3), corados com Azul de Coomassie G-250. As bandas identificadas com os códigos indicados no lado direito foram submetidas a análise de espectrometria de massas (LC-MS/MS) e são equivalentes aos códigos da Tabelas Suplementares 10 e 11.....	72
Figura 17: Diagrama de Venn com a comparação entre a quantidade de proteínas encontradas na fração enriquecida com proteínas de superfície (SEP) das formas epimastigota e tripomastigotas de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) Número de proteínas identificadas; (B) proteínas com sítio para âncora de GPI; (C) Proteínas com característica para superfície celular ou membrana plasmática (pelo menos uma PTM ou sinalização para membrana plasmática ou extracelular).....	75
Figura 18: Localização celular das 138 e 348 proteínas identificadas por MS/MS na fração SEP das formas tripomastigota e epimastigota de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i> , respectivamente, preditas através do software <i>Wolf-Psort</i>	76
Figura 19: Esquema demonstrando as características dos grupos de sialidase de <i>Trypanosoma rangeli</i> (TrSial) encontrados neste estudo, de acordo com a presença e quantidade de motivos ASP (verde), VTV (vermelho) e FRIP (azul). Abaixo de cada motivo está apresentado a sequência consenso encontrada nas diferentes proteínas que compões o grupo.	82

Figura 20: Sequência e características da proteína tipo mucina de *Trypanosoma rangeli* (TrSMUG-like, contig00371.3). Esta proteína apresenta todas as características da família de mucinas SMUG-L-like de *Trypanosoma cruzi*: presença do peptídeo sinal na região N-terminal da proteína (linha superior); sítios de O-glicosilação (asteriscos); sítio para ancoramento a GPI (ω); e cauda hidrofóbica na região C-terminal (sublinhado). As sequências com fundo amarelo indicam os peptídeos identificados por espectrometria de massas (LS-ESI-MS/MS). 83

Figura 21: Análise de *immunoblotting* das frações da superfície (SEP) das formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* (1), de *Trypanosoma cruzi* (2) e de células Vero (3), com aproximadamente 25 μ g das proteínas da fração SEP resolvidas em NuPage 4-12%. (A) gel foi corado com Azul de Coomassie G-250; anti-*T. rangeli* (1:600) (B) e anti-*T. cruzi* (1:600) (C). Antissoros de animais sadios foram utilizados e não houve reconhecimentos de proteínas em ambos os extratos (não apresentado). Boxes indicam regiões reconhecidas exclusivamente pelo antissoro homólogo. Setas indicam bandas com proteínas de *T. rangeli* reconhecidas exclusivamente pelo antissoros homólogos, identificadas por espectrometria de massas GP63 e FCaBP (setas pretas) e não identificadas (setas vermelhas). 85

Figura 22: Proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP) de *Trypanosoma rangeli* identificada por MS/MS na banda TR13 (Figura 21) e reconhecida pelo soro homólogo. (A) Sequência da proteína e cobertura (40%) obtida na análise LC-ESI-MS/MS, os peptídeos com fundo amarelo foram validados pelo programa Scaffold; (B) Espectro MS/MS do peptídeo sublinhado, representando a boa qualidade de identificação das proteína; (C) Alinhamento da proteína FCaBP de *T. rangeli* (TR01599) com a proteína homóloga de *T. cruzi* (Tc00.1047053507891.47). O quadro na figura C indica a região com menor similaridade entre as duas proteínas e onde está localizado o epítipo com potencial marcador diferencial para *T. rangeli* (Tabela 6). 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela contendo os programas utilizados nas análises <i>in silico</i> com a descrição da suas finalidades.	39
Tabela 2: Tabela-resumo da quantidade <i>spots</i> analisados nas diferentes amostras biológicas da forma tripomastigota de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
Tabela 4: Características encontradas nas proteínas identificadas em espectrometria de massas das frações (SEP) das formas epimastigota e tripomastigota de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> pelas abordagens proteômicas utilizadas.	73
Tabela 5: Proteínas na fração SEP de <i>Trypanosoma rangeli</i> identificadas por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS) em ambas as abordagens proteômicas utilizadas, com função predita e identificada nas bases de dados.....	78
Tabela 6: Lista de epítomos lineares ligantes em células B preditos das proteínas de superfície do <i>Trypanosoma rangeli</i> identificadas apenas pelos antissoro homólogo, sem similaridade (ou <60%) com proteínas de <i>T. cruzi</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

LNCC – Laboratório Nacional de Computação Científica
LC – do inglês “*Liquid Chromatography*”
ESI - do inglês “*Electrospray Ionization*”
MS – do inglês “*Mass Spectrometry*”
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
kDNA – DNA do cinetoplasto
RNA – Ácido ribonucleico
DTU – do inglês “*Discrete Taxonomic Unit*”
 μm - Micrometro
ELISA - do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
RAPD - do inglês, *Random Amplification of Polymorphic DNA*
1-D – Eletroforese unidimensional
2-D – Eletroforese bidimensional
m/z – Relação massa/carga
MALDI – do inglês “*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*”
TOF - do inglês “*Time-of-flight*”
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
MHC – do inglês “*Major Histocompatibility Complex*”
EST - do inglês “*Expressed Sequence Tags*”
DTM – Domínio Trans-Membranar
VSG - do inglês “*Variant Surface Glycoprotein*”
PI – Fosfatidilinositol
FCaBP - do inglês “*Flagellar calcium-binding protein*”
PTM – do inglês “*Post-Translational Modification*”
LIT - do inglês “*Liver Infusion Tryptose*”
DMEM – do inglês “*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*”
SBF - Soro Bovino Fetal
PBS - Tampão fosfato-salina
g – Força gravitacional
mM – Milimolar
 μL - Microlitro
 μg - Micrograma
Vhr – Volt/hora
mL - Mililitro
mg - Miligrama
Da - Dalton
kDa - Kilodalton

nm – Nanometro
SEP – do inglês “*Surface Enriched Proteins*”
SP – do inglês “*Surface proteins*”
TA – Temperatura Ambiente
DTT - Ditioneitol
IAA - Iodoacetamida
ACN - Acetonitrila
AF - Ácido Fórmico
pI – Ponto Isoelétrico
Mr – Massa molecular relativa
HPLC – do inglês “*High-Performance Liquid Chromatography*”
DDA - do inglês “*Data-Dependent Analysis*”
CID – do inglês “*Collision-Induced Dissociation*”
ORF – do inglês “*Open Reading Frame*”
MudPIT – do inglês “*Multidimensional Protein Identification Technology*”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	5
2.1	<i>Objetivos Específicos</i>	5
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1	<i>Similaridades e diferenças entre o Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920 e Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi Chagas, 1909</i>	7
3.2	<i>O diagnóstico diferencial entre Trypanosoma rangeli e Trypanosoma cruzi</i>	14
3.3	<i>Análise de proteínas em grande escala</i>	16
3.4	<i>Proteômica do Trypanosoma cruzi e do Trypanosoma rangeli</i>	18
3.5	<i>As proteínas de superfície de tripanosomatídeos</i>	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	<i>Cultivo e obtenção dos parasitos</i>	25
4.2	<i>Antissoros de animais experimentalmente infectados</i>	26
4.3	<i>Extração de proteínas solúveis</i>	26
4.4	<i>Obtenção de fração enriquecida de proteínas de superfície (SEP)</i>	27
4.5	<i>Eletroforese unidimensional (1-D) de proteínas em condições denaturantes (SDS-PAGE)</i>	29
4.6	<i>Perfil eletroforético bidimensional (2-D) das proteínas solúveis das formas tripomastigotas de Trypanosoma rangeli e de Trypanosoma cruzi</i>	30
4.7	<i>Ensaio de immunoblotting com géis unidimensionais (1-D)</i>	31
4.8	<i>Ensaio de immunoblotting com géis bidimensionais (2-D)</i>	32
4.9	<i>Obtenção e processamento das imagens</i>	33
4.10	<i>Digestão proteolítica das proteínas nos géis coletados (in-gel)</i>	33
4.11	<i>Digestão proteolítica das frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP) em solução (in-solution)</i>	34
4.12	<i>Análise por espectrometria de massa in tandem (LC-ESI-MS/MS) das proteínas solúveis obtidas a partir da eletroforese 2-D</i>	35
4.13	<i>Análise por espectrometria de massas in tandem (LC-ESI-MS/MS) das proteínas presentes nas frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP)</i>	36
4.14	<i>Processamento e análise dos espectros de massas</i>	37
4.15	<i>Análise in silico das proteínas identificadas por MS/MS</i>	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	<i>Análise das proteínas solúveis da forma tripomastigota de Trypanosoma rangeli diferenciada in vitro.....</i>	41
5.1.1	Perfil bidimensional (2-D) de referência da forma tripomastigota de <i>Trypanosoma rangeli</i>	41
5.1.2	Proteínas sem função definida.....	49
5.1.3	Localização celular e anotação funcional das proteínas de <i>Trypanosoma rangeli</i>	50
5.1.4	Metabolismo energético.....	52
5.1.5	Proteínas envolvidas na resposta ao estresse.....	54
5.1.6	Proteínas de superfície ou associadas à membrana plasmática.....	57
5.1.7	Predição <i>in silico</i> de epítomos lineares ligantes em células B da forma tripomastigota de <i>Trypanosoma rangeli</i>	58
5.2	<i>Mapeamento dos antígenos de Trypanosoma rangeli e de Trypanosoma cruzi</i>	59
5.2.1	Perfil unidimensional dos antígenos de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i> identificados por antissoros de camundongos experimentalmente infectados.....	59
5.2.2	Immunoblotting 2-D das proteínas solúveis de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
5.3	<i>Proteômica comparativa da superfície do Trypanosoma rangeli e do Trypanosoma cruzi</i>	65
5.3.1	Comparação entre os perfis eletroforéticos unidimensionais das frações enriquecidas com proteínas de superfície de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
5.3.2	Identificação das proteínas presentes nas frações enriquecidas com proteínas de superfície de <i>Trypanosoma rangeli</i> e de <i>Trypanosoma cruzi</i> por espectrometria de massas.....	71
5.3.3	Localização celular e classificação funcional das proteínas presentes na fração enriquecida com proteínas de superfície de <i>Trypanosoma rangeli</i>	74
5.3.4	Proteínas de superfície de <i>Trypanosoma rangeli</i>	76
5.4	<i>Antígenos de superfície do Trypanosoma rangeli com potencial aplicação no diagnóstico específico</i>	84
6	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICES	125

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma das principais doenças causadas por protozoários nas Américas. O *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 seu agente etiológico, infecta entre 8-10 milhões de pessoas incorrendo em elevada morbidade e, muitas vezes, a morte dos infectados (OPS, 2006).

Devido a complexidade do tratamento, às variáveis socioeconômicas envolvidas e ao conseqüente custo da doença, o diagnóstico precoce e específico da doença de Chagas é de fundamental importância. Entretanto, a reatividade sorológica cruzada com o *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, devido ao compartilhamento de cerca de 60% dos constituintes antigênicos solúveis das formas epimastigotas destas duas espécies, é um fator que pode influenciar nos resultados dos exames rotineiramente empregados em laboratórios clínicos (AFCHAIN *et al.*, 1979; SALDANA e SOUSA, 1996a).

Desta forma, o uso de antígenos bem caracterizados e oriundos das formas tripomastigotas, que são as formas encontradas nos hospedeiros vertebrados, para o diagnóstico diferencial de *T. rangeli* e *T. cruzi*, poderá resultar em maior especificidade nos exames sorológicos, reduzindo possíveis resultados falso-positivos ou inconclusivos no diagnóstico sorológico para a doença de Chagas (GUHL *et al.*, 2002). Esta hipótese já foi levantada por De Moraes e colaboradores (2008), sugerindo que a utilização das formas tripomastigotas destes dois parasitos, poderá servir como fonte de potenciais antígenos para diagnóstico diferencial.

Usualmente, a identificação de antígenos diferenciais entre estes parasitos, bem como a caracterização da variabilidade intraespecífica dos mesmos, vem sendo empregada de maneira pontual (DIEZ *et al.*, 2008). Uma das primeiras abordagens do genoma do *T. rangeli* em maior escala foi desenvolvida pelo nosso grupo, onde foram geradas 4.357 seqüências não redundantes, a maioria apresentando alta similaridade com o genoma do *T. cruzi* (GRISARD *et al.*, 2010). Além disto, este mesmo grupo iniciou o sequenciamento do genoma do *T. rangeli*, o qual está em fase de montagem e anotação (LNCC, 2011), através do qual será possível obter informações mais completas

sobre a organização gênica deste organismo, seus genes homólogos ao *T. cruzi*, bem como aqueles envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

Porém estes não revelam o rol de expressão proteica do *T. rangeli*, especialmente de suas proteínas de superfície, que podem constituir alvos específicos para diagnóstico diferencial. Para isto, abordagens proteômicas associadas a técnicas clássicas de identificação de antígenos, como os *immunoblottings*, se apresentam como importantes ferramentas na detecção de proteínas alvos para o diagnóstico de doenças infecto-parasitárias (RAMON-LUING *et al.*, 2010; SEPULVEDA *et al.*, 2010).

Embora a análise das proteínas solúveis possibilite a identificação de potenciais antígenos, sabe-se que as proteínas com maior potencial antigênico e, conseqüentemente, de maior aplicabilidade em diagnóstico diferencial, são aquelas associadas a superfície e à membrana plasmática destes parasitos (ZHONG *et al.*, 2010). Além disso, estas proteínas estão envolvidas nos processos de interação parasito-hospedeiro, como reconhecimento, adesão e penetração nas células hospedeiras.

Entretanto, são raros os estudos de caracterização de antígenos de superfície do *T. rangeli*. Dentre estes destaca-se o estudo de Añez-Rojas e colaboradores (2006) que propôs o uso de antígenos oriundos de formas epimastigotas como potencial alvo para o diagnóstico específico deste parasito, porém sem a identificação de antígenos espécie-específicos (ANEZ-ROJAS *et al.*, 2006).

Assim sendo, a identificação de novos antígenos específicos de *T. rangeli* e de *T. cruzi* para a aplicação em imunoenaios específicos é de suma importância para reduzir a ocorrência de resultados falso-positivos em diagnósticos sorológicos, especialmente em áreas endêmicas da doença de Chagas e onde há sobreposição destes parasitos (DE MORAES *et al.*, 2008).

Desta forma, considerando a relevância do diagnóstico específico da doença de Chagas e a necessidade de uma melhor compreensão de aspectos ainda desconhecidos da biologia *in vivo* do *T. rangeli*, o presente estudo teve como meta o estudo proteômico das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e a

identificação de proteínas antigênicas espécie-específicas com potencial aplicação no diagnóstico diferencial entre *T. rangeli* e *T. cruzi*. Para tal, foram utilizadas diferentes abordagens proteômicas para a análise tanto de proteínas solúveis quanto de proteínas de superfície destes parasitos, associadas a abordagens de *immunoblotting* utilizando soros de animais experimentalmente infectados.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Analisar o rol de proteínas expressas pela forma tripomastigota do *Trypanosoma rangeli* diferenciada *in vitro* e identificar proteínas diferencialmente reconhecidas por antissoros de camundongos experimentalmente infectados com *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*.

2.1 *Objetivos Específicos*

- Obter o perfil bidimensional referência das proteínas solúveis das formas tripomastigotas de *T. rangeli* diferenciadas *in vitro* e identificar as proteínas presentes neste perfil por espectrometria de massas;
- Caracterizar proteínas em extratos solúveis das formas tripomastigotas de *T. rangeli* diferencialmente reconhecidas por antissoros homólogos e heterólogos em ensaios de *immunoblotting* bidimensional utilizando antissoros de camundongos experimentalmente infectados;
- Comparar o perfil proteico da fração enriquecida com proteínas de superfície entre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*;
- Identificar as proteínas presentes na fração enriquecida com proteínas de superfície de ambas as formas de *T. rangeli* utilizando abordagens proteômicas baseada em gel (GeLC-ESI-MS/MS) e sem o uso de gel (LC-ESI-MS/MS);
- Identificar proteínas alvos para marcadores de diagnóstico específico de *T. rangeli* baseados no reconhecimento de antígenos de superfície de *T. rangeli* e *T. cruzi* por antissoros homólogos e heterólogos obtidos a partir de camundongos experimentalmente infectados com formas tripomastigotas destes parasitos;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Similaridades e diferenças entre o Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920 e Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi Chagas, 1909*

O *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, assim como o *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909, agente etiológico da Doença de Chagas, são protozoários hemoflagelados pertencentes à Classe Mastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (D' ALESSANDRO, 1976). A Ordem Kinetoplastida compreende organismos flagelados possuidores de uma região rica em DNA diferenciado (kDNA) denominada de cinetoplasto, localizada na sua única mitocôndria. Este kDNA está organizado em moléculas circulares denominadas de maxi e minicírculos. Além disto, apresentam uma organela citoplasmática diferenciada e similar ao peroxissomo, denominada glicossomo, a qual possui enzimas envolvidas na via glicolítica e no metabolismo de carboidratos (MICHELS *et al.*, 2000).

A Família Trypanosomatidae apresenta algumas características peculiares que a difere das demais famílias da Ordem Kinetoplastida, como a presença de uma camada subpericular de microtúbulos e a presença de um flagelo que emerge de uma bolsa flagelar localizada próximo ao cinetoplasto (DE SOUZA, 2002).

Já o gênero *Trypanosoma* é dividido em duas secções: Stercoraria e Salivaria (HOARE, 1972). A primeira inclui parasitos como o *T. cruzi*, o *Trypanosoma lewisi* e o *Trypanosoma theileri*, pois apresentam o desenvolvimento de suas formas infectivas no intestino posterior do triatomíneo, as quais estão presentes nas fezes, determinando uma infecção do tipo contaminativa. Já as espécies pertencentes a secção Salivaria, como por exemplo o *Trypanosoma brucei*, o *Trypanosoma vivax* e o *Trypanosoma congolense*, apresentam o desenvolvimento de suas formas infectivas nas glândulas salivares das espécies vetores, incorrendo portanto em uma transmissão por via inoculativa (HOARE, 1972).

Em função das diferenças e similaridades biológicas e moleculares com espécies de ambas as secções acima

descritas, a posição taxonômica do *T. rangeli* tem sido objeto de muita discussão. A maioria dos autores mantém a classificação original do *T. rangeli* como pertencente à secção Stercoraria, (BRIONES *et al.*, 1999; STEVENS *et al.*, 1999; GRISARD, 2002; HUGHES e PIONTKIVSKA, 2003) em função da maior similaridade genética com *T. cruzi*, principalmente quando utilizados marcadores clássicos, como o gene do RNA ribossomal 18S. Entretanto, trabalhos utilizando outros marcadores moleculares evidenciam considerável similaridade entre o *T. rangeli* e o *T. brucei*, alocando assim este parasito na secção Salivaria (AMORIM *et al.*, 1993; HENRIKSSON *et al.*, 1996).

Além desta discussão acerca da posição taxonômica do *T. rangeli*, observa-se para este taxon a existência de uma considerável variabilidade intraespecífica. Vallejo *et al.* (2002) utilizando o kDNA como molécula-alvo, demonstraram a existência de duas linhagens genéticas do *T. rangeli* na América Latina, composta por cepas que apresentam variações no tamanho e no número de regiões conservadas do minicírculo do kDNA, podendo apresentar uma (KP1), duas (KP2) ou quatro (KP3) regiões conservadas (VALLEJO *et al.*, 1994; VALLEJO *et al.*, 2002). Com base na presença destas estruturas de kDNA foi possível distinguir duas linhagens de *T. rangeli*, uma com a presença do minicírculo do tipo KP1 (KP1+) e outra sem este minicírculo (KP1-). A primeira é encontrada na América Central, Colômbia e Venezuela e a segunda com uma distribuição ainda não bem estabelecida, sendo encontrada tanto no sul do Brasil quanto na Colômbia (VALLEJO *et al.*, 2002).

O *T. cruzi* apresenta estrutura populacional multiclonal de elevada diversidade genética, que permitiu o agrupamento das cepas de *T. cruzi* em seis agrupamentos distintos ou *Discrete Typing Units* (DTU), que são conjuntos de linhagens de parasitos geneticamente relacionados entre si, identificados por marcadores genéticos e bioquímicos (ZINGALES *et al.*, 2009).

Tanto o *T. rangeli* quanto o *T. cruzi* apresentam ciclo biológico heteroxeno, ou seja, alternam obrigatoriamente entre hospedeiros invertebrados (vetores), hemípteros hematófagos da Subfamília Triatominae, e hospedeiros vertebrados, como marsupiais e mamíferos placentários, incluindo o homem. (BRENER, 1973; D' ALESSANDRO e SARAVIA, 1999).

Já foram descritas várias espécies da Subfamília Triatominae como transmissoras de *T. rangeli* e *T. cruzi* (COURA e DIAS, 2009), embora para o *T. rangeli* destacam-se espécies do gênero *Rhodnius* (D' ALESSANDRO, 1976). Dentre os hospedeiros vertebrados, centenas de espécies de mamíferos silvestres e domésticos foram encontradas infectadas por *T. cruzi*, e muitas destas também por *T. rangeli*. Porém, do ponto de vista epidemiológico, destacam-se os marsupiais (gambás) por apresentarem altas taxas de infecção e alta sinantropia com os hospedeiros invertebrados e humanos, estabelecendo uma ponte entre os ciclos silvestre e domiciliar de infecção (TOLEDO *et al.*, 1997; GRISARD *et al.*, 2000; RUIZ-PINA e CRUZ-REYES, 2002).

Apesar da elevada diversidade de espécies de hospedeiros invertebrados e mamíferos de *T. rangeli*, ainda existem muitas lacunas no entendimento do seu ciclo biológico, especialmente nos hospedeiros mamíferos, diferentemente do *T. cruzi* cuja biologia está melhor caracterizada (D' ALESSANDRO e SARAVIA, 1999; GRISARD, STEINDEL, *et al.*, 1999).

Sabe-se que o *T. rangeli* apresenta formas epimastigotas e tripomastigotas com elevado pleomorfismo. As formas tripomastigotas sanguíneas (Figura 1) apresentam tamanhos variando entre 26 a 34 μ m e uma membrana ondulante bem desenvolvida, além de apresentar um cinetoplasto pontual e subterminal (GUHL e VALLEJO, 2003).



Figura 1: Forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma rangeli* em sangue de camundongo experimentalmente infectado (aumento de 1.000X).

Com relação ao ciclo biológico do *T. rangeli*, a fase no hospedeiro invertebrado é a mais conhecida (Figura 2). Diferentemente do *T. cruzi*, onde as formas epimastigotas multiplicam-se exclusivamente no interior do tubo digestivo do

triatomíneo e ao alcançar a ampola retal do inseto se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas infectivas (BRENER, 1971), as formas epimastigotas do *T. rangeli* apresentam a capacidade de evadir do trato digestivo médio dos triatomíneos para a hemocele e a posterior invasão das glândulas salivares (HECKER *et al.*, 1990; DE OLIVEIRA e DE SOUZA, 2001).

Na hemocele, ocorre uma intensa multiplicação das formas epimastigotas de forma livre na hemolinfa (MEIRELLES *et al.*, 2005). Esse processo de invasão da hemocele, multiplicação e posterior invasão das glândulas salivares acarretam danos ao triatomíneo, como a destruição de hemócitos, dificuldade de muda e no desenvolvimento das ninfas, acarretando em alguns casos a morte destes vetores (VALLEJO *et al.*, 2009).

Após a colonização da hemocele, os parasitos migram às glândulas salivares e ao alcançarem o lúmen glandular sofrem um processo de diferenciação para metatripanosomas, ou tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectivas para os hospedeiros mamíferos (D' ALESSANDRO, 1976).

Já com relação ao ciclo biológico nos hospedeiros mamíferos, enquanto para o *T. cruzi* este ciclo é bem conhecido. Com formas intracelulares amastigotas em macrófagos, em células dos tecidos cardíaco ou muscular liso, além de formas tripomastigotas sanguíneas liberadas pelo rompimento das células infectadas após uma intensa multiplicação (divisão binária) das formas amastigotas (BRENER, 1971), o ciclo do *T. rangeli* não é bem caracterizado nestes hospedeiros mamíferos. Até então, apenas formas tripomastigotas sanguíneas do *T. rangeli* foram encontradas nos hospedeiros mamíferos. Porém, em ensaios *in vitro*, algumas formas intracelulares, sem a capacidade de divisão, foram observadas em linhagens celulares humanas (OSORIO *et al.*, 1995), de murinos e células Vero (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001). Contudo há um único registro de evidências de replicação de uma cepa deste parasito (C23) no interior de certas linhagens celulares em ensaios *in vitro* (ZUNIGA *et al.*, 1997a).

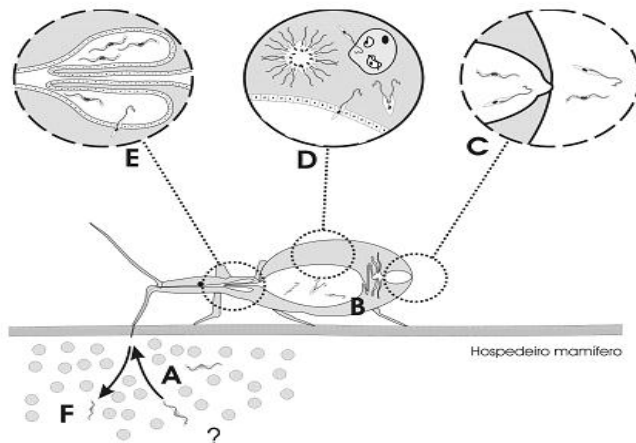


Figura 2: Ciclo biológico do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A – Ingestão das formas tripomastigotas de *T. rangeli* durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, B – Formas tripomastigotas e epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo, C – Parasitos alcançam a ampola retal e formas epimastigotas e tripomastigotas podem ser excretadas juntamente com as fezes e urina, D – Adesão de formas epimastigotas do parasito ao epitélio intestinal e transposição para a hemocele onde se multiplicam, E – Invasão pelo *T. rangeli* das glândulas salivares do triatomíneo e diferenciação para formas inectivas (metatripanosomas), as quais são inoculadas com a saliva (F) durante o repasto sanguíneo.
Fonte: Grisard & Steindel, 2011.

Ao estudar o ciclo do *T. rangeli* em infecções experimentais de camundongos, observa-se que na primeira semana de infecção há uma baixa parasitemia, com um pico entre o 5-7 dia, porém após 15 dias esta apresenta-se extremamente baixa ou indetectável, impossibilitando a visualização através de microscopia óptica (HORNA *et al.*, 1997). Apesar disto, já foi reportado que a realização de hemocultura permite a detecção deste parasito em camundongos com parasitemia negativa prolongada por mais de sete meses (STEINDEL, 1993), revelando a existência de mecanismos de multiplicação e/ou sobrevivência deste parasito no hospedeiro mamífero ainda não caracterizados (D' ALESSANDRO e SARAVIA, 1999).

Apesar destas lacunas no entendimento da biologia do *T. rangeli* nos hospedeiros mamíferos, este parasito é encontrado em toda a extensão da América Latina, em simpatria com o *T. cruzi* (D' ALESSANDRO e SARAVIA, 1999; GRISARD, STEINDEL, *et al.*, 1999) (Figura 3). No Brasil, já foi demonstrada a ocorrência do *T. rangeli* na Amazônia (COURA *et al.*, 1996; D' ALESSANDRO e SARAVIA, 1999), no Sul (STEINDEL *et al.*, 1991; GRISARD *et al.*, 2000) e no Nordeste (DIAS *et al.*, 2007). Também, já foram descritos casos de infecção humana na Amazônia (COURA *et al.*, 1996) e mais recentemente em pacientes com Doença de Chagas crônica em Minas Gerais e Bahia (DE SOUSA *et al.*, 2008).

Devido a esta sobreposição geográfica entre o *T. cruzi* e o *T. rangeli* e do compartilhamento do mesmo nicho ecológico (hospedeiros), estes parasitos já foram encontrados simultaneamente tanto em triatomíneos (STEINDEL *et al.*, 1994; CHIURILLO *et al.*, 2003) como em seres humanos em áreas endêmicas para Doença de Chagas (SALDANA *et al.*, 2005), demonstrando a possibilidade de ocorrência de infecções únicas e/ou mistas (MACHADO *et al.*, 2000; SALDANA *et al.*, 2005; DE SOUSA *et al.*, 2008).

Apesar de infectar humanos, assim como nos demais hospedeiros mamíferos, o *T. rangeli* não provoca uma patologia específica, como no caso do *T. cruzi*, que provoca uma patologia complexa chamada de Doença de Chagas. Esta doença é dividida em duas fases de acordo com as suas implicações clínicas: fase aguda e fase crônica. Durante a primeira fase a maioria dos infectados são assintomáticos ou, se sintomáticos, com o aparecimento de uma ou mais manifestações clínicas como febre, mialgia, dores de cabeça, entre outras (ANEZ *et al.*, 1999), e em menos de 5% dos casos há o óbito da pessoa infectada em virtude de miocardites acentuadas (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Esta fase aguda evolui para uma fase crônica em aproximadamente 30-40% dos pacientes (MUNOZ-SARAVIA *et al.*, 2010), e pode ser dividida em três formas, (i) assintomática ou indeterminada; (ii) sintomática cardíaca e (iii) sintomática digestiva, ou ainda uma forma mista (cardíaca e digestiva) (RASSI *et al.*, 2010).



Figura 3: Distribuição geográfica da doença de Chagas humana causada pelo *Trypanosoma cruzi* (área sombreada) nas Américas e locais onde já foram descritos casos de *Trypanosoma rangeli* (pontos).

Fonte: Grisard & Steindel, 2011.

A prevalência de doença de Chagas no Brasil é variada, podendo atingir cerca de 8,8% em Minas Gerais e Rio Grande do Sul, 7,4% em Goiás e 5,4% na Bahia (VINHAES e DIAS, 2000), 1,4% Piauí (BORGES-PEREIRA *et al.*, 2002), 1,9% para a região Amazônica Brasileira (DANTAS-MAIA *et al.*, 2007). Em Estados brasileiros onde a doença não é considerada endêmica têm-se verificado a infecção acidental pelo *T. cruzi*, especialmente por via oral (STEINDEL *et al.*, 2008).

Na região Sul do Brasil já foram registrados casos de pacientes com ambas as fases e com as formas cardíaca e digestiva da doença (FERNANDES *et al.*, 1997; MAEGAWA *et al.*, 2003; STEINDEL *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009), sendo os Estados do Paraná e o Rio Grande do Sul com o maior número de casos, especialmente na região nordeste do Paraná (TOLEDO *et al.*, 1997).

Apesar de no Brasil a transmissão vetorial do *T. cruzi* ser considerada baixa nos dias atuais, de acordo com o Ministério da Saúde (MS, 2012), a doença de Chagas ainda é umas das doenças infecto-parasitárias que mais causam morte no Brasil, o

que leva a uma contínua busca de novos conhecimentos para o tratamento, diagnóstico mais efetivo e entendimento dos seus aspectos biológicos destes parasitos.

3.2 O diagnóstico diferencial entre *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*

Considerando a reatividade sorológica cruzada (AFCHAIN *et al.*, 1979) e o compartilhamento de reservatórios e vetores (STEINDEL *et al.*, 1994; MACHADO *et al.*, 2000; CHIURILLO *et al.*, 2003), torna-se evidente a necessidade de diferenciar inequivocamente o *T. cruzi* do *T. rangeli* (GUHL *et al.*, 2002), especialmente em áreas endêmicas de Doença de Chagas (MACHADO *et al.*, 2000; RAMIREZ *et al.*, 2002; CABALLERO *et al.*, 2007).

Para isto, diferentes metodologias foram ou estão sendo empregadas, como o esfregaço sanguíneo e o xenodiagnóstico. Apesar do primeiro ser um teste rápido, torna-se pouco conclusivo devido ao curto tempo e a baixa parasitemia do *T. rangeli* nos hospedeiros vertebrados. Já o xenodiagnóstico apresenta baixa sensibilidade e reprodutibilidade em virtude da susceptibilidade diferencial de certas espécies de triatomíneos a diferentes cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi* (MACHADO *et al.*, 2001; GRISARD e STEINDEL, 2011), além da necessidade de elevados níveis de parasitemia nos hospedeiros mamíferos (GUHL *et al.*, 2002), tornando inviável e promovendo o desuso destes métodos no diagnóstico diferencial destes parasitos.

