



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**Proteômica de tripanosomatídeos: divisão celular de  
*Trypanosoma cruzi* e análise do proteoma de *Phytomonas serpens***

Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

Brasília  
2018

Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**Proteômica de tripanosomatídeos: divisão celular de  
*Trypanosoma cruzi* e análise do proteoma de *Phytomonas serpens***

Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart

Coorientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Tese apresentada ao programa de pós-graduação  
em Patologia Molecular da Universidade de  
Brasília como requisito parcial à obtenção do  
grau de doutor em Patologia Molecular.

Brasília  
2018

## **Banca Examinadora**

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart - Universidade de Brasília (UnB) - Presidente

Prof. Dr. Giuseppe Palmisano – Universidade de São Paulo (USP) – Membro externo à UnB.

Profa. Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima – Universidade de Brasília (UnB) – Membro externo ao programa de Patologia Molecular

Prof. Dr. Guilherme Martins Santos - Universidade de Brasília (UnB) – Membro interno

Dr. Marcos Rodrigo Alborghetti – Universidade de Brasília (UnB) - Suplente

## *Agradecimentos*

Apresento aqui uma parte muito importantes do meu doutorado: os amigos que fiz durante meus estudos na UnB. É certo que algumas vezes me decepcionei, mas por muitas mais vezes aprendi com meus amigos como ser uma pessoa melhor. Entendi que somos todos semelhantemente diferentes e é exatamente isso que nos faz mais amigos. Sendo diferentes nós podemos diluir nossos pontos fracos, apoiar uns aos outros em momentos difíceis, rir em momentos de ansiedade, encontrar uma palavra de esperança em momentos de incertezas. Hoje vejo que estava certo quem disse: mais importante que chegar é caminhar. Obrigado por caminhar comigo!

Obrigado, meu amigo e meu professor Carlos André, o professor que orienta com o coração. É muito difícil explicar a gratidão que sinto de poder falar que fui aceito como seu aluno e pela confiança que depositou em mim. Eu gostaria que soubesse que o que eu aprendi com você levarei para a vida toda, e desejo que muitos outros ainda possam passar pela experiência de ter um orientador como você. Prometo a você e a professora Beatriz que se um dia a mim for confiada a missão de ser professor, me dedicarei ao máximo para tentar passar a frente todo o carinho e conhecimento que vocês me dedicaram.

Obrigado a minha orientadora professora Beatriz Dolabela de Lima, gostaria que soubesse o quão importante foi para meu crescimento, sempre me desafiando cientificamente, sempre me estimulando ser melhor e apontando o caminho, sempre preocupada. Obrigado por permitir fazer parte do LABIOGENE e gostaria que soubesse que é muito importante para mim.

Gostaria também de render homenagens e agradecimentos aos meus pais Cecília e Agenor, meus irmãos Marina, Jordana e Moysés. Sou muito grato por saber que vocês estão sempre ao meu lado, me apoiando incondicionalmente. Amo vocês.

Aos professores, não só porque contribuíram imensamente com minha formação, mas principalmente pela amizade. Professores Consuelo, Mariana, Cecília, Sébastien, Fabiana, Aline, Vicente, Edivaldo, Dário e de maneira especial ao professor Marcelo pelos bons conselhos e pela confiança, e ao professor Wagner, que com sua paciência e dedicação inabalável me auxiliou em todos os meus projetos. A vocês meus profundos agradecimentos.

Aos meus companheiros de caminhada e de bancada, Marina, Reynaldo, Tulio, Egmar, Pedro, Elder, Caio, Simone, Bianca, Fabiana, Juliana, Raphaela, Jaques, Adriano, Antônio, Nuno, Carol, Thuany, Diana, Adelson, Samuel, Rayner, Luanna, Igor, Daniele, Guilherme, Lucas, Marcos, Mariana, Anderson, Bruna, e todos aqueles que fizeram parte do meu dia-a-dia. Seja regada a café ou a cerveja vocês serão sempre as melhores companhias.

De forma especial aos meus irmãos de coração: Ricardo, Arthur, Agnelo vocês foram as pessoas que durante esta longa caminhada, estavam sempre ao meu lado, tornando o caminho mais leve.

Aos amigos da Fundação Hemocentro de Brasília e do Hospital de Base do Distrito Federal. Obrigado pela compreensão e pela paciência.

Muito obrigado Deus, pois me permitir o convívio de pessoas tão especiais!

Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior

## Resumo

Os tripanosomatídeos compõem uma família de protozoários com flagelos únicos que inclui patógenos de invertebrados, vertebrados e plantas. Alguns desses protozoários causam importantes doenças humanas como é o caso do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Os tripanosomatídeos possuem grande semelhança genética entre si e características peculiares quando comparados a outros eucariotos, tais como a síntese de RNAs mensageiros policistrônicos durante o processo de transcrição, com consequente regulação gênica baseada em eventos pós-transcricionais, e divisão celular do tipo fechada, durante a qual não há o desaparecimento da carioteca e a condensação dos cromossomos. Dois tripanosomatídeos foram objetos de estudo desta tese, o *T. cruzi* e o fitopatógeno *Phytomonas serpens*.

O presente trabalho descreve, pela primeira vez, o isolamento e a análise proteômica da fração nuclear de *T. cruzi* usando uma estratégia do tipo *bottom-up* utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Assim, foram identificadas 864 proteínas, dentre as quais 272 proteínas foram anotadas como putativas não caracterizadas, e 275 não haviam sido previamente relatados na análise do proteoma global do parasito. O agrupamento das proteínas nucleares em *clusters* mostrou um maior enriquecimento de proteínas envolvidas com organização de cromatina e com funções de ligação ao DNA.

A variação do proteoma do *T. cruzi* durante seu ciclo celular também foi investigada. Para isso, as amostras proteicas de quatro pontos do ciclo celular foram tripsinizadas e marcadas com iTRAQ antes de análises por LC-MS/MS, revelando 785 proteínas e 88 fosfoproteínas reguladas com pelo menos um peptídeo fosforilado. O possível papel das proteínas e fosfoproteínas reguladas durante o ciclo celular foi discutido.

Por fim, este trabalho também descreve a primeira análise do proteoma de *P. serpens*, um fitoparásita cujo genoma ainda não está sequenciado e que possui potencial interesse médico, devido a sua reatividade imunológica cruzada com o *T. cruzi*. Usando-se um banco de dados composto de sequências de 200 organismos da classe Kinetoplastida, foram identificadas 4.387 proteínas no proteoma de *P. serpens*, sendo as sequências de *T. cruzi* foram as que mais contribuíram para as identificações, dentre os cinetoplastídeos causadores de doenças humanas. Os dados gerados permitiram propor um mapa metabólico central para o parasito, que incluiu todas as enzimas do ciclo do ácido cítrico e nova gama de proteínas possivelmente responsáveis pela reação cruzada imunológica entre *P. serpens* e *T. cruzi*.

## Abstract

Trypanosomatids comprise a family of flagellated protozoans that includes invertebrate, vertebrate and plant pathogens. Some of these protozoans cause important human diseases, as is the case of *Trypanosoma cruzi*, which causes Chagas' disease. Trypanosomatids have great genetic similarity between themselves and peculiar characteristics when compared to other eukaryotes, such as the synthesis of polycistronic messenger RNAs during the transcription process, with consequent gene regulation based on post-transcriptional events, and closed cell division during which it is not observed the disappearance of the nuclear envelope and the condensation of the chromosomes. Two trypanosomatids were objects of study of this thesis, *T. cruzi* and phytopathogen *Phytomonas serpens*.

The present work describes, for the first time, the isolation and proteomic analysis of the *T. cruzi* nuclear fraction using a bottom-up strategy based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS). Thus, 864 proteins were identified, of which 272 proteins were annotated as putative uncharacterized, and 275 had not previously been reported in the overall proteome analysis of the parasite. The grouping of nuclear proteins in clusters showed a greater enrichment of proteins involved with chromatin organization and with DNA binding functions.

The variation of *T. cruzi* proteome during its cell cycle was also evaluated. For this, protein samples from four points of the cell cycle were trypsinized and labeled with iTRAQ before LC-MS/MS analyzes, revealing that 785 proteins and 88 phosphoproteins were regulated. The possible role of the regulated proteins and phosphoproteins during the cell cycle was discussed.

Finally, this work also describes the first analysis of the proteome of *P. serpens*, a phytoparasite whose genome has not yet been sequenced and that has potential medical interest due to its cross-reactivity with *T. cruzi*. Using a database composed of sequences of 200 organisms of the Kinetoplastida class, 4,387 proteins were identified in the *P. serpens* proteome, with the *T. cruzi* sequences contributing the most to the identifications. The data generated allowed to propose a central metabolic map for the parasite, which included all the enzymes of the citric acid cycle and new range of proteins possibly responsible for the immunological cross-reaction between *P. serpens* and *T. cruzi*.

## Listas de Siglas e Abreviaturas

2-DE	Eletroforese Bidimensional
ACN	Acetonitrila
BLAST	----- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> (Dissociação induzida por colisão)
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido Etileno-diamino-tetra-acético)
ESI -	<i>Electrospray ionization</i>
FDR	<i>False Discovery rate</i> (Taxa de Identificações Falsas)
GO	Gene ontology (Ontologia gênica)
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i> (Dissociação por colisão de alta energia)
IAA	Iodoacetamida
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
LC -	<i>Liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida)
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem)
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
LTQ -	Linear Trap Quadrupole
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Ionização por Dessorção a Laser Assitida por Matriz)
MO	Microscopia Óptica
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massa)
MS/MS	Espectrômetro de massas em série
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Salino Fosfato)
SDS	Sodium dodecyl sulphate (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulphate – Polyacrylamide Gel Eletroforesis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio)
SFB	Soro fetal bovino
SL	Seqüência líder
TEAB	Trietilamônio bicarbonato
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	<i>Time of Flight</i> (Tempo de Voo)

# Sumário

Considerações Iniciais .....	9
Capítulo I – Introdução .....	10
1. Tripanossomatídeos .....	11
2. Doença de Chagas .....	13
3. Ciclo de Vida do <i>T. cruzi</i> .....	15
4. Ciclo celular em eucariotos superiores .....	17
5. Ciclo celular do <i>T. cruzi</i> .....	19
6. <i>Phytomonas serpens</i> .....	22
7. Proteômica baseada em espectrometria de massa .....	23
8. Proteômica de <i>T. cruzi</i> .....	25
9. Justificativa .....	27
10. Objetivos .....	28
10.1. Objetivos específicos .....	28
11. Referências Bibliográficas .....	29
Capítulo II – O subproteoma nuclear de <i>T. cruzi</i> .....	35
<i>Unveiling the Trypanosoma cruzi Nuclear Proteome</i> .....	36
Capítulo III – Proteômica de <i>T. cruzi</i> durante a divisão celular .....	49
1. Introdução .....	50
2. Metodologia .....	51
2.1. Estratégia experimental .....	51
2.2. Culturas celulares .....	52
2.3. Sincronização celular de formas epimastigotas .....	52
2.4. Validações da sincronização celular .....	53
2.4.1. Citometria de fluxo .....	53
2.4.2. Microscopias .....	53
2.5. Extração e digestão trípica de proteínas .....	54
2.6. Marcação com iTRAQ™ .....	55
2.7. Enriquecimento de fosfopeptídeos .....	55
2.8. LC-MS/MS e análises de dados por bioinformática .....	56
2.9. Estatística .....	57
3. Resultados e discussão .....	57
3.1. Validação dos diferentes tempos do ciclo celulares .....	57
3.2. Estudo qualitativo do proteoma e fosfoproteoma do ciclo celular de <i>T. cruzi</i> .....	61
3.3. Estudo quantitativo do proteoma e fosfoproteoma durante o ciclo celular de <i>T. cruzi</i> .....	65
3.4. Proteínas reguladas durante a divisão celular de <i>T. cruzi</i> .....	69
4. Referências bibliográficas .....	76
Anexo I .....	80
Anexo II .....	89
Capítulo IV – Análise proteômica de <i>Phytomonas serpens</i> .....	91
Considerações finais .....	115

## Considerações Iniciais

Devido à variedade de assuntos que abordamos neste trabalho, esta tese foi organizada em capítulos, a fim de permitir a leitura mais fluida. Inicialmente (Capítulo I) apresentamos uma breve revisão literária científica sobre assuntos abordados neste trabalho. Posteriormente dividimos os temas abordados em capítulos.

Sendo assim, o capítulo II trata da análise do subproteoma nuclear do *T. cruzi* apresentando o trabalho “*Unveiling the trypanosoma Cruzi nuclear proteome*” já publicado. O capítulo III trata de análise proteômica da divisão celular do *T. cruzi*. O capítulo IV, apresentaremos o manuscrito: “Proteome analysis of *Phytomonas serpens*, a phytoparasite of medical interest” que traz a caracterização proteômica de *Phytomonas serpens*, e está atualmente submetido em revista científica. Finalizamos a tese apresentando as considerações finais e as perspectivas deste trabalho.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**

## 1. Tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos (classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida) formam um grupo de notáveis espécies de protistas que engloba parasitas de invertebrados, vertebrados e plantas. Alguns desses protozoários são agentes etiológicos de doenças humanas como é o caso do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, do *T. brucei*, causador da doença do sono, e das espécies de *Leishmanias* responsáveis por diferentes formas clínicas da leishmaniose. Estes patógenos de interesse médico têm sido historicamente bastante estudados, sobretudo pela necessidade de desenvolver tratamentos mais efetivos contra suas infecções. Contudo, além da relevância dos tripanosomatídeos para a saúde humana, é importante ressaltar que estes organismos possuem características biológicas interessantes e peculiares, quando comparadas aos eucariotos superiores, e que muitas destas ainda são pouco conhecidas em nível molecular.

No que diz respeito à morfologia, os tripanosomatídeos são organismos móveis contendo um único flagelo, o qual se estende a partir de uma estrutura denominada bolsa flagelar situada próximo do cinetoplasto. O cinetoplasto (de onde vem o nome da classe Kinetoplastida) é uma rede condensada e concatenada de várias cópias do DNA mitocondrial (kDNA) que se localiza dentro da grande e única mitocôndria do parasito. A membrana destes protozoários é sustentada por uma camada de microtúbulos e recobrimo a membrana celular destes parasitas existe um vasto repertório de moléculas específicas que variam de acordo com a espécie e com o estágio de vida (STUART et al., 2008).

Os tripanosomatídeos possuem organelas denominadas glicossomos, que são peroxissomos modificados encontrados unicamente em cinetoplastídeos. A principal função dos glicossomos é ser o compartimento onde ocorre a maioria das reações da glicólise. Eles podem ainda participar de outras vias metabólicas como a via das pentoses-fosfato, a beta oxidação de ácidos graxos e a via de salvação de purinas (MICHELS et al., 2006).

Estes protozoários possuem características peculiares em certos processos como a transcrição gênica e a compactação de DNA, tendo assim uma organização nuclear distinta de outros eucariotos.

Os tripanosomatídeos compactam seu DNA de forma semelhante aos demais eucariotos, com a participação do octâmero formado por duplas de histonas H2A, H2B, H3 e H4 (ALSFORD; HORN, 2004). Também possuem genes codificantes para a histona H1, mas não foram encontrados homólogos da histona centromérica CenH3, necessária para montagem do cinetocore durante a mitose. De um modo geral, as histonas destes organismos apresentam alta divergência de sequência, em relação a outros eucariotos, principalmente no que diz respeito a modificações pós-traducionais

(DE GAUDENZI et al., 2011). Pouco se sabe a respeito da formação e distribuição dos cromossomos no núcleo, até mesmo pela dificuldade de se determinar o número de cromossomos presentes nesse organismo, uma vez que, durante a mitose, os cromossomos não se condensam totalmente (SOLARI, 1980).

Notavelmente, os tripanosomatídeos (e os cínoplastídeos de modo geral) parecem não utilizar o início da transcrição como uma etapa regulatória do controle da expressão gênica. Sendo assim, para a obtenção de mRNAs maduros, os mRNAs primeiramente são transcritos de forma policistrônica, e então esse RNAs são processados por meio de *trans-splicing* e poliadenilação para obtenção de mRNAs maduros (Figura 1). Desse modo, a competição entre o processamento e a degradação do RNA pode contribuir para a regulação dos níveis de mRNA o que faz com que estes protozoários sejam um modelo para o controle pós-transcricional da expressão gênica (CLAYTON, 2016; VANHAMME; PAYS, 1995).

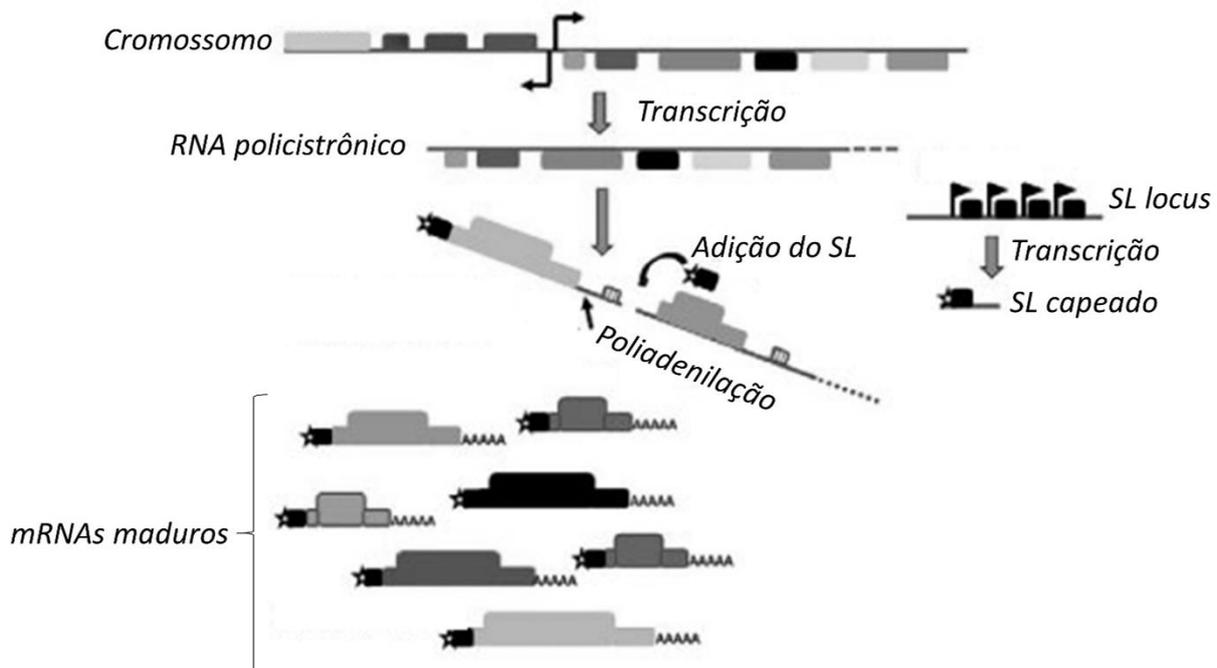


Figura 1. Transcrição e processamento do RNA em tripanosomatídeos. Os mRNA são transcritos do genoma de forma policistrônica. Durante o processamento do mRNA policistrônico ocorre o *trans-splicing*, quando uma sequência de 39 nucleotídeos chamados de sequência líder (SL) se liga a região 5' do mRNA e a poliadenilação que é a adição de uma cauda poli-A na região 3' originando assim mRNAs maduros. Adaptado (ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011).

Espécies de cinetoplastídeos possuem um alto número de genes ortólogos. Dos 8.000 mil genes que em média compõem o genoma de uma espécie da classe Kinetoplastida, estima-se que ao menos 6.000 possuam correspondentes ortólogos para a maioria dos membros desta classe. Por outro lado, estas semelhanças não impedem que estes parasitas causem doenças tão distintas (Simpson, Stevens, and Lukeš 2006; Stuart et al. 2008).