Visando melhorar os índices de sensibilidade e especificidade neste diagnóstico diferencial, algumas técnicas com o uso de anticorpos monoclonais em ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ou em reações de imunofluorescência indireta (RIFI), ou ainda a aglutinação por lectinas (DE MIRANDA SANTOS e PEREIRA, 1984; ACOSTA *et al.*, 1991; STEINDEL *et al.*, 1991) têm sido propostas. As técnicas de RIFI e ELISA são rotineiramente empregadas no diagnóstico da infecção chagásica (CABALLERO *et al.*, 2007), com a disponibilidade de uma variedade de kits comerciais, os quais possuem valores de especificidade e sensibilidade variáveis (UMEZAWA *et al.*, 1996; CABALLERO *et al.*, 2007). Contudo, nenhum destes testes são capazes de identificar

inequivocamente a infecção pelo *T. rangeli* ou diferenciar a infecção mista por ambos os parasitos.

Para tal, métodos de detecção e diferenciação genética, como análise de perfis de RAPD (do inglês, *Random Amplification of Polymorphic DNA*) (STEINDEL *et al.*, 1994) e análise dos genes do *spliced leader* (mini-exon) (GRISARD, CAMPBELL, *et al.*, 1999; VALLEJO *et al.*, 2002) foram propostas como opções para o diagnóstico e caracterização específicos do *T. rangeli*. Porém, como estes testes não são utilizados em rotina laboratorial, os métodos sorológicos ainda são mais apropriados, apesar da reatividade sorológica cruzada entre estes dois parasitos.

Esta reatividade sorológica cruzada entre *T. cruzi* e *T. rangeli* tem sido objeto de vários estudos há algum tempo, permitindo inclusive estimar um compartilhamento de 60% dos seus constituintes antigênicos solúveis (AFCHAIN *et al.*, 1979; O'DALY *et al.*, 1994; SALDANA e SOUSA, 1996a). Entretanto, a maioria destes estudos utilizaram antígenos solúveis de formas epimastigotas de cultura (AFCHAIN *et al.*, 1979; ANTHONY *et al.*, 1981; GUHL e MARINKELLE, 1982; O'DALY *et al.*, 1994; ZUNIGA *et al.*, 1997b; UMEZAWA e SILVEIRA, 1999; PEREIRA *et al.*, 2000; RAMIREZ *et al.*, 2002; CABALLERO *et al.*, 2007; GRIPPO *et al.*, 2011), o que pode influenciar nas estimativas da incidência do *T. cruzi* pela ocorrência de resultados falso-positivos ou inconclusivos em exames sorológicos (GUHL *et al.*, 2002), como já reportado inclusive em áreas não endêmicas (PARADA *et al.*, 2010). Atualmente vem sendo proposta a substituição destes antígenos oriundos de formas epimastigotas por antígenos recombinantes (BARFIELD *et al.*, 2011) ou por antígenos de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (BERRIZBEITIA *et al.*, 2006), apesar da dificuldade e risco na obtenção destas formas tripomastigota em culturas.

Desta forma, a utilização de antígenos específicos de formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* em áreas endêmicas com sobreposição geográfica e ecológica destes parasitos, poderá reduzir consideravelmente resultados falsos positivos no diagnóstico da Doença de Chagas e permitir um melhor detalhamento da distribuição do *T. rangeli* (DE MORAES *et al.*, 2008). No referido estudo, foram evidenciadas proteínas estágio-específico presentes apenas na forma tripomastigota de

T. cruzi, não sendo observadas no *T. rangeli*, possuindo assim grande potencial em diagnóstico diferencial. Contudo, não foram identificados ou caracterizados antígenos *T. rangeli*-específicos.

A identificação de novos antígenos específicos para cada parasito torna-se vital para o incremento da sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico sorológico diferencial. Para isto, a associação entre as análises proteômicas com ferramentas clássicas de determinação de antígenos, tem sido apresentada como uma alternativa para identificar antígenos com maior rapidez e amplitude (HESS *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2009; PERALTA *et al.*, 2010; ZHONG *et al.*, 2010).

Dentre estas, a associação entre a análise do perfil proteico, *immunoblottings* e a identificação de proteínas por espectrometria de massas vem sendo empregada na determinação de potenciais antígenos ou marcadores de diferentes organismos patogênicos (FALISSE-POIRRIER *et al.*, 2006; BOONJAKUAKUL *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2010), para doenças como câncer (CECCONI *et al.*, 2007; INDOVINA *et al.*, 2012) assim como para tripanosomatídeos patogênicos (FORGBER *et al.*, 2006; BOONJAKUAKUL *et al.*, 2007; HOLZMULLER *et al.*, 2008; MANFUL *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011; COELHO *et al.*, 2012; NAKAYASU *et al.*, 2012; WEN e GARG, 2012).

3.3 *Análise de proteínas em grande escala*

Atualmente há distintas abordagens empregadas para a análise e identificação do rol de proteínas de uma célula ou tecido. As abordagens proteômicas mais utilizadas seguem pelo menos três princípios básicos sendo: i) a separação ou resolução das proteínas presentes em uma mistura complexa; ii) a proteólise (digestão) das proteínas resultando peptídeos e; iii) a identificação dos peptídeos por espectrometria de massas (MS) e a conseqüente identificação das respectivas proteínas (HAN *et al.*, 2008). Baseadas nestas características, a identificação de proteínas presentes em uma fração proteica pode ser dividida em duas abordagens descritas a seguir.

Na primeira abordagem, com o uso de gel (*gel-based*), as proteínas são resolvidas através da eletroforese (SDS-PAGE) unidimensional (1-D) ou bidimensionais (2-D), seguida da

proteólise no gel (*in-gel*) destas proteínas e os peptídeos resultantes são identificados por espectrometria de massas (MS) (ATWOOD *et al.*, 2005; COLASANTE *et al.*, 2006; KOSEC *et al.*, 2006; CUERVO *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008; HOLZMULLER *et al.*, 2008).

Utilizando especialmente a separação das proteínas através de eletroforese 2-D, é possível resolver centenas de proteínas em uma única mistura de proteínas. Entretanto, mesmo com os avanços desta metodologia, como formação do gradiente de pH imobilizado (BJELLQVIST *et al.*, 1982), ainda ocorrem falhas na reprodutibilidade dos perfis de uma mesma célula ou tecido. Desta forma, a reprodutibilidade do perfil bidimensional torna-se fundamental para a análise proteômica 2-D (ASSUMPCAO *et al.*, 2011), para isto replicatas técnicas e biológicas são fundamentais para minimizar os erros inerentes a esta metodologia (LOPEZ, 2007).

Já na segunda abordagem, sem o uso de gel (*gel-free*), as proteínas são submetidas a clivagem proteolítica em solução, permitindo que os peptídeos resultantes possam ser separados em cromatografia líquida (LC) utilizando uma ou mais composições de fase estacionária e cada fração de peptídeos é submetida a análise por MS (WASHBURN *et al.*, 2001; MOTOYAMA e YATES, 2008).

A espectrometria de massas (MS) visa identificar a massa molecular de uma proteína ou peptídeo através da sua relação massa/carga (m/z) após um processo de adição de carga (ionização) a estas moléculas (HOFFMANN, 2007). Para tal, estas moléculas são ionizadas em fontes de ionizações, como o MALDI (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) e o ESI (do inglês, *Electrospray Ionization*) (HOFFMANN, 2007), seguida da análise da relação massa/carga (m/z) em um analisador de massas (e.g. *Time-of-flight* (TOF), *Quadrupole e Ion Trap*) (YATES *et al.*, 2009). Com isto são obtidos espectros de massa típicos de uma determinada proteína ou peptídeo, determinando a sequência dos aminoácidos daquele peptídeo através do sequenciamento *de novo* ou com a comparação destes espectros com base de dados de proteínas conhecidas (MATTHIESEN, 2007).

3.4 *Proteômica do Trypanosoma cruzi e do Trypanosoma rangeli*

Até o final da década de 1990, o uso da espectrometria de massas em *T. cruzi* estava focada na caracterização das âncoras de GPI ou de subprodutos metabólicos deste parasito (PREVIATO *et al.*, 1995; SERRANO *et al.*, 1995; HAYNES *et al.*, 1996). Apenas em 1999, com Brockman e colaboradores (1999), foram realizados os primeiros estudos que utilizaram a abordagem proteômica para a identificação de proteínas de *T. cruzi* ligantes ao MHC I por LC-MS/MS e com Hunter e colaboradores (2000) caracterizando uma malato desidrogenase do *T. cruzi* utilizando MALDI-TOF.

Em meados da década de 1990, com o aprimoramento das técnicas de sequenciamento de DNA, foram iniciados esforços para realizar o sequenciamento do DNA deste parasito (FERRARI *et al.*, 1997), porém apenas em 2005 foi obtido seu o sequenciamento genômico (EL-SAYED *et al.*, 2005), o que possibilitou o estudo em larga escala da proteômica deste parasito.

Neste período, surgiram os primeiros trabalhos de proteômica do *T. cruzi* em grande escala, tanto utilizando eletroforese 2-D associada a identificação das proteínas por MALDI-TOF (PABA, SANTANA, *et al.*, 2004; PARODI-TALICE *et al.*, 2004) quanto por LC-MS/MS (PABA, RICART, *et al.*, 2004). Entretanto, como até 2004 a sequencia completa do genoma deste parasito ainda não estava disponível, poucas proteínas foram identificadas nestes trabalhos, pois mesmo com avanços nas plataformas de espectrometria de massas, ainda há uma dependência de boas bases de dados de proteínas da espécie cujo perfil proteômico está sendo analisado (PRUESS *et al.*, 2006; MARTENS e APWEILER, 2009; MARTENS, 2011).

Assim, com o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* em 2005, Atwood e colaboradores (2005) identificaram mais de mil proteínas distintas através de uma abordagem sem o uso de gel, incrementando consideravelmente o número de proteínas identificadas para este parasito até então.

A partir de então, a análise proteômica vem sendo empregada na caracterização de proteínas de diversas espécies de tripanosomatídeos (NUGENT *et al.*, 2004; LUU *et al.*, 2006),

na análise da expressão diferencial de proteínas entre estágios de vida de um parasito (NUGENT *et al.*, 2004; CUERVO *et al.*, 2007) ou mesmo como alternativa para diagnóstico (AGRANOFF *et al.*, 2005).

Especificamente em *T. cruzi*, a proteômica vem sendo utilizada para a identificação de proteínas diferencialmente expressas entre cepas (KIKUCHI *et al.*, 2010), formas do parasito (PARODI-TALICE *et al.*, 2007; DE GODOY *et al.*, 2012), identificação de proteínas associadas a resistência a drogas tripanosomicidas, como o benzonidazol (ANDRADE *et al.*, 2008), no entendimento das modificações pós-traducionais das proteínas (DA CUNHA *et al.*, 2006), na identificação de antígenos candidatos a vacinas ou para diagnósticos imunológicos (NAKAYASU *et al.*, 2012) ou em proteínas diferencialmente expressas em determinadas condições às quais os parasitos são submetidos (ZHANG *et al.*, 2011; HALL *et al.*, 2012).

Em contrapartida, o conhecimento acerca do genoma e proteoma do *T. rangeli* sempre esteve restrito a alguns genes e marcadores clássicos visando à diferenciação do *T. cruzi*. Com o intuito de incrementar o conhecimento a respeito do genoma do *T. rangeli*, foi realizada a geração de EST (do inglês, *Expressed sequence Tags*) das formas tripomastigota e epimastigota do *T. rangeli* (SNOEIJER *et al.*, 2004; GRISARD *et al.*, 2010), agregando-se ao estudo do genoma do parasito que está em fase final de anotação (LNCC, 2011). Neste referido estudo, foi estimado que o tamanho médio do genoma do *T. rangeli* é de 124Mb. Com o sequenciamento de 15 milhões de bases da cepa SC58 do *T. rangeli*, foi possível identificar 7.610 ORF, completas ou incompletas, sendo destas 5.049 ORF anotadas como hipotéticas (Dr. Emundo Carlos Grisard, comunicação pessoal).

Apesar destas bases de dados, há pouca informação a respeito do rol das proteínas expressas pelo *T. rangeli*, pois em virtude das regulações pós-transcricionais e pós-traducionais em tripanosomatídeos, pode existir uma disparidade entre a quantidade de transcritos e a quantidade de proteínas (GYGI *et al.*, 1999; HARRISON *et al.*, 2002). Desta forma, a análise proteômica do *T. rangeli* torna-se fundamental para o melhor entendimento das proteínas expressas por este parasito, além de fornecer suporte à montagem e à acurácia do genoma.

3.5 *As proteínas de superfície de tripanosomatídeos*

Embora os métodos e equipamentos de espectrometria de massas tenham avançado na última década (DUNCAN, 2012; THELEN e MIERNYK, 2012), possibilitando a identificação de proteínas pouco expressas ou de difícil solubilização, percebe-se uma tendência na análise de grupos específicos de proteínas ou frações celulares. Em tripanosomatídeos podemos citar a análise de proteínas fosforiladas (fosfoproteômica) (NAKAYASU, GAYNOR, *et al.*, 2009), proteínas ribossômicas (AYUB *et al.*, 2009), proteínas associadas a membrana plasmática ou de superfície (ATWOOD *et al.*, 2006; CORDERO *et al.*, 2009; BROTHERTON *et al.*, 2012) ou secretadas pelas células (secretoma) (SILVERMAN *et al.*, 2008). Estas últimas abordagens têm sido utilizadas para a identificação de alvos vacinais e de marcadores para o diagnóstico específico destes parasitos.

As proteínas associadas a membrana plasmática ou de superfície (SP) estão envolvidas diretamente em eventos biológicos de interação com os hospedeiros, como reconhecimento, adesão e penetração nas células, bem como na regulação do transporte de nutrientes para o interior do parasito, responsáveis pelo mecanismo de sinalização celular (EPTING *et al.*, 2010), além de induzir resposta imune (ALMEIDA e GAZZINELLI, 2001). Sendo assim, estas proteínas de superfície são interessantes alvos para diagnóstico, tratamento de doenças ou fatores de virulência (MUIA *et al.*, 2010). Em tripanosomatídeos são descritas como importantes imunógenos para os hospedeiros mamíferos (BUSCAGLIA *et al.*, 2006), tornando-as importantes alvos para a aplicação em sorodiagnóstico.

Estima-se que as proteínas de superfície constituem cerca de 25% de todas as proteínas celulares (TUSNADY e SIMON, 2001a; b) e estão associadas à membrana por meio de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, por âncoras lipídicas covalentemente ligadas a membrana ou ainda associadas firmemente com as membranas por interações hidrofóbicas de seus domínios trans-membranares (DTM) (TUSNADY e SIMON, 2001b).

Estas proteínas podem ser divididas em dois grandes grupos, sendo: (i) as proteínas associadas a membrana plasmática, tanto proteínas integrais de membrana (transmembranares) ou associadas a uma camada da membrana plasmática e, (ii) as proteínas extracelulares de superfície, que participam da formação do glicocálice, como por exemplo as proteínas ligadas a âncoras de Glicosilfosfatidilinositol (GPI).

As proteínas ancoradas em GPI são as proteínas glicoconjugadas mais abundantes na superfície de *T. brucei* (OVERATH *et al.*, 1994), *T. cruzi* (FRASCH, 2000; NAKAYASU, YASHUNSKY, *et al.*, 2009) e *Leishmania major* (ROJAS *et al.*, 2008). Em *T. brucei*, as glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) (do inglês, *Variant Surface Glycoprotein*) desempenham papel importante no mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro contra este parasito. Em espécies do gênero *Leishmania*, as proteínas GPI estão envolvidas na resistência das formas promastigotas ao sistema complemento, indução da fagocitose pelos macrófagos e sobrevivência das formas amastigotas no interior do fagolisossomo (BRITTINGHAM *et al.*, 1995). Já em *T. cruzi*, existem proteínas distintas ancoradas em GPI envolvidas na adesão, invasão e sobrevivência deste parasito nas células hospedeiras (FERGUSON, 1997).

Estas proteínas estão ancoradas na sua porção C-terminal a uma molécula de fosfatidilinositol (PI) por meio de uma cadeia formada por açúcares ligada a um fosfato associado a um etanoamina, formando um complexo conhecido como *core* (FERGUSON, 1997). A ligação da proteína à âncora acontece no retículo endoplasmático através de um mecanismo de transaminação (MUNIZ e RIEZMAN, 2000).

Devido à abundância destas proteínas na superfície destes parasitos e pela sua importância na biologia da interação parasito-hospedeiro, diversos trabalhos têm demonstrado uma grande variabilidade destas glicoproteínas, destacando os trabalhos que empregam a análise proteômica em grande escala (LEBEAU *et al.*, 2005; NAKAYASU, YASHUNSKY, *et al.*, 2009; LACHAPPELLE *et al.*, 2011).

Em *T. rangeli*, as proteínas de superfície têm sido objeto de estudos, compondo as principais sequências de proteínas depositadas em bancos de dados públicos em função da necessidade de diferenciação com *T. cruzi* ou com a intenção de

melhorar o entendimento biológico deste parasito. Apesar do interesse, estas proteínas foram estudadas de maneira pontual, com pouca ou nenhuma aplicação de métodos proteômicos mais avançados (ANEZ-ROJAS *et al.*, 2006; CUERVO *et al.*, 2006; MILETTI *et al.*, 2006; PAVIA *et al.*, 2007; SUAREZ *et al.*, 2007; DIEZ *et al.*, 2008).

Em *T. cruzi*, as proteínas ancoradas em GPI podem ser classificadas em famílias, sendo as mais importantes, transsialidases (TcTS) como as gp90, gp82 e gp85, mucinas (TcMUC), proteínas associadas a mucinas (MASP, do inglês *mucin-associated proteins*) e as metaloproteases (gp63) (AGUSTI *et al.*, 1997; POLLEVICK *et al.*, 2000; ACOSTA-SERRANO *et al.*, 2001; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009). Estas proteínas desempenham papel fundamental na interação entre o *T. cruzi* e seus hospedeiros, especialmente na manutenção da infecção nos hospedeiros mamíferos. Como na transferência do ácido siálico da superfície das células hospedeiras para as mucinas (TcMUC) presentes na superfície da célula do *T. cruzi*, que é promovido pela TcTS, auxiliando na interação e penetração do parasito na célula hospedeira (FRASCH, 2000), além de proteger as formas tripomastigotas sanguíneas da ação de anticorpos anti-alfa galactosil (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000). Já as proteínas MASP, devido ao grande repertório de proteínas, podem estar envolvidas na interação do *T. cruzi* com específicas células hospedeiras (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009), bem como no favorecimento do escape deste parasito da resposta imune do hospedeiro durante a fase aguda de infecção (DOS SANTOS *et al.*, 2012).

Até o presente momento, poucas proteínas de *T. rangeli* homólogas ortólogas às proteínas de *T. cruzi* foram identificadas (BUSCHIAZZO *et al.*, 1993; PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 1993; BUSCHIAZZO *et al.*, 1997). Contudo, a presença de transcritos e de ORF no genoma do *T. rangeli* similares às proteínas de *T. cruzi*, suportam a existência destas neste parasito (FERREIRA *et al.*, 2010; GRISARD *et al.*, 2010).

As mucinas não foram identificadas em *T. rangeli* em trabalhos anteriores (ABATE *et al.*, 2005), da mesma forma que as MASP. Em contrapartida, as proteínas homólogas às transsialidases de *T. cruzi* já foram reportadas para o *T. rangeli* (TrSial) (SALDANA *et al.*, 1998). Estas TrSial não apresentam a

capacidade de transferir o ácido siálico da superfície das células hospedeiras para a superfície do parasito como em *T. cruzi* (PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 1993), fator fundamental para a adesão e penetração nas células hospedeiras.

Além destas, outra proteína da família das trans-sialidases, a glicoproteína (gp85), foi descrita para o *T. rangeli* e está relacionada com o estabelecimento da infecção deste parasito nos hospedeiros invertebrados (ANEZ-ROJAS *et al.*, 2006; PENA *et al.*, 2009). Também, trabalhos recentes demonstram que este parasito apresenta proteínas ortólogas às metaloproteases (gp63) de *T. cruzi*, porém sem a caracterização ou determinação da sua expressão na superfície do parasito (FERREIRA *et al.*, 2010).

Outros tipos de ancoramento na membrana encontrados em tripanosomatídeos são as âncoras miristoil e palmitoil (MAURER-STROH *et al.*, 2002; PRICE *et al.*, 2005). A proteína flagelar ligante a cálcio (FCaBP, do inglês, *Flagellar calcium-binding protein*) de *T. cruzi* é um exemplo de proteína ancorada à membrana do parasito por meio de uma âncora miristoil. Esta proteína desempenha papel fundamental na estruturação da bolsa flagelar e na localização do flagelo do parasito, especialmente nas formas tripomastigotas sanguíneas (PINTO *et al.*, 2003; WINGARD *et al.*, 2008).

Outras proteínas que requerem uma atenção especial para o entendimento biológico dos organismos, são as proteínas associadas à membrana. Estas executam funções biológicas importantes, tais como transdução de sinal e transporte de íons (SUAREZ *et al.*, 2007), sendo passíveis de modificações pós-traducionais como glicosilações e fosforilações (HA, 2009). Por conta destes aspectos biológicos importantes, a indústria farmacêutica tem considerado promissor o estudo destas proteínas, pois os receptores de membrana, as proteínas de canal ou de transporte podem mediar resistência adquirida a drogas, ou servir como alvo quimioterápico, uma vez que pequenas moléculas podem interagir com os domínios trans-membranares inativando estes transportadores (MOORE *et al.*, 2008).

Entretanto, em virtude da alta hidrofobicidade e da baixa abundância destas em relação às proteínas citosólicas, a análise deste grupo de proteína torna-se mais complexa. Desta forma,

há métodos que visam a obtenção de frações enriquecidas deste grupo de proteínas, como o fracionamento por ultracentrifugação (VOORHEIS *et al.*, 1979; BRASCHI *et al.*, 2006; BRIDGES *et al.*, 2008). Há ainda, metodologias que utilizam ligantes às proteínas de superfície, como biotina (STOLZ, 2003; SIDIBE *et al.*, 2007) ou lectinas ligantes a manose (ATWOOD *et al.*, 2006), entre outros. Utilizando estas abordagens, proteínas exclusivamente de membrana ou superfície foram identificadas em diversas formas de *T. cruzi* (TAMBOURGI *et al.*, 1993; DETKE, 2007), embora ainda possam existir algumas proteínas citosólicas nestes extratos (BRIDGES *et al.*, 2008).

A obtenção de frações enriquecidas de proteínas de superfície utilizando um detergente não iônico, Triton-X114 (1,1,3,3-Tetrametilbutil fenil-polietileno glicol) tem sido empregado como uma destas estratégias, especialmente em virtude da facilidade e eficiência do método (KO e THOMPSON, 1995). Neste processo, este detergente forma micelas à 23°C que possibilitam a solubilização de proteínas hidrofóbicas ou anfífilas nestas condições (BORDIER, 1980). Este método já foi utilizado para o isolamento e identificação de proteínas de superfície de *T. cruzi* (QUINONES *et al.*, 2004; CORDERO *et al.*, 2009), de *Leishmania* spp. (GARG *et al.*, 2005; WALKER *et al.*, 2012) e de *T. rangeli*, porém estes autores não realizaram a identificação destas proteínas (AÑEZ-ROJAS *et al.*, 2006).

Desta forma, a análise proteômica da superfície das formas tripomastigotas de *T. rangeli* possibilitará, além do conhecimento do rol de proteínas expressas, a identificação de proteínas com potencial para utilização em diagnóstico diferencial entre o *T. rangeli* e o *T. cruzi*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo e obtenção dos parasitos

As cepas dos parasitos utilizados neste trabalho são provenientes do criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP / UFSC). As formas epimastigotas das cepas Choachí de *T. rangeli* (KP1+) e Y de *T. cruzi* (TcII) foram cultivadas e mantidas com passagens semanais em meio LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) a 27°C.

Para a obtenção das formas tripomastigotas de *T. rangeli* utilizando um protocolo adaptado de Koerich e colaboradores (2002), conforme descrito por Stoco (2010). Aproximadamente 120×10^6 parasitos (epimastigotas) em fase exponencial de crescimentos em meio LIT foram lavados duas vezes com tampão fosfato-salina (PBS) 1X pH 7,4 e cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio DMEM pH 8,0 (1 g/L de glicose) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) e 6 mM de L-glutamina. O processo foi acompanhando através da quantificação dos parasitos por contagem direta em câmara de Neubauer e a visualização das formas através de microscopia ótica após coloração com Giemsa (Merck, Darmstadt). Após o oitavo dia foram obtidos aproximadamente 1×10^9 parasitos, dos quais aproximadamente 97% eram formas tripomastigotas de *T. rangeli*. Os parasitos foram lavados três vezes em PBS estéril (pH 7,4) por centrifugação a $1.500 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente e os sedimentos de parasitos imediatamente armazenados a -80°C até o uso.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram obtidas a partir da infecção de monocamadas de células Vero em meio DMEM pH 7,5 suplementado com 5% de SBF a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após 72 horas de infecção, diariamente os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a $300 \times g$ durante 30 minutos em temperatura ambiente e mantidos em repouso por uma hora a 37°C. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidas a partir da coleta do sobrenadante desta cultura em repouso obtendo-se aproximadamente 1×10^6 parasitos, dos quais 80-85% eram formas tripomastigotas. Estes parasitos foram lavados três vezes em PBS, conforme descrito

anteriormente, e armazenados a -80°C até o uso (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001).

4.2 Antissoros de animais experimentalmente infectados

Para a obtenção de antissoros, grupos de cinco camundongos Balb-C com seis semanas de vida foram infectados via intraperitoneal com $10^4/10^3$ formas tripomastigotas de *T. rangeli* ou de *T. cruzi*, respectivamente. A parasitemia de cada animal foi acompanhada através de exames semanais e após 30-45 dias os animais foram anestesiados, o sangue obtido através de punção cardíaca e mantido em repouso por uma hora a 4°C . Os antissoros policlonais (anti-*T. rangeli* e anti-*T. cruzi*) foram então obtidos através de centrifugação a $300 \times g$ por 10 minutos em temperatura ambiente, divididos em alíquotas e armazenados a -80°C até o uso.

Da mesma forma, antissoros de quatro animais não infectados e inoculados via intraperitoneal com PBS foram obtidos conforme o acima descrito e utilizados como controles negativos.

Todos os procedimentos envolvendo animais de experimentação foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (Processo CEUA: 23080.025618/2009-81).

4.3 Extração de proteínas solúveis

A obtenção dos extratos proteicos solúveis das formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi* foi realizada a partir de três replicatas biológicas com aproximadamente 1×10^9 parasitos, formadas por agrupamentos de diferentes culturas simultâneas do mesmo parasito/forma. Esta metodologia foi escolhida pois segundo Karp e colaboradores (2011), o agrupamento de várias culturas pode ser utilizada quando não é possível realizar várias replicatas técnicas a partir de uma mesma replicata biológica, mantendo o poder de detecção de variações biológicas.

A estes sedimentos celulares/parasitos foi adicionada uma solução de 40 mM Tris-HCl pH 7,4 suplementada com 1 mM de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St.

Louis) na razão de três vezes o seu volume. Em seguida o homogeneizado foi submetido à lise celular por sonicação em banho de gelo, com quatro pulsos de 20 segundos, em intervalos de um minuto entre cada pulso, na potência 10 (60 Sonic Dismembrator®, Thermo Fischer Scientific, Rockford). Em seguida foi adicionado 1% de Triton X-110 e homogeneizado intensamente duas vezes durante 30 segundos. As amostras foram então centrifugadas a $14.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C obtendo assim um extrato de proteínas solúveis no sobrenadante, sendo armazenadas a -80°C até o momento do uso.

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Biorad, Hercules) utilizando gradiente de concentração de albumina (BSA) como proteína padrão.

4.4 *Obtenção de fração enriquecida de proteínas de superfície (SEP)*

Para a obtenção de proteínas da superfície (SP) das formas epimastigota e tripomastigota dos respectivos parasitos foi seguido o protocolo descrito por Ko e Thompson (1995) (Figura 4), utilizando três replicatas biológicas obtidas conforme descrito no item 4.3. Em virtude da obtenção das formas de *T. cruzi* a partir de células Vero infectadas, foi realizado o mesmo procedimento com estas células como controle.

Aos sedimentos de parasitos foi adicionado 1 mL de tampão de lise (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 2% Triton X-114) suplementado com 1mM de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich), permanecendo por uma hora em gelo, com agitações de 30 segundos a cada 10 minutos.

Em seguida o homogeneizado foi centrifugado por $8.800 \times g$ durante 10 minutos a 0°C e o sobrenadante resultante (fração S1) transferido para um novo tubo e acondicionado a -20°C durante 24 horas. Já ao precipitado, foi adicionado de 1 mL do tampão A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,06% Triton X-114, suplementado com 1 mM de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich)), incubado em gelo por 10 minutos e centrifugado por $8.800 \times g$ durante 10 minutos a 0°C , obtendo assim uma fração sobrenadante (SBA) e uma fração do precipitado (P1), ambas armazenadas em -80°C .

Após 24 horas a fração S1 foi descongelada em temperatura ambiente (TA) durante cinco minutos e então incubada em banho a 37°C durante 12 minutos, seguindo uma centrifugação a 3.000 x *g* por três minutos a TA, gerando uma mistura com duas fases, uma superior (fração S2) e outra inferior rica em detergente. Após a transferência da fase superior para um novo tubo, foi adicionado três vezes o volume a fase inferior de tampão A, homogeneizado e incubado em gelo por 10 minutos. Em seguida o homogeneizado foi incubado em banho a 37°C durante 10 minutos e centrifugada a 3.000 x *g* por três minutos a TA, formando novamente uma mistura com duas fases: uma inferior rica em detergente e uma superior (fração S3) que foi transferida para um novo tubo.

À esta fase inferior foi adicionado três vezes o volume de tampão A, homogeneizada, incubada por 10 minutos em gelo e, após centrifugação a 18.000 x *g* por 10 minutos a 0°C, foi gerada uma fração sobrenadante (S4) e um precipitado (P2). A fração S4 foi transferida para um novo tubo e a esta foi adicionado três vezes o volume do tampão A, sendo novamente homogeneizada, incubada em gelo por 10 minutos e a 37°C por outros 10 minutos. Após centrifugação a 3.000 x *g* por três minutos em TA, foi gerada uma mistura com uma fase superior (fração S5) e uma fase inferior rica em detergente, denominada neste trabalho de fração enriquecida com proteínas de superfície (SEP).

Esta fração SEP foi precipitada com três volumes de acetona gelada 100% e incubada à -80°C por 30 minutos. Em seguida as proteínas foram recuperadas por centrifugação à 18.000 x *g* em 0°C por 15 minutos e após a remoção do sobrenadante o precipitado foi mantido em repouso a TA por 10 minutos e congelados à -80°C até o momento do uso.

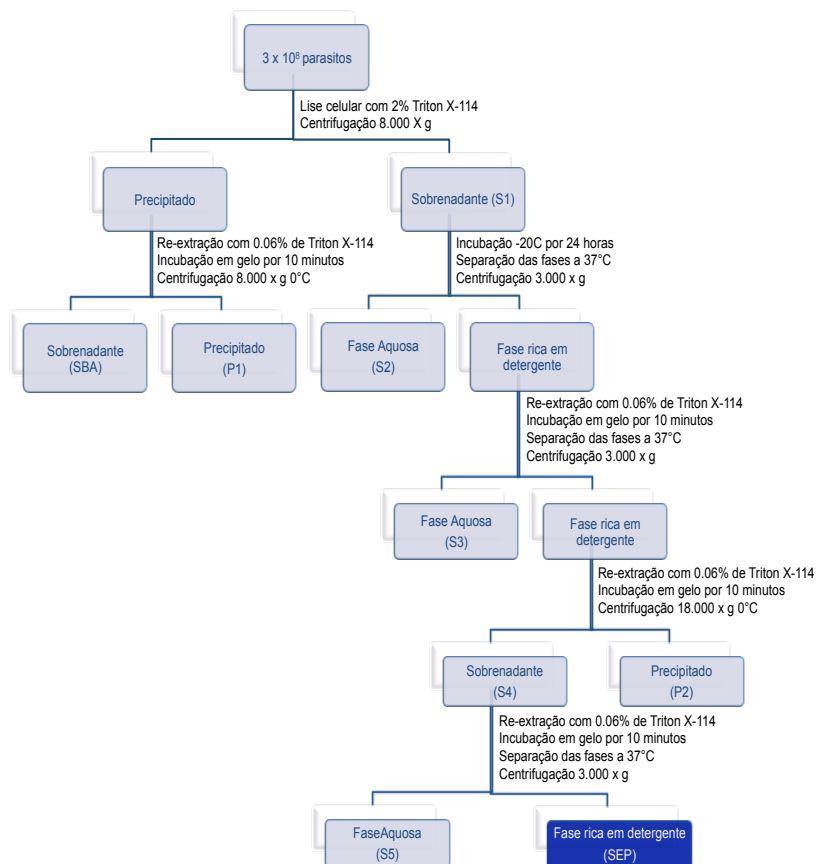


Figura 4: Esquema da metodologia para obtenção da fração enriquecida com proteínas de superfície (SEP) utilizando o Triton X-114. Fonte: Adaptado de Ko e Thompson (1995)

4.5 Eletroforese unidimensional (1-D) de proteínas em condições denaturantes (SDS-PAGE)

Os extratos de proteínas solúveis (25 µg) e as frações celulares obtidas durante a extração com o detergente Triton X-114 (30 µg), foram submetidas a eletroforese de gradiente NuPage® Novex® Bis-Tris mini gel 4-12% (Invitrogen, Carlsbad). Estas frações foram solubilizadas com 10-20 µL de tampão SDS (2 mM SDS, 22 % Glicerol, 100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 mM de

um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). Após a quantificação das proteínas por Bradford (Biorad), em torno de 25-30 µg de cada fração foram solubilizadas com 2,5 µL de tampão de corrida NuPage® LDS e 1 µL de agente redutor (DTT), aquecidas durante 10 minutos a 70°C e resolvidas por uma hora a 40mA. Estes géis foram corados com Azul de Coomassie G-250 ou nitrato de prata (Pierce® Silver Stain kit for Mass Spectrometry, Thermo Fischer Scientific, Rockford).

4.6 *Perfil eletroforético bidimensional (2-D) das proteínas solúveis das formas tripomastigotas de Trypanosoma rangeli e de Trypanosoma cruzi*

Os perfis 2-D das proteínas solúveis das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* utilizaram triplicatas biológicas compostas de 2,0 mg de proteínas para o mapa referência e 500µg para as análises de *immunoblotting* 2-D.

Para tal, as proteínas solúveis de ambos os parasitos foram precipitadas com 1 mL de acetona contendo 20% de ácido tricloroacético (TCA) durante 16 horas a -20°C. Em seguida foram submetidas a centrifugação por 12.000 x *g* durante 12 minutos a 4°C, onde foi obtido um precipitado contendo as proteínas de interesse. Este precipitado foi então lavado cinco vezes com 1mL de acetona gelada e centrifugado novamente 12 minutos a 4°C por 13.000 x *g*.

A este precipitado foi adicionado 250 µL tampão de solubilização (7 M Ureia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS, 40 mM ditiotretitol (DTT) e 1% de anfólitos (3-10)[®] (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala) e mantido em repouso a TA durante uma hora. Após este período, o sobrenadante, contendo as proteínas solubilizadas, foi incubado por 16 horas a TA com as tiras de gel IPG Strips pH 3-10[®] (GE Healthcare Bio-Sciences AB) de 13 cm X 3 mm (perfil 2-D) ou 7 cm x 3 mm (ensaios de *immunoblotting*), em aparato específico coberto com óleo mineral para prevenir a oxidação das proteínas e ressecamento do gel durante o período de hidratação.

As tiras foram então submetidas a eletrofocalização em equipamento IPGPhor3[®] (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Tiras de 13 cm foram submetidas a eletrofocalização por aproximadamente 12 horas sob as seguintes condições: 500V

constante por 4:30 horas, um gradiente de 8.000V até atingir 8.200Vhr, 8.000V constante até acumular 40.000 Vhr, outro gradiente de 200 V por 20 minutos a 20°C (VAN DEURSEN *et al.*, 2003). Já as tiras de 7 cm foram focalizadas durante aproximadamente quatro horas sob as seguintes condições: 300V constante por 2:30 horas, gradiente de 1.000V até atingir 300Vhr, seguido de 5.000V constante até acumular 4.000Vhr e gradiente de 200V por 20 minutos a 20°C.

Em seguida, as proteínas foram submetidas a separação por eletroforese SDS-PAGE. Para tal, as tiras oriundas da eletrofocalização foram incubadas por 20 minutos em 10mL de tampão de equilíbrio SDS I (75mM Tris-HCl, pH 8.8, 6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 10 mg/mL DTT e 1% azul de bromofenol a 0,002%) e, em seguida, com 10mL de tampão de equilíbrio SDS II (75mM Tris-HCl pH 8.8, 6M ureia, 30% glicerol, 2% SDS, 45mg/ml iodoacetamina e 1% azul de bromofenol a 0,002%) durante 20 minutos. As tiras foram, então, alocadas sob a superfície do gel e recobertas com solução selante de agarose contendo tampão de corrida (10% SDS, 10mM de β -mercaptoetanol, 20% de Glicerol, 200mM de Tris-HCl pH 6,8 e 0,05% de azul de bromofenol). As amostras foram resolvidas a 30mA por 16-20 horas (tiras 13 de cm) ou durante duas horas à 10mA (tiras de 7 cm) por aproximadamente 19°C.

Para a visualização das proteínas, os géis 2-D foram corados com Azul de Coomassie R-250. Para tal, os géis foram submersos em cinco volumes de solução corante (0,25% de Azul de Coomassie R-250, 10% de ácido acético e 45% de metanol) durante aproximadamente quatro horas em temperatura ambiente sob agitação constante, sendo na sequência descorados em solução de 30% de metanol e 10% de ácido acético.

4.7 Ensaios de immunoblotting com géis unidimensionais (1-D)

Os ensaios de *immunoblotting* com géis 1-D foram realizados tanto com as proteínas solúveis quanto com as frações SEP. Para tal, foram realizadas em triplicadas utilizando cerca de 20 μ g e 30 μ g das proteínas solúveis e da fração SEP, respectivamente, das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Após a resolução das proteínas em gel NuPage (4-12%),

as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (*iBlot Gel Transfer Stacks*) através de sistema *iBlot Gel Transfer Device* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e reveladas utilizando kit comercial *Western Breeze Chromogenic Immunodetection Kit* (Invitrogen). Para isto, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio por 30 minutos, lavadas cinco vezes por cinco minutos com água ultrapura sob agitação, e incubadas durante 60 minutos a TA com antissoros anti-*T. cruzi* e *T. rangeli* (1:1.000) e negativo (1:40), diluídos em solução de diluição. Após esta incubação as membranas foram lavadas com solução de limpeza e incubadas por 30 minutos a TA com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. Por fim, as membranas foram novamente lavadas com água ultrapura por dois minutos e incubadas por 10 minutos com solução cromogênica.

4.8 *Ensaio de immunoblotting com géis bidimensionais (2-D)*

Após a resolução em eletroforese 2-D, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare Bio-Sciences AB) em tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20% Metanol) durante duas horas a 25 V (TOWBIN *et al.*, 1979). Em seguida, as membranas foram incubadas coradas com Ponceau (Ponceau-S 0,1% em ácido acético 10%) e os padrões de massas moleculares identificados e assinalados.

As membranas foram bloqueadas em solução PBS-Tween 20 (0,1%) contendo 5% de leite em pó desnatado a 4°C por 12 horas. Após cinco ciclos de lavagem em solução de limpeza (PBS-Tween 20 0,1%) as membranas foram incubadas durante 90 minutos à 37°C com os antissoros (anti-*T. cruzi* e anti-*T. rangeli*) de camundongos nas diluições de 1:400 e 1:40 para soros de camundongos não infectados em solução de diluição (PBS-Tween 20 0,1%) com 2% de leite em pó. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente e incubadas durante 60 minutos sob agitação com o conjugado anti-Ig de camundongo (Promega, Madison) com peroxidase diluído 1:10.000 em solução de diluição. As membranas foram então lavadas cinco vezes por cinco minutos com solução de limpeza. A revelação das proteínas marcadas pelos antissoros foi

realizada por quimiluminescência utilizando kit ECL Pierce® (Thermo Fischer Scientific) e expostas a filmes radiográficos e, após o período de exposição, reveladas imediatamente em equipamento SRX-101A® (Konica Minolta Medical Imaging U.S.A Inc., Wayne).

4.9 *Obtenção e processamento das imagens*

Os géis e membranas foram digitalizados em equipamento *ImageScanner™II* (GE Healthcare Bio-Sciences AB) e o programa *LAB-SCAN®* (GE Healthcare Bio-Sciences AB) de acordo com as especificações do fabricante. As análises dos perfis e das membranas 2-D foram realizadas através do programa *ImageMaster™ 2D Platinum* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SE). Já as imagens dos géis 1-D foram analisadas em programa *ImageQuant™TL* (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

4.10 *Digestão proteolítica das proteínas nos géis coletados (in-gel)*

As proteínas reveladas nos ensaios 2-D e 1-D corados com Azul de Coomassie, denominados neste trabalho de *spots* proteicos ou bandas de proteínas, respectivamente, foram coletados e acondicionados em microtubos estéreis a -20°C até o processamento para a análise por espectrometria de massas (MS).

Cada *spot* ou banda foi previamente tratado com 500 µL de solução descorante I (50% metanol/5% ácido acético) durante duas horas sob agitação a TA. Em seguida, incubados com 200 µL de solução descorante II (50% acetonitrila (ACN) em 5 mM de carbonato de amônia (NH₄HCO₃) durante uma hora em agitação a 37°C e desidratados com 200 µL de acetonitrila (ACN) durante cinco minutos. O excesso de ACN foi removido em centrifugação sob vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) durante 30 minutos a TA.

Após esta etapa de descoloração e desidratação, os *spots*/bandas foram tratados com 10mM de DTT para a redução dos grupamentos tiol das cisteínas durante 30 minutos a 60°C, seguido da alquilação destes grupos tiol com 50mM de

iodoacetamida (IAA) durante 30 minutos a TA ao abrigo de luz. Posteriormente os géis foram novamente incubados com solução descorante II e desidratados com ACN conforme descrito anteriormente.

Na sequência, as proteínas foram submetidas a digestão proteolítica *in-gel* com tripsina (Promega). Para tal, foi utilizado 1 µg de tripsina em 5 mM NH_4HCO_3 com 1 mM CaCl_2 pH 8,0 durante 16 horas a 37°C e após este período a digestão foi interrompida com 175 mM HCl (pH 7,5).

Os peptídeos foram extraídos do gel com 100 µL de solução descorante II durante duas horas a 37°C, sendo o sobrenadante contendo os peptídeos transferido para um novo tubo e os géis submetidos a novo tratamento com 50µL de uma solução descorante I durante uma hora a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi transferido para o tubo contendo o sobrenadante obtido na primeira etapa de extração. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi desidratada por centrifugação a vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) e os peptídeos reconstituídos com 10 µL de 0,1% ácido fórmico (AF).

4.11 *Digestão proteolítica das frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP) em solução (in-solution)*

As digestões em solução das frações SEP foram realizadas seguindo os mesmos protocolos descritos acima, excetuando a etapas de descoramento do géis e recuperação dos peptídeos. Resumidamente, as frações SEP foram reconstituídas com 20 µL de solução de uréia 8 M em NH_4HCO_3 e 30 µg de cada fração foi submetida a redução (DTT), alquilação (IAA), digestão proteolítica utilizando 2 µg de tripsina (Promega) e a digestão foi interrompida com 175 mM HCl (pH 7.5). A solução foi então desidratada em centrífuga a vácuo (*SpeedVac*, Eppendorf) e os peptídeos foram recuperados com 25µL de 0,1% de AF.

Para as análises subsequentes por LC-ESI-MS/MS houve a necessidade de remover os traços de detergente (Triton X-114) nas amostras, para evitar a interferência deste na cromatografia líquida. Para isto, utilizamos colunas comerciais para remoção de detergente seguindo as instruções do

fabricante (*Detergent Removal Spin Columns* Pierce[®], Thermo Fischer Scientific).

4.12 *Análise por espectrometria de massa in tandem (LC-ESI-MS/MS) das proteínas solúveis obtidas a partir da eletroforese 2-D*

A identificação dos peptídeos resultantes da digestão em gel das proteínas presentes nos *spots* selecionados nos perfis 2-D das formas tripomastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi* foi realizada em plataforma LC-ESI-MS/MS, composta por sistema de cromatografia líquida *NanoAcquity* (Waters, Milfor) acoplada em linha com espectrômetro de massas *QTof Premier* (Waters) no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/USA) ou em plataforma composta pelo mesmo sistema de cromatografia líquida acoplada em linha com espectrômetro de massas *QTof Micromass* (Waters) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para tal, 4 μ L de cada digestão foram injetados em uma coluna de fase reversa com tamanho de 300 μ m x 5 mm *PepMap C18TM Trap* (Waters) em um fluxo de 20.000 μ l/minuto durante 1 minuto, objetivando a remoção do excesso de contaminantes e para promover a concentração dos peptídeos. Após 10 minutos, os peptídeos foram eluídos diretamente para uma coluna analítica (75 μ m x 15 cm) de fase reversa *C18 PepMap C18TM* (Waters) com fluxo de 300 η L/minuto e gradiente formado pelo solvente A (0,1% de FA em água com pureza para HPLC) e solvente B (0,1% de FA em ACN) nas seguintes condições: aumento da concentração do solvente B de 5 a 35% em nove minutos e até 85% em um minuto, em seguida diminuição até 1% do solvente B em um minuto. Entre cada análise houve a regeneração da coluna durante 10 minutos com 1% do solvente B.

O espectrômetro de massas modelo *Qtof Premier* foi configurado para realizar aquisições do tipo DDA (do inglês, *Data-Dependent Analysis*), operado em modo positivo (ES+) com voltagem na fonte de 5V. Apenas íons carregados 2+, 3+ e 4+ foram analisados dentro da janela de aquisição para os íons MS de 400-1.500 m/z durante um segundo, com intervalos de aquisição de 0,1 segundo. Os três íons mais abundantes na

primeira análise de massas (MS) foram submetidos a fragmentação (CID) por três segundos com janela aquisição entre 100 – 1.500 m/z, gerando assim o espectro MS/MS de íons 2+, 3+ e 4+ resultantes do íon (peptídeo) fragmentado.

Já o espectrômetro de massas modelo Q-ToF *Micromass* foi também configurado para realizar aquisições do tipo DDA, operado em modo ES+. Porém a janela de aquisição dos íons MS foi configurada entre 300-2000 m/z. Os dois peptídeos mais abundantes foram submetidos a fragmentação CID (35eV) por 3 segundos com intervalo de aquisição entre 50 – 3000m/z.

4.13 *Análise por espectrometria de massas in tandem (LC-ESI-MS/MS) das proteínas presentes nas frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP)*

Os peptídeos oriundos da digestão das proteínas da fração enriquecidas com proteínas de superfície (SEP) obtidos tanto por meio da digestão em gel quanto por meio de solução também foram analisados em plataforma LC-ESI-MS/MS, porém esta era composta por sistema de cromatografia líquida *NanoAcquity* (Waters) acoplado em linha com espectrômetro de massas *Nanospray LTQ Orbitrap Velos* (Thermo Fischer Scientific) no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/USA).

Brevemente, 3 µL de cada digestão foram injetados em uma coluna de fase reversa com tamanho de 300 µm x 5 mm *PepMap C18TM Trap* (Waters) durante um minuto a um fluxo de 5.000 µl/minuto. Após 10 minutos os peptídeos foram eluídos diretamente para a coluna (75 µm x 15 cm) de fase reversa analítica *C18 PepMap C18TM* (Waters) utilizando gradiente com os mesmos solventes A e B descritos no item anterior. No caso das digestões em gel, o gradiente utilizado foi: aumento da concentração do solvente B de 5 a 40% em 16 minutos, depois até 95% em um minuto e permanecendo durante três minutos, após, a concentração do solvente B foi reduzida para 5% em um minuto e a coluna regenerada com 5% do solvente B por 10 minutos, totalizando 30 minutos de gradiente. Já no caso das digestões em solução o gradiente aplicado foi: de 5 a 40% de solvente B em 100 minutos, 40 a 95% em dois minutos e

permanecendo durante 15 minutos, então após a diminuição da concentração para 5% de solvente B em dois minutos a coluna foi regenerada durante 15 minutos com 5% de solvente B, totalizando 130 minutos de gradiente.

O espectrômetro de massas *LTQ Orbitrap Velos* (Thermo Fischer Scientific) foi operado em modo positivo (ES+), com voltagem da fonte em 35kV e com tipo de aquisição de dados DDA, com janela de 400 até 1.400 *m/z* e resolução de massa nominal de 60.000, realizando 16 eventos de busca. Os íons mais intensos foram submetidos a fragmentação de baixa energia (CID), gerando assim espectros MS/MS para cada íon (peptídeo) selecionado. O tempo de aquisição foi de 30 minutos para as análises das peptídeos obtidos a partir das digestões em gel e de 130 minutos em solução.

4.14 *Processamento e análise dos espectros de massas*

Os dados brutos (*raw*) de MS/MS oriundos dos espectrômetros de massas *qTOF* e *LTQ Orbitrap Velos* foram processados utilizando o programa *MASCOT Distiller*® (Matrix Science, Boston) e a busca na base de dados foi realizada utilizando o programa *MASCOT* (Matrix Science). Para tal, foram elaboradas três bases de dados, sendo: i) 4.208 sequências do transcriptoma do *T. rangeli* (iniciais “TREG”) (GRISARD *et al.*, 2010); ii) genes preditos a partir da primeira montagem do genoma deste parasito (iniciais “contig”); iii) contendo apenas as ORF, completas ou parciais, obtidas a partir da segunda montagem do genoma (iniciais “TR”). Estas últimas são oriundas de dados do genoma do *T. rangeli* (TrangeliDB) (LNCC, 2011). Uma outra base de dados contendo 23.216 proteínas de *T. cruzi* obtidas a partir da base de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>, acessado em 10 de junho de 2011) foi elaborada para a identificação das proteínas de *T. cruzi*.

A estas bases de dados foram concatenadas sequências de potenciais contaminantes de tripsina de *Sus scrofa* (P00761), álcool desidrogenase (ADH) de *Saccharomyces* sp. (P00330), bem como sequência de queratina humana (Q14533). As bases de dados resultantes foram automaticamente utilizadas pelo *MASCOT* para a geração de uma base de dados reversa (*Decoy*).

Com isto, a busca das proteínas nas bases de dados utilizando o programa *MASCOT* foi realizada com os seguintes parâmetros: i) peptídeo com no máximo uma ausência de uma clivagem da tripsina; ii) carbamidometilação dos resíduos de cisteína e oxidação das metioninas como modificações variáveis; iii) 0,5 Da de tolerância da massa para peptídeos e para os fragmentos destes peptídeos. Em seguida, os resultados do *MASCOT (dat)* foram submetidos ao programa *Scaffold* (Proteome Software, Portland). Este programa realizou automaticamente a busca nas mesmas bases de dados e parâmetros utilizados no *MASCOT* através do pacote *X!Tandem*.

Após estas etapas, o programa *Scaffold* foi utilizado para compilar e validar as proteínas identificadas pelos programas de busca. Foram consideradas proteínas válidas aquelas que apresentaram pelo menos dois peptídeos, com FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) menor que 1% e com probabilidade de acerto dos peptídeos superior a 95% e 99% para a proteína (de acordo com o algoritmo *Protein Prophet*).

4.15 *Análise in silico das proteínas identificadas por MS/MS*

Após a identificação das sequências por MS/MS, foram realizadas diversas análises de bioinformática (Tabela 1) com as proteínas válidas. Para tal, utilizamos as sequências preditas das proteínas disponíveis nas base de dados mencionadas no item 4.14, objetivando identificar domínios trans-membranares (TUSNADY e SIMON, 2001a; WISTRAND e SONNHAMMER, 2005), peptídeos de localização celular ou sítios de clivagem (EMANUELSSON *et al.*, 2007; HORTON *et al.*, 2007), modificações pós-traducionais (HANSEN *et al.*, 1998; BOLOGNA *et al.*, 2004; POISSON *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2008), anotações funcionais (BARRELL *et al.*, 2009) e bioquímicas (MORIYA *et al.*, 2007).

Para melhor apresentação e visualização dos resultados, os mesmos foram compilados e apresentados na forma de figuras, gráficos e tabelas resumidas, contendo os dados mais relevantes do trabalho. Porém os dados brutos foram apresentados em tabelas suplementares e poderão ser requeridas ao autor (glauberwagner@gmail.com).

Tabela 1: Tabela contendo os programas utilizados nas análises *in silico* com a descrição da suas finalidades.

Programa	Função	HTTP	Referência
BLAST	Análise de similaridade dos epítomos com base de dados pré-formatadas de <i>T. cruzi</i>	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	(ALTSCHUL <i>et al.</i> , 1997)
WolfPsort	Predição da localização celular	http://wolfsort.org	(HORTON <i>et al.</i> , 2007)
HMMTOP	Predição de domínios trans-membranares	http://www.enzim.hu/hmmtop/	(TUSNADY e SIMON, 2001a)
TMHMM	Predição de domínios trans-membranares	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	(KROGH <i>et al.</i> , 2001)
TargetP	Predição da rota intracelular das proteínas	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	(EMANUELSSON <i>et al.</i> , 2007)
SignalP	Predição de peptídeo sinal e sito de clivagem	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	(EMANUELSSON <i>et al.</i> , 2007)
BepiPred	Predição de epítomos lineares de linfócitos B	http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/	(LARSEN <i>et al.</i> , 2006)
FragAnchor	Predição de sítios de ancoramento a GPI	http://navet.ics.hawaii.edu/~fraganchor/NNHMM/NNHMM.html	(POISSON <i>et al.</i> , 2007)
NetOGlyc	Predição de sítios de O-glicosilação	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	(HANSEN <i>et al.</i> , 1998)
NMT	Predição de sítios de miristoilação	http://mendel.imp.ac.at/myristate/SUPLpredictor.htm	(MAURER-STROH <i>et al.</i> , 2002)
PrePS	Predição de sítios de prenilação	http://mendel.imp.ac.at/PrePS/index.html	(MAURER-STROH e EISENHABER, 2005)
GOanna	Anotação funcional pela <i>Gene Ontology</i> (GO)	http://www.geneontology.org	(MCCARTHY <i>et al.</i> , 2006)
KAAS	Anotação funcional e metabolismo (KEGG).	http://www.genome.jp/tools/kaas/	(MORIYA <i>et al.</i> , 2007)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho apresentamos a primeira análise proteômica das proteínas solúveis da forma tripomastigota diferenciada *in vitro* de *T. rangeli*, bem como a primeira análise proteômica comparativa das proteínas de superfície das formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Também a identificação de marcadores de superfície diferenciais destes parasitos com potencial aplicação no diagnóstico sorológico, através de ensaios de *immunoblotting* com proteínas acima mencionadas identificadas e antissoros de animais infectados com as formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*.

Para o melhor entendimento, separamos este trabalho em quatro seções onde na primeira seção será apresentado o perfil proteômico 2-D das proteínas solúveis da forma tripomastigota diferenciada *in vitro* da cepa Choachí de *T. rangeli* e da forma tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi* obtida a partir de infecção de monocamadas de células Vero. Na segunda parte, apresentaremos os resultados obtidos através da análise por *immunoblotting* 1-D e 2-D utilizando proteínas solúveis destes parasitos. A terceira parte contempla os resultados referente a análise proteômica comparativa das proteínas de superfície das formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi*. Finalmente, na quarta seção, iremos apresentar antígenos de superfície da forma tripomastigota de *T. rangeli* com potencial de aplicação no diagnóstico diferencial entre estes parasitos.

5.1 *Análise das proteínas solúveis da forma tripomastigota de Trypanosoma rangeli diferenciada in vitro*

5.1.1 Perfil bidimensional (2-D) de referência da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli*

Para a obtenção do mapa de referência 2-D da forma tripomastigota do *T. rangeli*, foram utilizadas proteínas solúveis de três replicatas biológicas da forma tripomastigota diferenciada *in vitro* contendo aproximadamente 97-98% tripomastigota.

Na figura 5 estão apresentados três perfis 2-D representativos da forma tripomastigota de *T. rangeli* obtidos a partir das replicatas biológicas distintas. Estes perfis foram obtidos com aproximadamente 2,0 mg de proteínas solúveis resolvidas em tiras de 13 cm com faixa de pI 3-10 e massa molecular relativa (M_r) entre 20 – 250kDa.

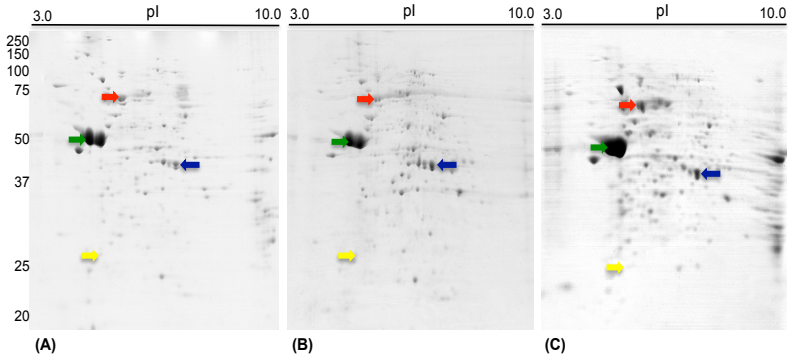


Figura 5: Perfis 2-D representativos da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* oriundos de três diferentes replicatas biológicas. Os spots destacados em diferentes cores representam spots com pI e MW similares e com a mesma proteína identificada por espectrometria de massas, demonstrando a reprodutibilidade dos perfis obtidos no Laboratório de Protozoologia. Setas: vermelhas (HSP70), verdes (beta tubulina), azuis (tirosina aminotransferase) e amarelas (proteína 14-3-3). Foram focalizadas 2,0 mg de proteína nos géis A e B, e 2,5mg no gel C e a segunda dimensão foi realizada em SDS-Page 10% e corados com Azul de Coomassie R-250.

Mesmo considerando as variações intrínsecas descritas para a técnica de eletroforese 2-D, observa-se uma grande reprodutibilidade destes perfis. Mais de 90% dos spots apresentaram correspondência de pI e M_r através da análise pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum* (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Além disto, foram identificadas as mesmas proteínas nos spots destacados pelas setas de mesma cor, com pI e M_r esperados para as respectivas proteínas. As setas vermelhas indicam spots correspondentes da proteína HSP 70 (TR07016), as setas verdes a proteína beta tubulina (TR05117), as setas azuis escuras a proteína tirosina aminotransferase (TR02148) e as amarelas indicam spots contendo a proteína 14-3-3 (TR00226).

Nas três replicatas biológicas, a maioria das proteínas detectadas estão entre a faixa de pI 4-8 e com massa molecular entre 25 – 120kDa, com poucos *spots* detectados abaixo deste valor (15, 19, 20, 21, 22 e 23kDa). Entretanto, nota-se que este perfil é distinto do perfil observado por Parodi-Talice e colaboradores (2007) para a forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*, o que pode ser esperado em se tratando de espécies distintas, ainda que filogeneticamente próximas.

Foram detectados 217 *spots* na replicata biológica A (Figura 6), 167 na B e 281 na replicata C (Tabela 2). Apesar da pequena variação na quantidade de *spots* detectados nos perfis 2-D das diferentes replicatas biológicas, foram identificadas as mesmas proteínas em *spots* com Mr e pI similares em ambos os perfis 2-D (Figuras 5 e 6), demonstrando boa reprodutibilidade dos perfis 2-D obtidos nos parâmetros e condições utilizadas.

Pode-se observar baixa resolução na separação das proteínas acima do pH 8, similar ao observado por outros autores utilizando tanto formas epimastigota quanto tripomastigotas de *T. cruzi* (PABA, SANTANA, *et al.*, 2004; PARODI-TALICE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008; KIKUCHI *et al.*, 2010). Verifica-se o mesmo para *T. brucei*, tendo sido observado uma melhor resolução das proteínas quando utilizado a faixa de pH 4-7 (VAN DEURSEN *et al.*, 2003). Entretanto, ao utilizar faixas de pH mais alcalinos (pH 8-12) Magalhães e colaboradores (2008) observaram melhor resolução das proteínas de *T. cruzi* nesta faixa, visto que há uma quantidade significativa de *spots* com baixa resolução próximo ao pH 10.

Tabela 2: Tabela-resumo da quantidade *spots* analisados nas diferentes amostras biológicas da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*

Parasito	RB ^a	Número de <i>spots</i>			Proteínas
		Detectados	Submetidos à MS	Positivos ^e	
<i>T. rangeli</i>	A ^b	217	216	155	137
	B ^b	167	31	30	25
	C ^c	281	143	88	66
<i>T. cruzi</i>	A ^b	376	291	216	143

^a RB: Replicata biológica;

^b Análises de MS realizadas no CDC/USA utilizando *qTOF Premier*;

^c Análises de MS realizadas no CBiot/UFRGS utilizando *qTOF*.

^e Com pelo menos uma proteína identificada

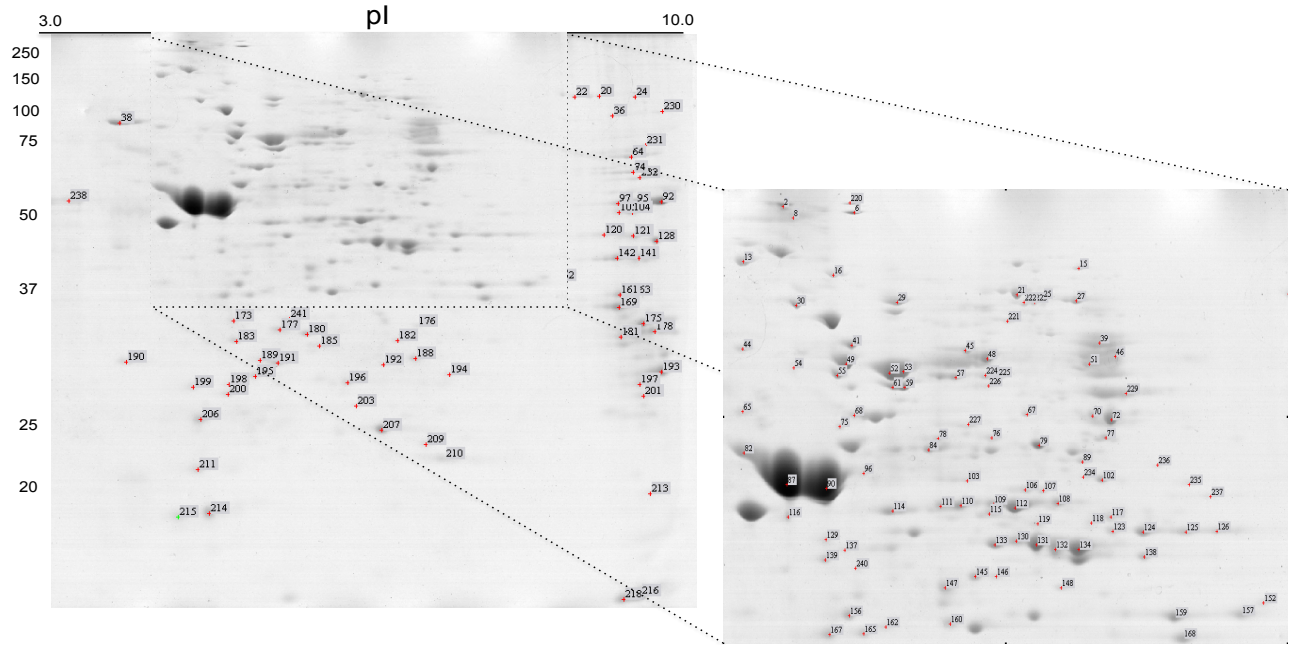


Figura 6: Perfil 2-D das proteínas solúveis (2,0 mg) da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* (cepa Choachí) diferenciada *in vitro*. Para a primeira dimensão foram utilizadas com tiras de 13cm com pI 3-10 e para segunda dimensão gel SDS-PAGE 10% corado com Azul de Coomassie R-250. Os códigos de identificação dos spots correspondem aos Id no Apêndice A.