## 2. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descrita por Carlos Chagas em 1909 quando este identificou o *Trypanosoma cruzi* como agente etiológico e o *Triatoma infestans* como um dos insetos hematófagos responsáveis pela sua transmissão vetorial.

Essa enfermidade atinge atualmente cerca de 7-8 milhões de pessoas e afeta os sistemas cardiovascular, gastrointestinal ou nervoso do hospedeiro. A doença de Chagas é endêmica em muitas regiões das Américas, ocorrendo da Argentina até sul do México e também alguns casos relatados nos Estados Unidos (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015). Contudo, desde a década passada a doença de chagas já havia ganhado proporções mundiais com casos relatados em países em outros continentes (Figura 2), propiciado principalmente pela migração populacional (PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015).

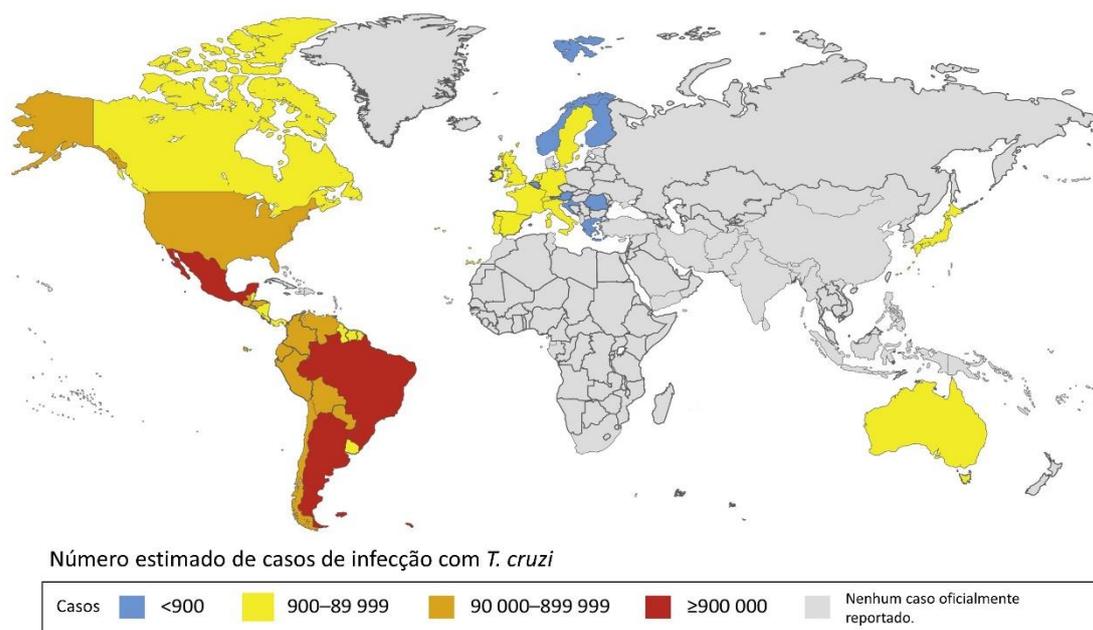


Figura 2. Distribuição global da doença de Chagas, baseado em dados oficiais. Adaptado (PEREZ; LYMBERY; THOMPSON, 2015).

Assim, o principal modo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* se dá por meio das fezes de insetos triatomíneos hematófagos chamados de “barbeiros”, após o repasto sanguíneo. Além da acima mencionada transmissão vetorial, a doença de Chagas pode ser propagada de outras formas como ingestão de alimentos contaminados, transmissão congênita, transfusão de sangue, transplante de órgãos e acidentes de laboratório (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015).

Com o desequilíbrio ecológico provocado pela ocupação e pelas atividades antrópicas em áreas silvestres e rurais, a doença disseminou-se, tornando-se endêmica em muitas regiões. Normalmente, as pessoas mais expostas possuem uma baixa condição sociocultural e econômica o que agrava os efeitos da doença sobre a sociedade (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016). Nos últimos anos empreendeu-se um grande esforço para se eliminar a transmissão domiciliar por *Triatoma infestans*. Sendo assim, o Brasil foi considerado livre desta modalidade de infecção pela Comissão Intergovernamental do Cone Sul. Apesar disso deve-se salientar que espécies outras de barbeiros podem transmitir a doença em diversas regiões do Brasil. No Nordeste brasileiro, por exemplo, há espécies de triatomíneos silvestres que se adaptam muito bem às moradias, atraídos pelas luzes das casas. O fenômeno da migração rural em direção aos centros urbanos no Brasil, fez aumentar a transmissão por transfusão sanguínea. Com a maior parte dos indivíduos infectados vivendo nas cidades, o risco de transmissão por transfusão sanguínea é muito alto, caso não se observe rigoroso controle nos bancos de sangue. Apesar dos progressos no controle da doença de Chagas, essa enfermidade segue como problema de saúde pública, sobretudo nas grandes cidades para onde convergiram pessoas infectadas pelo parasito, sejam aquelas assintomáticas ou oligossintomáticas em busca de trabalho, ou doentes em busca de tratamento (ARAUJO; SABROZA; DA SILVA, 2017).

A doença de Chagas pode se apresentar nas fases aguda ou crônica, que se diferenciam tanto pelo tempo de infecção quanto pela resposta do hospedeiro. As características da fase aguda variam quanto à presença ou não de sintomas e a sua gravidade. Na fase crônica o paciente pode apresentar-se sem sintomas aparentes (fase indeterminada) ou desenvolver a forma cardíaca, digestiva ou neurológica da doença (BRASIL, 2014; CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015).

Cerca de 40% dos pacientes enfermos desenvolvem a fase crônica sintomática da doença, sendo que 30% dos casos apresentam alterações cardíacas e 10% somam aqueles que apresentam alterações digestivas ou neurológicas (BRASIL, 2014; CARLOS PINTO DIAS et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015) os demais 60% são portadores da doença na sua fase indeterminada e conseqüentemente não possuem sintomas.

Na fase aguda, o diagnóstico é feito pela detecção do parasito no sangue periférico do doente, usando métodos diretos (pesquisa do parasito), uma vez que neste momento anticorpos ainda não são detectáveis. Ademais, importantes sintomas clínicos podem ser evidenciados na fase aguda, e estes sinais dependem da porta de entrada do parasito (ocular ou cutâneo). O Sinal de Romana, um edema bipalpebral e o Chagoma de inoculação cutâneo (Figura 3) são exemplos destes sinais (CARLOS PINTO DIAS et al., 2016).



Sinal de Romaña

Chagoma de inoculação cutâneo

Figura 3: Manifestações clínicas típicas da fase aguda da infecção com *T. cruzi*.

Na fase crônica da doença predomina a baixa parasitemia tornando os testes parasitológicos pouco eficientes. Como o título de anticorpos é mais elevado nesta fase, o método de diagnóstico se baseia na pesquisa de anticorpos anti-*T. cruzi* no sangue do paciente (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015).

Sem vacinas, atualmente no Brasil a única droga disponível para o tratamento dos doentes é o benzonidazol. Este medicamento possui maior efetividade no tratamento de quadros agudos tendo baixa taxa de curas na fase crônica e apresentam muitos efeitos colaterais que levam à interrupção do tratamento (Brasil 2014). Torna-se, portanto, urgentemente necessário o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficientes e mais bem tolerados.

### 3. O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* ocorre dentro do inseto vetor hematófago e de hospedeiros mamíferos como o homem (Figura 4). Durante seu ciclo de vida, o parasito se diferencia em quatro estágios: epimastigota e tripomastigota metacíclico no inseto vetor, e tripomastigota sanguíneo e amastigota dentro do hospedeiro mamífero (DE SOUZA, 1999).

## Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

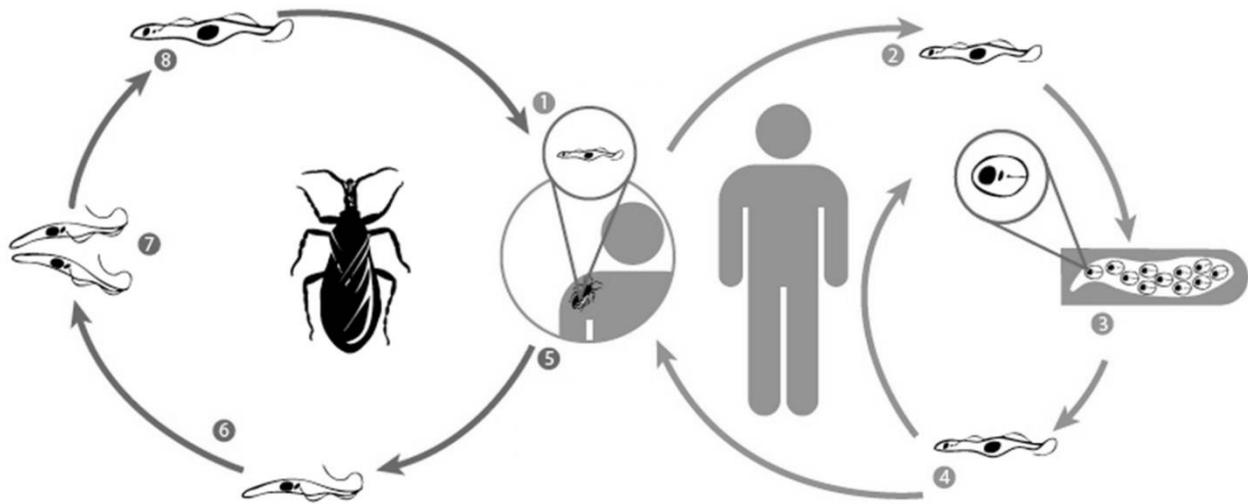


Figura 4 – **Eventos do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***: 1. Tripomastigotas metacíclicos são liberados por meio das fezes do inseto vetor infectado, e posteriormente o parasita poderá infectar o hospedeiro por uma lesão na pele ou por meio das mucosas; 2. Tripomastigotas metacíclicas são fagocitados e ao escaparem do fagossomo se diferenciarão em formas amastigotas no citoplasma; 3. Amastigotas se replicam; 4. Amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas e após o rompimento celular caem no sistema circulatório infectando novas células; 5. Inseto vetor ingere sangue contendo tripomastigotas; 6. Tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas; 7. Epimastigotas multiplicam-se na luz do sistema digestivo do inseto vetor; 8. Epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Adaptado de: [www.dpd-cdc-govdpx](http://www.dpd-cdc-govdpx).

Após o repasto sanguíneo, formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas por meio das fezes e urina do barbeiro infectado e, desse modo, estas formas podem infectar o hospedeiro por uma lesão na pele ou por meio das mucosas. As formas tripomastigotas metacíclicas entram então em contato com células fagocitárias e alguns destes parasitos conseguem sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro, escapando do fagossomo para o citoplasma celular (TEIXEIRA et al., 2006).

No citoplasma, os tripomastigotas se diferenciam na forma replicativa chamada amastigota, que por sua vez, permanece dentro da célula por quatro dias (ENGEL; DOYLE; DVORAK, 1985). A forma amastigota pode permanecer nas células musculares do hospedeiro por décadas, sem causar danos significativos a estes tecidos (TEIXEIRA et al., 2006). Eventualmente, os amastigotas se diferenciam novamente em formas tripomastigotas que rompem a célula hospedeira caindo no sistema sanguíneo, assim recomeçando o ciclo de infecção, podendo infectar diferentes tipos celulares (BRENER, 1997).

Quando o inseto vetor ingere sangue contendo formas tripomastigotas, estas se diferenciam em outro tipo de forma replicativa, chamadas epimastigotas, poucas horas após a sua ingestão. As

formas epimastigotas multiplicam-se na luz do sistema digestivo do inseto vetor onde posteriormente se diferenciam a tripomastigotas metacíclicos, fechando o ciclo (BRENER, 1997).

Cepas de *T. cruzi* podem ser bastante heterogêneos quanto a sua morfologia, virulência, patogenicidade, suscetibilidade a drogas, entre outros parâmetros. *T. cruzi* se divide por propagação clonal através de fissão binária, mas, ocasionalmente, surgem novas linhagens, devido à recombinação genética (ZINGALES, 2011). Também já foi descrito em *T. cruzi* um processo incomum de troca genética intermediada por fusão nuclear. Este processo parece similar ao processo nominado parasexual próprio de fungos (GAUNT et al., 2003; ZINGALES, 2011).

#### **4. Ciclo celular em eucariotos superiores**

A divisão celular em eucariotos é um processo biológico central no crescimento e proliferação celular, no desenvolvimento dos organismos, no reparo de danos ao DNA, na resposta a lesões e na patogênese de algumas doenças (SCHAFER, 1998).

O ciclo celular pode ser dividido em duas grandes fases celulares: interfase e mitose. A interfase é uma etapa caracterizada pelo crescimento celular e replicação do DNA, e posteriormente esta fase é sucedida pela mitose (MCINTOSH; HAYS, 2016; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

A interfase inclui as fases G1, S e G2. Na fase G1 a célula coordena seu tamanho e monitora seu exterior e interior a fim de se preparar para a replicação de DNA, que ocorrerá na fase S (MAES et al., 2017). Durante a fase G1, há uma intensa síntese de RNA e proteínas. Além disso, nesta fase as células apresentam cromatinas pouco condensadas impossibilitando a visualização dos cromossomos pela microscopia (HARTWELL; WEINERT, 1989). Entre as fases G1 e S o progresso do ciclo celular pode ser interrompido por períodos longos – que variam de horas a anos – antes de entrarem novamente no ciclo celular, esta fase é denominada G0 (JOHNSTON, 1990).

Após a replicação do DNA na fase S, a célula começa a se preparar para o processo de divisão nuclear em uma nova fase denominada G2 a qual é marcada pela intensa síntese de proteínas e consequentemente de rápido crescimento celular (MAES et al., 2017). Ao sair da interfase a célula inicia o processo de divisão denominado mitose, que se caracteriza pela divisão nuclear e a citocinese com a formação das células filhas (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

A mitose por sua vez também pode ser dividida em etapas distintas. Na prófase ocorre a condensação cromossômica e a desintegração da membrana nuclear. Posteriormente, com o surgimento dos fusos mitóticos se dá uma nova etapa nomeada prometáfase, que é sucedida pela metáfase onde se dará a ligação dos cromossomos aos fusos mitóticos. Esse processo permitirá a

separação dos cromossomos, resultando na formação de dois núcleos funcionais em um processo denominado telófase. A divisão celular se concluirá com a formação de duas células filhas durante a citocinese (MAES et al., 2017).

O processo de divisão celular conta com um alto grau de controle e refinamento por meio de um aparato bioquímico formado por um grupo de proteínas que regulam os processos de divisão celular em pontos específicos de checagem durante todo o ciclo celular. Estes pontos são de suma importância para impedir que o início de uma nova fase do ciclo se dê antes que a fase que lhe antecede esteja concluída, para verificar se o crescimento celular foi suficiente para o desenrolar da divisão ou mesmo se existem condições favoráveis para a progressão do ciclo celular. Os pontos de regulação do ciclo celular são mecanismos de vigilância que monitoram a ordem, a integridade e a fidelidade dos principais eventos do ciclo celular. Estes incluem o crescimento para o tamanho apropriado da célula, a replicação e integridade dos cromossomas, e a sua segregação precisa na mitose (BARNUM; O'CONNELL, 2014; HARTWELL; WEINERT, 1989).

O ciclo celular é um processo biológico muito preciso e regulado pela ativação coordenada de proteínas denominadas ciclinas quinases dependentes (Cdks) em diferentes vias de controle que asseguraram a adequada transmissão do genoma para as células filhas (BESSON; DOWDY; ROBERTS, 2008; SATYANARAYANA; KALDIS, 2009), regulando a progressão do ciclo celular durante a interfase e a mitose (BLAIN; MONTALVO; MASSAGUÉ, 1997; SCHAFER, 1998).

As ciclinas ao se associarem às Cdks regulam a capacidade destas de fosforilar proteínas alvos, sendo assim a ativação e a desativação do complexo ciclina-Cdk coordenam a progressão do processo de divisão celular (MURRAY, 2001)

A fim de manter o tamanho das células e assegurar que cada célula-filha seja dotada com a quantidade apropriada de material genético e biossintético, as células devem, em média, exatamente dobrar seu conteúdo antes da divisão. O controle do tamanho das células é crítico para regular a distribuição de nutrientes para a célula e para regular o tamanho e a função dos órgãos em organismos multicelulares. A existência de pontos de verificação do tamanho da célula permite que as células coordenem o tamanho das células com a progressão do ciclo celular. Pontos de verificação de tamanho de célula foram observados em G1 e G2 (BARNUM; O'CONNELL, 2014). A ciclina Cln3 é uma proteína envolvida no controle do tamanho celular e as Cdc25 e Wee1 respondem não somente ao tamanho celular mas também ao seu estado nutricional (CROSS, 1988; NASH et al., 1988; NURSE, 1975).

Danos no DNA são outros também são capazes de ativar o controle de ciclos celular, inativando ciclinas kinase dependentes (CDKs) até que a lesão seja reparada. A Chk1, uma quinase, que é ativada por todas as formas conhecidas de dano ao DNA, (BARNUM; O'CONNELL, 2014; TAPIA-ALVEAL; CALONGE; O'CONNELL, 2009).

A fase S marca um momento particularmente vulnerável para as células lidarem com danos no DNA. Quando a polimerase e suas proteínas associadas encontram um bloqueio à progressão, é necessário que o bloqueio seja removido para que a síntese de DNA possa ser retomada. A Cds1 e a Chk2 são quinases, de leveduras e de humanos respectivamente, relacionadas aos pontos de verificação durante a fase S (BARNUM; O'CONNELL, 2014; XU; DAVENPORT; KELLY, 2006).

A segregação das cromátides irmãs é um outro ponto sujeito ao controle do ciclo celular. Uma vez que todos os cinetócoros estejam ligados e alinhados na placa metafásica, a anáfase pode prosseguir, sendo promovida pela atividade de uma grande ligase de ubiquitina E3, conhecida como complexo promovedor da anáfase (APC). Esta ligase tem como alvo ciclinas mitóticas, que eliminam a atividade da CDK, e a securina, cuja degradação permite que a separase seja liberada e cliva os complexos de coesina nos cinetócoros. A atividade da APC é controlada por duas proteínas acessórias: Cdc20, que funciona até a metáfase-anáfase, e Cdh1, que continua facilitando a ubiquitinação mediada pela APC. O ponto de verificação do fuso funciona para evitar a ativação do APC Cdc20 sob condições em que os cinetócoros não estejam ligados pelos microtúbulos do fuso, ou quando fixados não estejam sob tensão (BARNUM; O'CONNELL, 2014; MCLEAN et al., 2011; WITTMANN; HYMAN; DESAI, 2001).

## **5. Ciclo celular em *Trypanosoma cruzi***

Embora algumas características morfológicas da replicação em epimastigotas tenham sido estudadas por Elias e colaboradores (2007), como a formação de novos cinetoplastos, núcleos e flagelos em culturas em fase exponencial de crescimento, são escassos os trabalhos científicos que elucidam aspectos moleculares do processo de divisão celular nestes organismos.

A divisão celular em tripanosomatídeos apresenta diferenças quando comparada com a divisão celular de outros eucariotos. Durante a mitose em *T. cruzi*, a membrana nuclear não desaparece, resultando assim em uma divisão nuclear fechada. Outra característica importante tange ao fato da não formação de cromossomos visíveis nestes indivíduos, o que impossibilita evidenciar por técnicas de microscopia, processos como a migração cromossômica para a formação das células filhas durante a divisão celular (DE SOUZA; OSMANI, 2007; ELIAS et al., 2002).

Durante a fase G1 do ciclo celular do *T. cruzi* os cromossomos estão dispersos pelo núcleo. Na fase S os cromossomos migram para a periferia nuclear, onde posteriormente ocorrerá a replicação (Figura 5) (ELIAS et al., 2002).