Devido à necessidade de um perfil proteômico do *T. cruzi* para as análises comparativas de *immunoblotting*, também realizamos a análise do perfil proteômico da forma tripomastigota de *T. cruzi* obtida a partir da infecção de células Vero (Figura 7), utilizando as mesmas condições para a geração e análise do perfil 2-D de *T. rangeli*. Apesar do perfil da forma tripomastigota da cepa Y do *T. cruzi* obtido no presente trabalho ser distinto do perfil observado por Parodi-Talice e colaboradores (2007), esta variação pode ser explicada em virtude das diferentes cepas e origens das formas tripomastigotas utilizadas. Os referidos autores utilizaram formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Dm28c de *T. cruzi* obtidas em meio de cultura TAU3AAG.

Todos os *spots* selecionados foram submetidos a digestão proteolítica no gel e os peptídeos resultantes foram identificados através de espectrometria de massas *in tandem* (LC-ESI-MS/MS). Desta forma, foram identificados 1.053 e 1.140 peptídeos das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, respectivamente (Tabelas Suplementares 1 e 2).

Foram analisados 216 *spots* da replicata biológica A de *T. rangeli*. Destes, 155 (72%, n=216) apresentaram peptídeos correspondentes a proteínas presentes em uma das bases de dados utilizadas. Da replicata B foram analisados apenas 31 *spots*, selecionados de acordo com a localização e intensidade, para confirmar a reprodutibilidade dos perfis obtidos. A replicata C foi a primeira amostra analisada no presente estudo, tendo sido utilizado uma plataforma LC-ESI-MS/MS distinta (*NanoAcquity* (Waters) acoplada em linha com espectrômetro de massas *Qtof Micromass q-Tof* (Waters) e em outro laboratório daqueles citados nos materiais e métodos, além de uma base de dados ainda não curada e condições de separação dos peptídeos distintas. Desta forma, estes fatores podem ter influenciado na baixa quantidade de proteínas identificadas, 66 em 143 *spots* analisados nesta replicata C (Tabela 2).

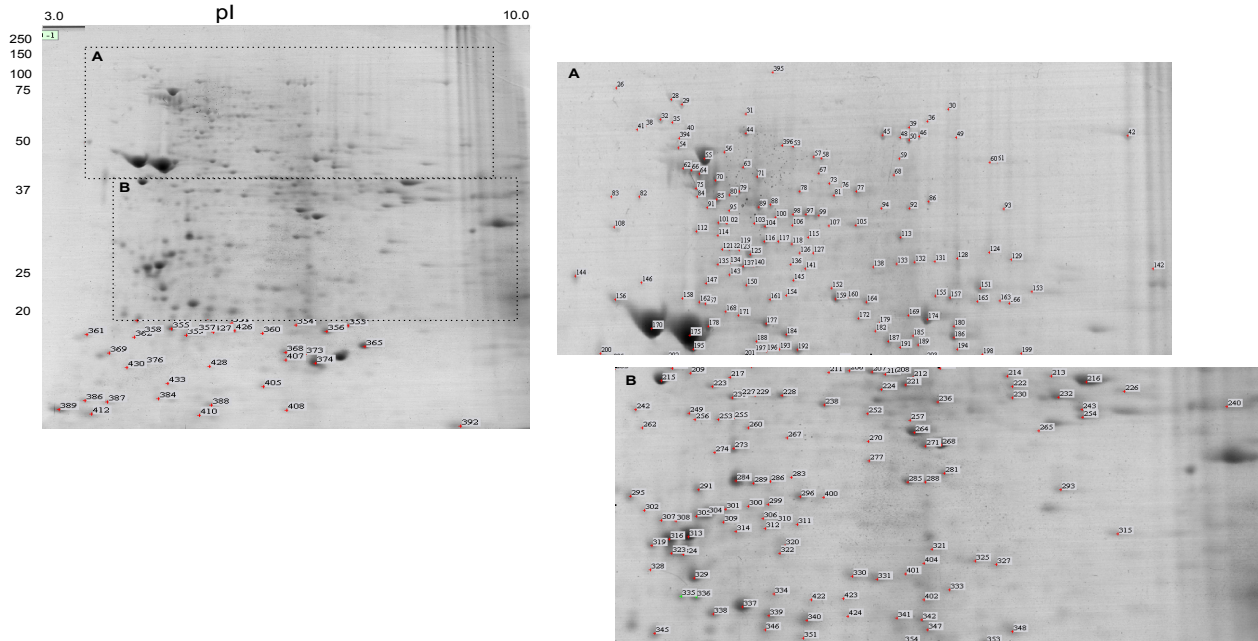


Figura 7: Perfil 2-D das proteínas solúveis (2,0 mg) da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) obtidas a partir de infecção de células Vero. Para a primeira dimensão foram utilizadas com tiras de 13cm com pI 3-10 e para segunda dimensão gel SDS-PAGE 10% corado com Azul de Coomassie R-250. Os códigos de identificação dos spots correspondem aos Id na Tabela Suplementar 4.

Apesar dos avanços nas plataformas de espectrometria de massas, a qualidade das análises proteômicas depende diretamente da qualidade e disponibilidade das bases de dados genômicos ou transcriptômicos. Normalmente são utilizadas bases contendo genes ou ORF da espécie cujo mapa proteômico está sendo analisado (PRUESS *et al.*, 2006; MARTENS e APWEILER, 2009; MARTENS, 2011). Até 2010 não havia informações disponíveis significativas a respeito do genoma do *T. rangeli*, o que poderia levar não identificação das proteínas deste parasito.

Desta forma, foram empregadas duas estratégias para a análise do genoma deste parasito, a primeira foi a análise do transcriptoma deste parasito, onde foi possível obter 4.208 sequências não redundantes de transcritos (GRISARD *et al.*, 2010).

Apesar do grande número de transcritos obtidos na análise do transcriptoma do *T. rangeli*, a identificação das proteínas expressas por este parasito baseadas nestes dados torna-se pouco efetiva, pois devido a regulações pós-transcricionais e pós-traducionais, pode ocorrer uma disparidade entre a quantidade de transcritos e de proteínas (GYGI *et al.*, 1999; HARRISON *et al.*, 2002). Desta forma, seria necessário o sequenciamento *de novo* de cada um dos peptídeos não identificados nas análises de MS/MS.

A segunda estratégia de identificação das proteínas presentes no perfil 2-D do *T. rangeli* foi realizada com as 7.610 ORF de genes do *T. rangeli* obtidas com o sequenciamento do genoma deste parasito, que está em processo final de anotação junto ao Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, 2011).

Utilizando dados do genoma do *T. rangeli*, foi possível identificar 137 distintas proteínas no proteoma 2-D do *T. rangeli* (Apêndice A e Tabela Suplementar 3), destacando proteínas encontradas em diferentes *spots* como a beta tubulina (TR05117), a arginina-quinase (TR00214), a cistationina gama liase (TR03680), as proteínas de choque térmico HSP70 (TR07016) e HSP60 (TR06127), além de 27 distintas proteínas sem função definida (Tabela 5). Estes dados representam cerca de 1,8% do total de ORF preditas para o genoma do *T. rangeli*.

Já para as análises das proteínas do *T. cruzi*, foram submetidos 291 *spots* para análises por LC-ESI-MS/MS e identificadas proteínas em 216 *spots* (75%, n=291) (Tabela Suplementar 4), representando cerca de 1,2% do total de genes preditos no genoma do *T. cruzi*.

Estas proporções de *spots* com proteínas identificadas por espectrometria de massas, bem como a representatividade das proteínas identificadas destes organismos baseadas nos dados genômicos, foram similares às observadas para outros organismos do mesmo grupo, mesmo utilizando diferentes métodos de identificação como MALDI-TOF/TOF (PARODI-TALICE *et al.*, 2004; PARODI-TALICE *et al.*, 2007; KIKUCHI *et al.*, 2010).

Foram identificadas 143 proteínas distintas de *T. cruzi* em uma única replicata biológica analisada por espectrometria de massas, utilizamos a base de dados de sequências proteicas de *T. cruzi* disponíveis na plataforma *EuPathDB* (ASLETT *et al.*, 2010).. Dentre as proteínas encontradas em mais de um *spot* estão a beta tubulina (Tc00.1047053506563.40) e a alfa tubulina (Tc00.1047053411235.9), HSP60 (Tc00.1047053507641.290), HSP70 (Tc00.1047053511211.160), HSP85 (Tc00.1047053507713.30), tiolredutase (Tc00.1047053503419.30) e triparedoxina-peroxidase (Tc00.1047053487507.10), além de 19 proteínas sem função definida distintas (Tabela Suplementar 4).

A beta tubulina (TR05117) foi identificada em 11 distintos *spots* em diferentes regiões do perfil 2-D do *T. rangeli*. Dentre estes, o *spot* 87 (49kDa), um dos mais proeminentes deste perfil, apresentou maior quantidade de peptídeos únicos para esta proteína (18), maior cobertura (65,9%) e o *Mr* observado está próximo ao *Mr* teórico para esta proteína (45,2kDa), correspondendo o *spot* referência para esta proteína. Nos demais *spots* onde foi verificada a presença desta proteína observa-se que a maioria destes estão localizados em regiões acima ou muito próximos ao *Mr* do *spot* referência 87 (Figura 6 e Apêndice A). Estes dados são similares aos perfis 2-D de outras espécies de tripanosomatídeos (DRUMMELSMITH, 2003; PARODI-TALICE *et al.*, 2004), inclusive ao perfil de *T. cruzi* apresentado neste trabalho (Figura 7).

Também foram observados *spots* com Mr inferior ao esperado para a beta tubulina, o que pode ser resultante da proteólise *in vivo* destas proteínas, modificações pós-traducionais ou da degradação de algumas proteínas durante o processamento das amostras. Segundo Drummel-Smith e colaboradores (2003) fragmentos desta proteína podem ser observados com Mr inferior ao esperado com o envelhecimento das culturas destes parasitos, o que pode explicar a identificação desta proteína nestes *spots*, visto que a forma tripomastigota de *T. rangeli* é obtida após o oitavo dia de cultura. Entretanto, acreditamos que o baixo número de *spots* (3) abaixo deste Mr (45,2kDa), aliado a boa reprodutibilidade dos perfis obtidos, indicam boa qualidade no processamento das amostras, com baixa proteólise e consequente degradação da amostra.

Outras proteínas identificadas associadas ao citoesqueleto foram a alfa tubulina (TR05056) e a actina (TR00036). Assim como a beta tubulina, a alfa tubulina foi observada em mais de um *spot* (90, 3 e 228) e apresenta o mesmo perfil de modificação pós-traducional ou proteólise descrito anteriormente (Figura 6).

5.1.2 Proteínas sem função definida

Foram identificadas em 33 *spots*, 27 (19%, n=137) distintas proteínas sem função definida (descritos no genoma do parasito como genes hipotéticos) no perfil 2-D de *T. rangeli*, conforme sua anotação nos bancos de dados. Já no perfil 2-D de *T. cruzi* foram identificadas 18 (12%, n=146), em 24 *spots*. Esta proporção de proteínas sem função definida em análises proteômicas, são similares às observadas em outros trabalhos na literatura, variando entre 8-14% (CUERVO *et al.*, 2007; PARODI-TALICE *et al.*, 2007; KIKUCHI *et al.*, 2010).

O elevado número de genes hipotéticos observado nos genomas das principais espécies de tripanosomatídeos (BERRIMAN *et al.*, 2005; EL-SAYED *et al.*, 2005), reflete a quantidade de genes sem função definida tanto no transcriptoma (GRISARD *et al.*, 2010) e no genoma do *T. rangeli* (Dr. Edmundo Grisard, comunicação pessoal), consequentemente no proteoma.

5.1.3 Localização celular e anotação funcional das proteínas de *Trypanosoma rangeli*

Dentre as 137 proteínas distintas identificadas no perfil 2-D de *T. rangeli*, observa-se grande quantidade de proteínas citosólicas e mitocondriais (76%) e poucas proteínas associadas a membranas ou extracelular (8%) (Figura 8). O mesmo foi observado para a forma tripomastigota de *T. cruzi*, onde 80% do total de 143 proteínas identificadas foram preditas como citosólicas ou mitocondriais e apenas 4% com sinal de endereçamento para a membrana plasmática.

A grande quantidade de proteínas citosólicas identificadas é observada neste tipo de abordagem proteômica com o uso de gel (DRUMMELSMITH, 2003; PARODI-TALICE *et al.*, 2004; ATWOOD *et al.*, 2005; CUERVO *et al.*, 2007; MAGALHAES *et al.*, 2008; KIKUCHI *et al.*, 2010). Proteínas de membrana ou extracelular são altamente hidrofóbicas e requerendo outros métodos de separação e fracionamento de proteínas, sem o uso de gel, para realizar a sua caracterização (SANTONI *et al.*, 2000; FENSELAU e RAHBAR, 2006).

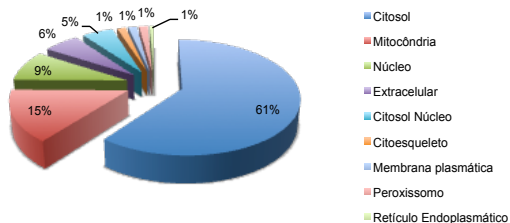


Figura 8: Gráfico com as diferentes localizações celulares preditas pelo programa *Wolf-PSort* das 139 proteínas de *Trypanosoma rangeli* identificadas no presente estudo.

Em relação as anotações funcionais pelo *Gene Ontology* (GO), não foi atribuída uma anotação funcional para apenas 32 proteínas de *T. rangeli* (23%, n=137). Já para as 105 (77%, n=137) proteínas com anotações funcionais (Tabela Suplementar 5), 78 (74%, n=105) foram relacionadas a um componente celular, 80 (78%, n=105) a processos biológicos e em 60 (57%, n=105) a funções moleculares (Figura 9).

Dentre os componentes celulares anotados pelo GO (Figura 9), observou-se um padrão similar a predição pelo programa *Wolf-PSort* (Figura 8), na qual a maior parte das proteínas foram classificadas como citoplasmática (26%), mitocondrial (23%), glicossomal (6%) ou nuclear (6%).

Com relação aos processos biológicos, cerca de 11% das proteínas participam de metabolismo de nucleotídeos ou compostos contendo estas nucleobases, como metilação de RNA (TR03071), edição de RNA (*splicing*) (TR04008), modificação de tRNA (TR01620) ou processos envolvendo purinas (cAMP ou helicases) (TR02653, TR05708). Na mesma proporção, em 11% foram anotadas proteínas envolvidas na resposta do parasito a fatores de estresse, como excesso de íons de peróxido de hidrogênio, sal ou temperatura, dentre as quais destacam-se as HSP70 (TR07016) e HSP 85 (TR00837) e triparedoxina-peroxidase (TR02563).

Também pudemos observar proteínas envolvidas em processos requeridos para a geração de energia para a célula, como processo de geração de precursores energéticos (8%) e metabolismo de carboidratos (8%). Nestes casos, destacam-se proteínas envolvidas na gliconeogênese (TR06599, TR02148, TR05296), via das pentoses (TR00236, TR05732 e TR05296), ciclo de Krebs (TR02438, TR03342, TREG201001C04.b), glicólise (TR02001, TR05738, TR06599, contig01422.5, TR02767) e no transporte de elétrons na mitocôndria (TR03577, TR04856). Além de proteínas associadas ao metabolismo de proteínas (8%), tanto na proteólise (cisteína peptidase e proteínas de proteossomo) quanto no processo de tradução (6%) (fatores de tradução) (Tabela Suplementar 5).

Das proteínas com função molecular anotada, proteínas com função catalítica (20%), de ligação com proteínas (13%) e atividades de hidrólise (13%) foram as mais abundantes. A maior parte destas proteínas estão associadas aos principais processo biológicos listados anteriormente, destacando-se a malato desidrogenase, as HSP e proteínas com atividade na tradução de proteínas.

Esta distribuição total de proteínas de *T. rangeli* com anotação pelo GO foi similar ao obtido para a forma tripomastigota de *T. cruzi* (Tabela Suplementar 6), onde foi possível atribuir uma anotação funcional para 121 proteínas

(82%, n=146). Destas, 98 proteínas (80%, n=121) tiveram um processo biológico atribuído e em 85 (70%, n=121) um componente celular. Entretanto, diferentemente de *T. rangeli*, apenas em 21 proteínas de *T. cruzi* (18%, n=121) foi possível atribuir uma função molecular.

Considerando apenas os componente celulares, notamos que a distribuição de proteínas de *T. cruzi* assemelha-se à de *T. rangeli*, com 37% associadas ao citoplasma, 20% a mitocôndria e 7% ao núcleo. Entretanto, observa-se que dentre os processos biológicos as proteínas associadas à resposta ao estresse (23%) foram as mais identificadas em *T. cruzi*, seguidas de proteínas associadas ao transporte (9%), processos catabólicos (9%) e metabolismo de carboidrato (8%). Esta identificação majoritária de proteínas associadas a resposta ao estresse também foi observada para a forma tripomastigota, derivada de células ou de cultura, de outras cepas de *T. cruzi* (PARODI-TALICE *et al.*, 2007; KIKUCHI *et al.*, 2010).

5.1.4 Metabolismo energético

De acordo com os resultados obtidos pelas análise realizadas no KEGG (Apêndice B) e pelo GO, foram encontradas distintas proteínas no perfil 2-D do *T. rangeli* envolvidas no metabolismo energético e associadas a rotas bioquímicas como glicólise (9), ciclo do ácido cítrico (4), do piruvato (4) e a via das pentoses (3).

Dentre estas proteínas destacam-se a frutose-1,6-bifosfato citosólica (TR05296, *spot* 142) e glicosomal (TR00236, *spots* 141 e 142), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (contig 01422.5, *spot* 181), enolase (TR06599, *spots* 109 e 112), fosfoglicerato quinase (TR02767, *spots* 11, 110, 138), malato desidrogenase (TR02438, *spots* 24, 142, 175, 178).

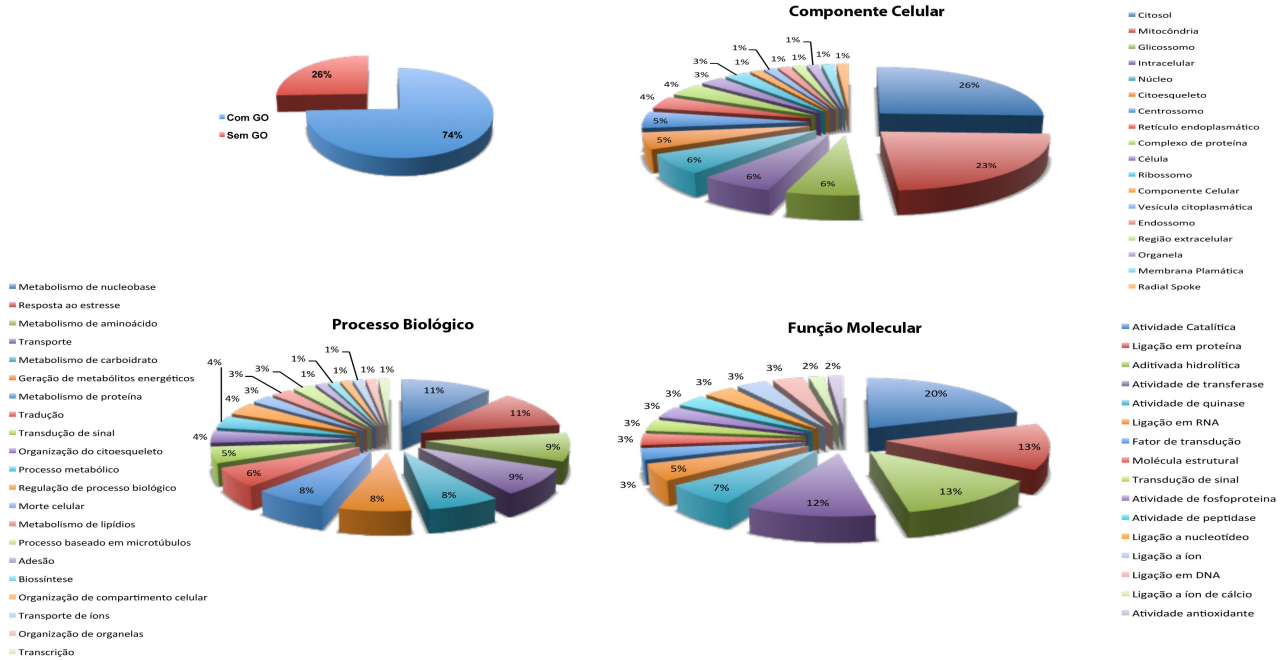


Figura 9: Proporção de proteínas distintas de *Trypanosoma rangeli* com anotação funcional segundo o *Gene Ontology* (GO). Proteínas sem anotação ou com pelo menos uma anotação (Superior esquerdo) e distribuição das principais categorias nas três ontologias do GO: Componente Celular (Superior direito), Processo Biológico (Inferior Esquerdo) e Função Molecular (Inferior direito).

Estas mesmas proteínas foram encontradas tanto em análise de perfis 2-D quanto em análise sem uso de gel para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* (PABA, SANTANA, *et al.*, 2004; PARODI-TALICE *et al.*, 2007; MAGALHAES *et al.*, 2008; KIKUCHI *et al.*, 2010; DE GODOY *et al.*, 2012). De acordo com Kikuchi e colaboradores (2010), 39% das proteínas identificadas em perfil 2-D de três cepas de *T. cruzi* foram anotadas como participantes de metabolismo energético, demonstrando o elevado número de proteínas relacionadas ao metabolismo energético identificadas nestas condições de estudo.

Magalhães e colaboradores (2008) observaram que as formas tripomastigotas de *T. cruzi* apresentam um aumento na expressão de proteínas relacionadas ao ciclo de Krebs em relação as formas epimastigotas. Já segundo Bringaud e colaboradores (2006), as formas epimastigotas expressam maior quantidade de proteínas associadas a metabolização de aminoácidos, como a L-prolina e L-glutamina, que constituem a principal fonte energética destas formas parasitárias nos hospedeiros invertebrados, quando na ausência de glicose.

Desta forma, podemos inferir que a identificação de diferentes proteínas associadas a estas vias bioquímicas, *e.g.* via glicolítica e ciclo do ácido cítrico, no perfil 2-D da forma tripomastigota de *T. rangeli*, pode ser devido ao estresse nutricional que o *T. rangeli* é submetido para alternar da forma epimastigota para a forma tripomastigota *in vitro*. Especialmente em função da mudança de um cultivo das formas epimastigota com restrição de glicose e abundância de aminoácidos para uma condição com maior disponibilidade de glicose, porém com restrição de aminoácidos, necessária para a obtenção das formas tripomastigota *in vitro* (KOERICH *et al.*, 2002).

Interessantemente, a diferenciação do *T. rangeli in vitro* é dependente da suplementação do aminoácido L-glutamina (KOERICH *et al.*, 2002), o que poderia indicar uma maior quantidade de proteínas relacionadas ao metabolismo deste aminoácido, o que não foi observado no presente estudo.

5.1.5 Proteínas envolvidas na resposta ao estresse

Algumas proteínas revelaram uma anotação funcional associada à resposta ao estresse, como dihidrolipoil

desidrogenase (TR04445), superóxido dismutase (TR05576), proteína sti1 induzida por estresse (TR02091), subunidade alfa do proteossomo (TR00880), a triparedoxina peroxidase (TR02563) e além de oito distintas HSP (do inglês *Heat Shock Proteins*) ou chaperonas (Apêndice A).

Dentre estas proteínas destaca-se a HSP70, que desempenha papel fundamental no dobramento de proteínas recém sintetizadas, bem como na translocação para as organelas (HARTL, 1996). No presente estudo, foram identificadas três distintas HSP70, duas citosólicas TR07016 e TR03366, além de uma mitocondrial TR03493.

A HSP70 (TR07016) apresenta a *Mr* teórica próxima do esperado (68,6kDa) e descrito na literatura para estes organismos (LEE *et al.*, 1988; LEE, 1998). Esta proteína foi identificada em sete distintos *spots* (Apêndice A), porém apenas os *spots* 52 e 53 apresentaram *Mr* observadas próximas da teórica para esta proteína e *pI* próximo do descrito na literatura, 5,55 e 5,66 respectivamente, além de apresentar a maior cobertura e quantidade de espectros para estas proteínas, sendo estas possíveis regiões de duas diferentes isoformas desta proteína.

Também foram observados *spots* com *Mr* de 48kDa (235 e 237), o que pode ser relacionado com possíveis modificações pós-traducionais descritas para estas proteínas (PARODI-TALICE *et al.*, 2007), ou peptídeos identificados são relativos a uma proteína paróloga presente no interior da mitocôndria dos tripanosomatídeos (ENGMAN *et al.*, 1989).

Foi identificada também uma co-chaperona DnaJ (*spot* 117) (44kDa) em um *spot* correspondente ao seu *Mr* e *pI* teórico. Esta proteína ao se associar com a HSP70 promove a ativação da atividade de ATPase da HSP70, conseqüentemente, a correção e auxílio no enovelamento de proteínas de *T. cruzi* mal formadas, quando em resposta ao aumento da temperatura ou tempo prolongado de cultivo (EDKINS *et al.*, 2004).

Além destas, foi identificada uma proteína HSP60 (TR06127) em sete distintos *spots*, destes, os *spots* 75 e 81 apresentaram tanto o ponto isoelétrico quanto a *Mr* próximos aos valores teóricos para esta proteína, correspondendo a possíveis isoformas desta proteína. Esta HSP60 contém uma sequência de

endereço para a mitocôndria, similar ao observado em outras espécies (CHENG *et al.*, 1989; BRINGAUD *et al.*, 1995).

As chaperonas (HSP) são proteínas envolvidas com a manutenção da homeostase celular especialmente em resposta a fatores abióticos, como excesso de dano oxidativo, compostos químicos ou temperatura. Estas chaperonas têm como principal função auxiliar o enovelamento das proteínas tanto no citoplasma quanto no interior do retículo endoplasmático ou mitocôndria.

Devido a importância deste processo na manutenção da integridade celular, estas proteínas são extremamente conservadas ao longo da evolução e encontradas em todos os organismos eucarióticos (YOUNG *et al.*, 2003).

Em tripanosomatídeos, estas proteínas já foram localizadas tanto na mitocôndria, como no citoplasma (LEE *et al.*, 1988; OLSON *et al.*, 1994; LEE, 1998; FOLGUEIRA e REQUENA, 2007). Neste organismos, as mudanças de formas durante o ciclo de vida exigem uma grande quantidade destas proteínas sendo expressas ao longo de todo o ciclo de vida, sendo essenciais para o sucesso na mudança de forma e no estabelecimento das infecções tanto nos hospedeiros vertebrados como invertebrados (LOUW *et al.*, 2010). Em especial as HSP70, são sintetizadas em elevados níveis em parasitos mantidos em cultura, possivelmente devido ao estresse (OLSON *et al.*, 1994). Desta forma, o grande número de proteínas destas famílias identificadas no presente estudo, pode estar relacionado às condições de estresse nutricional durante o ciclo de diferenciação do *T. rangeli*.

Além disto, devemos destacar que estas proteínas já foram descritas como marcadores fenotípicos ou de infecção de diferentes tripanosomatídeos, especialmente aqueles que apresentam formas sanguíneas em seus hospedeiros (BANNAI *et al.*, 2003; ZURITA *et al.*, 2003), além de potenciais marcadores da efetividade de tratamento em chagásicos (KRAUTZ *et al.*, 1998).

5.1.6 Proteínas de superfície ou associadas à membrana plasmática

Conforme apresentado na figura 8, apenas 10 proteínas (8%) das 137 proteínas são proteínas extracelulares ou associadas a membrana plasmática do *T. rangeli*, dentre elas quatro sialidases (*spots* 48, 51, 120, 156 e 167) e uma GP63 (*spots* 39, 46, 229).

Como estas proteínas foram identificadas com base em proteínas preditas a partir de transcritos de *T. rangeli*, não foi possível estimar o *pI* e a *Mr* baseada na sequência encontrada. Entretanto, ao considerar as informações da literatura para estas proteínas (PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 1993; BUSCHIAZZO *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 2010), observamos que os *spots* 48 e 51, ambos com *Mr* de 73 e 72kDa podem corresponder a uma ou mais destas sialidases, e o *spot* 229 (65kDa) corresponde ao *spot* referência para proteína GP63 completa

O perfil 2-D de *T. rangeli* não possibilitou a identificação de um grande número de proteínas hidrofóbicas ou de membrana, pois além de ter sido utilizado extrato de proteínas solúveis, este tipo de abordagem proteômica não possibilita a identificação destes tipos de proteínas (SANTONI *et al.*, 2000; FENSELAU e RAHBAR, 2006), bem como de proteínas pouco expressas, limitando o conhecimento a respeito do rol de proteínas de uma célula, especialmente das proteínas de superfície.

Todavia, devido à importância destas proteínas de superfície para o ciclo biológico e na patogênese dos tripanosomatídeos (FERGUSON, 1997; POLLEVICK *et al.*, 2000; BERRIMAN *et al.*, 2002; BUSCAGLIA *et al.*, 2006; BARTHOLOMEU *et al.*, 2009; JACKSON, 2010), a análise proteômica das proteínas de superfície do *T. rangeli* essencial para o entendimento das diferenças biológicas apresentadas por este parasito em relação ao *T. cruzi*. Por isto, utilizamos outras abordagens para fracionamento, separação e identificação deste grupo de proteínas, que serão descritas mais adiante.

5.1.7 Predição *in silico* de epítomos lineares ligantes em células B da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli*

Foram identificados 201 epítomos lineares ligantes a anticorpos, com tamanhos entre nove a 15 aminoácidos, em 97 das 137 proteínas da forma tripomastigota de *T. rangeli*. Estes epítomos foram preditos a partir da análise das sequências das proteínas preditas nas bases de dados utilizadas através do programa *BepiPred* (LARSEN *et al.*, 2006), utilizando valor limitante (*threshold*) de 0,90, que confere alta especificidade de identificação pelo programa.

Estes 201 epítomos de *T. rangeli* foram submetidos a análise de similaridade com proteínas de *T. cruzi* utilizando o programa *blastp* (ALTSCHUL *et al.*, 1997), com os parâmetros ajustados para busca de sequências curtas de proteínas (*e-value* 0,1, *word size* 2 e sem ajuste de composição). Com base nesta busca, 125 epítomos preditos foram idênticos a uma região correspondente na proteína similar de *T. cruzi*, em contrapartida 81 epítomos resultantes de 56 proteínas distintas não apresentaram similaridade ou similaridade inferior a 60% com o *T. cruzi* nas condições de busca utilizadas (Tabela Suplementar 7).

Desta forma, de posse do mapa referência do perfil 2-D da forma tripomastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi* e considerando que esta análise preliminar sugerem possíveis antígenos com epítomos específicos para o *T. rangeli*, resolvemos investigar, através de *immunoblotting* 1-D e 2-D, o padrão de reconhecimento destas proteínas por antissoros de camundongos experimentalmente infectados com o *T. rangeli* ou com o *T. cruzi*.