Figura 5. Dinâmica dos cromossomos no núcleo de *T. cruzi* durante o ciclo celular. Em G1, os cromossomos se encontram dispersos no núcleo e posteriormente migram para a periferia nuclear onde permanecerão durante as fases posteriores. Adaptado (ELIAS et al., 2002)

Após o término da síntese de DNA nuclear, a cromatina volta a se afrouxar, o nucléolo desaparece, e com o surgimento dos fusos mitóticos inicia-se a separação do material genético que culminará na completa separação nuclear (Figura 6). Durante este processo é visível também o alongamento do cinetoplasto e o surgimento de um novo corpo basal e flagelo que resultará, após a completa citocinese, em duas células filhas (D. E. Teixeira et al. 2012).

O tempo médio necessário para que o parasita passe pela fase de síntese, G2, mitose e citocinese é de cerca de 13 horas para a forma epimastigota (Figura 7), podendo existir variações deste tempo para diferentes isolados (ELIAS et al. 2007).

Trabalhos recentes usaram abordagens proteômicas e da transcritômicas visando o estudo molecular da divisão celular de tripanosomatídeos. Entre eles ressaltam-se recentes publicações, como o estudo de mudanças do transcritoma durante o ciclo proliferativo do *Trypanosoma cruzi* (CHÁVEZ et al., 2017), bem como o estudo proteômico que determinou variações de modificações em histonas durante o ciclo celular (LEANDRO DE JESUS et al., 2016), a análise proteômica comparativa de proteínas ligadas à cromatina de formas replicativas e não replicativas (LEANDRO DE JESUS et al., 2017) ou mais recente, o proteoma da ciclo celular de de *T. brucei* (CROZIER et al., 2018). Contudo, não temos conhecimento de nenhum trabalho que até então se proponha estudar o proteoma e fosfoproteoma global do *T. cruzi* durante diferentes pontos do seu ciclo celular.

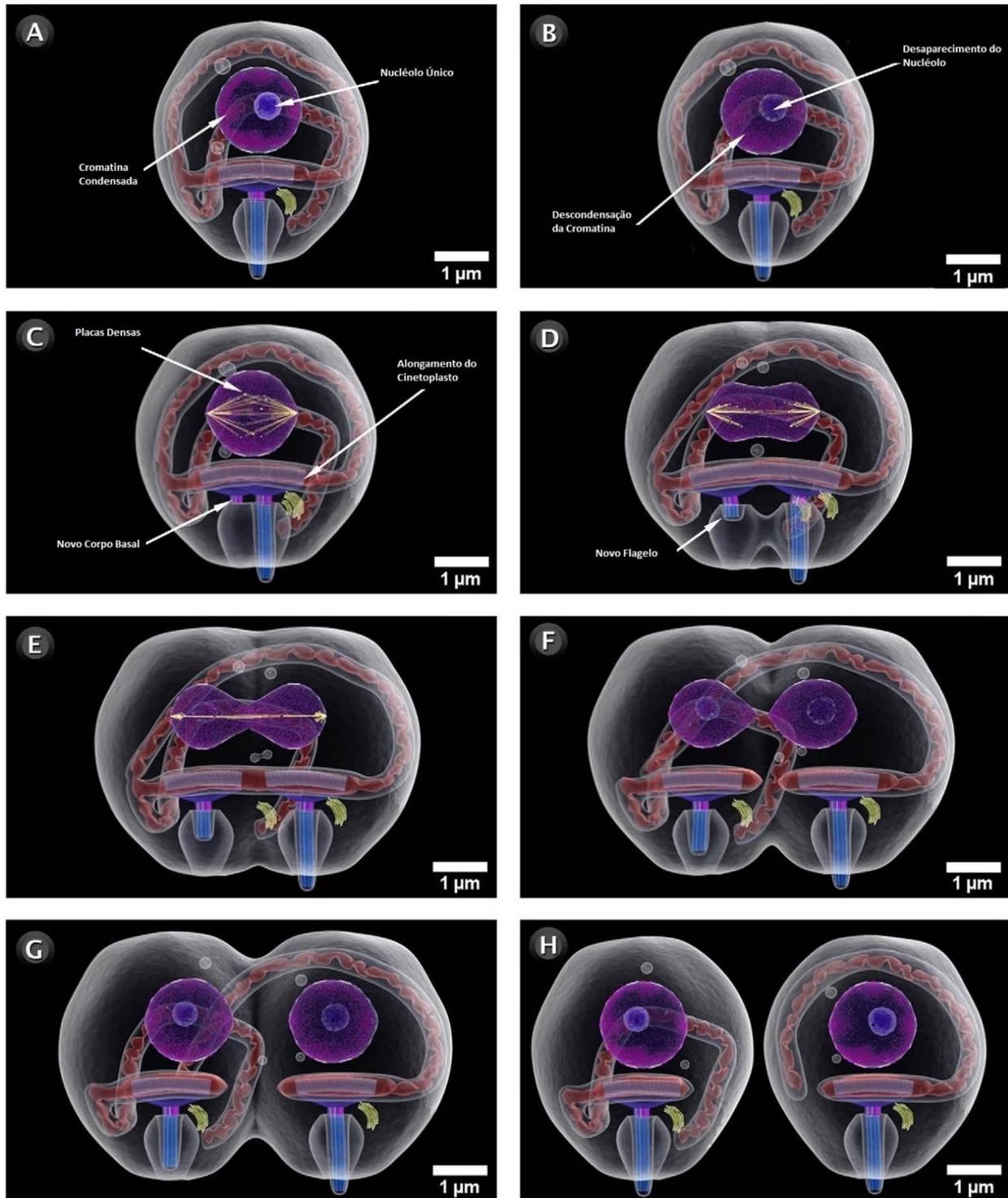


Figura 6. Estágios da divisão celular por divisão binária das formas epimastigotas de *T. cruzi*. A – Fim da fase de síntese, as células ainda apresentam DNA condensado na periferia nuclear e a presença do nucléolo. B – Início do G2 com a descondensação do DNA e desaparecimento do nucléolo, C – Início da segregação do DNA, D – Início da citocinese e formação de um segundo flagelo. E, F, G – Fases intermediárias da citocinese e H – Formação de duas células filhas. Adaptado (TEIXEIRA et al., 2012).

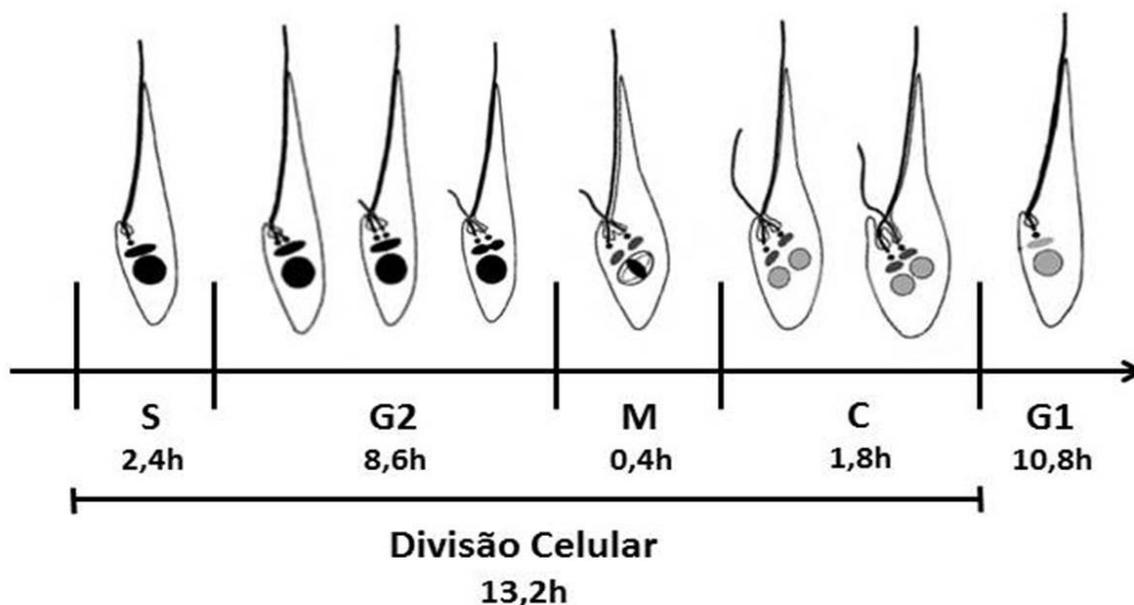


Figura 7. Tempo médio das etapas de divisão celular da forma epimastigota (Cepa Y). S – Síntese, M – Mitose, C – Citocinese. Adaptado (SANTOS et al., 2007).

## 6. *Phytomonas serpens*

*Phytomonas serpens* é um protozoário isolado de tomates (*Lycopersium esculentum*), com morfologia altamente polimórfica e movimentos serpenteados. Inicialmente chamado de *Leptomonas serpens* (JANKEVICIUS et al., 1989).

Por não possuir citocromo na mitocôndria, e conseqüentemente uma cadeia respiratória clássica, a produção energética de *P. serpens* é predominantemente dependente da glicólise (MASLOV; NAWATHEAN; SCHEEL, 1999; TIELENS; VAN HELLEMOND, 1998)

O ciclo de vida do *P. serpens* alterna entre a planta e o inseto. Os insetos (*Phthia picta*) se infectam após se alimentar em tomates contaminados, e assim posteriormente apresentarão parasitas nas excretas, tubo digestivo e glândulas salivares sendo assim capazes de infectar posteriormente tomates sadios (COSTA, 2006).

Não diferente das outras espécies que compõem o gênero *Phytomonas*, pouco se conhece sobre o *P. serpens*, conseqüentemente a patogenicidade e o impacto desta infecção na cultura do tomate precisam ser mais bem determinados (COSTA, 2006).

*Phytomonas serpens* têm aguçado o interesse da pesquisa médica após a descrição de uma reação antigênica cruzada com *T. cruzi*. A existência de antígenos comuns entre *T. cruzi* e *P. serpens* despertou o interesse do uso deste último como um organismo capaz de promover imunização anti-

*T. cruzi*. Soros de pacientes com doença de Chagas apresentaram forte reatividade contra antígenos de *P. serpens* por ensaios sorológicos convencionais, como imunofluorescência indireta e teste de aglutinação direta (BREGANÓ et al., 2003) e em western blotting (GRAÇA-DE SOUZA et al., 2010). Posteriormente foi mostrado que a imunização oral com *Phytomonas serpens* foi capaz de promover proteção em camundongos contra a infecção de *T. cruzi* (PINGE-FILHO et al., 2005), reduzindo a carga parasitária e prevenindo a trombocitopenia e a leucopenia associadas a essa infecção (DA SILVA et al., 2013).

Apesar de peculiaridades em torno de seu metabolismo, o *P. serpens* é um organismo não patogênico para humanos, de fácil cultivo e por isso elegível como um modelo seguro para estudo de características básicas dos tripanossomatídeos.

## **7. Proteômica baseada em espectrometria de massa**

Proteoma é o conjunto de proteínas expressas em uma amostra biológica em um dado momento, em um dado espaço independente se sua origem é celular, tecidual ou fluídica (AEBERSOLD et al., 2001). Diferentemente do genoma, que é praticamente estático e pode ser bem definido em um determinado organismo, o proteoma está continuamente em mudança devido a respostas a fatores internos e externos (Guércio 2009).

Inicialmente, a detecção imunológica, o sequenciamento químico ou enzimático de proteínas, bem como o sequenciamento automático por degradação de Edman (Edman et al. 1950) eram as metodologias disponíveis para a identificação de proteínas. Contudo, vale salientar que estas estratégias dependiam de previa obtenção de peptídeos puros, determinavam a sequência de um único peptídeo de tamanho limitado por vez, e eram consideradas técnicas demoradas.

A espectrometria de massas conseguiu sanar essas dificuldades, tornando o estudo proteômico mais fácil e rápido. Apesar do primeiro espectrômetro de massas ter sido desenvolvido em 1899 pelo ganhador do prêmio Nobel de física J. J. Thompson, foi com o advento das técnicas de ionização como MALDI (TANAKA et al., 1988) e ESI (FENN et al., 1989), que permitiram manter, ao menos parcialmente, preservada a estrutura primária da cadeia peptídica, que impulsionou o uso da espectrometria de massas na biologia molecular.

Mais recentemente, com o avanço tecnológico dos espectrômetros apoiados pela genômica, é possível analisar misturas complexas de peptídeos, em abordagens proteômicas nomeadas de shotgun (WU; MACCOSS, 2002). Isso permitiu que a espectrometria de massa fosse convertida em uma ferramenta mais abrangente e versátil para a proteômica de larga escala (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

A proteômica é altamente impactada por tecnologias capazes de fracionar amostras biológicas previamente à análise por espectrometria de massas. Conseqüentemente, a seleção de um método de separação apropriado é, frequentemente, o primeiro passo para estas análises, impactando-as diretamente quanto à sensibilidade e precisão desta técnica (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

Entre as metodologias que figuram, destacam-se estratégias de separação em gel ou livres de gel. Dentre as metodologias que usam gel, a eletroforese bidimensional foi muito utilizada em pesquisas proteômicas.

A eletroforese bidimensional (2-DE) foi muito usada como técnica qualitativa desde que foi descrita, em 1975 (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Nessa técnica, as proteínas são primeiramente segregadas de acordo como seus pontos isoelétricos e posteriormente de acordo com suas massas moleculares, resultado assim em um gel com pontos ou bandas que representavam uma ou um grupo de proteínas. Diferenças proteômicas podiam ser evidenciadas ao comparar eletroforeses bidimensionais de duas amostras ou mesmo as proteínas podiam ser identificadas por espectrometria de massa, após a excisão e digestão das bandas ou pontos revelados no gel (VIDOVA; SPACIL, 2017).

Atualmente dentre as abordagens para análises proteômicas baseadas em espectrometria de massas, a mais comum são as que utilizam cromatografia associada a espectrometria de massas. Nesse tipo de abordagem a amostra proteica, após digestão enzimática, é separada por meio de cromatografia líquida, em geral cromatografia em fase reversa. Então, os peptídeos eluídos são transferidos por um sistema de vácuo ao espectrômetro de massas, que se encarregaram de registrar as razões massa/carga e a intensidade dos peptídeos. Após mensurar a relação carga/massa do peptídeo o espectrômetro poderá encaminhá-lo a um processo de fragmentação e posteriormente analisar os novos fragmentos gerados. As massas dos peptídeos e dos seus fragmentos são utilizadas para identificá-lo, e as intensidades são utilizadas para a sua quantificação. (MEISSNER; MANN, 2014; WU; MACCOSS, 2002).

Apesar da quantificação das proteínas ser possível através de metodologias label-free, é difícil garantir para esta estratégia o controle de qualidade de todas as etapas analíticas (CHEN, 2008). Alternativamente, reagentes isobáricos, como iTRAQ™, facilitam a análise quantitativa dos proteomas, dentre outras formas reduzindo o tempo de análise, preservando as modificações pós traducionais dos peptídeos e propiciando a análise direta dos dados.

O iTRAQ é composto por um grupo repórter, que em umas das suas diferentes configurações as massas variam entre 114 e 117 Da, e um grupo balanceador com massas entre 28 a 31 Da, e por fim um grupo reativo se liga às amins livres no terminal N de todos os peptídeos nos resíduos de lisina. Conseqüentemente, cada peptídeo marcado aparece com mesma massa em uma varredura MS, resultado do caráter isobárico da marcação, Contudo, após a fragmentação dos íons percursores é

possível determinar a intensidade dos diferentes grupos repórteres o que se traduzirá na abundância relativa deste peptídeo marcado para cada condição analisada.

## 8. Proteômica de *T. cruzi*

A proteômica é uma ferramenta bastante apropriada para o estudo da expressão de proteínas em tripanossomatídeos, principalmente devido ao fato de que estes protozoários parecem não utilizar o início da transcrição como uma etapa regulatória do controle da expressão gênica (Vanhamme and Pays 1995) .

Em 2004, o grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB publicou o primeiro estudo de análise proteômica entre as formas do *T. cruzi*, usando eletroforese bidimensional (PABA et al., 2004a) e em seguida o primeiro trabalho proteômico enfocando o processo de amastigogênese usando-se 2-DE, análise computacional e espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF permitindo apontar a existência de proteínas exclusivas ou diferencialmente expressas em estágios específicos do parasita (PABA et al., 2004b).

Entre outros trabalhos que utilizaram ferramentas proteômicas na pesquisa em *T. cruzi* estão o estudo da metaciclogênese, onde foram apresentadas diferenças entre os proteomas das formas tripomastigotas e epimastigotas, bem como proteínas apresentando expressão diferencial durante a metaciclogênese (PARODI-TALICE et al., 2007). Além do mais, técnica de 2-DE mais apropriadas para resolução de proteínas básicas foi otimizada e aplicada para comparar o proteoma dos diversos estágios de vida do *T. cruzi* (MAGALHÃES et al., 2008).

Abordagens proteômicas também foram usadas para o estudo de cepas resistentes ao tratamento contra o benzonidazol, revelando a expressão diferencial de proteínas em cepas resistentes (ANDRADE et al., 2008).

Com a publicação do genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005) e a disponibilidade de equipamentos mais poderosos, foi possível identificar um maior número de proteínas em cada estudo. Exemplo disso foi a publicação de um dos estudos proteômicos mais abrangentes de *T. cruzi*, que identificou, por meio de estratégia “shotgun”, 2.864 proteínas em todas as formas do parasita, 1.861 proteínas para a forma epimastigota, mostrando que 732 são exclusivas deste estágio de vida (ATWOOD et al., 2005).

Temas foram revisitados usando novas estratégias de análise. Entre eles o estudo proteômico do processo de amastigogênese, que permitiu evidenciar proteínas, vias, e eventos de fosforilações

coordenadas por cinases e fosfatases envolvidas na coordenação da amastigogênese (QUEIROZ et al., 2014).

Pode-se considerar que a análise de uma fração específica de um proteoma – subproteoma – também tem contribuído para o entendimento da biologia do *T. cruzi*. Sobretudo, porque esta estratégia concentra proteínas pouco expressas, que possivelmente estariam sub-representadas em um estudo proteômico global de uma amostra biológica completa como é o proteoma de uma célula ou tecido, dificultando sua identificação (TAYLOR; FAHY; GHOSH, 2003).

Um dos primeiros trabalhos que analisaram um subproteoma de *T. cruzi* foi a análise dos reservossomas, que identificou novas proteínas de diferentes classes, como enzimas, bombas de prótons, proteínas de transporte (SANT'ANNA et al., 2009), proteínas da superfície celular das formas de vida presentes no homem também foram contempladas em um estudo subproteômico (QUEIROZ et al., 2013). Recentemente, dois trabalhos foram publicados comparando as proteínas associadas à cromatina de formas replicativas e não replicativas, mostrando que a composição de fatores ligados à cromatina diferem grandemente entre as formas estudadas (LEANDRO DE JESUS et al., 2017), bem como revelando histonas com modificações variáveis durante o ciclo celular do *T. cruzi* (LEANDRO DE JESUS et al., 2016).

A proteômica é uma técnica capaz de gerar grande quantidade de informação, como uma ferramenta importante na elucidação de diversos processos biológicos pouco conhecidos, e por isso, é uma excelente estratégia para obter informação de fenômenos biológicos incomuns como é o caso da divisão celular de *T. cruzi*.

## 9. Justificativa

O presente trabalho é a intersecção entre duas linhas de pesquisa tradicionais desenvolvidas na Universidade de Brasília, o estudo molecular da divisão celular do *T. cruzi* (Laboratório de Biologia do Gene – Instituto de Biologia - UnB) e a análise proteômica e subproteômica dos diferentes estágios de vida deste parasito (Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas – Instituto de Biologia - UnB).

Ao unir ferramentas proteômicas a técnicas de biologia celular pretendemos alcançar um maior sucesso nas tentativas de elucidar, não somente quais proteínas estão envolvidas no processo de divisão celular, mas também propor o papel destas proteínas durante a divisão.