5.2 Mapeamento dos antígenos de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*

5.2.1 Perfil unidimensional dos antígenos de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi* identificados por antissoros de camundongos experimentalmente infectados

Analisando os perfis proteicos 1-D resolvidos em gel com gradiente de concentração 4-12% (*NuPage*), observa-se claramente algumas bandas com proteínas espécie-específica e/ou estágio-específicas, estas últimas especialmente em *T. cruzi*, pois os perfis das formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli* apresentam um padrão bastante similar (Figura 10 A).

Ao comparar os perfis entre estas duas espécies, observa-se a presença de três bandas de aproximadamente 30, 60 e 75 kDa tanto na forma epimastigota quanto tripomastigota de *T. rangeli* (Figura 10 A), as quais estão ausentes nas formas do *T. cruzi*. Além disto, há um maior número de bandas acima de 100kDa nos perfis proteicos do *T. rangeli*. Mejía e colaboradores (2004) observaram a presença de uma banda de 48 kDa específica para a forma tripomastigota metacíclica de *T. rangeli* obtidas em vetores, entretanto no presente estudo esta banda também é observada na forma epimastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi*. Esta discrepância pode ser devida às diferentes origens das formas tripomastigotas de *T. rangeli* utilizadas e às diferentes cepas de *T. cruzi*, cepa Y no presente estudo e Dm28c no estudo de Mejía e colaboradores (2004).

Também observamos três bandas de aproximadamente 37, 67 e 180 kDa exclusivamente observadas na forma tripomastigota de *T. cruzi*, similar ao observado por Basso e colaboradores (BASSO *et al.*, 1986).

Desta forma, a utilização de gel de gradiente 4-12% possibilitou identificar diferenças no padrão das proteínas, especialmente entre as formas tripomastigotas destes parasitos, além das diferenças no padrão de reconhecimento destas proteínas por antissoros de animais infectados com estes parasitos.

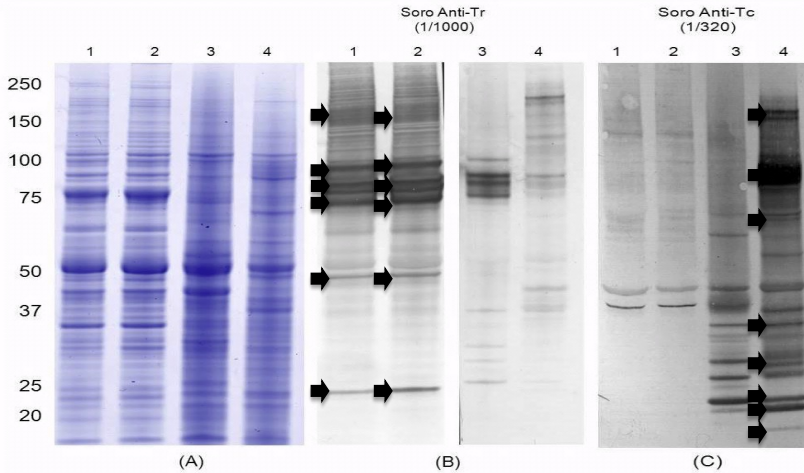


Figura 10: *Immunoblotting* unidimensional com 29 μ g proteínas solúveis das formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*. (A) Perfil unidimensional Nu-Page 4-12% das proteínas solúveis corado com Azul de Coomassie G-250; (B) Antissoro anti-*T. rangeli* (1/1000); (C) anti-*T. cruzi* (1/320). Linhas: 1 - Epimastigota de *T. rangeli*; 2 - Tripomastigota de *T. rangeli*; 3 - Epimastigota de *T. cruzi*; 4 - Tripomastigota de *T. cruzi*. Setas indicam proteínas reconhecidas exclusivamente pelos antissoros homólogos.

De Moraes e colaboradores (2008) ao utilizarem antissoros de pacientes chagásicos com as diferentes manifestações da doença de Chagas, demonstraram a presença de antígenos estágio-específico nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, porém ausentes nas formas tripomastigotas de *T. rangeli*, sugerindo que estas possam ser proteínas potenciais para diagnóstico diferencial. Entretanto, não foram observados antígenos estágio-específicos para o *T. rangeli*, o que seria importante para o incremento da especificidade dos métodos de diagnóstico sorológico, especialmente para o *T. rangeli*.

Utilizando antissoros de camundongos infectados com *T. rangeli* ou com *T. cruzi*, foi possível observar um forte reconhecimento de proteínas nas regiões entre 75-100 kDa da forma epimastigota de *T. cruzi* pelo antissoro heterólogo (antissoro de animais infectados com o *T. rangeli*), além de um fraco reconhecimento de bandas de 25, 29, 32 e 40 kDa. Este padrão não foi observado quando utilizadas proteínas solúveis

da forma tripomastigota, apesar de haver um fraco reconhecimento de proteínas de aproximadamente 40, 47, 75, 120 e 150 kDa (Figura 10 B, linhas 3 e 4), demonstrando que o reconhecimento sorológico cruzado é menor quando utilizado antígenos da forma tripomastigota de *T. cruzi* nestes ensaios (Figura 10 B, linhas 3 e 4).

Entretanto, ao observar as proteínas de *T. rangeli* que são reconhecidas pelo antissoro heterólogo anti-*T. cruzi*, observa-se que este reconhecimento é fraco para ambas as formas, apenas reconhecendo antígenos de aproximadamente 40, 47 e 125 kDa (Figura 10 C, linhas 1 e 2). Proteínas na faixa compreendida entre 40 e 47 kDa, são também identificadas nos perfis de *T. cruzi* pelo antissoro heterólogo (Figura 10 B, linhas 3 e 4), sugerindo a presença de antígenos com a mesma que podem estar relacionados com a reatividade sorológica cruzada.

Com relação às proteínas reconhecidas pelos antissoros homólogos, nota-se que o reconhecimento de antígenos da forma tripomastigota de *T. cruzi* é mais intenso do que da sua forma epimastigota (Figura 10 C, linhas 3 e 4), dentre os quais podemos destacar as proteínas presentes na região entre 23, 30-34, 37 e 60-100 kDa. Já para *T. rangeli*, observa-se que há um forte reconhecimento pelo antissoro homólogo de proteínas com aproximadamente 25, 50, 60, 75, 80, 95 e 110-150 kDa (Figura 10 B, linhas 1 e 2), sendo este número de proteínas maior do que o anteriormente descrito por Saldaña e colaboradores (1996a; b).

Com base nestes resultados, pode ser observado que as proteínas da forma tripomastigota de *T. cruzi* e de *T. rangeli* apresentam alvos potenciais para o diagnóstico diferencial entre estas duas espécies, devido ao forte reconhecimento de proteínas pelos respectivos antissoros homólogos e o fraco reconhecimento destas proteínas pelos antissoros heterólogos, corroborando com o observado por De Moraes e colaboradores (2008) com soros de pacientes chagásicos em diferentes formas e estágios da doença.

5.2.2 Immunoblotting 2-D das proteínas solúveis de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*

Após os resultados obtidos nos ensaios de *immunoblotting* 1-D, demonstrando que o uso das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* apresentam menor reatividade sorológica cruzada, passamos a investigar a possibilidade da aplicação do perfil de *immunoblotting* 2-D das formas tripomastigotas, para a identificação das proteínas de *T. rangeli* com potencial para aplicação no diagnóstico diferencial.

Para tal, foram realizados ensaios de *immunoblotting* utilizando 500 µg de proteínas solúveis de *T. rangeli* e de *T. cruzi* resolvidas por eletroforese 2-D utilizando tiras de pH 3-10 de 7 cm. Após obter perfis bidimensionais com o mesmo padrão de reprodutibilidade demonstrado anteriormente, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF e incubadas com os antissoros.

Após pelo menos seis ensaios de *immunoblotting* 2-D, pudemos observar um forte reconhecimento de proteínas entre 60-100 kDa nos extratos de *T. rangeli* pelo antissoro homólogo, assim como observado na análise 1-D. Porém devido ao reconhecimento intenso nesta região não foi possível identificar proteínas isoladamente (Figura 11 A). Diferentemente do observado no *immunoblotting* 1-D, várias proteínas de *T. rangeli* foram identificadas pelo antissoro heterólogo no ensaio 2-D (Figura 11 D), dentre estas destacam-se as proteínas constitutivas como a beta-tubulina (aproximadamente 50 kDa) e as de HSP (70 e 85 kDa), possivelmente devido ao alto grau de similaridade entre estas sequências no *T. rangeli* e no *T. cruzi*.

Da mesma forma, o reconhecimento de proteínas de *T. cruzi* pelo antissoro homólogo foi muito intenso na mesma faixa de pH e *Mr* observada com o antissoro heterólogo (Figura 11 D), porém apresentando um perfil distinto do observado nos ensaios de 1-D (Figura 10).

Com exceção do reconhecimento de uma proteína de aproximadamente 50 kDa no extrato de células Vero, que corresponde à beta tubulina (Figura 11 C e F), não foi observado nenhum reconhecimento nos extratos proteicos de *T. cruzi* ou de *T. rangeli* pelos soros de animais controle não infectados.

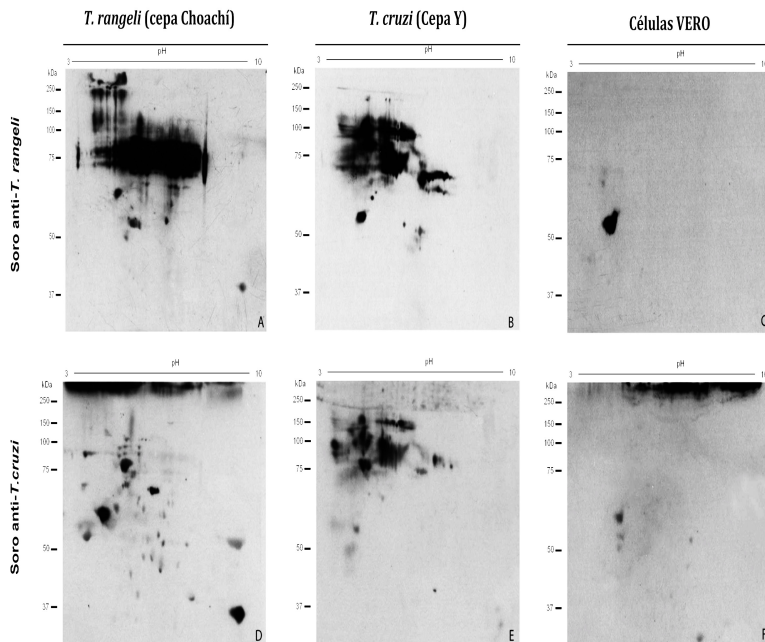


Figura 11: *Immunoblotting 2-D* das formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*. Os perfis 2-D foram resolvidos com 500 μ g de proteínas solúveis das forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Y) obtidas a partir de infecção em células Vero; forma tripomastigota de *T. rangeli* (cepa Choachi) diferenciadas *in vitro*; e de células Vero. Para tal, as proteínas foram focalizadas em tiras de pH 3-10 de 7cm e resolvidas em gel SDS-PAGE 12%, em seguida incubadas com antissoros de animais experimentalmente infectados. Os antissoros foram diluídos na proporção de 1:400 e as membranas expostas ao reagente ECL por: 3 minutos (B, C, F), 1 minuto (A, D), 30 segundos (E).

Apesar de não ser possível a identificação de antígenos nas condições testas através do *immunoblotting 2-D*, podemos observar assim como através dos *immunoblotting 1-D*, o reconhecimento mais intenso de antígenos de *T. cruzi* pelo antissoro heterólogo do que de *T. rangeli*.

Além disto, Souto-Padrón e colaboradores (1989) já demonstraram que proteínas antigênicas de *T. cruzi* estão localizadas em determinadas regiões do parasitos, especialmente associadas à bolsa flagelar. Utilizando peptídeos de *T. cruzi* sintetizados a partir de proteínas localizadas nestas

regiões, Zuñiga e colaboradores (2007) demonstram alta reatividade sorológica destes antígenos com antissoro de animais infectados com *T. rangeli*. Dentre estas proteínas, podemos destacar a proteína da bolsa paraflagelar. Esta proteína de aproximadamente 69kDa foi identificada tanto nas análises 1-D quanto 2-D, e pode estar fortemente associada a reatividade sorológica cruzada entre estes organismos, em virtude da alta similaridade das proteínas de *T. rangeli* e de *T. cruzi* (98%).

Contudo, apesar de não ser possível a identificação individual de proteínas de *T. rangeli* exclusivamente pelo antissoro homólogo, foi possível observar a presença nas regiões com alto reconhecimento por este soro de proteínas relacionadas com a superfície do parasito, como as sialidases e a GP63, especialmente nas análises 1-D (região entre 60-100kDa) e de diferentes HSPs.

Alguns autores têm demonstrado que grande parte dos constituintes antigênicos de *T. cruzi* são provenientes da superfície (SOUTO-PADRON *et al.*, 1989; DE MARCHI *et al.*, 2011; THOMAS *et al.*, 2012) ou até mesmo de antígenos secretados (UMEZAWA *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 2002). Añez-Rojas e colaboradores (2006) demonstraram pela primeira vez a possibilidade do uso de proteínas de superfície ancoradas em GPI do *T. rangeli* no diagnóstico sorológico específico deste parasito. Desta forma, optamos por focar nosso estudo na análise proteômica comparativa da superfície das formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli* e *T. cruzi*, objetivando a identificação de antígenos de superfície marcadores para o diagnóstico diferencial destes parasitos.

5.3 *Proteômica comparativa da superfície do Trypanosoma rangeli e do Trypanosoma cruzi*

Com base nos dados apresentados na seção anterior, devido a não efetiva identificação de antígenos específicos de *T. rangeli* a partir de antígenos solúveis em eletroforese bidimensional, aliados ao reconhecimento de apenas uma faixa destas proteínas entre 60-100kDa (Figura 10 e Figura 11), passamos a investigar a presença de antígenos específicos nas proteínas de superfície do *T. rangeli* (Wagner *et al.*, Dados não publicados).

Este tipo de abordagem tem apresentado resultados promissores, pois o fracionamento celular resulta no enriquecimento de proteínas pouco expressas ou de proteínas não facilmente solubilizadas, como por exemplo as proteínas de superfície ou associadas à membrana plasmática, em frações proteicas específicas (ALI-KHAN *et al.*, 2003).

Conforme comentado anteriormente, as proteínas de superfície (SP) ou associadas à membrana plasmática estão envolvidas em eventos biológicos relacionados com a patogênese (EPTING *et al.*, 2010) e na indução da resposta imune (ALMEIDA e GAZZINELLI, 2001). Desta forma, considerando a variabilidade destas proteínas de superfície em tripanosomatídeos, a capacidade imunogênica e a importância destas proteínas de superfície na biologia destes organismos, foi realizada a análise de proteômica comparativa em grande escala das proteínas de superfície (SP) das formas tripomastigota e epimastigotas do *T. rangeli* e do *T. cruzi* (Wagner *et al.*, Dados não publicados).

Apesar da dificuldade na obtenção de proteínas de membrana plasmática, devido à alta hidrofobicidade, há métodos que possibilitam a obtenção de quantidades significativas destas proteínas através do fracionamento celular utilizando determinados detergentes (FENSELAU e RAHBAR, 2006). A utilização do detergente não iônico Triton X-114 tem sido demonstrada como um eficiente surfactante para a obtenção de proteínas de superfície, especialmente aquelas ancoradas em GPI (PINHO e DE SIMONE, 1989; ANEZ-ROJAS *et al.*, 2006; CORDERO *et al.*, 2009). Com base neste protocolo, foi possível obter uma fração enriquecida com proteínas de superfície (SEP)

das formas tripomastigotas e epimastigota de *T. rangeli* e de *T. cruzi*.

Cordero e colaboradores (2009) demonstraram a eficiência deste método com a utilização de anticorpos monoclonais para a proteínas de superfície de *T. cruzi*, como GP90, GP82, GP35/50 e FCaBP. Como o *T. rangeli* não apresenta estas proteínas, com exceção da proteína FCaBP, foram utilizadas formas tripomastigotas de uma linhagem de *T. rangeli* expressando a proteína GFP e a proteína GP82 de *T. cruzi*, para os testes de eficácia deste método nas condições laboratoriais.

Utilizando esta linhagem foi observada uma diminuição na quantidade de proteínas ao longo das frações obtidas durante o fracionamento celular, obtendo uma fração final SEP com quantidade baixa de proteínas, menor que 60 µg (Figura 12 A). A fração S2 constitui a principal fonte de proteínas citosólicas ou não solúveis em Triton X-114, confirmada pela detecção tanto da tubulina (Figura 12 B) quanto da proteína GFP expressa de forma heteróloga pelo *T. rangeli* (Figura 12 C).

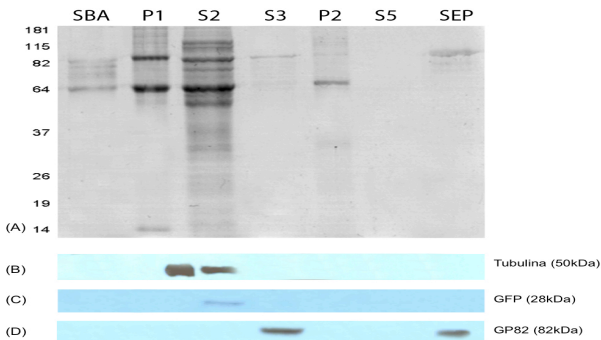


Figura 12: Análise das frações obtidas durante o processo de extração de proteínas de superfície (SEP) utilizando Triton X-114 (Item 4.4) da forma tripomastigota de uma linhagem de *Trypanosoma rangeli* transfectado com os genes da GP82 de *T. cruzi* e GFP. (A) Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) com 20 µg de proteínas corados com Azul de Coomassie R-250. *Western blot* utilizando anticorpos: (B) monoclonal murino anti-beta Tubulina (1:5.000); (C) monoclonal murino anti-GFP (1:5.000); (D) monoclonal murino anti-GP82 (1:1.000); MW: massa molecular relativa (Mr) em kDa. Legenda das frações são correspondentes às frações demonstradas na figura 4.

Apesar da pouca quantidade de proteína na fração SEP, foi observado que o anticorpo monoclonal contra a proteína de superfície GP82 detecta apenas uma proteína de aproximadamente 80kDa na fração S3 e na fração SEP (Figura 12 D), demonstrando a eficiência na obtenção de proteínas de superfície. Todavia, não podemos descartar a presença na fração SEP de uma pequena quantidade de proteínas citosólicas ou com características físico-químicas que as tornam solúveis em Triton X-114.

Com base nestes resultados, onde foi comprovada a eficiência deste método para a obtenção de uma fração enriquecida de proteínas de superfície (SEP) de *T. rangeli*, este procedimento foi utilizado para a obtenção da fração SEP de replicatas biológicas das formas epimastigota e tripomastigota diferenciadas *in vitro* de *T. rangeli* e das formas epimastigota e tripomastigota obtidas a partir de infecção em célula Vero de *T. cruzi*. Com estas frações foi realizada a análise proteômica comparativa das proteínas de superfície destes dois parasitos conforme o desenho experimental esquematizado na figura 13. Paralelamente, as frações SEP das formas tripomastigotas destes parasitos foram utilizadas para a identificação de possíveis marcadores de superfície espécie-específica, através da análise de *immunoblotting* utilizando antissoros de camungondos experimentalmente infectados (Figura 13).

5.3.1 Comparação entre os perfis eletroforéticos unidimensionais das frações enriquecidas com proteínas de superfície de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*

As frações SEP das formas epimastigota e tripomastigotas de *T. rangeli* resolvidas em gel *NuPage* 4-12% apresentaram um perfil muito similar. Um total de oito bandas em comum nas frações SEP são observadas nos perfis corados com Azul de Coomassie G-250 de acordo com análises realizadas pelo programa ImageQuantTM TL (GE Healthcare Bio-Sciences) (Figura 14 A e C). Entretanto, após a coloração com nitrato de prata, percebe-se pelo menos três bandas com aproximadamente 93, 97 e 115 kDa apenas na fração SEP das formas tripomastigota do *T. rangeli* (Figura 14 D).

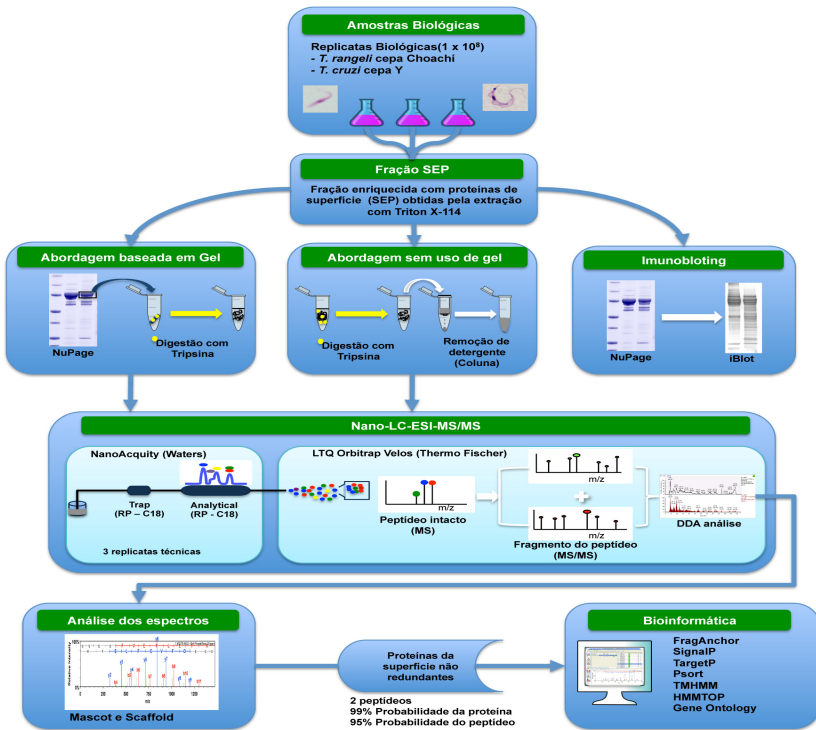


Figura 13: Esquema com o desenho experimental da análise proteômica comparativa das proteínas de superfície (SP) das formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*.

Desta forma, nota-se claramente que o presente perfil da fração SEP da forma tripomastigota de *T. rangeli* apresentou bandas específicas que não foram detectadas tanto nos perfis previamente reportados por Añez-Rojas e colaboradores (2006) quanto na forma epimastigota da cepa Choachí de *T. rangeli*, que por sua vez é similar ao perfil da fração SEP da forma epimastigota observado no referido trabalho .

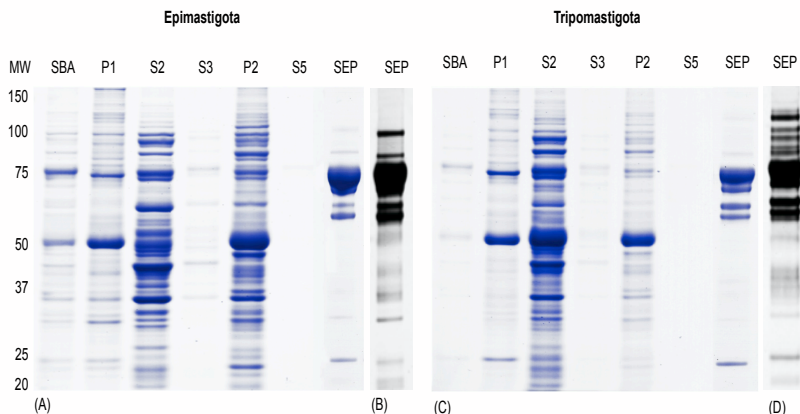


Figura 14: Perfil eletroforético (*NuPage 4-12%*) com 30 μg de proteínas das frações obtidas durante o procedimento de extração de proteínas por Triton-X114 das forma epimastigota (A) e tripomastigota (C) de *Trypanosoma rangeli* (cepa Choachí). (A) coradas com Azul de Coomassie G-250. Frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP) da forma epimastigota (B) e tripomastigota (D) coradas com prata. MW: massa molecular relativa em kDa. Legenda das frações são correspondentes às frações demonstradas na figura 4.

Ao comparar os perfis das frações SEP das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, é possível observar diferenças significativas tanto no número quanto na Mr observadas em ambos os perfis. Quatro bandas correspondendo a proteínas com Mr observadas de 32, 60, 75 e 104 kDa foram observadas em ambos os perfis, porém a banda de 32 kDa apresenta-se mais intensa no perfil de *T. cruzi* (Figura 15).

Interessante notar que o perfil da fração SEP da forma tripomastigota de *T. cruzi* obtido no presente estudo é similar ao observado para formas tripomastigotas metacíclicas obtidas em fase estacionária de cultura (CORDERO *et al.*, 2009), utilizando formas metacíclicas de *T. cruzi*. Entretanto, a banda de aproximadamente 32 kDa é muito mais intensa no perfil da forma tripomastigota de *T. cruzi* derivada de células infectadas do que nas formas metacíclicas observadas por Cordero e colaboradores (2009) e para a forma tripomastigota de *T. rangeli* (Figura 15).

Também observamos que o perfil da fração SEP das formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* é completamente

distinto do observado em tripomastigota (Figura 15) e, assim como observado por Cordero e colaboradores (2009), poucas proteínas são visíveis nos géis corados com Azul de Coomassie G-250.

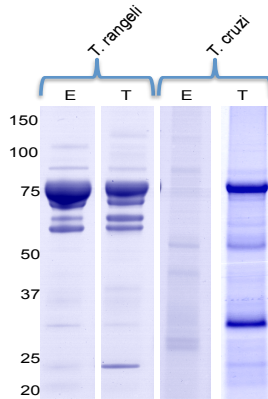


Figura 15: Comparação entre os perfis das frações SEP das formas epimastigota (E) e tripomastigotas (T) de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*. 30 µg de proteínas foram resolvidas em gel NuPage 4-12% e corados com Azul de Coomassie G-250.

Estes dados demonstram um padrão das frações SEP completamente distinto entre as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, porém similar entre as diferentes formas de *T. rangeli*, excetuando-se as três bandas proteicas descritas anteriormente. Sugere-se haver uma mudança significativa na expressão das proteínas de superfície entre as diferentes formas do *T. cruzi* e não do *T. rangeli*, considerando que a obtenção das formas tripomastigotas de *T. rangeli* são derivadas de diferenciação em cultura *in vitro*. Contudo, esta forma derivada de cultura de *T. rangeli* não apresenta diferenças na infecção aos hospedeiros em relação as formas tripomastigotas obtidas a partir da glândula salivar do triatomíneo (KOERICH *et al.*, 2002). Além disto, o presente perfil SEP da forma tripomastigota do *T. rangeli* é similar, em termos de Mr, ao mesmo perfil SEP obtido para a forma sanguínea do *T. brucei* (ZIEGELBAUER e OVERATH, 1992). Então, podemos inferir que o perfil obtido para esta forma tripomastigota de *T. rangeli* é similar ao perfil da forma sanguínea.

5.3.2 Identificação das proteínas presentes nas frações enriquecidas com proteínas de superfície de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi* por espectrometria de massas

Ao aplicar ambas as abordagens proteômicas, com e sem o uso de gel, para as mesmas amostras biológicas, foi possível identificar 138 e 343 distintas proteínas nas frações SEP de *T. rangeli* e *T. cruzi*, respectivamente (Tabela 4, Tabelas Suplementares 08, 09, 10, 11, 12 e 13).

Para o *T. rangeli*, estas 138 proteínas identificadas nesta fração representam em torno de 13% de um total de 1.067 proteínas predição de endereçamento para a superfície deste parasito, baseados na presença de peptídeo sinal na porção N-terminal das proteínas preditas no genoma deste parasito (Dr. Edmundo C. Grisard, comunicação pessoal). Contudo estes dados do genoma podem estar superestimados, pois a predição da localização celular não considera a presença de regulações ou modificações pós-traducionais necessárias para o endereçamento destas proteínas à superfície destes parasitos. Além disto, sabe-se que a maioria das proteínas de superfície de tripanosomatídeos são oriundas de famílias multigênicas compostas por dezenas até milhares de genes (FRASCH, 2000; BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

Análises das proteínas presentes nas 37 bandas (Figura 16) selecionadas, possibilitou a identificação de 25, 49 e 150 proteínas das formas epimastigota e tripomastigotas de *T. rangeli* e tripomastigota de *T. cruzi*, respectivamente (Tabelas Suplementares 10 e 11). Já a análise sem o uso de gel das proteínas presentes na fração SEP possibilitou a identificação de 116 e 281 proteínas distintas *T. rangeli* e *T. cruzi*, respectivamente (Tabelas Suplementares 12 e 13).

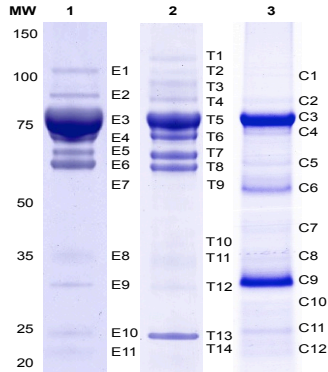


Figura 16: Perfil eletroforético (*NuPage* 4-12%) com 30 μ g das frações enriquecidas com proteínas de superfície (SEP) das formas epimastigota (1) e tripomastigota (2) de *Trypanosoma rangeli* (1) e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (3), corados com Azul de Coomassie G-250. As bandas identificadas com os códigos indicados no lado direito foram submetidas a análise de espectrometria de massas (LC-MS/MS) e são equivalentes aos códigos da Tabelas Suplementares 10 e 11.

Entre as proteínas de *T. rangeli*, 42 (31%, n=138) e 36 (26%, n=138) foram identificadas exclusivamente nas formas tripomastigotas e epimastigota, respectivamente, enquanto 60 (43%, n=138) foram encontradas em ambas as formas (Figura 17 A, esquerda). Em contrapartida, 128 (37%, n=343) das 343 proteínas identificadas em *T. cruzi* foram encontradas em ambas as formas, enquanto 157 (46%, n=343) apenas na forma tripomastigota e 58 (17%, n=343) proteínas foram exclusivamente encontradas na forma epimastigota (Tabela 4, Figura 17 A, direita). Estes resultados foram superiores, em termos quantitativos, aos apresentados por Cordero e colaboradores (2009), que identificaram 98 proteínas em formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, utilizando uma estratégia para a identificação das proteínas (MudPIT, do inglês "*Multidimensional Protein Identification Technology*") diferente das utilizadas neste trabalho.

Contudo, nossos resultados apontam para uma maior diferença e complexidade relacionadas a quantidade total de diferentes proteínas de superfície entre as formas de *T. cruzi* analisadas neste trabalho do que entre as formas de *T. rangeli*.

Tabela 3: Características encontradas nas proteínas identificadas em espectrometria de massas das frações (SEP) das formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* pelas abordagens proteômicas utilizadas.

	<i>Trypanosoma rangeli</i>				<i>Trypanosoma cruzi</i>			
	Ambos ^a	Epi	Tripo	Total	Ambos ^a	Epi	Tripo	Total
Proteínas	60	36	42	138	128	58	157	343
Âncora GPI	15	7	15	37	5	5	28	38
Peptídeo sinal / via secretória	22	14	13	49	30	20	43	63
TMD ^b	27	19	13	59	50	29	60	139
Miristolação / prenilação	2	0	1	3	5	3	2	10
Localização								
Extracelular ^c	23	10	16	49	20	10	31	61
Membrana Plasmática	10	11	8	29	33	13	35	81
Outra ^d	27	15	18	60	75	35	91	201
Sem PTM^e	22	12	11	45	67	24	74	165

^a Proteínas identificadas em ambas as formas dos parasitos;

^b Domínios trans-membranares (TMD): proteínas com pelo menos um TMD;

^c Incluídas proteínas com sinal para retículo endoplasmático;

^d Localizações: Citosol, citoesqueleto, mitocôndria, peroxissomo ou núcleo;

^e PTM: Modificação pós-traducional.

5.3.3 Localização celular e classificação funcional das proteínas presentes na fração enriquecida com proteínas de superfície de *Trypanosoma rangeli*

Dentre as proteínas de superfície não redundantes, 93 (67%, n=138) e 178 (52%, n=343) proteínas de *T. rangeli* e de *T. cruzi*, respectivamente, apresentam pelo menos uma modificação pós-traducional (âncora de GPI, miristoil ou prenil), um domínio trans-membranar (TMD) ou endereçamento para a membrana plasmática, para o espaço extracelular ou para uma via secretória (Figura 17 B, Tabelas Suplementares 10, 11, 17 e 18), que confirmam a presença destas proteínas na fração SEP.

Das 93 proteínas de *T. rangeli*, 47 apresentam funções conhecidas como sialidasas, GP63, proteína tipo mucina, proteína de superfície ToIT, glicoproteína de adesão do flagelo e proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP) (Tabelas Suplementares 10 e 12).

Apesar da eficiência deste método em obter uma fração enriquecida com proteínas de superfície (Figura 12), foram observadas proteínas solúveis que não foram completamente removidas durante as etapas de fracionamento celular (Figura 18). Além disto, proteínas presentes em organelas como os reservossomos (CORDERO *et al.*, 2009) e glicosossomos (SANT'ANNA *et al.*, 2009) apresentam características físico-químicas para serem solubilizadas pelo Triton X-114, como por exemplo a presença de domínios trans-membranares.

Entre todas as 138 proteínas não redundantes de *T. rangeli* identificadas, 59 (43%, n=138) foram descritas como hipotéticas ou hipotéticas conservadas ou com função desconhecida, enquanto 79 (57%, n=138) apresentam função conhecida (Tabela 5). Estas proporções são similares as observadas em outros organismos (ATWOOD *et al.*, 2005; CORDERO *et al.*, 2009). Assim, como no caso do perfil 2-D das proteínas solúveis de *T. rangeli*, estes dados são reflexo do alto número de genes hipotéticos descritas nos genomas dos protozoários, acarretando dificuldade na caracterização funcional das proteínas de *T. rangeli*, e consequentemente, na interpretação da significância biológica destas proteínas no metabolismo e na interação com os hospedeiros.

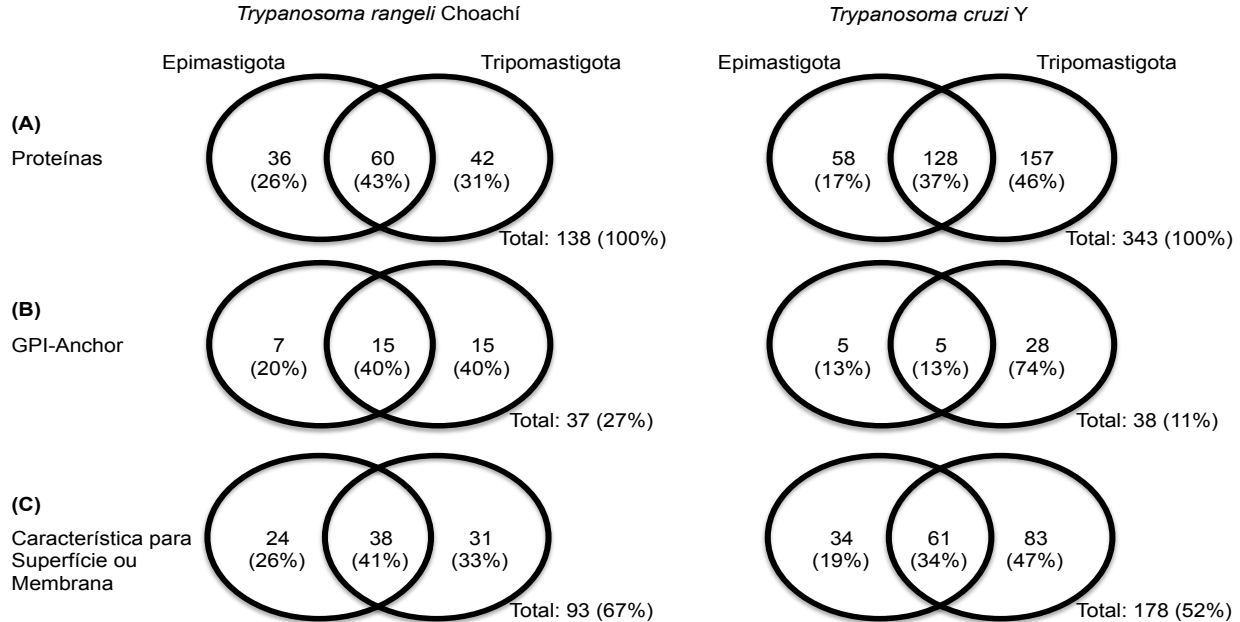


Figura 17: Diagrama de Venn com a comparação entre a quantidade de proteínas encontradas na fração enriquecida com proteínas de superfície (SEP) das formas epimastigota e tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*. (A) Número de proteínas identificadas; (B) proteínas com sítio para âncora de GPI; (C) Proteínas com característica para superfície celular ou membrana plasmática (pelo menos uma PTM ou sinalização para membrana plasmática ou extracelular).

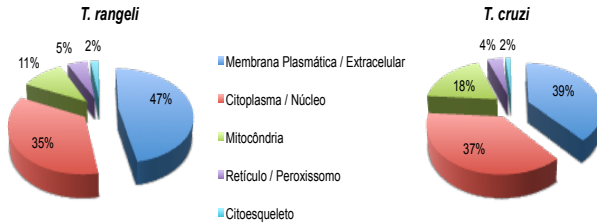


Figura 18: Localização celular das 138 e 348 proteínas identificadas por MS/MS na fração SEP das formas tripomastigota e epimastigota de *Trypanosoma rangeli* e de *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, preditas através do software *Wolf-Psort*.

A estas proteínas também foi inferida uma classificação funcional através do GO. Das 138 proteínas presentes na fração SEP de *T. rangeli* e das 343 presentes em *T. cruzi*, 63 (46%, n=138) e 224 (65%, n=343) proteínas foram classificadas em pelo menos uma das três ontologias da GO, respectivamente (Tabelas Suplementares 14 e 15). Entre os processos biológicos, pode-se observar que a proporção de proteínas associadas a categoria de transporte foi muito similar em ambos os parasitos, *T. rangeli* (22%) e *T. cruzi* (23.4%). Já com relação ao componente celular, 46% e 65% das proteínas das frações SEP de *T. rangeli* e *T. cruzi*, respectivamente, foram associadas à membrana plasmática ou à mitocôndria. As atividades de exo-alfa-sialidase, GTPase e fosfolipases foram as mais frequentes funções moleculares anotadas pelo GO em *T. rangeli* (35.7%).

5.3.4 Proteínas de superfície de *Trypanosoma rangeli*

Comparando as proteínas presentes na fração SEP de *T. rangeli* com os dados do transcriptoma do *T. rangeli* (GRISARD *et al.*, 2010), apenas 71 proteínas (51%, n=138) haviam sido previamente identificadas no nível de RNA como por exemplo, proteínas tipo mucinas (mucina-like) e a metaloprotease GP63 (Tabela Suplementar 16). Contudo, foram identificadas novas proteínas de *T. rangeli*, tais como, proteína de superfície ToIT e a glicoproteína de adesão do flagelo.

O enriquecimento de proteínas ancoradas em GPI através do fracionamento celular com X-114 tem sido

amplamente utilizado (KO e THOMPSON, 1995; ANEZ-ROJAS *et al.*, 2006; CORDERO *et al.*, 2009; NAKAYASU, YASHUNSKY, *et al.*, 2009). Apesar do amplo conhecimento da complexidade da superfície celular do *T. cruzi* (CORDERO *et al.*, 2009; NAKAYASU, YASHUNSKY, *et al.*, 2009), apenas 11% (38, n=343) das proteínas da superfícies de *T. cruzi* apresentaram ancoramento a GPI preditos, enquanto em 27% (37, n=138) das proteínas da superfície do *T. rangeli* apresentaram este tipo de ancoramento. Embora a quantidade absoluta de proteínas ancoradas a GPI sejam similares nas frações SEP destes dois parasitos, fica claro uma maior proporção deste tipo de proteínas em *T. rangeli* do que em *T. cruzi* (Figura 17 C). Entretanto, *T. cruzi* apresenta aproximadamente 2,5 vezes mais proteínas distintas na fração SEP do que *T. rangeli*, o que reforça a existência de uma maior diversidade de proteínas na superfície do *T. cruzi* do que do *T. rangeli*, o que pode estar relacionado com as naturezas patogênicas e não patogênicas destas espécies, respectivamente (Tabela Suplementar 17 e 18).

Comparando as proteínas ancoradas em GPI entre as formas epimastigota e tripomastigota, foram encontradas 15 (40%, n=37) proteínas em ambas as formas de *T. rangeli*, em contrapartida apenas 5 (13%, n=38) distintas proteínas ancoradas em GPI foram observadas em ambas as formas de *T. cruzi*, sugerindo um repertório desta classe de proteínas muito similar entre as formas do *T. rangeli* (Figura 17).

Entre estas 37 proteínas ancoradas em GPI de *T. rangeli*, 26 apresentaram peptídeos de endereçamento para a superfície do parasito (extracelular e membrana plasmática), sendo principalmente as sialidase, GP63, proteína tipo mucina e glicoproteína de adesão do flagelo. Outras três apresentaram endereçamento para a mitocôndria, uma para o peroxissomo e as demais para outros componentes celulares. A maioria destas proteínas foram encontradas nas formas tripomastigotas de *T. rangeli* (15) e *T. cruzi* (28) (Figura 17 C).

Tabela 4: Proteínas na fração SEP de *Trypanosoma rangeli* identificas por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS) em ambas as abordagens proteômicas utilizadas, com função predita e identificada nas bases de dados.

Proteína ^a	Código	Forma ^b	MW ^c	Peptídeos exclusivos	
				E	T
<i>14-3-3 protein</i>	TR00226	T	30		3
<i>Aldehyde dehydrogenase</i>	TR03125	T	51		5
<i>Ama1 protein</i>	TR06390	B	19	2	2
<i>Aminopeptidase, putative</i>	contig03424.74	T	109		5
<i>ChaperoninHSP60, mitochondrial precursor</i>	TR06127	B	60	7	9
<i>COP-coated vesicle membrane protein erv25 precursor</i>	TR02358	T	28	3	
<i>Cytochrome P450</i>	TR01631	E	67	3	
<i>Extracellular receptor, putative</i>	contig04182.6	B	97	3	11
<i>Flagellar calcium-binding protein</i>	TR01599	B	23	6	8
<i>Flagellum-adhesion glycoprotein, putative</i>	contig00444.4	T	62		2
<i>Gim5A protein</i>	TR00090	E	27	7	
<i>Glucosamine-6-phosphate isomerase</i>	TR01674	B	32	4	2
<i>Golgi/lysosome glycoprotein</i>	TR02368	B	68	2	6
<i>Group II trans-sialidase superfamily</i>	contig00118.10	B	84	4	4

<i>Haloacid dehalogenase-like Hydrolase</i>	TR00831	T	31		2
<i>Heat shock protein 85</i>	TR00837	B	81	9	20
<i>I/6 autoantigen</i>	TR00726	B	22	7	12
<i>Malic enzyme</i>	TR00259	E	63	4	
<i>Mucin-like glycoprotein</i>	contig00371.3	T	32		2
<i>P450 reductase</i>	TR00564	E	69	9	
<i>Rab7 GTP binding protein</i>	TR04957	B	24	7	4
<i>Reiske iron-sulfur protein precursor</i>	TR03577	T	34		8
<i>Sialidase</i>	contig03514.7	B	96	2	4
<i>Sialidase</i>	contig03708.15	T	103		2
<i>Surface protease GP63</i>	TR07133	B	73	2	3
<i>Surface protease GP63</i>	contig05156.2	B	63	3	3
<i>Surface protease GP63</i>	TR07104	B	58	2	2
<i>Surface protease GP63</i>	TR05051	B	51	2	3
<i>Surface protein TolT</i>	contig06375.4	T	34		2
<i>Vacuolar-type proton Translocating pyrophosphatase</i>	TR01468	T	78		5

^a Nomes das proteínas identificadas foram obtidos diretamente dos bancos de dados;

^b Proteínas identificadas: (B) ambas as formas; (E) Epimastigota; (T) Tripomastigota

^c MW: Massa molecular relativa (kDa) teórica.

Na banda de proteína mais proeminente em ambas as formas de *T. rangeli* (Figura 16, bandas E3 e T5) foi identificada uma sialidase de *T. rangeli* (TrSial) (contig00118.10), que é considerada um importante antígeno associada a soro reatividade cruzada com *T. cruzi* (SALDANA *et al.*, 1998; SALDANA *et al.*, 2002). Esta proteína tem como massa *Mr* teórica de 84 kDa, porém foi observada em uma banda com *Mr* 73 kDa. Esta diferença entre a *Mr* teórica e observada pode ser em virtude da perda de 106 aminoácidos, correspondente à cauda hidrofóbica, durante o processamento de ancoramento a GPI.

As proteínas membros da família das trans-sialidasas são caracterizadas pela presença de três distintos motivos: i) catalítico FRIP (xRxP); ii) ASP (SxDxGTW); e iii) VTV or FLY (VTVxNVxLYNR) (FRASCH, 2000). Contudo, as sialidasas de *T. rangeli* não apresentam o motivo FRIP, levando a perda da função de trans-sialidase (PONTES-DE-CARVALHO *et al.*, 1993).

Embora poucas sialidasas tenham sido descritas para o *T. rangeli* (TrGP1, 2 e 4) (PENA *et al.*, 2009) e a expressão destas tenha sido confirmada em nível de RNA (GRISARD *et al.*, 2010), novas sialidasas foram encontradas neste trabalho. Seis distintas TrSial foram identificadas, embora apenas cinco destas apresentaram motivos ASP e VTV. Além disto, estas seis TrSial podem ser classificadas em três distintos grupos, baseadas na distribuição dos motivos nestas sequências: i) proteínas com um motivo VTV preservado e dois motivos ASP (Contig00118.10 e contig00819.22), similares às proteínas previamente reportadas por Pena e colaboradores (2009); e dois novos grupos, ii) proteínas com um motivo VTV e um ASP (contig00199.7), e iii) proteínas com um motivo VTV degenerado e a presença de um motivo FRIP (contig03514.7 e contig03708.15) (Figura 19). Estes grupos apresentam características similares às apresentadas por Freitas e colaboradores (2011), que caracterizaram oito distintos grupos de sialidasas em *T. cruzi* (TcS) de acordo com a distribuição destes mesmos motivos, onde o primeiro grupo de TrSial é similar ao grupo TcSgroup II, o segundo grupo TrSial com o grupo TcSgroup III e o último grupo com o grupo TcSgroup VII.

Outra proteína ancorada em GPI encontrada em ambas as formas do *T. rangeli* foi a metaloprotease GP63. As

metaloproteases GP63 compreendem uma família gênica bastante diversa (EL-SAYED *et al.*, 2005) com distintas isoformas descritas em *T. cruzi* (CUEVAS *et al.*, 2003) e *L. major* (ETGES *et al.*, 1986). Embora a identificação do gene da gp63 tenha sido reportada em *T. rangeli* (GRISARD *et al.*, 2010), a expressão destas proteínas ainda não havia sido reportada para este parasito. Neste estudo, identificamos quatro distintas metaloproteases (similar a GP63): 73 kDa (TR07133), 63 kDa (contig05156.2), 53 kDa (TR07104) e 51 kDa (TR05051). O motivo catalítico (HEXXHXXGXX) (Apêndice B) (MA *et al.*, 2011) foi encontrado em todas as quatro proteínas GP63 identificadas, sugerindo a presença de pelo menos quatro isoformas de metaloproteases na superfície do *T. rangeli*.

Uma proteína tipo mucina de *T. rangeli* com 33 kDa (*TrSMUG-L-like protein*, contig00371.3) foi identificada apenas na superfície das formas tripomastigota de *T. rangeli*. Em *T. cruzi*, as mucinas são importantes proteínas associadas com a adesão do parasito à célula hospedeira e, conseqüentemente, na invasão das células, pois estas proteínas glicoconjugadas (N-acetilglucosamina oligossacarídeos O-ligados) (GlcNAc) são aceptores do ácido siálico transferido pelas trans-sialidasas na superfície do *T. cruzi* (BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

Estas mucinas de *T. cruzi* são divididas em dois grandes grupos, TcMUC e TcSMUG. O grupo das TcMUC é formado por uma família gênica bastante polimórfica, sendo subdividida em dois grupos, TcMUCI and TcMUCII, baseado no número de genes em sequência encontrados no genoma (FRASCH, 2000). Já o grupo TcSMUG são proteínas de *T. cruzi* com massa molecular relativa (*Mr*) entre 35/50kDa encontradas apenas na superfície das formas encontradas nos hospedeiros invertebrados (NAKAYASU, YASHUNSKY, *et al.*, 2009) e, diferentemente das outras, elas não desempenham o papel de acceptor do ácido siálico em *T. cruzi* (URBAN *et al.*, 2011).

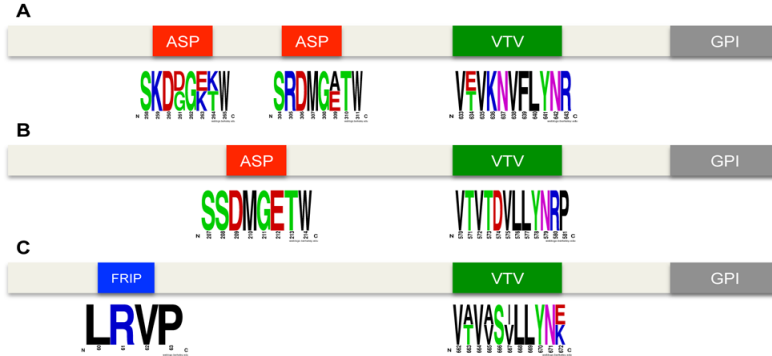


Figura 19: Esquema demonstrando as características dos grupos de sialidase de *Trypanosoma rangeli* (TrSial) encontrados neste estudo, de acordo com a presença e quantidade de motivos ASP (vermelho), VTV (verde) e FRIP (azul). Abaixo de cada motivo está apresentada a sequência consenso encontrada nas diferentes proteínas que compõem o grupo.

Além destas típicas mucinas, já foram reportadas em *T. cruzi* proteínas conhecidas como proteínas tipo mucinas (*TcMUG-Like*), porém estas não foram identificadas em *T. rangeli* até o momento (ABATE *et al.*, 2005).

Entretanto, análises *in silico* (HANSEN *et al.*, 1998; EMANUELSSON *et al.*, 2007; POISSON *et al.*, 2007) de uma proteína de *T. rangeli* identificada neste trabalho (contig00371.3) possibilitou a identificação das características típicas esperadas para estas proteínas tipo mucinas: peptídeo sinal na região N-terminal, sítio de ancoramento a GPI, cauda hidrofóbica na região C-terminal, 27 sítios de O-glicosilação, e uma região rica em treonina na porção final da proteína (Figura 20). A identificação de peptídeos referentes a esta proteína na fração SEP da forma tripomastigota de *T. rangeli* e estas características preditas sugerem, pela primeira vez, a presença de uma proteína TrSMUG-L-like na superfície da forma tripomastigota do *T. rangeli*.

Outras proteínas ancoradas em GPI identificadas na superfície da forma tripomastigota de *T. rangeli* foram a proteína de superfície ToIT e a glicoproteína de adesão do flagelo. A primeira está associada a indução da resposta imune via células T em camundongos infectados com *T. cruzi* (QUANQUIN *et al.*,

1999), desta forma, a proteína ortóloga TolT de *T. rangeli* identificada neste trabalho, pode estar envolvida na indução da resposta imune protetora contra *T. cruzi* em animais infectados com *T. rangeli* e desafiados posteriormente com *T. cruzi* (BASSO *et al.*, 2008). A segunda proteína, glicoproteína de adesão do flagelo, pode estar envolvida na adesão do flagelo no corpo do parasito (COOPER *et al.*, 1993; NOZAKI *et al.*, 1996) e durante o processo de citocinese celular (LACOUNT *et al.*, 2002).



Figura 20: Sequência e características da proteína tipo mucina de *Trypanosoma rangeli* (TrSMUG-like, contig00371.3). Esta proteína apresenta todas as características da família de mucinas SMUG-L-like de *Trypanosoma cruzi*: presença do peptídeo sinal na região N-terminal da proteína (linha superior); sítios de O-glicosilação (asteriscos); sítio para ancoramento a GPI (ω); e cauda hidrofóbica na região C-terminal (sublinhado). As sequências com fundo amarelo indicam os peptídeos identificados por espectrometria de massas (LS-ESI-MS/MS).

Além destas proteínas ancoradas em GPI, uma proteína de 24 kDa ancorada na membrana plasmática através de ancora miristoil, proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP), também foi identificada na superfície de ambas as formas do *T. rangeli*. Sabe-se que esta proteína está envolvida na montagem e funcionalidade do flagelo. O gene desta proteína de *T. rangeli* foi descrito por Porcel e colaboradores (1996) e segundo estes autores, apesar da alta homologia com a proteína homóloga de *T. cruzi*, estas proteínas apresentam uma região bastante distinta na região N-terminal, que pode ser útil para o diagnóstico diferencial deste parasito.

5.4 Antígenos de superfície do *Trypanosoma rangeli* com potencial aplicação no diagnóstico específico

Apesar de vários autores terem discutido a reatividade sorológica cruzada entre *T. cruzi* e *T. rangeli*. (SALDANA e SOUSA, 1996b; DE MORAES *et al.*, 2008), poucos trabalhos utilizam proteínas de superfície como fontes de antígenos para avaliar esta resposta sorológica cruzada (ANEZ-ROJAS *et al.*, 2006).

Como mencionado anteriormente, as proteínas de superfície são importantes antígenos com potencial uso no diagnóstico diferencial entre *T. cruzi* e *T. rangeli*. Segundo Añez-Rojas e colaboradores (2006), as proteínas solúveis ao Triton X-114, especialmente as proteínas ancoradas em GPI, podem servir como fontes de antígenos para o diagnóstico sorológico diferencial entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, devido ao reconhecimento específico destas proteínas apenas pelo antissoro homólogo de animais imunizados com estas proteínas.

Objetivando verificar o uso destas proteínas de superfície no diagnóstico diferencial destes dois parasitos, realizamos ensaios de *immunoblotting* 1-D utilizando as fração SEP das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* com antissoros de animais experimentalmente infectados (Figura 21). Como esperado, as proteínas de superfície de *T. rangeli* foram fortemente reconhecidas pelo antissoro homólogo (anti-*T. rangeli*) (Figura 21 B, linha 1), e várias proteínas de *T. cruzi* foram reconhecidas pelo antissoro heterólogo (anti-*T. rangeli*) (Figura 21 B, linha 2). Em contrapartida, poucas proteínas da superfície de *T. rangeli* foram fracamente reconhecidas pelo antissoro heterólogo (anti-*T. cruzi*) (Figura 21 C, linha 1). Estes dados são distintos dos propostos por Añez-Rojas *et al.* (2006), que demonstrou apenas uma proteína da fração SEP da forma epimastigota de *T. cruzi* (30kDa) e outra de *T. rangeli* (28kDa) fracamente reconhecidas pelos antissoros heterólogos obtidos de coelhos imunizados com a fração SEP da forma epimastigota. Esta discrepância de dados pode estar relacionada aos diferentes modelos utilizados de infecção e imunização entre o nosso trabalho e de Añez-Rojas e colaboradores (2006).

Conforme apresentado na figura 21, utilizando antígenos de superfície, é possível observar que a reatividade sorológica

cruzada proposta para estes parasitos não é recíproca, devido ao reconhecimento mais acentuado dos antígenos de *T. cruzi* pelo antissoro heterólogo (anti-*T. rangeli*) do que os antígenos de *T. rangeli* reconhecidos pelo antissoro anti-*T. cruzi*, indicando a real possibilidade de diagnósticos falso-positivos em pacientes infectados apenas com *T. rangeli*.

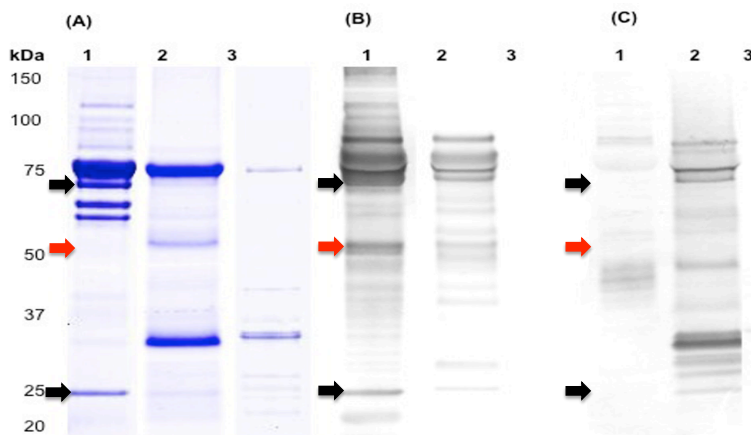


Figura 21: Análise de *immunoblotting* das frações da superfície (SEP) das formas tripomastigotas de *Trypanosoma rangeli* (1), de *Trypanosoma cruzi* (2) e de células Vero (3), com aproximadamente 25µg das proteínas da fração SEP resolvidas em NuPage 4-12%. (A) gel corado com Azul de Coomassie G-250; anti-*T. rangeli* (1:600) (B) e anti-*T. cruzi* (1:600) (C). Antissoros de animais saudáveis foram utilizados e não houve reconhecimentos de proteínas em ambos os extratos (não apresentado). Boxes indicam regiões reconhecidas exclusivamente pelo antissoro homólogo. Setas indicam bandas com proteínas de *T. rangeli* reconhecidas exclusivamente pelo antissoro homólogo, identificadas por espectrometria de massas GP63 e FCaBP (setas pretas) e não identificadas (setas vermelhas).

Devido a forma tripomastigota de *T. rangeli* ser uma forma sanguínea e este parasito não apresentar forma intracelular, a resposta imune observada pode ser similar a resposta do hospedeiro para *T. brucei*. As proteínas VSG, também proteínas de superfície ancoradas em GPI, são consideradas antígenos imunodominantes de *T. brucei* e induzem fortemente a resposta humoral nestes hospedeiros (REINITZ e MANSFIELD, 1990; MANSFIELD, 1994). Além disto, grande parte dos constituintes antigênicos de *T. cruzi* são

provenientes da superfície (SOUTO-PADRON *et al.*, 1989; DE MARCHI *et al.*, 2011; THOMAS *et al.*, 2012) ou até mesmo secretados (UMEZAWA *et al.*, 1996; MATSUMOTO *et al.*, 2002). Desta forma, podemos especular que a superfície das formas tripomastigotas de *T. rangeli* apresentam grande potencial antigênico, compreendendo os principais alvos para a resposta humoral dos hospedeiros contra o *T. rangeli* descrita por Zuñiga e colaboradores (2007).

Embora proteínas da forma epimastigota de *T. cruzi* tenham sido reportadas como marcadores específicos para este parasito (PEREIRA *et al.*, 2000; NAKAZAWA *et al.*, 2001) e para *T. rangeli* (SALDANA *et al.*, 1998; ANEZ-ROJAS *et al.*, 2006), a presente análise proteômica comparativa da superfície da forma tripomastigota de *T. rangeli* e *T. cruzi* possibilitou a detecção de um considerável número de proteínas específicas de *T. rangeli*. Como podemos observar na figura 21 (B linha 1), proteínas de superfície com Mr observadas de aproximadamente 25kDa (TR13), 70kDa (TR6), 75kDa (TR5) e 90kDa (TR4) (Tabela 6) foram exclusivamente identificadas nas formas tripomastigotas de *T. rangeli* e fortemente reconhecidas pelo soro homólogo, tornando estas potenciais alvos para marcadores específicos no diagnóstico de *T. rangeli*.

Após a identificação destes potenciais marcadores, realizamos a predição de epítomos lineares ligantes em células B presentes nas proteínas identificadas na fração SEP de *T. rangeli* e de *T. cruzi*, pois segundo Horna e colaboradores (HORNA *et al.*, 1997) as infecções de *T. rangeli* em roedores produzem elevados índices séricos de anticorpos, tanto IgM quanto IgG. Desta forma, foram identificados 185 epítomos em 95 proteínas SP de *T. rangeli* (Tabela Suplementar 19) e 561 epítomos em 230 proteínas SP de *T. cruzi* (Tabela Suplementar 20).

Entre os epítomos de *T. rangeli*, 114 (61%, n=185) não apresentaram similaridade significativa (> 60%) com proteínas de *T. cruzi* e destes, 78 (68%, n=114) foram encontrados em proteínas com predição de localização na superfície do parasito (membrana plasmática ou extracelular). Interessante que dentre os 71 (29%, n=185) epítomos com similaridade às proteínas de *T. cruzi* a maioria, 45 (62%, n=71) foram preditos a partir de proteínas localizadas em outras regiões como núcleo ou citosol.

Similarmente, 429 (76%, n=561) epítomos preditos para *T. cruzi* não apresentaram similaridade com proteínas homólogas de *T. rangeli*. enquanto apenas 132 (26%, n=561) apresentam similaridade com alguma proteína de *T. rangeli*.

Desta forma, estes dados sugerem a presença de epítomos espécie-específicos em proteínas de superfície do *T. rangeli* identificadas na fração SEP com potencial aplicação no diagnóstico sorológico deste parasito. Na tabela 6 (Tabela suplementar 19) estão sendo apresentados 21 possíveis epítomos lineares ligantes em célula B preditos nas proteínas presentes da fração SEP identificadas apenas pelo antissoros homólogos.

De acordo com Zhao e Li (2010), epítomos com boa capacidade antigênica e de ligação a anticorpos não devem apresentar grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, porém segundo Kringelum e colaboradores (KRINGELUM *et al.*, 2013), estes epítomos devem conter uma região central com alguns (poucos) aminoácidos hidrofóbicos e flanqueados com aminoácidos carregados. Utilizando estes critérios, vários epítomos listados na tabela 6 podem ser descartados em uma primeira análise pela presença de vários resíduos hidrofóbicos.

Dentre todos estes epítomos preditos podemos listar pelo menos três pertencentes às proteínas de superfície GP63 (70kDa) e a proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP) (25kDa) como potenciais marcadores específicos para *T. rangeli*, baseados na característica de antigenicidade, menor quantidade de resíduos hidrofóbicos e na diferença com as proteínas homólogas de *T. cruzi* (Tabela 6).

Dentre estas proteínas, a proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP) de *T. rangeli* (Figura 22 A) já foi relatada como um potencial marcador específico para o *T. rangeli*, mesmo considerando a alta similaridade com a proteína homóloga de *T. cruzi* (PORCEL *et al.*, 1996). A ausência de seis resíduos na porção N-terminal desta proteína em relação a proteína homóloga de *T. cruzi* (Figura 22 C), confere a distinção de um epítomo exclusivo ao *T. rangeli* (SKSSAGNKDGKSATD) que pode ser responsável pelo forte reconhecimento específico do antissoro homólogo nesta região (Figura 22 B, linha 1), tornando este peptídeo um potencial marcador específico para o *T. rangeli* em diagnóstico sorológico diferencial ao *T. cruzi*.