Pouco se sabe ainda sobre os processos de divisão celular nesse parasito e existe muito a ser elucidado quando se trata de fatores regulatórios da replicação, compactação do DNA, formação de cromossomos, dentre outros. Visto que a divisão celular é alvo de diversos medicamentos na terapêutica moderna, quanto mais completa a informação sobre proteínas-chave durante o processo de divisão celular do *T. cruzi* se obtiver maior a perspectiva de identificar alvos terapêuticos e conseqüentemente, desenvolver tratamentos mais seguros e efetivos para doença de Chagas.

Ademais, este trabalho procura ajudar na descrição de um processo que parece ser muito distinto ao encontrado nos demais eucariotos, gerando assim dados importantes sobre um processo de divisão celular alternativo que ocorre em tripanosomatídeos.

De forma complementar, estudamos o proteoma do *Phytomonas serpens*, um tripanossomatídeo fitoparasita, não patogênico humano, de fácil cultivo, que além de poder ser um organismo de escolha para o estudo de sua família tem potencial interesse médico por possuir reação antigênica cruzada com *T. cruzi*.

## 10. Objetivos

Analisar o processo de divisão celular das formas replicativas do *Trypanosoma cruzi*, por meio da caracterização de proteomas totais durante a divisão e do subproteomas nuclear do parasito, visando a identificação das principais proteínas envolvidas neste processo. Caracterizar o proteoma de *P. serpens*, suas peculiaridades metabólicas e sua reatividade imunológica cruzada com *T. cruzi*.

### 10.1 Objetivos específicos

- Obter frações enriquecidas de núcleo e realizar a análise subproteômica desta fração.
- Estabelecer a sincronização das formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Validar a sincronização do ciclo celular das formas epimastigotas por citometria de fluxo e técnicas de microscopia.
- Analisar e comparar os proteomas da forma epimastigota de *T. cruzi* em diferentes etapas do processo de divisão celular.
- Identificar proteínas estágio-específicas ou diferencialmente expressas durante a divisão celular de epimastigotas.
- Analisar o proteoma de *P. serpens* com base em um banco de dados composto por sequencias proteicas de outras espécies de cinetoplastídeos.
- Enumerar proteínas possivelmente responsáveis pela reação imunológica cruzada entre *P. serpens* e *T. cruzi*.

## 11. Referências Bibliográficas

- ALSFORD, S.; HORN, D. **Trypanosomatid histones** *Molecular Microbiology*, 2004.
- ANDRADE, H. M. et al. Proteomic analysis of trypanosoma cruzi resistance to benzimidazole. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 6, p. 2357–2367, 2008.
- ARAÚJO, A. J. G. DE; SABROZA, P. C.; DA SILVA, L. F. R. F. **Situação atual Situação atual da epidemiologia da doença de Chagas**. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/epidemiologia/>>.
- ARAÚJO, P.; TEIXEIRA, S. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in Trypanosoma cruzi: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 257–266, 1 jan. 2011.
- ATWOOD, J. A. et al. The Trypanosoma cruzi Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473–476, 15 jul. 2005.
- BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell cycle regulation by checkpoints. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1170, p. 29–40, 2014.
- BESSION, A.; DOWDY, S. F.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. **Dev Cell**, v. 14, n. 2, p. 159–169, 2008.
- BLAIN, S. W.; MONTALVO, E.; MASSAGUÉ, J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p27(Kip1) with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25863–25872, 1997.
- BRASIL, M. DA S. **Guia de vigilância em saúde**. [s.l.: s.n.].
- BREGANÓ, J. W. et al. Phytomonas serpens, a tomato parasite, shares antigens with Trypanosoma cruzi that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 257–264, 2003.
- BRENER, Z. Trypanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo. **Scielo Books**, p. 24–31, 1997.
- CARLOS PINTO DIAS, J. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 1–10, 2016.
- CHÁVEZ, S. et al. Transcriptome-wide analysis of the Trypanosoma cruzi proliferative cycle identifies the periodically expressed mRNAs and their multiple levels of control. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.

- CHEN, C. H. (W ). Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 1, p. 16–36, 2008.
- CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.
- COSTA, P. M. O. **Exploração do genoma de *Phytomonas serpens***. [s.l.] Fundação Osvaldo Cruz, 2006.
- CROSS, F. R. DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 8, n. 11, p. 4675–4684, 1988.
- CROZIER, T. W. M. et al. Proteomic analysis of the cell cycle of procyclic form *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp.RA118.000650, 2018.
- DA SILVA, R. V. et al. Oral Exposure to *Phytomonas serpens* Attenuates Thrombocytopenia and Leukopenia during Acute Infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–9, 2013.
- DE GAUDENZI, J. G. et al. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays In Biochemistry**, v. 51, p. 31–46, 2011.
- DE SOUZA, C. P. C.; OSMANI, S. A. **Mitosis, not just open or closed Eukaryotic Cell**, 2007.
- DE SOUZA, W. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: From 1909 to 1999. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 17–36, 1999.
- EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.
- ELIAS, M. C. Q. B. et al. Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 944–953, 2002.
- ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: Biological Characterization of Clones Derived from Chronic Chagasic Patients. II. Quantitative Analysis of the Intracellular Cycle. **The Journal of Protozoology**, v. 32, n. 1, p. 80–83, 1985.
- FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.
- GAUNT, M. W. et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936–939, 2003.

GRAÇA-DE SOUZA, V. K. et al. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. **Biological Research**, v. 43, n. 2, p. 233–241, 2010.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints : control that ensure the order of cell cycles events. **Science**, v. 246, n. November, p. 629–633, 1989.

JANKEVICIUS, J. V. et al. Life Cycle and Culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a Trypanosomatid Parasite of Tomatoes. **The Journal of Protozoology**, v. 36, n. 3, p. 265–271, 1989.

JOHNSTON, L. H. Periodic events in the cell cycle. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 274–279, 1990.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, n. 3, p. 231–243, 1975.

LEANDRO DE JESUS, T. C. et al. Chromatin proteomics reveals variable histone modifications during the life cycle of *trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 6, p. 2039–2051, 2016.

LEANDRO DE JESUS, T. C. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 23–38, 2017.

MAES, A. et al. The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma. **Oncotarget**, v. 8, n. 52, p. 90501–90520, 2017.

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

MASLOV, D. A.; NAWATHEAN, P.; SCHEEL, J. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 207–221, 1999.

MCINTOSH, J.; HAYS, T. A Brief History of Research on Mitotic Mechanisms. **Biology**, v. 5, n. 4, p. 55, 2016.

MCLEAN, J. R. et al. **State of the APC/C: Organization, function, and structure** *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2011.

MEISSNER, F.; MANN, M. **Quantitative shotgun proteomics: Considerations for a high-quality**

**workflow in immunology** *Nature Immunology*, 2014.

MICHELS, P. A. M. et al. **Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 2006.

MURRAY, A. W. **Cell Cycle: Centrioles at the checkpoint** *Science*, 2001.

NASH, R. et al. The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. **The EMBO journal**, v. 7, n. 13, p. 4335–46, 1988.

NURSE, P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. **Nature**, v. 256, n. 5518, p. 547–551, 1975.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007–21, 1975.

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. 517–524, 2004a.

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

PARODI-TALICE, A. et al. **Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis**. *Journal of Mass Spectrometry*. **Anais...**2007

PEREZ, C. J.; LYMBERG, A. J.; THOMPSON, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 11, p. 595–603, 2015.

PINGE-FILHO, P. et al. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: Role of nitric oxide. **Immunology Letters**, v. 96, n. 2, p. 283–290, 2005.

QUEIROZ, R. et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Epimastigote Cell Surface Proteins by Two Complementary Methods. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3255–3263, 5 jul. 2013.

QUEIROZ, R. M. L. et al. Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* amastigogenesis. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 13, n. 12, p. 3457–72, 2014.

SANT'ANNA, C. et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, v. 9, n. 7, p. 1782–1794, 2009.

- SANTOS, A. L. S. et al. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 8, p. 915–921, 2007.
- SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. **Mammalian cell-cycle regulation: Several cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms***Oncogene*, 2009.
- SCHAFFER, K. A. The cell cycle: a review. v. 35, n. 6, p. 461–473, 1998.
- SOLARI, A. J. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chromosoma**, v. 78, n. 2, p. 239–255, 1980.
- STUART, K. et al. **Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases***Journal of Clinical Investigation*, 2008.
- TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988.
- TAPIA-ALVEAL, C.; CALONGE, T. M.; O'CONNELL, M. J. **Regulation of Chk1 Cell Division**, 2009.
- TAYLOR, S. W.; FAHY, E.; GHOSH, S. S. **Global organellar proteomics***Trends in Biotechnology*, 2003.
- TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.
- TEIXEIRA, P. C. et al. Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 12, p. 1549–1562, 2006.
- TIELENS, A. G. M.; VAN HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. **Parasitology Today**, v. 14, n. 7, p. 265–271, 1998.
- VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 223–240, 1995.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. **The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer***Cell Proliferation*, 2003.
- VIDOVA, V.; SPACIL, Z. **A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition***Analytica Chimica Acta*, 2017.

WITTMANN, T.; HYMAN, A.; DESAI, A. **The spindle: A dynamic assembly of microtubules and motors** *Nature Cell Biology*, 2001.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **WHO Chagas disease (American trypanosomiasis) Factsheet**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>.

WU, C. C.; MACCOSS, M. J. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. **Current opinion in molecular therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 242–50, 2002.

XU, Y.; DAVENPORT, M.; KELLY, T. J. Two-stage mechanism for activation of the DNA replication checkpoint kinase Cds1 in fission yeast. **Genes & development**, v. 20, n. 8, p. 990–1003, 2006.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 11, n. 1, p. 49–79, 2009.

ZINGALES, B. Trypanosoma cruzi: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 44–48, 2011.

**CAPÍTULO II**  
**O SUBPROTEOMA NUCLEAR DO *T. CRUZI***

RESEARCH ARTICLE

# Unveiling the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Proteome

Agenor de Castro Moreira dos Santos Júnior<sup>1\*</sup>, Dário Eluan Kalume<sup>2</sup>, Ricardo Camargo<sup>1</sup>, Diana Paola Gómez-Mendoza<sup>1</sup>, José Raimundo Correa<sup>1</sup>, Sébastien Charneau<sup>1</sup>, Marcelo Valle de Sousa<sup>1</sup>, Beatriz Dolabela de Lima<sup>1</sup>, Carlos André Ornelas Ricart<sup>1</sup>

**1** Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910–900, Brasília, Brazil, **2** Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), 21040–360 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* [agenor.unb@gmail.com](mailto:agenor.unb@gmail.com)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Santos Júnior AdCMd, Kalume DE, Camargo R, Gómez-Mendoza DP, Correa JR, Charneau S, et al. (2015) Unveiling the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Proteome. PLoS ONE 10(9): e0138667. doi:10.1371/journal.pone.0138667

**Editor:** Edecio Cunha-Neto, University of Sao Paulo, BRAZIL

**Received:** June 24, 2015

**Accepted:** September 2, 2015

**Published:** September 18, 2015

**Copyright:** © 2015 Santos Júnior et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grant n° 563998/2010-5), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás, Programa Nacional de Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica (CAPES grant n°: 23038.005298/2011-83) and Financiadora de Estudos e Projetos. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Replication of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, displays peculiar features, such as absence of chromosome condensation and closed mitosis. Although previous proteome and subproteome analyses of *T. cruzi* have been carried out, the nuclear subproteome of this protozoan has not been described. Here, we report, for the first time to the best of our knowledge, the isolation and proteome analysis of *T. cruzi* nuclear fraction. For that, *T. cruzi* epimastigote cells were lysed and subjected to cell fractionation using two steps of sucrose density gradient centrifugation. The purity of the nuclear fraction was confirmed by phase contrast and fluorescence microscopy. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) allowed the identification of 864 proteins. Among those, 272 proteins were annotated as putative uncharacterized, and 275 had not been previously reported on global *T. cruzi* proteome analysis. Additionally, to support our enrichment method, bioinformatics analysis in DAVID was carried out. It grouped the nuclear proteins in 65 gene clusters, wherein the clusters with the highest enrichment scores harbor members with chromatin organization and DNA binding functions.

## Introduction

*Trypanosoma cruzi*, a protozoan that belongs to the Trypanosomatidae family, causes Chagas disease, the American trypanosomiasis, which affects approximately 7–8 million people worldwide, especially in Latin America [1]. Chagas disease is mainly transmitted by triatomine bugs, but it can also be disseminated through blood transfusion, organ transplant, vertical transmission from mother to offspring, ingestion of contaminated food and laboratory accidents [1].

*T. cruzi* possesses a digenetic life cycle, differentiating into four main life forms: epimastigote and metacyclic trypomastigote, which are found in the insect vectors, and trypomastigote and amastigote, which occur in mammalian hosts. In epimastigote, the life form studied here, the kinetoplast (a mitochondrial complex array of DNA fibrils) is localized anterior to the nucleus [2].

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

*T. cruzi* and other trypanosomatids have peculiar cell nucleus features when compared to other eukaryotes, such as animals. Some examples of these features are the absence of chromosome condensation and distribution in mitosis [3], closed mitosis (i.e. the nuclear envelope remains intact) [4] and replication of the DNA in the periphery of the nucleus [5]. In spite of the fact that these features have been described earlier, little is known about cell replication processes, as well as the proteins involved in these mechanisms.

*T. cruzi* presents polycistronic transcription and its gene expression is post-transcriptionally regulated, leading to a poor correlation between mRNA and protein levels [6]. Therefore, proteomics can be considered a reliable tool for the study of gene product expression in this parasite. Previous proteomic studies have been carried out aiming the understanding of *T. cruzi* biology, including global proteomic analysis [7, 8], proteomic changes during cell differentiation [9, 10] and analysis of subproteomes such as secretome [11], cell surface [12, 13], and organelles [14]. Here, we present for the first time, to the best of our knowledge, the isolation and proteome analysis of *T. cruzi* nuclear fraction.

## Material and Methods

Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Gibco, South America, and modified trypsin was acquired from Promega (Madison, WI, USA). All others reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

### Parasite culture

*T. cruzi* (CL Brener strain) epimastigotes were cultivated at 28°C in Liver Infusion Tryptose medium (LIT) [15] supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), 100 µg/ml ampicillin and 100 µg/ml streptomycin and 2 mg/mL hemin until the cells reached the logarithmic phase.

### Isolation of *T. cruzi* nuclear fraction

The methodology developed for the production of *T. cruzi* nuclear fraction was based on protocols previously described [16, 17]. For CL-Brener cell counting, a Neubauer chamber was used and approximately  $1.0 \times 10^{10}$  epimastigote cells were used for each nuclear isolation procedure. The following procedure was carried out independently for two biological replicates. All steps were performed at 4°C. Cells were centrifuged at 5,000 g for 10 min and then washed three times in Phosphate Buffered Saline (PBS). Pellet was resuspended in eight volumes of hypotonic buffer TENM2 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoethanol) and cell turgidity was confirmed by optical microscopy. Nonidet P40 0.5% (v/v) final concentration and protease inhibitors (Complete Mini, Roche, Meylan, France) were added to the cells, which were then lysed using a Dounce homogenizer. Cell lysis was followed by optical microscopy. Osmolarity of the lysate was reestablished by adding 12.5% (v/v) of 2 M sucrose (final sucrose concentration 0.25 M). It was then transferred to a conical centrifuge tube containing 5 ml of 0.58 M sucrose in TENM2 and centrifuged at 2,000 g for 10 min. The top layer containing the cytosol was carefully removed. The pellet, which contained a high density organelle fraction, was resuspended with 16 ml of 1.9 M sucrose in TENM2. The suspension was loaded on a centrifuge tube (SW28 Beckman) containing a discontinuous step gradient (from the bottom, 8 ml of 2.30 M sucrose, 8 ml of 2.10 M sucrose and 8 ml of 2.01 M sucrose; all steps in TENM2 with protease inhibitors). The tube was centrifuged at 141,000 g in a SW28 rotor for 3 h at 4°C. Fractions were immediately unloaded from the top, stained with the blue-fluorescent 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), examined by phase contrast and

fluorescence microscopy in a TCP SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## SDS-PAGE and identification of protein bands by 1D-LC-MS/MS

Equal amounts of each sample (cytosol, kinetoplast and nucleus), corresponding to  $30\ \mu\text{g}$  of protein per lane, were separated on 13% T SDS-PAGE gels using a SE 600 electrophoresis system (Hoefer, Inc, San Francisco, CA, USA). Electrophoresis was performed at 15 mA at  $18^{\circ}\text{C}$ . Next, gels were stained with Coomassie Blue G 250 (CBB-G 250) and digitalized in Image Scanner (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) using a Power Look Software (GE Healthcare).

Protein bands of interest were excised from the gel and washed twice with 50% (v/v) acetonitrile, followed by reduction with 10 mM dithiothreitol (DTT) in 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8.0 at  $56^{\circ}\text{C}$  for 1 hour. Cystein carbamidomethylation of each sample was performed with 55 mM iodoacetamide (IAA) for 1 h at room temperature in the dark. Gel slices were then rinsed three times with 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8.0 and dehydrated with 100% (v/v) ACN. After vacuum drying, the gels were rehydrated with digestion buffer (12.5 ng/ $\mu\text{L}$  modified trypsin in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 8.0, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) and the proteolytic digestion was performed overnight at  $37^{\circ}\text{C}$ . The peptides were recovered from gel by three cycles of 10 min incubation with ACN:  $\text{H}_2\text{O}$ :TFA (66:33:0.1 v/v/v) and 10 min sonication. Extracts were dried in a vacuum centrifuge, resuspended in loading solution (3% ACN:97%  $\text{H}_2\text{O}$ : 0.1% formic acid) and injected onto a Q-TOF micro mass spectrometer (Waters, Manchester, UK).

Following the injection of the sample at a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  flow rate for 15 min, the peptides were captured onto the reversed-phase (RP) trap column (180  $\mu\text{m} \times 20\ \text{mm}$ ) packed with 5  $\mu\text{m}$  Symmetry C18 material (Waters, Milford, MA, USA). As the linear gradient started, the eluted peptides were separated using a nanoACQUITY BEH130 C18 1.7  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m} \times 150\ \text{mm}$  RP analytical column (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phases used for the RP chromatography were 0.1% formic acid in water (mobile phase A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (mobile phase B). The total chromatography time was set to 70 min and the initial condition was 97% A and 3% B. Gradient increased linearly from 3 to 10% B in 3.67 min, then to 40% B from 3.67 to 50.79 min, and up to 85% B from 50.79 to 54.79 min. The gradient was maintained in 85% B from 54.79 to 58.79 min, followed by decreasing to 3% B from 58.79 to 60.79 min, and finally re-equilibration of the column to the initial condition till 70 min at a flow rate of 500 nL/min.

For the LC-MS/MS analysis, DDA acquisition mode was performed. Capillary and cone voltage was set at 3500 and 30 V, respectively. For the MS survey, the scan time was set to 1 s with inter-scan delay at 0.1 s and the range was from 400 to 2000 Da. The MS survey switched to MS/MS acquisition when the intensity of the precursor ion reached above 40 counts per second. For the MS/MS, the maximum number of selected precursor ions for fragmentation was three ions of charge 2, 3 or 4 detected from a single MS survey scan. MS/MS was obtained at a scan rate of 2 s and inter-scan delay at 0.1 s, acquired over the range from 50 to 2000 Da. MS/MS acquisition returned to MS survey when the peak intensity fell below 4 counts per second or after 4.2 seconds have elapsed. Collision energy was ramped according to the  $m/z$  and charge state of the precursor ion, controlled by the charge state recognition files. The TOF analyzer was calibrated with phosphoric acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (GFP, 100 fmol/ $\mu\text{L}$  in 50:50:1, methanol: $\text{H}_2\text{O}$ :acetic acid) as the reference solution from 50 to 2000  $m/z$ . Singly-charged cluster ion  $m/z$  585 was used as lock mass correction, and lock spray reference scan frequency was set to every 15 s during the acquisition at a scan of 1 second.

## Extraction and trypsin digestion of *T. cruzi* nuclear proteins for 2D-LC-MS/MS

*T. cruzi* nuclear fraction replicates were resuspended in 7 M urea/2 M thiourea at 4°C and homogenized using a vortex mixer (5 times 20 s with intervals of 5 min in ice bath). The nuclei lysis was monitored by optical microscopy. Each lysate was centrifuged for 10 min at 15,000 g. The protein concentration of the supernatant was quantified using a Qubit<sup>®</sup> Protein Assay Kit (Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) according to manufacturer's instructions, and the extracts were stored at -80°C until use.

Before trypsin digestion, a volume of 4 µL of 1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8.0 was added to 36 µL of nucleus extract (80 µg of protein) followed by the addition of 4.4 µL of 100 mM DTT and incubation at 30°C for 1 h. For cystein carbamidomethylation, 5 µL of 400 mM IAA was added to the sample, which was incubated at room temperature for 30 min in the dark. Subsequently, 250 µL of ultrapure H<sub>2</sub>O were added to lower urea and thiourea concentration. Modified trypsin was then added to reach a final trypsin:substrate ratio of 1:50. Finally, samples were incubated overnight at 39°C. The resulting tryptic peptides were acidified with 0.1% TFA and desalted using C18 Ultra-Micro Spin columns (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). The resulting samples were dried in a vacuum centrifuge.

## 2D-LC-MS/MS

Prior to 2D-LC-MS/MS, the tryptic peptide samples from two biological replicates were resuspended in 40 µL and 25 µL of anion exchange loading buffer (5 mM ammonium formate, 5% ACN pH 3.2), respectively, to a final peptide concentration of 2 µg/µL. The peptide mixtures were analyzed in nanoLC/MS<sup>E</sup> acquisition mode using a SYNAPT<sup>™</sup> G1 HDMS<sup>™</sup> System (Waters, Manchester, UK) and mass spectra were acquired in positive ion TOF V-mode. TOF analyzer was calibrated with the MS/MS fragment ions of [Glu1]-fibrinopeptide B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (GFP, 100 fmol/µL in 50:50:1, methanol:H<sub>2</sub>O:acetic acid) from 50 to 2000 m/z. GFP double-charged precursor ion at *m/z* 785.8426 was used as lock mass correction for accurate MS post acquisition measurements. During each LC-MS/MS run, the reference sprayer (GFP) was injected once every 30 s and acquired for 1 s. The mass spectra were acquired alternating low and high collision energy during 0.8 s in each mode and 0.02 s inter-scan delay time. In the low-energy MS mode data were collected at constant collision energy of 4 eV, whereas in the high-energy MS mode the collision energy ramped from 15 to 55 eV. Capillary and cone voltage was set at 3000 and 35 V, respectively. MS survey scan range was from 300 to 2000 Da and MS/MS was acquired over the range from 50 to 2000 Da.

Digested peptide mixtures were loaded onto a Waters nanoACQUITY UPLC system coupled to the mass spectrometer. Chromatography setup was based on the method by [18], consisting of an online two-dimensional (2D) nano-scale liquid chromatography. The first dimension chromatography included a pre-packed 180 µm × 20 mm strong cation-exchange (SCX) column (nanoACQUITY UPLC SCX TRAP Column) (Waters, Milford, MA, USA) in conjunction with a trap column (180 µm × 20 mm) packed with 5 µm Symmetry C18 material (Waters, Milford, MA, USA). For the second dimension, a nanoACQUITY BEH130 C18 1.7 µm, 75µm x 150mm reversed-phase (RP) analytical column (Waters, Milford, MA, USA) was used. An isocratic auxiliary pump (or ASM) allowed the SCX column to be equilibrated with loading buffer and performed the step gradient runs by loading 9 µL of "salt plugs" onto the SCX columns. The "plug" solutions (fractions) contained both ammonium formate and acetonitrile in varied concentration. The eight fractions were prepared from a 1M ammonium formate stock solution, pH 3.2 and acetonitrile according to the following: three fractions (50, 100 and 150 mM ammonium formate) containing 5% acetonitrile, four 200 mM ammonium

formate buffers with 5, 10, 20 and 30% acetonitrile, and a FLUSH solution (350 mM ammonium formate, 50% acetonitrile). Following the injection of the fractions at a 5  $\mu$ L/min flow rate for 10 min, the released peptides from the SCX column were captured into the C18 trap column, while the eluted ones were separated on the reversed-phase analytical column using a linear gradient of 0.1% formic acid in water (mobile phase A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (mobile phase B) for 80 min performed by the binary pump (BSM). Chromatography initial condition was set at 95% A and 5% B, and the gradient increased linearly from 5 to 50% B in 56.8 min, then to 85% B from 56.80 to 59.80 min, and maintain it in 85% B from 59.80 to 62.80, followed by decreasing to 5% B from 62.80 to 65.80 min, and finally re-equilibration of the column (95% A and 5% B) from 65.80 to 80 min at a flow rate of 300 nL/min.

## Data Analyses

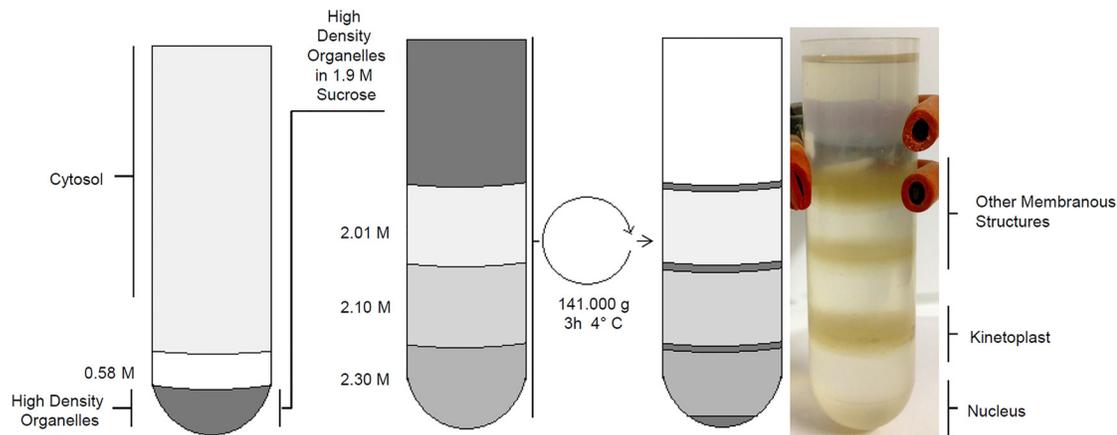
For the MS<sup>E</sup> acquisition mode, mass spectra were processed using the Protein LynxGlobal Server version 2.5.1 (PLGS) (Waters, Manchester, UK), and proteins were identified using the embedded Identity<sup>E</sup> algorithm. MS/MS spectra were searched against the *Trypanosoma cruzi* CL Brener database containing reverse sequences (<http://www.uniprot.org>; release oct\_2014). For protein search, the parameters used were carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and the variable modifications were acetylation of the N-terminal, deamidation of asparagines/glutamine, pyro-glutamine, pyro-glutamate and oxidation of methionine. One trypsin missed cleavage site was allowed and the precursor and fragment ion tolerances were 10 and 20 ppm, respectively. Protein identification criteria included the detection of at least three fragment ions per peptide and seven per protein, and at least one peptide per protein hit. False-positive discovery rate was set at 1%. Components were typically clustered against a theoretical peptide ion mass database using a mass precision of 10 ppm and a time tolerance of 0.25 min. Elevated energy ions were aligned with low-energy precursor peptide ions using an approximate precision of 0.05 min. Bioinformatics analyses were performed using Blast2GO software (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) and DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [19].

## Results and Discussion

The procedure used here to isolate *T. cruzi* nuclear fraction was adapted from two previously described methods. One of them permitted the isolation of *T. cruzi* high density organelles [16], while the other was developed for the purification of *T. brucei* nucleus in order to produce samples suitable for proteomic analysis [17].

Following lysis of epimastigote life forms, a fraction containing *T. cruzi* epimastigote high density organelles was pelleted by centrifugation on 0.58 M sucrose. This fraction was then subjected to sucrose density gradient ultracentrifugation, which resulted in a pellet and three interfaces as shown in Fig 1.

Since *T. brucei* and *T. cruzi* display several morphological differences, the protocol developed by [17] did not provide identical results when applied to *T. cruzi*. For example, after ultracentrifugation, *T. brucei* nuclear fraction was concentrated in the interface between 2.30 M and 2.10 M sucrose [17], while *T. cruzi* nuclear fraction was found in the pellet (Fig 1). Analysis of this fraction by phase contrast microscopy showed rounded structures with diameter of 2.5  $\mu$ m, presenting more refringent spots inside, compatible with nucleolus. DAPI<sup>®</sup> labeling and fluorescence microscopy demonstrated the presence of DNA inside those structures (Fig 2). Phase microscopy also showed the absence of kinetoplasts, networks of circular DNA that occur inside mitochondria, in *T. cruzi* nuclear fraction. Kinetoplasts, which are significantly smaller than the nuclei [2], were recovered in the interface between 2.1 M and 2.01 M sucrose



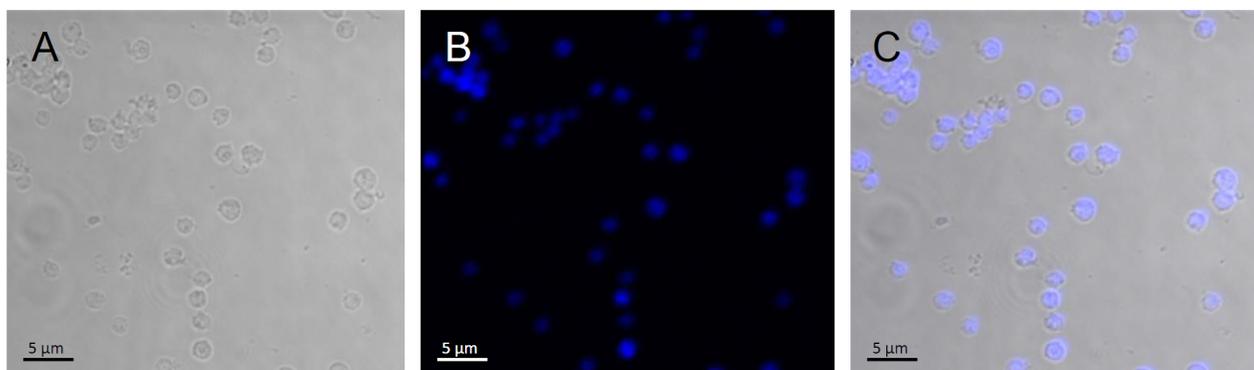
**Fig 1. *T. cruzi* epimastigote subcellular fractionation.** Sucrose gradient steps and isolated fractions are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0138667.g001

layers, while the interface above sucrose 2.01 M contained other membranous structures (data not shown).

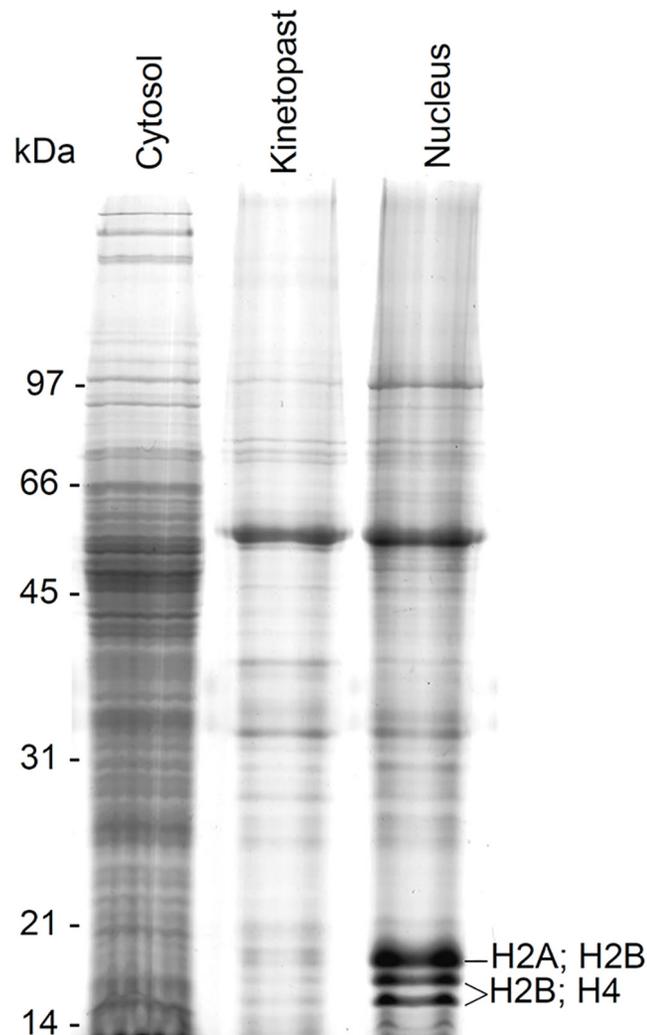
The protein profiles of nuclear, cytoplasmic and kinetoplast fractions were compared by SDS-PAGE (Fig 3). The nuclear fraction profile displayed three bands between 14 and 21 kDa which were less intensely stained in the other samples. Similar protein band profiles were previously reported in *T. brucei* nuclear fraction and were assumed as histones [17], based solely on the molecular mass range. In order to identify those protein bands, they were subjected to mass spectrometric analysis which revealed that those are the typical nuclear histone proteins H2, H3 and H4 (Fig 3). This finding associated with microscopy analysis (Fig 2) ensured the high efficiency of the cell fractionation process used in this work.

Proteome analysis of the *T. cruzi* nuclear fraction by 2D-LC-MS/MS provided the identification of 864 proteins (S1 Table) of 12875 peptides (S2 Table). The first large scale *T. cruzi* proteome analysis [8] described 1,573 epimastigote proteins and a total of 2,784 proteins from the four parasite life-stages. Here, the identification of 275 proteins that were not reported by in that work [8] was achieved (S3 Table), demonstrating that isolation of *T. cruzi* nuclear fraction permitted the enrichment of proteins which were underrepresented in global proteomic studies [20]. Therefore, proteins involved in vital nuclear biological processes, i.e. centrin, histones, nucleolar proteins, nucleosome assembly proteins, ribosome proteins, transcription factors and



**Fig 2. Phase contrast and fluorescence microscopy analysis of *T. cruzi* nuclear fraction.** A—Phase contrast, B—DAPI staining, C—Merge. The round structures correspond to nuclei.

doi:10.1371/journal.pone.0138667.g002



**Fig 3. SDS-PAGE of *T. cruzi* subcellular fractions.** Epimastigote cells were lysed and subjected to cell fractionation as described in Material and Methods. Cytosolic, kinetoplastic and nuclear samples (30µg/lane) were subjected to 13% T SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

doi:10.1371/journal.pone.0138667.g003

structural nuclear proteins were identified. Examples of peptide mass spectra (MS/MS) of centrin and histones can be seen in [S1 File](#).

Centrins are calcium-binding proteins that were shown to play important roles in cell replication, centrosome stability and nuclear architecture in *Dictyostelium discoideum* [21]. They have been shown to be involved in the growth and division of Trypanosomatids. For instance, the expression of a mutant form of centrin reduced the growth of the *Leishmania donovani*, [22] while in *T. brucei* the depletion of TbCentrin4 resulted in the dysregulation of nuclear and cell division [23].

Several proteins related to RNA processing were identified such as poly A binding protein, RNA helicases, elongation factors and eukaryotic translation initiation factors. Fifty-three ribosomal proteins were identified in the nuclear fraction, and 25 of them were identified as components of the 40S ribosomal subunit and other 28 as components of the 60S subunit. Presence of ribosomal proteins in the nuclear fraction was expected since ribosome biosynthesis is a process that takes place mainly in the nucleoli and nucleoplasm [24].

Some membrane proteins involved in host-parasite interactions, such as mucins, trans-sialidases and kinetoplastid membrane proteins (KMP) were also identified. In *T. cruzi* mucins are the main acceptors of sialic acid via a trans-sialidase reaction. However, different mucins are produced depending on the parasite life stage, suggesting that they might have other functions [25]. Kinetoplastid membrane proteins (KMP) are described as flagellar proteins conserved among kinetoplastids. Previous work showed that gene silencing of *T. brucei* KMP-11 by RNA interference inhibited basal body segregation and cytokinesis, resulting in parasites with multiple nuclei of various sizes, which indicates a continuous and defective nuclear division while cell division was blocked [26]. Moreover, those protein families were efficiently used to produce a Leishmania vaccine [27, 28], and the identification of KMPs in *T. cruzi* nuclear subproteome reinforce that their role are not limited to parasite-host interactions.

The data also revealed that *T. cruzi* nuclear subproteome is composed of several members of heat shock proteins and the retrotransposon hot spot (RHS). Heat shock proteins (HSP) are involved in homeostasis in the course of stress treatment [29] and have been identified before in most *Trypanosoma* proteome and subproteome analyses [7–9, 29, 30], including nuclei [31]. HSP have also been considered as potential targets to design new drugs against African trypanosomiasis [32]. RHS proteins, on the other hand, were described as one of the largest gene family in *T. cruzi* genome [33]. Western blot analysis in *T. brucei* has shown that RHS proteins are constitutively expressed and occur mainly in the nucleus [34]

Some enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism were also identified in the present work. Those proteins are normally found in cell compartments other than nucleus. However, previous reports have showed that a large number of proteins are present in more than one cellular compartment. For example, in mouse liver cells it was demonstrated that 39% of all organellar proteins present in multiple cellular locations [35]. Additionally, it is known that there is a close functional relationship between *T. cruzi* organelles, which is frequently observed in subcellular fractionation studies [36].

The list of proteins identified in the present work was subjected to bioinformatics analysis aiming at assigning to them theoretical molecular functions and predicted cell localization. Gene Ontology (GO) analysis using Blast2GO software provided a limited amount of information since only 238 proteins (less than 30% of total) were assigned to a cell compartment. Analysis was also carried out using DAVID bioinformatic tools to determine gene functional classification as well as enrichment scores to specific clusters.

Thus, DAVID analysis (functional annotation clustering) provided 65 gene clusters (S4 Table), wherein the two clusters with the highest enrichment scores (28.9 and 22.9) harbor gene members that have nucleosome assembly and organization and DNA/RNA binding as enriched functional annotations. The next enriched cluster (transmembrane transporter activity) presented an enrichment score significantly lower than the first two (Table 1).

A significant proportion of identified *T. cruzi* nuclear fraction proteins, 272 proteins corresponding to 31%, were annotated as putative uncharacterized *T. cruzi* proteins with unknown functions. This is in agreement with previous *T. cruzi* proteome analysis [10]. Possibly, these proteins are involved in nucleus-associated processes such as gene regulation, DNA replication and cell division molecules. Therefore, they should be studied as potential targets for developing new drugs.

Bioinformatics analysis of the putative uncharacterized *T. cruzi* nuclear proteins using DAVID classified them into 8 functional annotation clusters. The cluster bearing the highest enrichment score (5.8) grouped ALBA RNA/DNA binding proteins (Table 2). ALBA (Acetylation lowers binding affinity) proteins were recently described in the protozoan *Plasmodium falciparum*, where they perform a role in non-coding RNA and the regulation of antigenic variation [37].