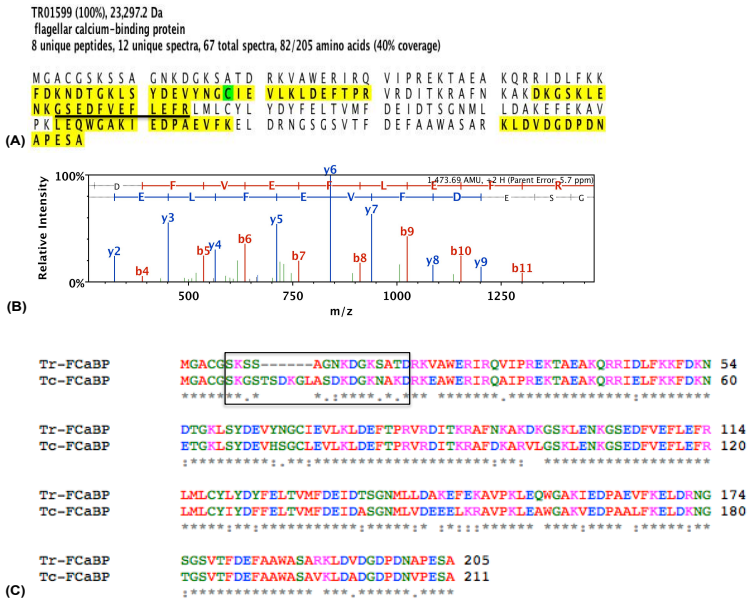


Figura 22: Proteína flagelar ligadora de cálcio (FCaBP) de *Trypanosoma rangeli* identificada por MS/MS na banda TR13 (Figura 21) e reconhecida pelo soro homólogo. (A) Sequência da proteína e cobertura (40%) obtida na análise LC-ESI-MS/MS, os peptídeos com fundo amarelo foram validados pelo programa Scaffold; (B) Espectro MS/MS do peptídeo sublinhado, representando a boa qualidade de identificação das proteína; (C) Alinhamento da proteína FCaBP de *T. rangeli* (TR01599) com a proteína homóloga de *T. cruzi* (Tc00.1047053507891.47). O quadro na figura C indica a região com menor similaridade entre as duas proteínas e onde está localizado o epítipo com potencial marcador diferencial para *T. rangeli* (Tabela 6).

Tabela 5: Lista de epítomos lineares ligantes em células B preditos das proteínas de superfície do *Trypanosoma rangeli* identificadas apenas pelos antissoro homólogo, sem similaridade (ou <60%) com proteínas de *T. cruzi*.

Código	Proteína ^a	B ^b	Mr ^c	Lo ^d	Epítopo	Score ^e
TR07133	<i>Surface protease GP63</i>	TR4	90	SP	TKPPPKEGEEYG	2,06
TR06873	<i>Trans-sialidase</i>	TR4	90	SP	GVPPGGSSQ	1,96
contig04199.3	<i>Trans-sialidase</i>	TR4	90	SP	ASPLGGQPPSVSPR	1,81
TR06718	<i>Hypothetical protein</i>	TR5	75	MT	DNNHVPGDNGGDSSV	1,68
contig00118.10	<i>Group II trans-sialidase superfamily</i>	TR5	75	SP	EGGDSAGYD	1,63
TR01599	<i>Flagellar calcium-binding protein</i>	TR13	25	MT	SKSSAGNKDGKSATD ^f	1,58
TR06390	<i>Ama1 protein</i>	TR13	25	SP	QVNPGGDVRYYP	1,57
contig05156.2	<i>Surface protease GP63</i>	TR6	70	SP	KKPEGEDRK	1,55
TR06390	<i>Ama1 protein</i>	TR13	25	SP	YAPPPPLVTP	1,49
TR07133	<i>Surface protease GP63</i>	TR4	90	SP	DTVTGSRPPFN	1,45
contig04199.3	<i>Trans-sialidase</i>	TR4	90	SP	FGGGGTAPT	1,37
contig03514.7	<i>Trans-sialidase</i>	TR1	115	SP	QEPTEIPMGAGPGS	1,32
TR07133	<i>Surface protease GP63</i>	TR4	90	SP	VPPEHRSEGV	1,31
contig05156.2	<i>Surface protease GP63</i>	TR6	70	SP	EEDDTGVQG ^f	1,27
TR02368	<i>Golgi/lysosome glycoprotein</i>	TR6	70	SP	EDKATGNVNT	1,26
contig03514.7	<i>Trans-sialidase</i>	TR1	115	SP	DSGHTGGLN	1,23

TR02368	<i>Golgi/lysosome glycoprotein</i>	TR6	70	SP	KKGEKDPCHV	1,21
contig05156.2	<i>Surface protease GP63</i>	TR6	70	SP	GQTLPGSLT	1,15
TR02368	<i>Golgi/lysosome glycoprotein</i>	TR6	70	SP	QGNERQGFAGAGGE	1,13
contig00118.10	<i>Group II trans-sialidase superfamily</i>	TR5	75	SP	TPTRSEITWEPG	1,13
TR06390	<i>Ama1 protein</i>	TR13	25	SP	PMEVQRPQRD	1,13
contig05156.2	<i>Surface protease GP63</i>	TR6	70	SP	SRKPSNACVEG ^f	1,10

^a Nomes das proteínas identificadas foram obtidos diretamente dos bancos de dados;

^b Identificação das bandas correspondentes a figura 16;

^c Massa molecular relativa (*Mr*) das bandas da figura 16;

^d Lo: Localização celular predita da proteína;

^e *Score*: valor de score do epitopo determinado pelo programa BepiPred (ponto de corte > 0,9) (Larsen et. al., 2006).

^f Peptídeos com potencial antigênico e como marcador diferencial.

Com base nos resultados ao longo deste trabalho, podemos afirmar que a análise proteômica comparativa das proteínas de superfície de *T. rangeli* e *T. cruzi*, combinada com a análise de *immunoblotting*, possibilitou a detecção e identificação de potenciais proteínas e peptídeos marcadores diferenciais de *T. rangeli* em relação ao *T. cruzi*. Tornando este o primeiro estudo que identifica proteínas de superfície da forma tripomastigota de *T. rangeli* e *T. cruzi* como fontes de antígenos destes dois parasitos com aplicabilidade no diagnóstico sorológico diferencial.

As proteínas, GP63 e FCaBP estão sendo expressas heterologicamente em sistema bacteriano para a obtenção de anticorpos monoclonais e a caracterização destas proteínas de *T. rangeli*.

Também, ensaios de *immunoblotting* utilizando soros de pacientes chagásicos e as proteínas de superfície das formas tripomastigota de *T. rangeli* e *T. cruzi* estão sendo realizados. Da mesma forma, os epítomos preditos de *T. rangeli* apresentados neste trabalho foram sintetizados e ensaios de ELISA utilizando estes epítomos serão realizados utilizando antissoros de camundongos experimentalmente infectados e de pacientes chagásicos.

Além disto, este trabalho servirá de apoio para as análises do genoma do *T. rangeli* que está em fase final de anotação, pois confirma a expressão de genes preditos no genoma deste parasito.

6 CONCLUSÕES

- Neste trabalho apresentamos o primeiro mapa do perfil proteômico 2-D da forma tripomastigota diferenciada *in vitro* de *T. rangeli*, o qual revela a maioria dos *spots* proteicos resolvidos entre a faixa de pI 4-8 e com massa molecular relativa entre 25 – 120 kDa;
- Através do perfil 2-D foram identificadas 137 proteínas distintas da forma tripomastigota do *T. rangeli*, sendo 76% proteínas citosólicas ou mitocondriais e destacando-se proteínas associadas a funções energéticas, à resposta ao estresse, proteínas do citoesqueleto, além de várias proteínas sem função definida;
- A avaliação da reatividade sorológica cruzada utilizando proteínas solúveis de *T. rangeli* e de *T. cruzi* e antissoros homólogos e heterólogos revelou que o reconhecimento cruzado é menos intenso quando utilizadas proteínas das formas tripomastigotas;
- Proteínas solúveis nas faixas de 25 kDa e entre 75-100 kDa da forma tripomastigota diferenciada *in vitro* de *T. rangeli* são reconhecidas exclusivamente pelo antissoro homólogo, revelando-se promissores marcadores específicos para este parasito;
- O estudo das frações enriquecidas de proteínas de superfície (SEP) de *T. rangeli* e *T. cruzi* possibilitou a identificação de 138 e 343 distintas proteínas, respectivamente;
- Foram identificados três novas proteínas de *T. rangeli* presentes na superfície deste parasito, uma proteína tipo mucina (TrSMUG-L-like), uma glicoproteína de adesão ao flagelo e uma proteína de superfície ToIT;
- Dentre todas as proteínas de superfície de *T. rangeli* e de *T. cruzi* identificadas neste estudo, 31% e 46% foram observadas exclusivamente na forma tripomastigota de cada parasito, respectivamente;
- Além disto, as análises das frações SEP das formas epimastigota e tripomastigota de *T. rangeli* e *T. cruzi*, revelaram maior similaridade entre os perfis proteicos

das frações SEP das formas de *T. rangeli* do que de *T. cruzi*, sugerindo uma alteração significativa na expressão das proteínas de superfície ao longo do processo de diferenciação do *T. cruzi*, o que não foi observado para o *T. rangeli*;

- Dentre o rol de proteínas identificadas exclusivamente na superfície do *T. rangeli*, 27% são proteínas ancoradas em GPI, contrastando com apenas 11% das proteínas de superfície do *T. cruzi* ancoradas da mesma forma;
- Foi observado a presença de três distintos grupos de sialidases (TrSial) no proteoma da fração de superfície do *T. rangeli* (TrSial II, V e VII), sendo os dois últimos reportados para este parasito pela primeira vez neste estudo;
- A proteína tipo mucina (TrSMUG-L-like) de *T. rangeli* foi identificada apenas na fração de proteínas de superfície da forma tripomastigota deste parasito;
- Duas proteínas presentes na superfície das formas tripomastigotas de *T. rangeli* GP63 (70 kDa) e a FCaBP (24 kDa) foram reconhecidas exclusivamente por antissoro homólogo, tornando-as candidatas para a aplicação no diagnóstico específico do *T. rangeli*;
- Foram preditos por análise computacionais epítomos lineares ligantes a célula B presentes nas proteínas da fração proteica de superfície de *T. rangeli* sem similaridade com epítomos de *T. cruzi*, destacando os epítomos das proteínas GP63 e da FCaBP;
- A análise proteômica da superfície do *T. rangeli*, combinada com análises clássicas de *immunoblotting* demonstrou ser uma eficiente estratégia para a detecção de antígenos com potencial marcadores da infecção por *T. rangeli*.

REFERÊNCIAS

- ABATE, T. et al. A mucin like gene different from the previously reported members of the mucin like gene families is transcribed in *Trypanosoma cruzi* but not in *Trypanosoma rangeli*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 391-5, Jul 2005.
- ACOSTA, L. et al. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 6, p. 676-83, Jun 1991.
- ACOSTA-SERRANO, A. et al. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143-50, May 2001.
- AFCHAIN, D. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 4, p. 507-14, Aug 1979.
- AGRANOFF, D. et al. Proteomic fingerprinting for the diagnosis of human African trypanosomiasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 4, p. 154-7, Apr 2005.
- AGUSTI, R. et al. The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* is anchored by two different lipids. **Glycobiology**, v. 7, n. 6, p. 731-5, Sep 1997.
- ALI-KHAN, N.; ZUO, X.; SPEICHER, D. W. Overview of proteome analysis. In: (Ed.). **Current Protocols in Protein Science**. 2008/04/23: John Wiley and Sons, Inc., v.Chapter 22, 2003. p.Unit 22 1. ISBN 1934-3663 (Electronic).
- ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, n. 4, p. 467-77, Oct 2001.

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1 1997.
- AMORIM, M. I.; MOMEN, H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Trypanosoma rangeli: sequence analysis of beta-tubulin gene suggests closer relationship to Trypanosoma brucei than to Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, v. 53, n. 2, p. 99-105, Apr 1993.
- ANDRADE, H. M. et al. Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi resistance to Benznidazole. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 6, p. 2357-67, Jun 2008.
- ANEZ, N. et al. Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 2, p. 215-22, Feb 1999.
- ANEZ-ROJAS, N. et al. Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from Trypanosoma rangeli and Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, v. 97, n. 2, p. 140-5, Feb 2006.
- ANTHONY, R. L.; CODY, T. S.; CONSTANTINE, N. T. Antigenic differentiation of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli by means of monoclonal-hybridoma antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 6, p. 1192-7, Nov 1981.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D457-62, Jan 2010.
- ASSUMPCAO, T. C. et al. Insight into the salivary transcriptome and proteome of Dipetalogaster maxima. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 2, p. 669-79, Feb 4 2011.
- ATWOOD, J. A., 3RD et al. Glycoproteomics of Trypanosoma cruzi trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 12, p. 3376-84, Dec 2006.
- ATWOOD, J. A., 3RD et al. The Trypanosoma cruzi proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-6, Jul 15 2005.

AYUB, M. J. et al. Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 1, p. 30-4, Apr 24 2009.

BANNAI, H. et al. Cloning and expression of mitochondrial heat shock protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 926-33, Sep 2003.

BARFIELD, C. A. et al. A Highly Sensitive Rapid Diagnostic Test for Chagas Disease That Utilizes a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigen. **IEEE Transactions on Bio-medical Engineering**, v. 58, n. 3, p. 814-7, Mar 2011.

BARRELL, D. et al. The GOA database in 2009--an integrated Gene Ontology Annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database issue, p. D396-403, Jan 2009.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3407-17, Jun 2009.

BASSO, B.; MORETTI, E.; FRETES, R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 370-4, Jun 2008.

BASSO, B.; MORETTI, E. R.; VOTTERO-CIMA, E. *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. I. Comparative studies by polyacrylamide-gel electrophoresis. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 28, n. 3, p. 265-9, Jul-Sep 1986.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, Jul 15 2005.

BERRIMAN, M. et al. The architecture of variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 131-40, Jul 2002.

BERRIZBEITIA, M. et al. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 291-6, Feb 2006.

BJELLQVIST, B. et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 6, n. 4, p. 317-39, Sep 1982.

BOLOGNA, G. et al. N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1626-32, Jun 2004.

BOONJAKUAKUL, J. K. et al. Proteomic and immunoblot analyses of *Bartonella quintana* total membrane proteins identify antigens recognized by sera from infected patients. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2548-61, May 2007.

BORDIER, C. Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 25, p. 1604-1607, Sep 6 1980.

BORGES-PEREIRA, J. et al. Study of the infection and morbidity of Chagas' disease in municipality of Joao Costa: National Park Serra da Capivara, Piaui, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 315-22, Jul-Aug 2002.

BRASCHI, S. et al. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1471-82, Mar 2006.

BRENER, Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 13, n. 3, p. 171-8, May-Jun 1971.

_____. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 347-82, 1973.

BRIDGES, D. J. et al. Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. **Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 83-99, Jan 2008.

BRINGAUD, F. et al. Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 74, n. 1, p. 119-23, Oct 1995.

BRINGAUD, F.; RIVIERE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1-9, Sep 2006.

BRIONES, M. R. et al. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 219-32, Nov 30 1999.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3102-11, Sep 15 1995.

BROCKMAN, A. H.; ORLANDO, R.; TARLETON, R. L. A new liquid chromatography/tandem mass spectrometric approach for the identification of class I major histocompatibility complex associated peptides that eliminates the need for bioassays. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 11, p. 1024-30, 1999.

BROTHERTON, M. C. et al. Analysis of Membrane-Enriched and High Molecular Weight Proteins in *Leishmania infantum* Promastigotes and Axenic Amastigotes. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 8, p. 3974-85, Aug 3 2012.

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

BUSCAGLIA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229-36, Mar 2006.

BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A. C. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to

T. cruzi trans-sialidase. **Glycobiology**, v. 7, n. 8, p. 1167-73, Dec 1997.

BUSCHIAZZO, A. et al. Sequence of a Trypanosoma rangeli gene closely related to Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, n. 1, p. 115-6, Nov 1993.

CABALLERO, Z. C. et al. Evaluation of serological tests to identify Trypanosoma cruzi infection in humans and determine cross-reactivity with Trypanosoma rangeli and Leishmania spp. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 1045-9, Aug 2007.

CECCONI, D. et al. Proteomic analysis of pancreatic endocrine tumor cell lines treated with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. **Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1644-53, May 2007.

CHENG, M. Y. et al. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. **Nature**, v. 337, n. 6208, p. 620-5, Feb 16 1989.

CHIURILLO, M. A. et al. Detection of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 775-9, Sep 2003.

COELHO, V. T. et al. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like Leishmania using an immunoproteomic approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1430, Jan 2012.

COLASANTE, C. et al. Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form Trypanosoma brucei brucei. **Proteomics**, v. 6, n. 11, p. 3275-93, Jun 2006.

COOPER, R.; DE JESUS, A. R.; CROSS, G. A. Deletion of an immunodominant Trypanosoma cruzi surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. **Journal of Cell Biology**, v. 122, n. 1, p. 149-56, Jul 1993.

CORDERO, E. M. et al. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of Trypanosoma cruzi. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 7, p. 3642-52, Jul 2009.

COSTA, M. M. et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2172-84, May 6 2011.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009.

COURA, J. R. et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 278-9, May-Jun 1996.

CUERVO, C.; LOPEZ, M. C.; PUERTA, C. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 401-9, Sep 2006.

CUERVO, P. et al. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 154, n. 1, p. 6-21, Jul 2007.

CUEVAS, I. C.; CAZZULO, J. J.; SANCHEZ, D. O. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 10, p. 5739-49, Oct 2003.

D' ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R. e EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the kinetoplastida**. London: London Academic, v.3, 1976. p.327-403.

D' ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES, H. M. (Ed.). **Protozoal Diseases**: Arnold, 1999.

DA CUNHA, J. P. et al. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 268-77, Dec 2006.

- DANTAS-MAIA, T. O. et al. Seroprevalence of American trypanosomiasis in adults in an area of the western Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 436-42, Jul-Aug 2007.
- DE GODOY, L. M. et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2694-703, Aug 2012.
- DE MARCHI, C. R. et al. Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1850-5, Nov 2011.
- DE MIRANDA SANTOS, I. K.; PEREIRA, M. E. Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic South American trypanosomes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 5, p. 839-44, Sep 1984.
- DE MORAES, M. H. et al. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites and Vectors**, v. 1, n. 1, p. 20, Jan 1 2008.
- DE OLIVEIRA, M. A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 1, p. 22-6, Jan 2001.
- DE SOUSA, M. A. et al. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brazil). **Parasitology Research**, v. 103, n. 3, p. 697-703, Aug 1 2008.
- DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.
- DETKE, S. *Leishmania mexicana amazonensis*: development of a peptide tag useful for labeling and purifying biotinylated recombinant proteins. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 221-5, Mar 1 2007.

DIAS, F. B. et al. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceara, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 643-5, Aug 2007.

DIEZ, H. et al. Cellular location of KMP-11 protein in *Trypanosoma rangeli*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 1, p. 93-6, Spring 2008.

DOS SANTOS, S. L. et al. The MASP family of *Trypanosoma cruzi*: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1779, Aug 2012.

DRUMMELSMITH, J. Proteome Mapping of the Protozoan Parasite *Leishmania* and Application to the Study of Drug Targets and Resistance Mechanisms. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 2, n. 3, p. 146-155, Mar 1 2003.

DUNCAN, M. W. Good mass spectrometry and its place in good science. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 47, n. 6, p. 795-809, Jun 2012.

EDKINS, A. L.; LUDEWIG, M. H.; BLATCH, G. L. A *Trypanosoma cruzi* heat shock protein 40 is able to stimulate the adenosine triphosphate hydrolysis activity of heat shock protein 70 and can substitute for a yeast heat shock protein 40. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 8, p. 1585-98, Aug 2004.

EGER-MANGRICH, I. et al. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines in vitro. **Parasitology Research**, v. 87, n. 6, p. 505-9, Jun 2001.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, Jul 15 2005.

EMANUELSSON, O. et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 953-71, 2007.

ENGMAN, D. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Molecular cloning of mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 11, p. 5163-8, Nov 1989.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283-91, Nov 2010.

ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania promastigotes* is anchored in the membrane by a myristic acid-labeled phospholipid. **EMBO Journal**, v. 5, n. 3, p. 597-601, Mar 1986.

FALISSE-POIRRIER, N. et al. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 3, p. 593-6, Dec 2006.

FENSELAU, C.; RAHBAR, A. Isolation of Plasma Membrane Proteins for Proteomic Analysis. In: PRESS, C. (Ed.). **Methods in Proteomics**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. cap. 6, p.510. (Alexander Lazarev).

FERGUSON, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1295-302, Sep 29 1997.

FERNANDES, C. D. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 343-51, May-Jun 1997.

FERNANDES, C. D. et al. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 27-32, Feb 2009.

FERRARI, I. et al. Towards the physical map of the *Trypanosoma cruzi* nuclear genome: construction of YAC and BAC libraries of the reference clone T. *cruzi* CL-Brener. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 843-52, Nov-Dec 1997.

FERREIRA, K. A. et al. Genome survey sequence analysis and identification of homologs of major surface protease (gp63) genes in *Trypanosoma rangeli*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 9, p. 847-53, Nov 2010.

FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J. M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 359-77, Jul 2007.

FORGBER, M. et al. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. **PLoS ONE**, v. 1, p. e40, 2006.

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 282-6, Jul 2000.

FREITAS, L. M. et al. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25914, 2011.

GARG, R. et al. Isolation of integral membrane proteins of *Leishmania promastigotes* and evaluation of their prophylactic potential in hamsters against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 23, n. 9, p. 1189-96, Jan 19 2005.

GRIPPO, V. et al. Human recombinant antibodies against *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 beta protein. **Parasitology**, p. 1-12, Mar 18 2011.

GRISARD, E. C. Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, n. 1, p. 5, Jul 5 2002.

GRISARD, E. C.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v. 118 (Pt 4), p. 375-82, Apr 1999.

GRISARD, E. C. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphis marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, southern Brazil.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, n. 6, p. 795-800, Nov-Dec 2000.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 12. Porto Alegre: Atheneu, 2011. cap. 12, p.109-114.

GRISARD, E. C. et al. Characterization of Trypanosoma rangeli strains isolated in Central and South America: an overview. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203-9, Mar-Apr 1999.

GRISARD, E. C. et al. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite Trypanosoma rangeli. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 174, n. 1, p. 18-25, Nov 2010.

GUHL, F. et al. Molecular characterization and diagnosis of trypanosoma cruzi and T. rangeli. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 362-70, Jul-Aug 2002.

GUHL, F.; MARINKELLE, C. J. Antibodies against Trypanosoma cruzi in mice infected with T. rangeli. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 361, Jun 1982.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: an updated review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-42, Jun 2003.

GUPTA, M. K.; SUBRAMANIAN, V.; YADAV, J. S. Immunoproteomic identification of secretory and subcellular protein antigens and functional evaluation of the secretome fraction of Mycobacterium immunogenum, a newly recognized species of the Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus group. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2319-30, May 1 2009.

GYGI, S. P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 1720-30, Mar 1999.

HA, Y. Structure and mechanism of intramembrane protease. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 2, p. 240-50, Apr 2009.

HALL, A. S. et al. An Overview of Computational Life Science Databases & Exchange Formats of Relevance to Chemical Biology Research. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, Aug 28 2012.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J. R., 3RD. Mass spectrometry for proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 483-90, Oct 2008.

HANSEN, J. E. et al. NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, n. 2, p. 115-30, Feb 1998.

HARRISON, P. M. et al. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 5, p. 1083-90, Mar 1 2002.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, n. 6583, p. 571-9, Jun 13 1996.

HAYNES, P. A.; FERGUSON, M. A.; CROSS, G. A. Structural characterization of novel oligosaccharides of cell-surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Glycobiology**, v. 6, n. 8, p. 869-78, Dec 1996.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitology Research**, v. 76, n. 4, p. 311-8, 1990.

HENRIKSSON, J. et al. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 112 (Pt 4), p. 385-91, Apr 1996.

HESS, J. L. et al. Immunoproteomics. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 815, n. 1-2, p. 65-75, Feb 5 2005.

HOARE, C. A. **The classification of mammalian trypanosomes**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972.

HOFFMANN, E. D. **Mass Spectrometry: principles and applications**. 3. Jhon Wiley & Sons Ltd, 2007.

HOLZMULLER, P. et al. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 1, p. 79-86, Jan 2008.

HORNA, A. E. et al. Experimental *Trypanosoma rangeli* infection in a murine model. **Revista de Biologia Tropical**, v. 44-45, p. 125-9, Mar 1997.

HORTON, P. et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W585-7, Jul 2007.

HUGHES, A. L.; PIONTKIVSKA, H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 4, p. 644-52, Apr 2003.

HUNTER, G. R. et al. Tetrameric and dimeric malate dehydrogenase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 203-14, Feb 5 2000.

INDOVINA, P. et al. Mass spectrometry-based proteomics: The road to lung cancer biomarker discovery. **Mass Spectrometry Reviews**, Jul 24 2012.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 1, p. 33-45, Jan 2010.

KIKUCHI, S. A. et al. Proteomic analysis of two *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 strains. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 540-51, Dec 2010.

KO, Y. G.; THOMPSON, G. A. Purification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by modified triton X-

114 partitioning and preparative gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 224, n. 1, p. 166-72, Jan 1 1995.

KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. **Parasitology Research**, v. 88, n. 1, p. 21-5, Jan 2002.

KOSEC, G. et al. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 18-28, Jan 2006.

KRAUTZ, G. M. et al. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 2, p. 137-43, Feb 1998.

KRINGELUM, J. V. et al. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. **Molecular Immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 24-34, Jan 2013.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-80, Jan 19 2001.

LACHAPELLE, S. et al. Proteome-wide Identification of WRN-Interacting Proteins in Untreated and Nuclease-Treated Samples. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 3, p. 1216-1227, Mar 4 2011.

LACOUNT, D. J.; BARRETT, B.; DONELSON, J. E. *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17580-8, May 17 2002.

LARSEN, J. E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immune Research**, v. 2, p. 2, 2006.

LEBEAU, I. et al. First proteomic analysis of based on its developing genome sequence. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 119-129, Jan 1 2005.

LEE, M. G. The 3' untranslated region of the hsp 70 genes maintains the level of steady state mRNA in *Trypanosoma brucei* upon heat shock. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 17, p. 4025-33, Sep 1 1998.

LEE, M. G. et al. Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 20, p. 9567-85, Oct 25 1988.

LNCC. *Trypanosoma rangeli* Genome Project. 2011. Disponível em: < <http://www.labinfo.lncc.br/index.php/trypanosoma-rangeli> >. Acesso em: 01/06/2011.

LOPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 849, n. 1-2, p. 190-202, Apr 15 2007.

LOUW, C. A. et al. The Hsp70 chaperones of the Trityps are characterized by unusual features and novel members. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 497-505, Dec 2010.

LUU, V. D. et al. Functional analysis of *Trypanosoma brucei* PUF1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 340-9, Dec 2006.

MA, L. et al. An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. **Parasitology Research**, v. 109, n. 4, p. 1075-84, Oct 2011.

MACHADO, E. M. et al. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 863-6, Nov-Dec 2000.

MACHADO, P. E. et al. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 632-4, May 1 2001.

MAEGAWA, F. A. et al. Autochthonous Chagas' disease in Santa Catarina State, Brazil: report of the first case of digestive tract involvement. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 609-12, Sep-Oct 2003.

MAGALHAES, A. D. et al. Trypanosoma cruzi alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. **Proteome Sci**, v. 6, p. 24, 2008.

MANFUL, T. et al. A search for Trypanosoma brucei rhodesiense diagnostic antigens by proteomic screening and targeted cloning. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9630, 2010.

MANSFIELD, J. M. T-cell responses to the trypanosome variant surface glycoprotein: a new paradigm? **Parasitology Today**, v. 10, n. 7, p. 267-70, Jul 1994.

MARTENS, L. Proteomics databases and repositories. **Methods in Molecular Biology**, v. 694, p. 213-27, 2011.

MARTENS, L.; APWEILER, R. Algorithms and databases. **Methods in Molecular Biology**, v. 564, p. 245-59, 2009.

MATSUMOTO, T. K. et al. Trypanosoma cruzi: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 42, n. 3, p. 187-92, Mar 2002.

MATTHIESEN, R. **Mass spectrometry data analysis in proteomics**. New Jersey: Humana Press Inc, 2007.

MAURER-STROH, S.; EISENHABER, B.; EISENHABER, F. N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 4, p. 523-40, Apr 5 2002.

MAURER-STROH, S.; EISENHABER, F. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. **Genome Biology**, v. 6, n. 6, p. R55, 2005.

MCCARTHY, F. M. et al. AgBase: a functional genomics resource for agriculture. **BMC Genomics**, v. 7, p. 229, 2006.

MEIRELLES, R. M. et al. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology Research**, v. 97, n. 4, p. 259-69, Oct 2005.

MEJÍA, A. J.; PALÁU, M. T.; ZUÑIGA, C. A. Protein profiles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology Latinoamerica**, v. 59, p. 142-7, 2004.

MICHELS, P. A.; HANNAERT, V.; BRINGAUD, F. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 11, p. 482-9, Nov 2000.

MILETTI, L. C. et al. Characterization of D-glucose transport in *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 133, n. Pt 6, p. 721-7, Dec 2006.

MOORE, D. T.; BERGER, B. W.; DEGRADO, W. F. Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. **Structure**, v. 16, n. 7, p. 991-1001, Jul 2008.

MORIYA, Y. et al. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W182-5, Jul 2007.

MOTOYAMA, A.; YATES, J. R., 3RD. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 19, p. 7187-93, Oct 1 2008.

MS. SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasília, 2012. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/chagas/bases/chagasbrnet.def> >. Acesso em: 04/09/2012.

MUIA, R. P. et al. Identification of glycoproteins targeted by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, a virulence factor that disturbs lymphocyte glycosylation. **Glycobiology**, v. 20, n. 7, p. 833-42, Jul 2010.

MUNIZ, M.; RIEZMAN, H. Intracellular transport of GPI-anchored proteins. **EMBO Journal**, v. 19, n. 1, p. 10-5, Jan 4 2000.

MUNOZ-SARAVIA, S. G. et al. Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Failure Reviews**, Dec 17 2010.

NAKAYASU, E. S. et al. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. **Proteomics**, v. 9, n. 13, p. 3489-506, Jul 2009.

NAKAYASU, E. S. et al. Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 1, p. 237-46, Jan 1 2012.

NAKAYASU, E. S. et al. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Systems Biology**, v. 5, p. 261, 2009.

NAKAZAWA, M. et al. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 1024-7, Sep 2001.

NOZAKI, T.; HAYNES, P. A.; CROSS, G. A. Characterization of the *Trypanosoma brucei* homologue of a *Trypanosoma cruzi* flagellum-adhesion glycoprotein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 245-55, Nov 25 1996.

NUGENT, P. G. et al. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 51-62, Jul 2004.

O'DALY, J. A. et al. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 265-87, Apr 1994.

OLSON, C. L. et al. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 5, p. 3868-74, Feb 4 1994.

OPS. **Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas**. Montevideo: Organización Panamericana de la Salud, 2006.

OSORIO, Y. et al. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 5, p. 687-93, Oct 1995.

OVERATH, P. et al. Structure and function of GPI-anchored surface proteins of *Trypanosoma brucei*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 2, p. 343-7, Feb 1994.

PABA, J. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 3, p. 517-24, May-Jun 2004.

PABA, J. et al. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 1052-9, Apr 2004.

PARADA, C. et al. *Trypanosoma rangeli* in a blood donor at the Valencian Blood Transfusion Centre. **Vox Sanguinis**, v. 99, n. 2, p. 193-4, Aug 1 2010.

PARODI-TALICE, A. et al. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 8, p. 881-6, Jul 2004.

PARODI-TALICE, A. et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1422-32, Nov 2007.

PAVIA, P. X. et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 49, n. 1, p. 23-30, Jan-Feb 2007.

PENA, C. P. et al. Molecular analysis of surface glycoprotein multigene family TrGP expressed on the plasma membrane of *Trypanosoma rangeli* epimastigotes forms. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 255-62, Sep 2009.

PERALTA, R. H. et al. Taenia crassiceps cysticeri: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from Taenia solium cysticeri. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 295-300, Mar 1 2010.

PEREIRA, V. R. et al. Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 367-70, Jul-Aug 2000.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects Trypanosoma cruzi trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113 (Pt 7), p. 1299-307, Apr 2000.

PINHO, R. T.; DE SIMONE, S. G. Characterization of plasma membrane polypeptides of Trypanosoma from bats. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 13-8, Jan 1 1989.

PINTO, A. P. et al. Structural characterization of a recombinant flagellar calcium-binding protein from Trypanosoma cruzi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1652, n. 2, p. 107-14, Dec 1 2003.

PINTO, P. M. et al. Proteomic survey of the pathogenic Mycoplasma hyopneumoniae strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 83-93, Mar 31 2007.

POISSON, G. et al. FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 121-30, May 2007.