**Table 1. Top 2 most representative clusters of nuclear proteome by DAVID bioinformatics resources.**

Annotation Cluster 1 Enrichment Score: 28.91298942880829		Count	P-Value	Benjamini
GOTERM_BP_FAT	chromatin assembly	41	3.5E-31	8.6E-29
GOTERM_BP_FAT	protein-DNA complex assembly	41	3.5E-31	8.6E-29
GOTERM_BP_FAT	nucleosome organization	41	3.5E-31	8.6E-29
GOTERM_BP_FAT	DNA packaging	41	3.5E-31	8.6E-29
GOTERM_BP_FAT	nucleosome assembly	41	3.5E-31	8.6E-29
GOTERM_BP_FAT	chromatin assembly or disassembly	41	2.0E-29	2.4E-27
GOTERM_BP_FAT	chromatin organization	41	8.0E-27	6.5E-25
GOTERM_BP_FAT	chromosome organization	41	6.3E-25	3.9E-23
Annotation Cluster 2 Enrichment Score: 22.966985589113087		Count	P-Value	Benjamini
INTERPRO	Histone core	38	1.3E-35	3.2E-33
INTERPRO	Histone-fold	38	7.2E-34	1.2E-31
SP_PIR_KEYWORDS	chromosomal protein	38	2.4E-30	2.0E-28
GOTERM_CC_FAT	Chromatin	38	6.2E-21	5.7E-19
GOTERM_CC_FAT	Nucleosome	38	6.2E-21	5.7E-19
GOTERM_CC_FAT	protein-DNA complex	38	1.2E-19	5.5E-18
GOTERM_CC_FAT	chromosomal part	38	4.1E-17	1.2E-15
GOTERM_CC_FAT	Chromosome	38	4.5E-11	6.8E-10

doi:10.1371/journal.pone.0138667.t001

**Table 2. The cluster of most enriched uncharacterized putative proteins by DAVID bioinformatics resources.**

Annotation Cluster 1 Enrichment Score: 6.663417037371656		Count	P-Value	Benjamini
INTERPRO	Alba, DNA/RNA-binding protein	6	5.4E-10	4.3E-8
PIR_SUPERFAMILY	PIRSF030333:DNA/RNA-binding protein related to Alba	4	1.0E-6	1.0E-5
PIR_SUPERFAMILY	PIRSF030333:UCP030333_Alba	4	1.0E-6	1.0E-5
INTERPRO	Uncharacterised conserved protein UCP030333, DNA/RNA-binding Alba-related	4	3.9E-6	1.5E-4

doi:10.1371/journal.pone.0138667.t002

In *T. brucei*, cytoplasmic ALBA proteins that regulate translation initiation were identified [38]. However, the members of this protein family were first described as DNA-binding proteins in Archaea [39] and were shown to be associated with nuclear RNase MRP/P in yeast and mammals [40]. Existence of nuclear Alba proteins in *T. cruzi* could indicate intriguing differences between gene expression machinery in both trypanosomatids, which should be investigated in the future. Nonetheless, bioinformatic methods demonstrated the quality of our nuclear fraction and provided strong evidences that many putative uncharacterized proteins could participate of *T. cruzi* gene regulation processes.

Other putative uncharacterized proteins were clustered in functional groups such as cell cycle regulation and transcriptional control. Proteins with WD repeat were found among uncharacterized proteins, and one of them was described in *T. brucei* as having WD repeat elements homologue of receptor for activated C kinase 1 (RACK1) called TRACK. This protein is distributed predominantly in a perinuclear region and cytoplasm, but not along the endoplasmic reticulum and mitochondrion, and its function is to control the final stages of mitosis [41].

## Conclusions

The analysis of *T. cruzi* epimastigote nuclear subproteome was only possible because a specific cell fractionation procedure was optimized. The use of a purified nuclear fraction certainly

enhanced the concentration of nuclear proteins that would be underrepresented in whole cell proteome analysis. The procedure also provided other subcellular fractions (e.g. kinetoplasts) that could be used in further subproteomic studies such as quantitative experiments and the identification of post-translational modifications in specific subcellular fractions.

Overall, more than 800 proteins, including putative uncharacterized proteins, were identified and assigned to *T. cruzi* nucleus. The approach used here may also be applied to study the nuclear fraction of other *T. cruzi* life stages, such as amastigote and trypomastigote. Finally, we believe that the characterization of *T. cruzi* nuclear subproteome may contribute to delineate a complete picture of the parasite proteome and to understand central processes that occur during its life cycle, including replication and differentiation.

## Supporting Information

**S1 File. Examples of peptide mass spectra (MS/MS): Centrin and Histones.**  
(PDF)

**S1 Table. Proteins that compose the nuclear proteome of *T. cruzi* epimastigote form.**  
(XLSX)

**S2 Table. LC-MS/MS peptide analysis data of *T. cruzi* nuclear fraction.**  
(XLSX)

**S3 Table. Proteins of nuclear proteome not found in the large scale *T. cruzi* proteome analysis.**  
(XLSX)

**S4 Table. Clusters assigned by DAVID bioinformatics resources.**  
(XLSX)

## Acknowledgments

The authors thankfully acknowledge Arthur Pontes for the critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ACMSJ DEK SC BDL CAOR. Performed the experiments: ACMSJ DEK JRC RC DPG. Analyzed the data: ACMSJ DEK MVS BDL CAOR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MVS BDL CAOR. Wrote the paper: ACMSJ DEK DPG RC MVS CAOR.

## References

1. WHO. Chagas disease 2014 [cited 2014]. Available: [http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/).
2. Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 2002.
3. Solari AJ. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma*. 1980.
4. Solari AJ. Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell*. 1995; 19(2):65–84. PMID: [7550575](#).
5. Elias M, Faria M, Mortara R, Motta M, Souza W, Thiry M, et al. Chromosome Localization Changes in the *Trypanosoma cruzi* Nucleus. *Eukaryotic Cell*. 2002; 1(6):944–53. PMID: [12477795](#)
6. Araújo P, Teixeira S. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011; 106(3):257–66. doi: [10.1590/S0074-02762011000300002](#) PMID: [21655811](#)
7. Paba J, Santana JM, Teixeira ARL, Fontes W. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *PROTEOMICS*. 2004.

8. Atwood J, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science*. 2005; 309(5733):473–6. doi: [10.1126/science.1110289](https://doi.org/10.1126/science.1110289) PMID: [16020736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020736/)
9. Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila A, Duran R, Correa A, et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Journal of mass spectrometry: JMS*. 2007; 42(11):1422–32. doi: [10.1002/jms.1267](https://doi.org/10.1002/jms.1267) PMID: [17960573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17960573/)
10. Queiroz R, Charneau S, Mandacaru S, Schwämmle V, Lima BD, Roepstorff P, et al. Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* amastigogenesis. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2014; 13(12):3457–72. doi: [10.1074/mcp.M114.040329](https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040329)
11. Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues S, Cordero E, Marques A, Varela-Ramirez A, et al. Proteomic Analysis of Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. *Journal of Proteome Research*. 2013; 12(2):883–97. doi: [10.1021/pr300947g](https://doi.org/10.1021/pr300947g) PMID: [23214914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23214914/)
12. Queiroz R, Charneau S, Motta F, Santana J, Roepstorff P, Ricart C. Comprehensive Proteomic Analysis of Epimastigote Cell Surface Proteins by Two Complementary Methods. *Journal of Proteome Research*. 2013; 12(7):3255–63. doi: [10.1021/pr400110h](https://doi.org/10.1021/pr400110h) PMID: [23682730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23682730/)
13. Queiroz R, Charneau S, Bastos I, Santana J, Sousa M, Roepstorff P, et al. Cell Surface Proteome Analysis of Human-Hosted Life Stages. *Journal of Proteome Research*. 2014; 13(8):3530–41. doi: [10.1021/pr401120y](https://doi.org/10.1021/pr401120y) PMID: [24978697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24978697/)
14. Ferella M, Nilsson D, Darban H, Rodrigues C, Bontempi E, Docampo R, et al. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*—localization of novel proteins to various organelles. *Proteomics*. 2008; 8(13):2735–49. doi: [10.1002/pmic.200700940](https://doi.org/10.1002/pmic.200700940) PMID: [18546153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18546153/)
15. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med São Paulo*. 1964.
16. Batista JAN, Teixeira SMR, Donelson JE. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Molecular and*. 1994.
17. Rout M, Field M. Isolation and characterisation of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*: identification of a major repetitive nuclear lamina component. *Journal of Biological Chemistry*. 2001. doi: [10.1074/jbc.M104024200](https://doi.org/10.1074/jbc.M104024200)
18. Liu H, Finch JW, Luongo JA, Li GZ, Gebler JC. Development of an online two-dimensional nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry method for improved chromatographic performance and &hellip;. *Journal of Chromatography*. 2006.
19. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009; 4(1):44–57. doi: [10.1038/nprot.2008.211](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211) PMID: [19131956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131956/).
20. Taylor SW, Fahy E, Ghosh SS. Global organellar proteomics. *Trends Biotechnol*. 2003; 21(2):82–9. PMID: [12573857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12573857/).
21. Mana-Capelli S, Graf R, Larochelle D. *Dictyostelium discoideum* CenB Is a Bona Fide Centrin Essential for Nuclear Architecture and Centrosome Stability. *Eukaryotic Cell*. 2009; 8(8):1106–17. doi: [10.1128/EC.00025-09](https://doi.org/10.1128/EC.00025-09) PMID: [19465563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465563/)
22. Selvapandiyan A. Expression of a Mutant Form of *Leishmania donovani* Centrin Reduces the Growth of the Parasite. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(46):43253–61. doi: [10.1074/jbc.M106806200](https://doi.org/10.1074/jbc.M106806200) PMID: [11544261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11544261/)
23. Shi J, Franklin J, Yelinek J, Ebersberger I, Warren G, He C. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in *T. brucei*. *Journal of Cell Science*. 2008; 121(18):3062–70. doi: [10.1242/jcs.030643](https://doi.org/10.1242/jcs.030643)
24. Gerhardy S, Menet AM, Peña C, Petkowski JJ, Panse VG. Assembly and nuclear export of pre-ribosomal particles in budding yeast. *Chromosoma*. 2014; 123(4):327–44. doi: [10.1007/s00412-014-0463-z](https://doi.org/10.1007/s00412-014-0463-z) PMID: [24817020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24817020/).
25. Frasch A. Functional Diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. 2000; 16:1–5. PMID: [10858646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10858646/)
26. Li Z, Wang C. KMP-11, a Basal Body and Flagellar Protein, Is Required for Cell Division in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*. 2008; 7(11):1941–50. doi: [10.1128/EC.00249-08](https://doi.org/10.1128/EC.00249-08) PMID: [18820079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18820079/)
27. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 2005; 174(11):7160–71. PMID: [15905560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15905560/).
28. Guha R, Das S, Ghosh J, Naskar K, Mandala A, Sundar S, et al. Heterologous priming-boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of

- Leishmania (Leishmania) donovani*. *Vaccine*. 2013; 31(15):1905–15. doi: [10.1016/j.vaccine.2013.02.025](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.025) PMID: [23499564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23499564/).
29. Pérez-Morales D, Lanz-Mendoza H. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes subjected to heat shock. *BioMed Research*. 2012.
  30. Sodr  CL, Chapeaurouge AD, Kalume DE, de Mendonça Lima L, Perales J, Fernandes O. Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Arch Microbiol*. 2009; 191(2):177–84. doi: [10.1007/s00203-008-0439-6](https://doi.org/10.1007/s00203-008-0439-6) PMID: [19002435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19002435/).
  31. Martin F, Requena JM, Martin J, Alonso C, L pez MC. Cytoplasmic-nuclear translocation of the Hsp70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 196(3):1155–62. doi: [10.1006/bbrc.1993.2372](https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2372) PMID: [8250874](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8250874/).
  32. Pizarro JC, Hills T, Senisterra G, Wernimont AK, Mackenzie C, Norcross NR, et al. Exploring the *Trypanosoma brucei* Hsp83 potential as a target for structure guided drug design. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(10):e2492. doi: [10.1371/journal.pntd.0002492](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002492) PMID: [24147171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24147171/); PubMed Central PMCID: PMCPMC3798429.
  33. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005.
  34. Bringaud F, Biteau N, Melville S, Hez S, El-Sayed N, Leech V, et al. A New, Expressed Multigene Family Containing a Hot Spot for Insertion of Retroelements Is Associated with Polymorphic Subtelomeric Regions of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*. 2002; 1(1):137–51. PMID: [12455980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12455980/)
  35. Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Xie X, Mootha VK, Mann M. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell*. 2006; 125(1):187–99. doi: [10.1016/j.cell.2006.03.022](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.022) PMID: [16615899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16615899/).
  36. Sant'Anna C, Nakayasu E, Pereira M, Lourenço D, Souza W, Almeida I, et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *PROTEOMICS*. 2009; 9(7):1782–94. doi: [10.1002/pmic.200800730](https://doi.org/10.1002/pmic.200800730) PMID: [19288526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19288526/)
  37. Ch ne A, Vembar SS, Riviere L, Lopez-Rubio JJ, Claes A, Siegel TN, et al. PfAlbas constitute a new eukaryotic DNA/RNA-binding protein family in malaria parasites. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(7):3066–77. doi: [10.1093/nar/gkr1215](https://doi.org/10.1093/nar/gkr1215) PMID: [22167473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22167473/); PubMed Central PMCID: PMCPMC3326326.
  38. Mani J, G ttinger A, Schimanski B, Heller M, Acosta-Serrano A, Pescher P, et al. Alba-domain proteins of *Trypanosoma brucei* are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. *PLoS One*. 2011; 6(7):e22463. doi: [10.1371/journal.pone.0022463](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022463) PMID: [21811616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21811616/); PubMed Central PMCID: PMCPMC3141063.
  39. Sandman K, Reeve JN. Archaeal chromatin proteins: different structures but common function? *Curr Opin Microbiol*. 2005; 8(6):656–61. doi: [10.1016/j.mib.2005.10.007](https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.007) PMID: [16256418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16256418/).
  40. Aravind L, Iyer LM, Anantharaman V. The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. *Genome Biol*. 2003; 4(10):R64. doi: [10.1186/gb-2003-4-10-r64](https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-10-r64) PMID: [14519199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14519199/); PubMed Central PMCID: PMCPMC328453.
  41. Rothberg KG, Burdette DL, Pfannstiel J, Jetton N, Singh R, Ruben L. The RACK1 homologue from *Trypanosoma brucei* is required for the onset and progression of cytokinesis. *J Biol Chem*. 2006; 281(14):9781–90. doi: [10.1074/jbc.M600133200](https://doi.org/10.1074/jbc.M600133200) PMID: [16469736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16469736/); PubMed Central PMCID: PMCPMC1997280.

**CAPÍTULO III**  
**PROTEÔMICA DE *T. CRUZI* DURANTE A DIVISÃO**  
**CELULAR**

## 1. Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é um tripanossomatídeo da classe Kinetoplastida que parasita organismos invertebrados e vertebrados, incluindo o homem, a quem causa uma condição conhecida como doença de Chagas.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é uma doença que foi descrita por Carlos Chagas em 1909, e é transmitida vetorialmente principalmente por insetos hematófagos triatomíneos (“barbeiros”). Atualmente a doença de Chagas acomete cerca de 7-8 milhões de pessoas, sendo endêmica em muitas regiões das Américas, ocorrendo da Argentina até sul do México tendo também alguns casos relatados nos Estados Unidos (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015). As manifestações clínicas da doença podem causar danos ao sistema cardiovascular, gastrointestinal ou nervoso do hospedeiro. Além da transmissão vetorial, a contaminação alimentar, congênita, via transfusão sanguínea e transplante de órgãos também são possíveis (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2015).

A divisão celular dos tripanossomatídeos destoa muito da via clássica dos demais eucariotos. Por exemplo, durante a mitose destes protozoários a membrana nuclear não desaparece, configurando um processo denominado mitose fechada. Outra característica importante, tange ao fato da não formação de cromatina condensada nestes indivíduos, o que impossibilita evidenciar, pela microscopia durante a divisão celular, processos como a separação dos cromossomos homólogos. Os fenômenos que controlam o ciclo celular desse protozoário são complexos e regulados por mecanismos moleculares especiais que ainda não completamente elucidados (DE SOUZA; OSMANI, 2007; SOUZA, 2002)

Trabalhos recentes contribuíram para um melhor entendimento do processo da divisão celular nestes organismos. Entre eles destacam-se a recente análise do transcrito do *T. cruzi* durante o ciclo celular (CHÁVEZ et al., 2017), a proteômica de da cromatina (LEANDRO DE JESUS et al., 2016) e a proteômica comparativa da cromatina entre formas replicativas e não replicativas do *T. cruzi* (LEANDRO DE JESUS et al., 2017). Contudo, até o momento, nenhum trabalho se propôs a estudar o proteoma e o fosfoproteoma global do *T. cruzi* durante diferentes pontos do seu ciclo celular.

Portanto, neste capítulo será apresentado um estudo da divisão celular do *T. cruzi* no qual o proteoma e o fosfoproteoma do parasito (coletados em diferentes pontos do ciclo celular) foram analisados comparativamente utilizando-se marcação isobárica (iTRAQ) prévia à etapa de LC-MS/MS.

## 2. Metodologia

### 2.1. Estratégia experimental

Culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram sincronizadas com hidroxiuréia e coletas em 4 tempos diferentes, marcadas com iTRAQ™ e submetidas a LC-MS/MS e análises estatísticas e de bioinformática conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

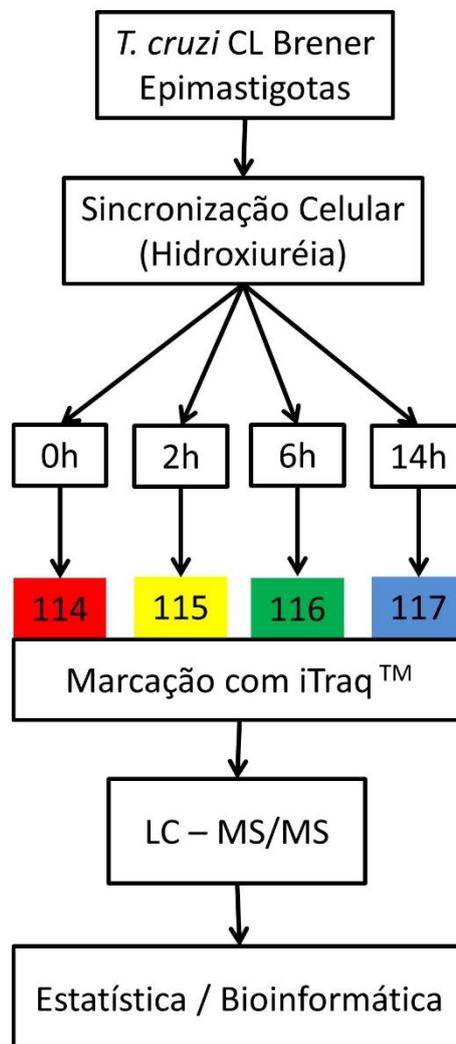


Figura 1. Fluxograma da estratégia experimental para a comparação do proteoma das formas epimastigotas em diversos tempos da divisão celular.

## 2.2. Culturas celulares

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram cultivadas em meio LIT (CAMARGO, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), hemina a uma concentração final de 2 mg/mL, e com ampicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL), esterilizado por filtração em filtro 0,22 µm (Millipore), e incubadas a 28 °C, em estufa, de modo que o volume do meio de cultura não ultrapassasse 25% do volume do frasco. As culturas foram mantidas nessas condições até alcançarem densidade celular de  $10^7$  parasitos/mL, e posteriormente os volumes foram escalonados com meio LIT, ajustando a concentração para  $10^6$  células/mL, para a obtenção da quantidade de células em fase logarítmica de crescimento, necessárias para experimentos posteriores. A viabilidade celular foi acompanhada por microscopia óptica.

## 2.3. Sincronização celular de formas epimastigotas

Culturas em meio LIT de formas epimastigotas em fase de crescimento logarítmico foram acrescidas de 20 mM de hidroxiuréia. A hidroxiuréia inibe a ação da enzima ribonucleotídeo redutase, interferindo assim na conversão de ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. Sem os desoxirribonucleotídeos, as células ficam impedidas de entrar no período de síntese de DNA da divisão celular, também conhecida como fase S (YOUNG; HODAS, 1964). Após o tratamento com hidroxiuréia, contagens sucessivas foram feitas para confirmar a estabilização do número de parasitos/mL no decorrer do tempo de exposição.

Passadas 18 horas, o meio com hidroxiuréia foi removido após centrifugação a 2.740 g, por 15 min, a temperatura ambiente e as células que estavam no sedimento foram lavadas com PBS em três ciclos de centrifugação também a 2.740 g, por 15 min, a temperatura ambiente. Por fim os epimastigotas foram ressuspensos em meio LIT e incubadas a 28 °C. Alíquotas foram recolhidas imediatamente após a retirada da hidroxiuréia (controle) e a cada 2 horas para experimentos de validação da sincronização por citometria de fluxo (ELIAS et al., 2002).

## 2.4. Validações da sincronização celular

### 2.4.1. Citometria de fluxo

Para verificar a sincronização celular, alíquotas contendo  $10^7$  epimastigotas, retiradas a cada intervalo de 2 h, foram lavadas com PBS a 4.000 g por 6 min em temperatura ambiente, ressuspensas em 500  $\mu$ L de solução metanol e acetona (1:1) e incubadas a  $-20^{\circ}$  C por 20 min para o processo de fixação. Após fixadas, foram novamente centrifugadas a 4.000 g por 6 min a  $4^{\circ}$  C. As células então foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas por, no mínimo, 24 h, a  $4^{\circ}$  C para a sua completa reidratação. Após reidratação o PBS foi retirado com uma centrifugação a 4.000 g por 6 min, a  $4^{\circ}$  C, e o sedimento ressuspensado com 1 mL de solução de marcação (100 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% Nonidet P40; 3  $\mu$ M de iodeto de propídeo) e incubado a temperatura ambiente por 15 min protegido da luz. A citometria foi executada em um citometro de fluxo FACSVerser (BD Biosciences) e as análises no software Flowjo v10.

### 2.4.2. Microscopias

Para as microscopias de fluorescência, alíquotas de 10  $\mu$ L dos diferentes tempos durante o ciclo celular foram misturadas a 5  $\mu$ L de Prolong® DAPI (Invitrogen). A mistura foi aplicada no centro da lâmina de microscopia que posteriormente recebeu uma lamínula. A lâmina ficou incubada a  $4^{\circ}$  C, no escuro por 36 h e posteriormente foi observada e fotografada no microscópio de fluorescência EVOS™ FL Auto 2 (Termo Fisher).

Para microscopias de campo claro, alíquotas de 10  $\mu$ L dos diferentes tempos durante o ciclo celular foram secas em lâminas de microscopias e posteriormente fixadas com metanol. Em seguida, a lâmina foi coberta com corante giemsa (Doles) por 10 min, lavada sob água corrente e seca a temperatura ambiente. As lâminas foram observadas e fotografadas no microscópio de fluorescência EVOS™ FL Auto 2 (Termo Fisher).

## 2.5. Extração e digestão trípica de proteínas.

A extração e a digestão das proteínas foram adaptadas de método anteriormente descrito (WISNIEWSKI et al., 2009). Brevemente, cada amostra de uma triplicata biológica contendo aproximadamente  $10^7$  epimastigotas de *T. cruzi* CL Brener foi lisada com 50  $\mu$ L de tampão de lise LB1 (TEAB 0,02M, SDS 4%, DTT 0,1 M, pH 7,9) com auxílio de um mini pistilo. Após a homogeneização das células, a suspensão foi aquecida a 90°C por 10 min; as amostras sonicadas com o auxílio de um processador ultrassônico GE50T em três ciclos de 10 s com 40% de potência e, então, submetidas à centrifugação a 16.000 g, 15 min em temperatura ambiente.

Após a centrifugação, o sedimento foi descartado, e a concentração de proteínas do sobrenadante foi quantificada usando o Qubit Protein Assay (Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas correspondentes a 80  $\mu$ g de proteínas foram diluídas com TU (TEAB 0,02 M, 8 M ureia, pH 8,5) para um volume final de 200  $\mu$ l e, posteriormente, transferidas para unidades de colunas de filtração (Sartorius, Germany) contendo filtros com *cut off* de 30 kDa. Os sistemas de filtração foram centrifugados a 10.000 g por 10 min. Em seguida, os filtros, com as proteínas maiores que 30 kDa retidas, foram lavados com 100  $\mu$ L de TU sob as mesmas condições de centrifugação.

As proteínas retidas no filtro foram alquiladas aplicando 100  $\mu$ L de solução de IAA (0,05 M de IAA em TU) no filtro e incubando-o por 20 min, 21° C no escuro. Posteriormente o sistema foi centrifugado a 10.000 g, 10 min, lavado com 100  $\mu$ L de TU e lavado novamente com 100  $\mu$ L de DT (TEAB 0,02M pH 7,9), sob a mesma condição de centrifugação, para retirar todo o IAA.

Para a digestão trípica foi adicionado ao filtro 90  $\mu$ L de solução de tripsina porcina (Promega) em DT, na proporção final 1:50 ( $\mu$ g de tripsina:  $\mu$ g de proteína da amostra a ser digerida) e incubada a 37°C em agitador térmico (Thermomixer), sob agitação de 300 rpm, por 12 h.

Após a digestão, os peptídeos foram recuperados adicionando ao filtro, 90  $\mu$ L de água ultrapura seguido de centrifugação a 14.000 g, 20 min. As soluções contendo os peptídeos eluídos foram imediatamente acidificadas com volume de TFA para atingir uma concentração final de 0,05% (v/v). Por fim, os peptídeos recuperados foram quantificados usando Qubit Protein Assay (Thermo Fisher). Alíquotas de 30  $\mu$ g foram secas em centrífuga a vácuo e mantidas a -20 °C.

## 2.6 Marcação com iTRAQ

A marcação com o reagente iTRAQ™ foi feita de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 30 µg de peptídeos de cada amostra foram solubilizadas em 30 µL de solução 300 mM TEAB. A cada amostra foram adicionados 23 µL de um reagente iTRAQ™ (114, 115, 116 ou 117). Os frascos foram incubados a temperatura ambiente por 2 horas e em seguida cada amostra (correspondendo aos tempos de ciclo celular 0, 2h, 6 h e 14 h), já com suas marcações específicas (reagentes 114, 115, 116 e 117, respectivamente), foi misturada na mesma proporção formando um “multiplex”.

## 2.7. Enriquecimento de fosopeptídeos

O método usado para o enriquecimento de peptídeos foi adaptado de metodologias anteriormente propostas (JENSEN; LARSEN, 2007; THINGHOLM et al., 2006). Os peptídeos marcados com iTRAQ™ (114-117) e já misturados em proporções iguais foram solubilizados em TC (tampão de carregamento) contendo 1 M de ácido glicólico em solução de 80% (v/v) de ACN e 5% (v/v) TFA.

Posteriormente, a solução de peptídeos foi incubada junto com microesferas de óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) em agitador térmico (Thermomixer), a 200 rpm por 10 min. Após a incubação, o tubo, contendo as microesferas, foi submetido a um pulso de centrifugação para a retirada do sobrenadante.

As microesferas foram lavadas com TL1 (80% (v/v) de ACN e 1% (v/v) TFA), seguida de uma segunda lavagem com TL2 (10% (v/v) de ACN e 0.1% (v/v) TFA) para retirar peptídeos não fosforilados. Os tubos contendo as microesferas de TiO<sub>2</sub> foram deixados para secar em temperatura ambiente. Os peptídeos contidos nas microesferas de TiO<sub>2</sub> foram eluídos com lavagens sucessivas, primeiro usando TE1 que continha 1,5% (v/v) de NH<sub>4</sub>OH (pH > 11,5) e, posteriormente, TE2 que é composto por 30% (v/v) ACN. Os fosfopeptídeos recuperados em ambas eluições foram misturados e secos em centrífuga a vácuo e mantidas a -30° C até a identificação por espectrometria.

## 2.8. LC/MS-MS e análises de dados por bioinformática

As amostras foram analisadas em um sistema cromatográfico com colunas capilares (nano-UHPLC Dionex Ultimante 3000) acoplado *on-line* ao espectrômetro de massas híbrido *ion trap-orbitrap*, Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Foram utilizados dois tipos de colunas capilares no sistema cromatográfico, uma pré-coluna com diâmetro interno de 100 µm x 200 mm de comprimento, empacotadas no laboratório com partículas esféricas de sílica revestida por grupos octadecil (C18) ReprosilPur de 5 µm com poros de 120 Å (Dr. Maich) e uma coluna analítica de diâmetro interno de 75µm x 35 cm de comprimento, também empacotada no laboratório, com partículas C18 Reprosil de 3µm com poros de 120 Å (Dr. Maich). As amostras foram eluídas usando-se um gradiente de 100% de solução A (0.1% ácido fórmico) até 26% de solução B (0.1% ácido fórmico, 95% ACN) por 180 min, 26% até 100% de solução B por 5 min e 100% de solução B por 8 min (um total de 193 min a 200 nL/min). Após cada corrida, a coluna foi lavada com 90% de solução B e reequilibrada com solução A.

Os espectros de massa foram adquiridos em modo positivo aplicando-se *data-dependent automatic survey MS scan* e aquisição de espectros de massas em *tandem* (MS/MS). Todos os *MS scan* no *orbitrap* (amplitude de massa: m/z 350-1800 e resolução: 120000) foram seguidos por MS/MS dos quinze íons mais intensos no LTQ. A fragmentação no LTQ ocorreu por dissociação de alta energia induzida por colisão (HCD) e as sequências de íons selecionados foram excluídas dinamicamente a cada 15 segundos.

A busca e a identificação das proteínas utilizou o programa Proteome Discoverer v.1.3 beta (Thermo Scientific) com algoritmo Mascot v.2.3 contra banco de dados de *T. cruzi* CL Brener instalado no servidor do laboratório e gerados usando a ferramenta Database on Demand contendo as proteínas encontradas no UniProt/SWISS-PROT e UniProt/TrEMBL.

Proteínas contaminantes (como tripsina porcina) foram adicionadas ao banco de dados e removidas manualmente das listas de identificações. As buscas foram feitas com os seguintes parâmetros: precisão no MS de 10 ppm, no MS/MS de 0.05 Da, até 2 sítios de clivagem perdidos, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação da metionina, acetilação N-terminal da proteína e fosforilação como modificações variáveis. O número de proteínas, o grupo de proteínas e o número de peptídeos foram filtrados com uma taxa de detecção de falsos positivos (FDR) menor que

1% e peptídeos com rank 1 e mínimo de 2 peptídeos por proteínas foram aceitos para identificação com Proteome Discoverer. O *software* Protein Center (ThermoScientific) foi usado para interpretar os resultados em nível de proteínas.

## 2.9. Estatística

Determinamos se as intensidades relativas das proteínas variaram de forma estatisticamente significativa usando o *software* Perseus (TYANOVA et al., 2016). Para isso, os valores de intensidades de cada amostra foram normalizados pela suas medianas (coluna e linha). Foram consideradas como reguladas aquelas proteínas que apresentaram um teste ANOVA com FDR < 0,05 (Benjamini-Hochberg). O teste de Tukey foi usado como pós-teste ao ANOVA para determinar em qual condição experimental contribuiu para a regulação da proteína.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Validação dos diferentes tempos do ciclo celulares

Culturas independentes de formas epimastigotas (CL Brener) de *Trypanosoma cruzi*, mantidas em meio LIT em fase logarítmica de crescimento, foram usadas para a obtenção de réplicas biológicas de células sincronizadas. A manutenção das culturas sob sucessivos ciclos de escalonamento permitiu que a maior parte das células se encontrasse viável e replicando no momento do experimento. Posteriormente, estas células foram expostas à ação da hidroxiuréia, de modo a induzir a parada do ciclo celular antes da fase de síntese de DNA. Após permanecerem 18 h na presença de hidroxiuréia, os epimastigotas conservaram-se morfolologicamente típicos, com movimento dos flagelos preservados, não apresentando indício visual de morte celular pela ação da hidroxiuréia (dados não mostrados).

Do mesmo modo, após 18 h de exposição à hidroxiuréia, não foi observado o aumento da concentração celular na cultura, indicando que o reagente promoveu com sucesso a interrupção da divisão celular. A progressão do ciclo celular foi acompanhada por citometria de fluxo laminar de células previamente marcadas com iodeto de propídeo

para evidenciar o aumento de DNA na célula durante a sua divisão, permitindo determinar pontos importantes como: G1, síntese de DNA e mitose (Figura 2).

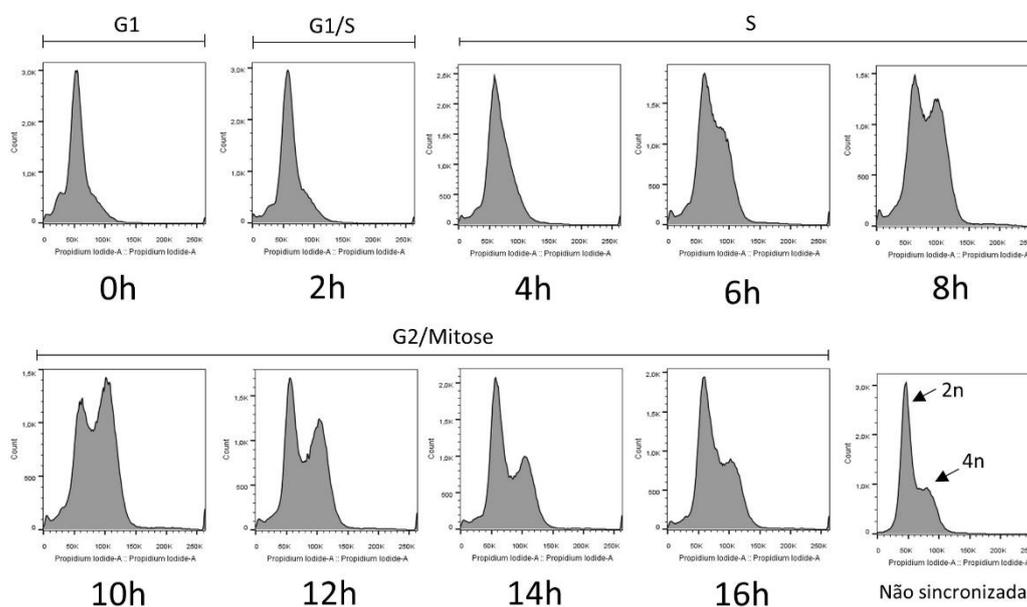


Figura 2. Citometria de fluxo mostrando a síntese de DNA durante diferentes fases da progressão do ciclo celular após a retirada da hidroxiuréia.

A citometria das células recém-liberadas da ação da hidroxiuréia (0 h) mostrou que as células estavam em G1 com uma fluorescência compatível com células 2n. Passadas as primeiras horas, notou-se o início do processo de síntese de DNA, marcado pelo discreto alargamento do pico de fluorescência na citometria de fluxo. Sendo assim, nas primeiras duas horas após a liberação do ciclo celular as células estavam saindo da fase G1 e iniciando a fase S, e na sexta hora, as células encontravam-se em plena fase S, caracterizada pelo surgimento do pico 4n, em virtude do aumento de DNA característico do processo de síntese.

A partir da décima hora após a liberação do ciclo celular, iniciou-se o retorno da fluorescência a níveis compatíveis com células 2n, sendo que, em 14 h as células estavam saindo da fase G2 e conseqüentemente entraram em mitose.

Após acompanhar o ciclo celular das células sincronizadas, elegemos os pontos 0h, 2h, 6h e 14h para realizar um estudo proteômico e fosfoproteômico que contemplasse as fases G1, fase inicial da síntese de DNA (G1/S), síntese de DNA (S) e mitose respectivamente.

As microscopias de campo claro (Figura 3) e de fluorescência (Figura 4) foram utilizadas para demonstrar nestes pontos eleitos, alterações celulares como a presença de células binucleadas, cinetoplastos e flagelos duplicados. Sendo assim, as imagens de microscopia corroboram a escolha dos pontos utilizados para o estudo proteômico.

Os tempos escolhidos para análise proteômica são similares ao utilizados por Chaves e colaboradores (2017) em um estudo transcriptômico de diferentes etapas do ciclo celular do *T. cruzi*.

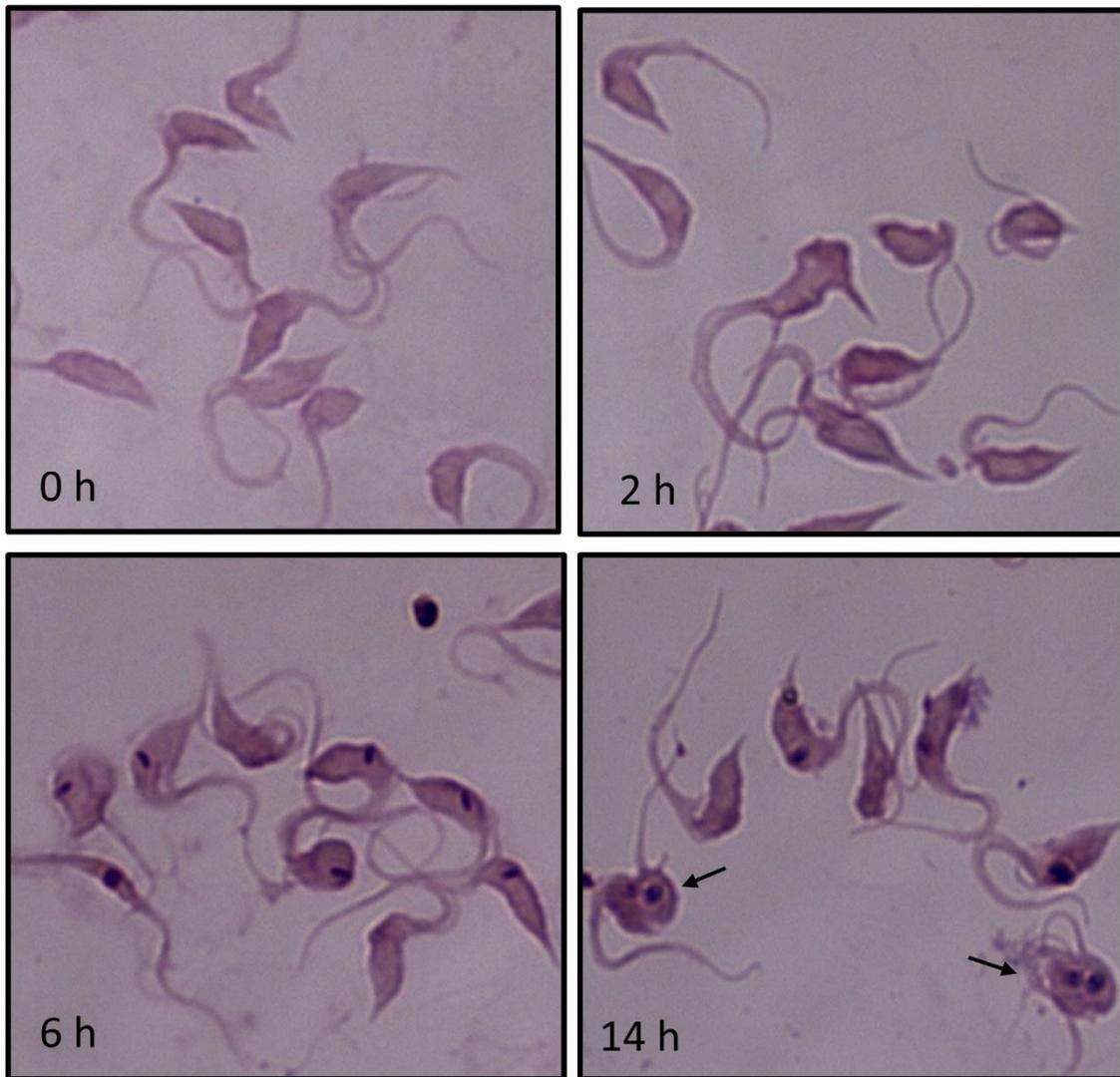


Figura 3. Microscopia de campo claro de epimastigoras coletados nos tempos 0 h, 2 h, 6 h e 14 h, após a liberação do ciclo celular. As células foram coradas com Giemsa, aumento 1000x. As setas em 14h evidenciam células 4n, binucleadas e biflageladas.