POLLEVICK, G. D. et al. Trypanosoma cruzi surface mucins with exposed variant epitopes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27671-80, Sep 8 2000.

PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; TOMLINSON, S.; NUSSENZWEIG, V. Trypanosoma rangeli sialidase lacks trans-

sialidase activity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, n. 1, p. 19-25, Nov 1993.

PORCEL, B. M. et al. Trypanosoma rangeli and Trypanosoma cruzi: molecular characterization of genes encoding putative calcium-binding proteins, highly conserved in trypanosomatids. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 387-99, Dec 1996.

PREVIATO, J. O. et al. Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of Trypanosoma cruzi Y-strain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 13, p. 7241-50, Mar 31 1995.

PRICE, H. P. et al. Functional analysis of TbARL1, an N-myristoylated Golgi protein essential for viability in bloodstream trypanosomes. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 4, p. 831-41, Feb 15 2005.

PRUESS, M. et al. Databases and resources for in silico proteome analysis. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 49, p. 397-414, 2006.

QUANQUIN, N. M. et al. Immunization of mice with a ToIA-like surface protein of Trypanosoma cruzi generates CD4(+) T-cell-dependent parasiticidal activity. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4603-12, Sep 1999.

QUINONES, W. et al. The glycosome membrane of Trypanosoma cruzi epimastigotes: protein and lipid composition. **Experimental Parasitology**, v. 106, n. 3-4, p. 135-49, Mar-Apr 2004.

RAMIREZ, L. E. et al. High prevalence of Trypanosoma rangeli and Trypanosoma cruzi in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 84, n. 3, p. 189-98, Dec 2002.

RAMON-LUING, L. A. et al. Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for Trichomonas vaginalis. **Proteomics**, v. 10, n. 3, p. 435-44, Feb 2010.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010.

REINITZ, D. M.; MANSFIELD, J. M. T-cell-independent and T-cell-dependent B-cell responses to exposed variant surface glycoprotein epitopes in trypanosome-infected mice. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 7, p. 2337-42, Jul 1990.

REN, J. et al. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 21, n. 11, p. 639-44, Nov 2008.

ROJAS, A. et al. Isolation, purification, characterization and antigenic evaluation of GPI-anchored membrane proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**, v. 105, n. 2, p. 139-44, Feb 2008.

RUIZ-PINA, H. A.; CRUZ-REYES, A. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilche, Yucatan, Mexico. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 613-20, Jul 2002.

SALDANA, A. et al. Antigenic significance of a *Trypanosoma rangeli* sialidase. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 697-701, Aug 2002.

SALDANA, A. et al. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the Panama canal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 729-31, Nov 2005.

SALDANA, A.; SOUSA, O. E. *Trypanosoma rangeli* and *trypanosoma cruzi*: cross-reaction among their immunogenic components. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 81-2, Jan-Feb 1996a.

_____. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 363-6, Apr 1996b.

SALDANA, A. et al. *Trypanosoma rangeli* sialidase: kinetics of release and antigenic characterization. **Acta Tropica**, v. 70, n. 1, p. 87-99, Jun 15 1998.

SANT'ANNA, C. et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1782-94, Apr 2009.

SANTONI, V.; MOLLOY, M.; RABILLOUD, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1054-70, Apr 2000.

SEPULVEDA, J. et al. *Schistosoma mansoni* host-exposed surface antigens characterized by sera and recombinant antibodies from schistosomiasis-resistant rats. **International Journal for Parasitology**, p. 1-11, Jul 21 2010.

SERRANO, A. A. et al. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27244-53, Nov 10 1995.

SIDIBE, A. et al. Integrated membrane protein analysis of mature and embryonic stem cell-derived smooth muscle cells using a novel combination of CyDye/biotin labeling. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, n. 10, p. 1788-97, Oct 2007.

SILVERMAN, J. M. et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biology**, v. 9, n. 2, p. R35, 2008.

SNOEIJER, C. Q. et al. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 3, n. 1, p. 1, May 13 2004.

SOUTO-PADRON, T. et al. *Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite. **European Journal of Cell Biology**, v. 50, n. 2, p. 272-8, Dec 1989.

STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi* isoladas de reservatórios e vetores silvestres em Santa Catarina**. 1993. Tese de Doutorado (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STEINDEL, M. et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 261-7, May-Jun 1994.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 25-32, Jan 2008.

STEINDEL, M. et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 73-9, Jan-Mar 1991.

STEVENS, J. R. et al. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 5, p. 749-57, May 1999.

STOCO, P. H. **Caracterização das DNA topoisomerase II de *Trypanosoma rangeli***. 2010. (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

STOLZ, J. Isolation and characterization of the plasma membrane biotin transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. **Yeast**, v. 20, n. 3, p. 221-31, Feb 2003.

SUAREZ, B. A.; CUERVO, C. L.; PUERTA, C. J. The intergenic region of the histone H2a gene supports two major lineages of *Trypanosoma rangeli*. **Biomédica**, v. 27, n. 3, p. 410-8, Sep 2007.

TAMBOURGI, D. V. et al. Biotinylation a fast and reproducible method for labelling *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 44, n. 2, p. 91-4, Jun 1993.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in chagas disease--a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-91, Aug 2006.

THELEN, J. J.; MIERNYK, J. A. The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us. **The Biochemical Journal**, v. 444, n. 2, p. 169-81, Jun 1 2012.

THOMAS, M. C. et al. Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 2, p. 167-73, Feb 2012.

TOLEDO, M. J. et al. Triatomids and forest reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the state of Parana, southern Brazil. Preliminary results. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 197-203, May-Jun 1997.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979.

TUSNADY, G. E.; SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 849-50, Sep 2001a.

_____. Topology of membrane proteins. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 41, n. 2, p. 364-8, Mar-Apr 2001b.

UMEZAWA, E. S. et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2143-7, Sep 1996.

UMEZAWA, E. S.; SILVEIRA, J. F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 285-8, 1999.

URBAN, I. et al. Molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* TcSMUG family of mucin genes and proteins. **The Biochemical Journal**, v. 438, n. 2, p. 303-13, Sep 1 2011.

VALLEJO, G. A. et al. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Tropica**, v. 81, n. 1, p. 77-82, Jan 2002.

VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; SCHAUB, G. A. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/T. *rangeli*: Vector-parasite interactions. **Acta Tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 137-47, May-Jun 2009.

VALLEJO, G. A. et al. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 67, n. 2, p. 245-53, Oct 1994.

VAN DEURSEN, F. J.; THORNTON, D. J.; MATTHEWS, K. R. A reproducible protocol for analysis of the proteome of *Trypanosoma brucei* by 2-dimensional gel electrophoresis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 107-10, Apr 25 2003.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. Chagas disease in Brazil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 16 Suppl 2, p. 7-12, 2000.

VOORHEIS, H. P. et al. The isolation and partial characterization of the plasma membrane from *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal**, v. 180, n. 1, p. 11-24, Apr 15 1979.

WALKER, J. et al. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 2, p. 166-76, Jun 2012.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R., 3RD. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242-7, Mar 2001.

WEN, J. J.; GARG, N. J. Proteome expression and carbonylation changes during *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease in rats. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 11, n. 4, p. M111 010918, Apr 2012.

WINGARD, J. N. et al. Structural insights into membrane targeting by the flagellar calcium-binding protein (FCaBP), a myristoylated and

palmitoylated calcium sensor in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 34, p. 23388-96, Aug 22 2008.

WISTRAND, M.; SONNHAMMER, E. L. Improved profile HMM performance by assessment of critical algorithmic features in SAM and HMMER. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 99, 2005.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 11, p. 49-79, Jan 1 2009.

YOUNG, J. C.; BARRAL, J. M.; ULRICH HARTL, F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 10, p. 541-7, Oct 2003.

ZHANG, Y.; ZHU, Y.; HE, F. An overview of human protein databases and their application to functional proteomics in health and disease. **Science China Life Sciences**, v. 54, n. 11, p. 988-98, Nov 2011.

ZHAO, L.; LI, J. Mining for the antibody-antigen interacting associations that predict the B cell epitopes. **BMC Structural Biology**, v. 10 Suppl 1, p. S6, 2010.

ZHONG, Z.-R. et al. Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of Schistosomiasis japonica. **Acta Tropica**, v. 116, n. 1, p. 1-8, Oct 1 2010.

ZIEGELBAUER, K.; OVERATH, P. Identification of invariant surface glycoproteins in the bloodstream stage of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 15, p. 10791-6, May 25 1992.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009.

ZUNIGA, C. et al. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 523-30, Jul-Aug 1997a.

_____. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. **Tropical Medicine and International Health**, v. 2, n. 5, p. 482-7, May 1997b.

ZÚÑIGA, C. et al. *Trypanosoma rangeli* infected mouse sera reactivity with *Trypanosoma cruzi* synthetic peptides. **Parasitology Latinoamerica**, v. 62, p. 3-6, 2007.

ZURITA, A. I. et al. Cloning and characterization of the *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 372-8, Apr 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Proteínas identificadas por MS no perfil 2-D da forma tripomastigota de *Trypanosoma rangeli*, com seus respectivos potenciais isoeletricos (pI), massas moleculares relativas (Mr) teóricos, numeração dos spots, localização celular e grupos de proteínas similares.

Código ^a	Proteína ^b	pI ^c	MW ^c	Número dos spots	Local ^d	KEGG
TR00226	<i>14-3-3 protein</i>	4.714	30,0	148, 198	C	K06630
TR02934	<i>14-3-3 protein</i>	4.933	29,0	195	C	K06630
TR05897	<i>2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase</i>	7.916	43,8	124	M	K00639
TR04750	<i>2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit</i>	6.001	39,7	177	M	K00167
TR03422	<i>25 kDa translation elongation factor 1-beta</i>	6.551	16,8	191	N	K03232
TR03071	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	4.567	35,2	167	C	K02941
TR02042	<i>69 kDa paraflagellar rod protein</i>	6.115	44,2	48	C	
TR04024	<i>69 kDa paraflagellar rod protein</i>	5.927	43,7	45, 48, 72	C N	
TR00036	<i>actin</i>	5.464	42,0	231	K	K10355
TR06474	<i>activated protein kinase C receptor</i>	5.910	35,0	180, 182	C N	K14753
TR01680	<i>adenylate kinase</i>	6.287	29,0	188, 196	C	K00939
TR02653	<i>adenylate kinase</i>	9.034	24,3	197	C	K00939
TR05738	<i>alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)</i>	6.728	41,6	95, 146	M	K13954
TR05056	<i>alpha tubulin</i>	4.697	49,8	3, 90, 228	K	K07374
TR02075	<i>aminopeptidase</i>	5.960	42,7	103	C	
TR00214	<i>arginine kinase</i>	4.956	34,8	76, 111, 114, 127, 137, 230	C	K00934
TR05117	<i>beta tubulin</i>	5.275	45,2	2, 8, 57, 82, 87, 116, 129, 183, 199, 209, 238	C	K07375
TR04313	<i>branched-chain amino acid aminotransferase</i>	8.299	40,5	142, 143	M	K00826

TR06725	<i>calmodulin</i>	4.331	72,1	44		C	
TR01302	<i>calpain-like cysteine peptidase</i>	5.973	77,2	6, 220		C	
TR03738	<i>chaperonin containing T-complex protein</i>	4.933	59,2	126		C	K09497
TR06127	<i>chaperonin HSP60, mitochondrial precursor</i>	5.146	59,7	36, 68, 75, 81, 117, 118, 123		M	K04077
TREG204011D02.b	<i>Cyclophilin</i>	-	-	163, 169, 216, 218		C	
TR03680	<i>cystathione gamma lyase</i>	6.777	44,4	119, 130, 131, 132		C	K00810
TR03337	<i>cytochrome C oxidase subunit IV</i>	5.617	39,0	162		M	
TR06262	<i>cytoskeleton-associated protein CAP5.5</i>	4.576	87,8	27, 30, 55		C	
TR04445	<i>dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4)</i>	7.458	51,0	89		C	K00382
TR01384	<i>elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)</i>	9.127	52,8	89, 79, 92, 95, 97		C	K03231
TR06347	<i>elongation factor 2</i>	6.195	94,3	18, 21		C	K03234
TR06599	<i>enolase (EC 4.2.1.11)</i>	6.772	37,3	109, 112		C	K01689
TR04008	<i>eukaryotic initiation factor 4a</i>	6.300	45,6	15, 115		N	K03257
TR00655	<i>eukaryotic initiation factor 5a</i>	4.601	18,0	110, 214		C	K03263
TR04947	<i>flagellar radial spoke protein-like</i>	4.191	60,7	44		N	
TR05296	<i>fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (EC 3.1.3.11)</i>	9.142	38,1	142		M	K03841
TR00236	<i>fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal (EC 4.1.2.13)</i>	9.037	41,0	141, 142		C	K01623
TR00392	<i>glucokinase 1 (EC 2.7.1.2)</i>	8.799	41,7	141, 142		C	K00845
TR01674	<i>glucosamine-6-phosphate isomerase</i>	7.253	31,7	194		C	K02564
TR03733	<i>glucose-regulated protein 78</i>	4.839	71,5	77		RE ^e	K09490

TREG210005G03.b contig01422.5	<i>Glutamate dehydrogenase</i> <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (EC 1.2.1.12)</i>	- 8.441	- 30,8	120, 125, 126 181	C C	K00134
TR03342	<i>glycosomal malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)</i>	9.760	33,7	178	E	K00026
TR00831	<i>haloacid dehalogenase-like hydrolase</i>	5.100	30,8	132, 189	C	K07024
TR03366	<i>heat shock 70 kDa protein</i>	4.641	27,2	236	C	K03283
TR03493	<i>heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor</i>	4.861	55,4	61, 124, 125	M	K04043
TR06000	<i>heat shock protein 100 (HSP100)</i>	6.958	80,2	25	C	
TR07016	<i>heat shock protein 70 (HSP70)</i>	5.514	68,6	49, 52, 53, 61, 125, 235, 237	C	K03283
TR00837	<i>heat shock protein 85</i>	4.959	81,2	221	C	K04079
TR04415	<i>heat shock protein DnaJ</i>	7.461	44,2	117	C	
TR03608	<i>heat shock protein-like protein</i>	5.811	35,9	180	MP	
TR03124	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F</i>	5.238	49,2	24	C N	
TR03752	<i>hexokinase (EC 2.7.1.1)</i>	9.182	51,8	64, 104, 105, 166	C	K00844
TR02868	<i>Hypothetical protein</i>	8.78	55,8	74	C	K00865
TR05732	<i>Hypothetical protein</i>	7.895	24,1	102	M	K01412
TR03074	<i>Hypothetical protein</i>	7.833	15,2	130	C	K01697
TR02181	<i>Hypothetical protein</i>	7.460	21,0	8	C	K03152
TR04816	<i>Hypothetical protein</i>	9.761	25,1	61	M	K04043
TR00075	<i>Hypothetical protein</i>	5.807	39,6	106	P	
TR00231	<i>Hypothetical protein</i>	4.507	22,3	65, 111, 211	C	

TR00293	<i>Hypothetical protein</i>	5.330	66,4	125	C	
TR00380	<i>Hypothetical protein</i>	4.910	42,9	38	N	
TR00591	<i>Hypothetical protein</i>	9.764	30,8	190, 234	M	
TR01041	<i>Hypothetical protein</i>	4.842	34,1	115, 156, 165	C N	
TR01557	<i>Hypothetical protein</i>	4.792	119,1	16, 223	C	
TR01915	<i>Hypothetical protein</i>	4.477	47,9	116, 227	C	
TR02227	<i>Hypothetical protein</i>	9.649	42,5	128	N	
TR02402	<i>Hypothetical protein</i>	4.363	37,5	239	N	
TR03316	<i>Hypothetical protein</i>	10.585	30,5	92	C	
TR03809	<i>Hypothetical protein</i>	9.988	27,3	193	M	
TR04205	<i>Hypothetical protein</i>	4.578	83,1	222	N	
TR04633	<i>Hypothetical protein</i>	5.991	50,7	227	C	
TR04837	<i>Hypothetical protein</i>	4.920	34,4	130, 173	C	
TR04870	<i>Hypothetical protein</i>	4.706	38,7	67, 129	C	
TR05341	<i>Hypothetical protein</i>	5.910	58,2	226	C	
TR05886	<i>Hypothetical protein</i>	4.938	28,4	200	M	
TR05950	<i>Hypothetical protein</i>	9.594	42,9	141	N	
TREG204001H02.b	<i>Hypothetical Protein</i>	-	-	13	C	
contig06923.34	<i>hypothetical protein, conserve</i>	8.868	38,6	241	E ^e	
contig00187.1	<i>hypothetical protein, conserved</i>	5.143	45,0	139	C	
TR00726	<i>I/6 autoantigen</i>	5.021	21,9	206	C	
TR06709	<i>IgE-dependent histamine-releasing factor</i>	4.220	19,5	215	C	
TR05816	<i>inosine-5'-monophosphate dehydrogenase</i>	8.915	55,9	232	C N	K00088
TR05576	<i>iron superoxide dismutase</i>	7.299	22,0	310	C	K04564

TR01620	<i>LA RNA binding protein</i>	9.605	38,7	121		N	K11090
TR05935	<i>lipophosphoglycan biosynthetic protein</i>	5.389	82,1	29, 229		C	
TR02858	<i>lysophospholipase</i>	7.836	30,2	201		M	K06128
TR04677	<i>lysosomal/endosomal membrane protein p67</i>	6.935	71,5	148, 198		E ^{e,f}	
TR02438	<i>malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)</i>	8.549	33,2	24, 142, 175, 178		P	K00026
TREG201003B05.b	<i>Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)</i>	-	-	74, 160, 232		C	K00026
TR00259	<i>malic enzyme (EC 1.1.1.38)</i>	7.269	62,6	46, 72		M	K00027
TR04446	<i>mitochondrial processing peptidase, beta subunit</i>	6.741	36,0	102		C	K01412
TR03101	<i>mitochondrial RNA binding protein</i>	9.648	38,5	152		M	
TR02578	<i>nascent polypeptide associated complex subunit</i>	4.411	19,2	199		C	K03626
TR01610	<i>paraflagellar rod component</i>	4.940	68,0	41, 72		N	
TR04810	<i>paraflagellar rod protein 3</i>	5.961	68,7	45		C	
TR02201	<i>peptidase M20/M25/M40</i>	5.769	51,7	115		C	
TR02767	<i>phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)</i>	6.024	44,9	110, 111, 138		C	K00927
TR06121	<i>prostaglandin F2alpha synthase</i>	6.381	42,5	132		M	
contig00774.9	<i>proteasome activator protein PA26, putative</i>	6.292	25,2	203		C	
TR00880	<i>proteasome alpha 3 subunit</i>	5.236	32,0	191		C	K02728
TR03212	<i>proteasome alpha 5 subunit</i>	4.674	27,2	103, 206		C	K02729
TR00459	<i>proteasome regulatory ATPase subunit 3</i>	6.953	44,3	118		C	K03063
TR06658	<i>proteasome regulatory ATPase</i>	6.814	34,8	107		C	K03065

	<i>subunit 5</i>						
TR01385	<i>protein kinase</i>	6.914	30,9	182		C	
TR03123	<i>protein phosphatase</i>	4.786	45,7	240		C	
TR03675	<i>pyridoxal kinase</i>	7.017	33,4	70, 188		C	K00868
TR06266	<i>pyruvate phosphate dikinase (EC 2.7.9.1)</i>	8.396	82,2	22		C	K01006
contig00566.46	<i>pyruvate phosphate dikinase 1 (EC 2.7.9.1)</i>	8.324	101,1	20		C	K01006
TR03103	<i>RAB GDP dissociation inhibitor alpha</i>	5.955	49,9	110		C	
TR03577	<i>reiske iron-sulfur protein precursor</i>	6.623	33,7	177		MP ^f	K00411
TR05418	<i>ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor</i>	6.756	21,6	217		M	
TR05708	<i>RNA helicase</i>	6.897	49,2	108		C	K12812
TR02534	<i>RNA-binding protein</i>	9.308	32,0	104		C N	
TR03208	<i>RNA-binding protein</i>	10.225	26,9	163		C N	
TR04758	<i>S-adenosylhomocysteine hydrolase</i>	6.294	48,4	110		C	K01251
TR05363	<i>serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit</i>	5.441	34,4	177		C	K06269
TR06624	<i>seryl-tRNA synthetase</i>	5.298	53,6	22, 84, 152, 222		C	K01875
TREG004006B06.b	<i>Sialidase</i>	-	-	48		E	
TREG201003D12.b	<i>Sialidase</i>	-	-	48, 51		E	
TREG206001D12.b	<i>Sialidase</i>	-	-	120		E	
TREG206005H03.b	<i>Sialidase</i>	-	-	156, 167		E	
TR01873	<i>spermidine synthase</i>	5.879	33,0	46, 207		E	K00797
TR06821	<i>sterol 24-c-methyltransferase</i>	6.253	40,9	97, 146		C	K00559
TR02091	<i>stress-induced protein sti1</i>	6.300	62,8	224, 225		C	

TR04856	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein (EC 1.3.5.1)</i>	6.653	67,0	226		M	K00234
TR02001	<i>succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain (EC 6.2.1.4)</i>	6.845	45,1	119, 130, 131		M	K01900
TR01479	<i>succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase</i>	7.564	53,4	96		M	K01027
TREG204009F12.b	<i>Surface protease GP63</i>	-	-	39, 46, 229		E	
TR06606	<i>thermostable carboxypeptidase 1</i>	6.681	36,8	76		C	K01299
TR03503	<i>threonyl-tRNA synthetase</i>	6.640	91,3	27		N	K01868
TR04770	<i>transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	5.538	89,0	39, 70		C	K13525
TR02117	<i>transketolase (EC 2.2.1.1)</i>	7.012	72,7	51		C	K00615
TREG210005B02.b	<i>Translation elongation factor 1 beta</i>	-	-	103		C	K03232
TR06591	<i>translation elongation factor 1-beta</i>	4.893	14,7	206		N	K03232
TR02126	<i>tricarboxylate carrier</i>	9.416	25,2	161		C ^f	
TR02563	<i>tryparedoxin peroxidase</i>	7.245	20,6	185, 192		C	K11185
TR02148	<i>tyrosine aminotransferase</i>	6.423	45,5	79, 131, 134		C	K00815
TR00246	<i>vacuolar ATP synthase subunit B</i>	5.190	55,7	152		C	K02147

^a Códigos de acessos: "TREG" proteínas obtidas no transcriptoma do *T. rangeli*; "contig" são proteínas referente aos genes preditos a partir da montagem do genoma de *T. rangeli*; "TR" são ORFs obtidas no genoma não montado de *T. rangeli*;

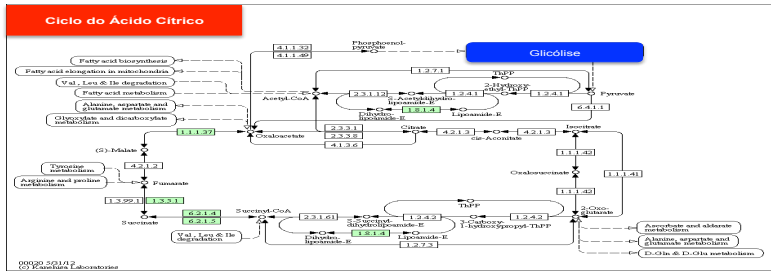
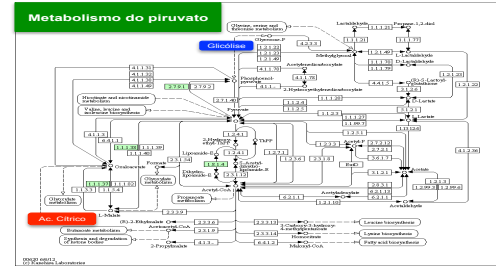
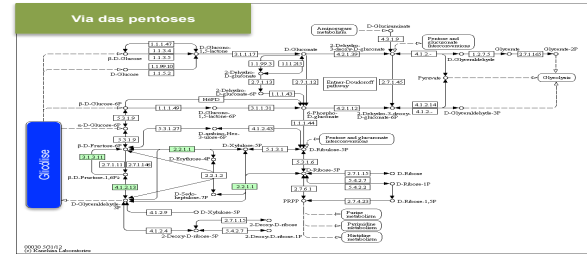
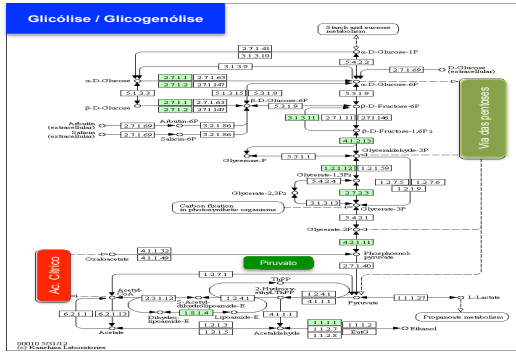
^b Os nomes das proteínas identificadas foram obtidos diretamente dos bancos de dados;

^c Ponto Isoelétrico (pI) e MW (Massa molecular relativa (Mr)) em kDa teóricas;

^d Localização Celular (LC), onde: citosol (C); núcleo (N); mitocôndria (M); extracelular (E); retículo endoplasmático (RE); membrana plasmática (MP); citoesqueleto (K); peroxissomo (P);

^e Proteínas contendo peptídeo sinal de clivagem no retículo; ^f Proteína com pelo menos um domínio hidrofóbico trans-membranar (TMD);

APÊNDICE C: Esquema com as proteínas (quadros verde claro) de *Trypanosoma rangeli* mapeadas nas principais vias do metabolismo energético: glicólise (9), ciclo do ácido cítrico (5), via das pentose (3) e metabolismo do piruvato (3).



APÊNDICE D: Alinhamento com as proteínas da família das metaloproteases (GP63) identificadas na fração SEP de *Trypanosoma rangeli*. A região no sublinhada corresponde ao motivo catalítico (HEXXHXXGXX).

TR05051	10	20	30	40	50	60	70	80	
TR07133	MRPRFCLAPFFFLALLLLLAVHCAAGCVFSAVPRVEGRFDEVV--GKSGPSSIAVVRBLPRKGGGAMGTQYTVAAAREG	78							
CGR14005136.2	MLRFLREAPSQSARLLHVMVAVCCGSGVYAAAGPVYPCN-FDEVMRGGEGLSSAPVVVVKAVPSAGESQSEYTVVMGEK--	77							
TR07104	-----MHCAGGCLA AAPALRHRCFNFDVEMRKSGLPL--TAVVRELPHKGGCGAMQAYTAAQDAE	57							
TR05051	90	100	110	120	130	140	150	160	
TR07133	KRDVWPRIIAVSTEDLTDPSKYVCTSAEAREKPPDFGGQDAECKEEDVLTSTKIKKTLLEILEIPVAVKLHAEKLLVQRAKTPLV	158							
CGR14005136.2	---WASIRIVASMRDLEDNKKHCELSLTKQPNLRGCTVSCSQEDSLTRNGKKEILTRAIHAAIKLHADLLLVPELEGPLK	154							
TR07104	S-EWRPPIRIAPVVQTNDRNVACVKAG-DLFRGVCGRTRCEETHVLTDAKRKTLNLSVLPRAIKLHTDRLLLVPEINGKLI	135							
TR05051	170	180	190	200	210	220	230	240	
TR07133	VPPFKAEHRCQVFKVPEAARHKEGVKDAVVLLVYASRN---YGTSAVPCVFPQEGGEPDIAGALHIVPPYHALADHMSARAT	235							
CGR14005136.2	VPNFP-EKSIICGQFVPEPHESEGVNADNVLVVAAP---RQVVALPCATLENGRPIVGVVNPAPADLRFIRLATRIFA	229							
TR07104	LPSTF---GVPCQYFTLPTERTITDGVTCADRVLYAAAGPFSYNIFAAAATCTVTSLELRFESVGAIDPNDAVLTTASAEVSRVA	102							
	VPSDL---CGLLEERRHVFEEHKEGVSDADNVLVYFAGPANGAI-AWASSCALLHHDGRFPVVGMNVDFQYING-GSVDRVV	211							
TR05051	250	260	270	280	290	300	310	320	
TR07133	AHALAHALGFSHEQMTSEHSLVNVSDVGRASPVVVRKSVTLNKKTKLHYGCDTTCQMEIYNVEA---VLLVSLRNAK	310							
CGR14005136.2	AHEIAHALGFAVGNMAAGERNVNTGMEGRKLSVVMATSNAAH-AARHRYVCDRISCGMELNDFNGDGTLESHEVSKRNAK	308							
TR07104	AHEIAHALGFSYEAHNEKGVKSESTGRGRG-RKRVYGVNRYA-RAAAHFNGDSELGMELEEDTQVQGRHFHWEERAR	100							
	AHEIAHALSEAFNLOEKGLVSYKSDVGRGKSVVMATSNAAH-KAAAHFNCDRISLECGMELEDPLEKSG--SHWERRNAV	288							
TR05051	330	340	350	360	370	380	390	400	
TR07133	DEIMSPLEKTTACGYXTALTRAAFELGLVYKAVMGREEPNMGWNNSGCEFLTTPCSEKTP-TAVPDSMFCDKNDATSIHCT	388							
CGR14005136.2	DEIMAPLGG---AGYYTELTLAAAFADLGVYKANMAAEFNGGGRSSGCELLQKCKCGLD--LSKYPKMFCDMT-PRFLQCT	383							
TR07104	DEIMAPTFG---AGYYTALTLAAVFAFLGVYVNVSGMAEFSWSDTSGDFLTKKCKTDELAKTYHMFCDASDKATLRCS	208							
	DEIMAPFG---VGRYATLMAAFELGLVYKAVWMAEFSWNGTQCFELFKKCTETSNLAAATYHMLCDASDTALRCS	366							
TR05051	410	420	430	440	450	460	470	480	
TR07133	SNPQALGTCESIDKAGSD-ETDTCMFVFPFPGGEPQV-FFCAMEGDDTLPGSLRQKGL---SWCLDTEP---	451							
CGR14005136.2	SDRYFNGCTDSEIIE-MLSNQOTDACHTVAAVVSEDFNYVFCNGCQRKKSQSSKRTKQVNFNMECLDKTFPFKE--	460							
TR07104	TERHHVGRCTGNLVD---CHLSTKDKCLVSSFFTASQSGEEVLSKCSDDGVSASLPGSLTGKD---SWCLDAEFLQAK--	438							
TR05051	490	500	510	520	530	540	550	560	
TR07133	-----LTLQTL-----KNAQIGKI-----	464							
CGR14005136.2	---GEYVGSVAAYVAEVMCTGGKVNLTGSGTDTWQTCACGDTVTCGRPFNNK---EDVICPEYAEVCTISVNGSGLLP--	533							
TR07104	AGNNDYAGVSGVCAVQCAREGKVKVYKVLGSDTWHECSEGEISQVTASEHFK-NGGKIKCPRYAEVCTVAADSSG---LI	514							
TR05051	570	580	590	600	610	620	630	640	
TR07133	-----VVQWDGCKEAKWNRKVPAAEEDPSAFSVSGPVDTFISGGGQSGRPFPPPPPPPPVPCRPPECPADAG	599							
CGR14005136.2	IPSVLQDAEGEAEDKKGQGEKEVQFSLSLAAQFPAAQLPAVPSAALPSGALGGAAGGIPSTFPRVIALGAVGLDTEAA	490							
TR07104	S-----ENDEVEPQR--ANAGPPHT	533							
TR05051	650	660	670	680	690	700	710	720	
TR07133	EGHAEAGVVEQOHTAVPN-----SHKQPOVSGSEKEEQAAPAAQSATPPATTNATNVTEATLQNSDSDGTAASHBSTSLLRFPY	675							
CGR14005136.2	AEPEKAGKSGDAVAPTRPTAALPSSGGGASSELGAAAPKESDSDTARATATPKTAPATPLTSTPTASANSDFEKKLE	570							
TR07104	-----	533							
TR05051	730	740	750						
TR07133	SCVCGGCGCG-----	685							
CGR14005136.2	EVVCGVGSDAQVAAAAGVYISSAFVAVYTAAVAMLLP	607							
TR07104	-----	533							