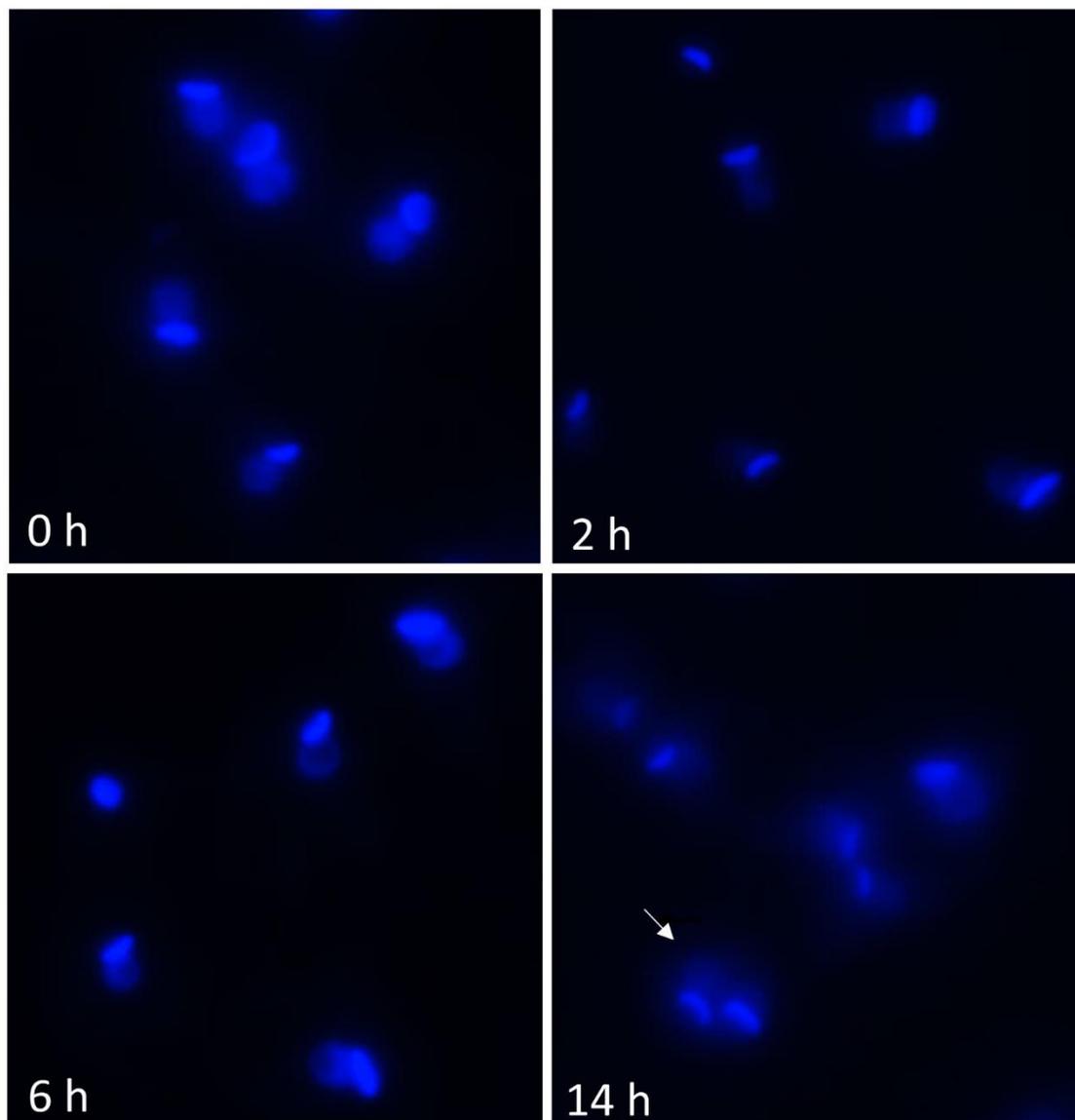


Figura 4. Microscopia de fluorescência de epimastigotas coletados nos tempos 0 h, 2 h, 6 h e 14 h, após a liberação do ciclo celular. As células foram marcadas com DAPI, aumento de 1000x. A seta em 14h evidencia célula 4n, binucleada e com dois cinetoplasto.

### 3.2 Estudo qualitativo do proteoma e fosfoproteoma de *T. cruzi* durante o ciclo celular.

Análise proteômica de células previamente fracionadas (subproteomas) ou sob condições específicas, como diferentes etapas da divisão celular ou pontos durante o processo de diferenciação, podem causar o aumento da concentração de proteínas específicas, muitas vezes de importância vital nas referidas frações celulares ou processos biológicos. Este fato facilita a identificação destas proteínas, que estariam por vezes sub-representadas no proteoma global.

A estratégia utilizada neste trabalho permitiu a identificação de um total de 3.627 proteínas com, ao menos, um peptídeo único. Destas, 3.064 foram identificadas apenas na análise de proteoma total das células sincronizadas e 1.017 proteínas identificadas após o enriquecimento de fosfopeptídeos, enquanto outras 454 proteínas foram identificadas em ambas as amostras.

A fim de determinar quais proteínas encontradas no proteoma de *T. cruzi* durante a divisão celular foram previamente descritas no núcleo (SANTOS JUNIOR et al., 2015) ou mesmo associados a cromatina de *T. cruzi* (LEANDRO DE JESUS et al., 2016), comparamos estes proteomas e identificamos cerca 184 proteínas comuns (Figura 5).

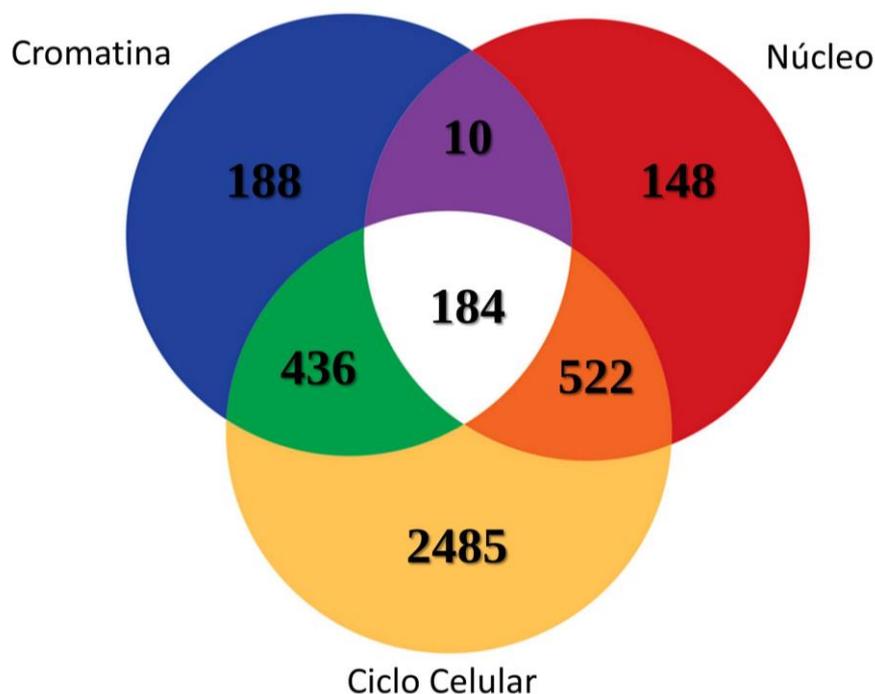


Figura 5. Diagrama de Venn mostrando a distribuição de proteínas de *T. cruzi* identificadas em análises proteômicas da cromatina (LEANDRO DE JESUS et al., 2016) , núcleo (SANTOS JUNIOR et al., 2015) e durante o ciclo celular (presente trabalho).

Ao evidenciar-se que determinada proteína foi anteriormente associada à estrutura nuclear ou mesmo à cromatina, sugere-se que esta possa participar de processos biológicos envolvidos na replicação celular. Além do mais, associamos às proteínas identificadas informações sobre a possível localização celular onde estas proteínas se concentram.

A presente análise proteômica identificou, sem dados de quantificação, algumas proteínas que participam da regulação do ciclo celular. Entre estas proteínas podemos citar a MOB1 associada ao ciclo celular (Q4DZ03), centrinas (Q4CTH2; Q4E3T4; Q4E591, Q4DQ49), proteína de ligação centrômero/microtúbulos (Q4DAV5, Q4D1G9). MOB1 pertence a uma família de proteínas altamente conservadas nos eucariotos que está associada a processos do final da mitose (STAVRIDIS et al., 2003; VITULO et al., 2007), inclusive em tripanossomatídeos. Por exemplo, uma Mob1 de *T. brucei*, anteriormente estudada, é requerida para a acurada e eficiente citocinese neste parasito (HAMMARTON et al., 2005).

As centrinas são outra família de proteínas importantes no processo de divisão celular. Centrinas são proteínas que fazem parte da superfamília *EF-Hand*; possuem domínios de ligação ao cálcio, e foram descritas pela primeira vez no eucarioto autotrófico *Tetraselmis striata* (COLING; SALISBURY, 1992). Dentre as 4 centrinas identificadas neste trabalho, duas: a centrina 1 (Q4E591) e a centrina 4 (Q4DQ49) também foram encontradas no proteoma nuclear de formas epimastigotas de *T. cruzi* (SANTOS JUNIOR et al., 2015), sendo que a centrina 4 também foi encontrado no proteoma de proteínas associadas à cromatina (LEANDRO DE JESUS et al., 2016).

Estudos anteriores mostraram que a centrina 1 é requerida para a segregação de organelas e durante a citocinese em *T. brucei*. (SELVAPANDIYAN et al., 2007) e para centrina 4, além da participação no processo de segregação de organelas e da citocinese destaca-se por seu papel na coordenação do processo de divisão nuclear também em *T. brucei* (SHI et al., 2008).

A proteína de ligação centrômero/microtúbulos é uma outra proteína possivelmente relacionada ao processo de divisão celular, conforme proposto em estudos com *S. cerevisiae* (JIANG et al., 1993).

Das proteínas identificadas no proteoma total, 1.402 (cerca de 38%) estão anotadas no genoma como não caracterizadas. Essas proteínas não caracterizadas foram analisadas usando a ferramenta Interpro da plataforma DAVID, para listar os principais domínios proteicos que as compõem. Assim, a busca dos domínios proteicos que

compõem estas proteínas não caracterizadas resultou na identificação de 57 diferentes domínios. A lista completa bem como seu enriquecimento estão apresentados na tabela 1.

Dentre os motivos proteicos mais enriquecidos nas proteínas não caracterizadas encontra-se o domínio altamente conservado *Bromodomain*. As proteínas que contêm o *Bromodomain* apresentam, dentre outras funções, a atividade de histona acetiltransferase e a participação no remodelamento da cromatina para mediação transcricional (NTRANOS; CASACCIA, 2016). Tais funções já foram observadas em *T. cruzi* (VILLANOVA et al., 2009).

Proteínas Parkin co-reguladas, que participam do sistema ubiquitina/proteassoma, foram anteriormente descritas como importantes no processo de citocinese de *T. brucei* (HAMMARTON; MONNERAT; MOTTRAM, 2007) e sua presença em formas epimastigotas de *T. cruzi* foi evidenciada por técnicas transcriptômicas. (SANTOS et al., 2016). Em humanos, mutações em proteínas contendo estes domínios proteicos estão relacionadas ao surgimento de parkinsonismo (TAYLOR et al., 2007).

A proteína não caracterizada (Q4CLL9), uma das proteínas que possuem o domínio NOT2/NOT3/NOT4, apresenta 54% de identidade com a subunidade 3 do complexo de transcrição CCR4-NOT de *Trypanosoma theileri*. Proteínas que possuem este domínio estão classicamente associadas ao processo de regulação de gênica (BAI et al., 1999).

Ademais, dentre os motivos proteicos enumerados acima, encontramos domínios associados à canais membranares (*Porin domain*, nuclear, motivos de ligação a DNA/RNA), domínios de ligação ao cálcio (*EF-Hand domain*), demonstrando a importância de determinar a função destas proteínas não caracterizadas.

Tabela 1: Domínios proteicos identificados nas sequências das proteínas hipotéticas não caracterizadas do proteoma de *T. cruzi* durante o ciclo celular.

<b>INTERPRO Term</b>	<b>Count</b>	<b>Fold</b>
Porin domain	6	19,4
Conserved hypothetical protein CHP02231	5	19,4
Bromodomain, conserved site	4	19,4
Parkin co-regulated protein	3	19,4
Pyrrolo-quinoline quinone repeat	3	19,4
NOT2/NOT3/NOT5	3	19,4
Putative 4-mercaptohistidine N1-methyltransferase, OvoA C-terminal	3	19,4
Glycosyltransferase, GlcNAc	5	16,2
DNA/RNA-binding protein Alba-like	5	16,2
Quinonprotein alcohol dehydrogenase-like domain	4	15,5
Uncharacterised conserved protein UCP030333, DNA/RNA-binding	3	14,6
Emopamil-binding	3	14,6
Saccharopine dehydrogenase / Homospermidine synthase	3	14,6
Protein of unknown function DUF1042	4	13
Dimeric alpha-beta barrel	4	13
U box domain	4	13
Stomatin	4	13
Shoulder domain	3	11,7
Sterile alpha motif domain	3	11,7
Major vault protein, N-terminal	3	11,7
Isopenicillin N synthase-like	4	11,1
CS-like domain	7	9,7
Alkaline phosphatase-like, alpha/beta/alpha	5	9,7
Dpy-30 motif	5	9,7
NSF attachment protein	4	9,7
Nuclear transport factor 2, Eukaryote	3	9,7
Nuclear transport factor 2	3	9,7
TMP21-related	6	9
Band 7 protein	4	7,8
HSP20-like chaperone	7	7,6
Quinonprotein alcohol dehydrogenase-like superfamily	13	7,4
GOLD	6	7,3
Galactose mutarotase-like domain	3	7,3
Sterile alpha motif/pointed domain	3	7,3
Bromodomain	4	6,5
Major facilitator superfamily	14	6,2
Glucose/ribitol dehydrogenase	6	4,3
Nodulin-like	4	4,3
MORN motif	9	4,1
Cytochrome b5-like heme/steroid binding domain	5	4
NLI interacting factor	5	3,9
Rhodanese-like domain	4	3,9
Major facilitator superfamily domain	18	3,7
Tetratricopeptide-like helical	36	3,2
EF-hand-like domain	25	3,2
Tetratricopeptide repeat-containing domain	16	3,2
HAD-like domain	13	3,1
Tetratricopeptide repeat	15	2,9
Ankyrin repeat	7	2,7
Thioredoxin domain	6	2,7
EF-hand domain	18	2,6
Armadillo-type fold	37	2,5
Ankyrin repeat-containing domain	7	2,3
Thioredoxin-like fold	13	2,1
Armadillo-like helical	18	2
EF-Hand 1, calcium-binding site	9	2
NAD(P)-binding domain	16	1,9

### 3.3 Estudo quantitativo do proteoma e fosfoproteoma durante o ciclo celular de *T. cruzi*.

Para a quantificação relativa das proteínas durante a divisão celular, consideramos válidas as proteínas que foram observadas em ao menos duas das três réplicas. Após aplicados os filtros estatísticos propostos, encontramos 785 proteínas (Anexo I) reguladas para o proteoma total e 88 fosfoproteínas (Anexo II) reguladas, sendo que, retiradas as redundâncias entre os proteomas, foram identificadas um total de 846 proteínas reguladas durante a divisão celular do parasito.

As proteínas reguladas no proteoma total do ciclo de celular do *T. cruzi* foram agrupadas em 4 diferentes *clusters* de comportamento (Figura 6). Apesar do agrupamento em 4 *clusters*, pode-se observar que os *clusters* A e A' agrupam proteínas com comportamento semelhante e podem ser caracterizados principalmente pela queda nos níveis de expressão das proteínas que as compõem, no ponto 6 h. Contudo, diferenças sutis entre a expressão das proteínas nos demais pontos analisados justificaram a segregação em dois grupos. Assim, o *cluster* A apresenta uma discreta elevação da expressão das proteínas entre 0 h e 2 h, enquanto o *cluster* A' uma redução na expressão das proteínas nesse mesmo período.

De forma oposta ao apontado para os *clusters* A e A', dois *clusters* (B e B') podem ser caracterizados pelo aumento de expressão proteica 6 h após o início do experimento. Assim de forma similar ao *clusters* A e A', a diferença de tendência da expressão entre o ponto 0 h e 2 h também possibilitou separá-los em B (redução na expressão das proteínas entre 0 h e 2 h) e B' (aumento na expressão das proteínas entre 0 h e 2 h).

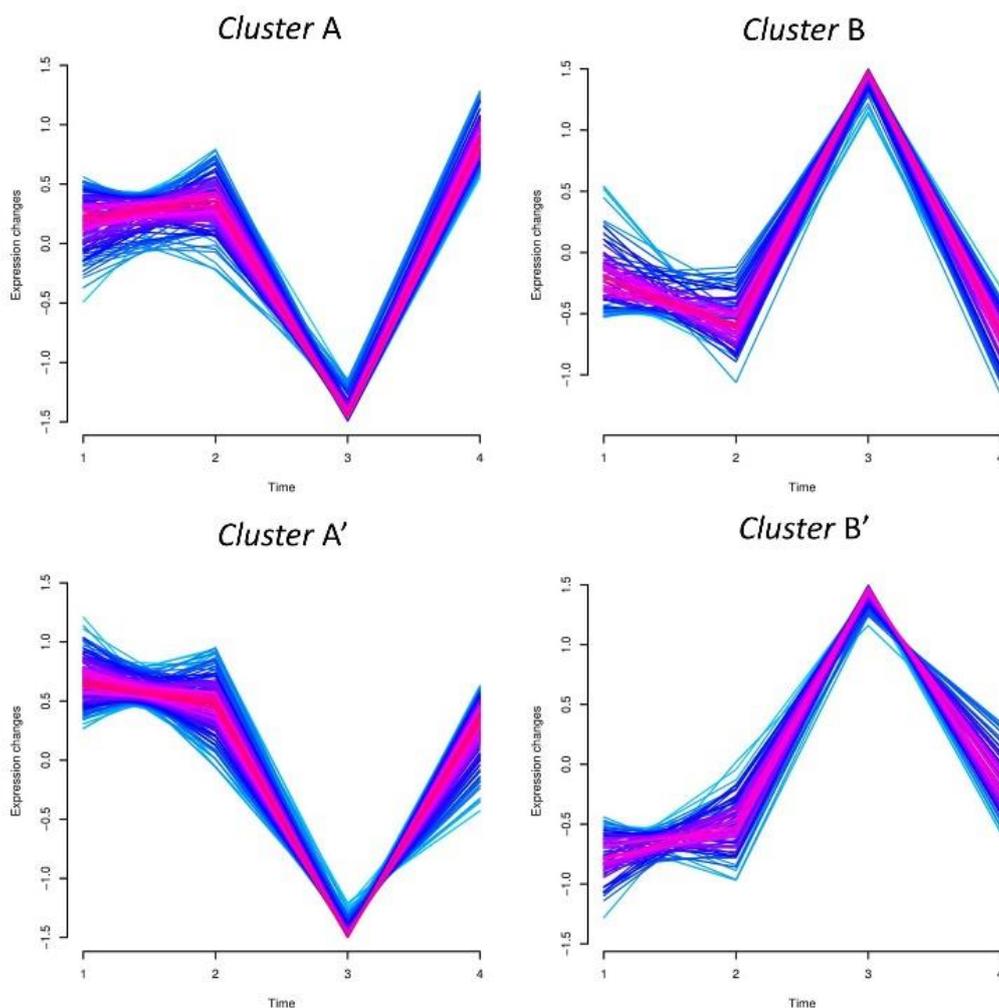


Figura 6. Linhas de tendência da abundância relativa de proteínas durante o ciclo celular nos tempos 1 (0 h), 2 (2 h), 3 (6 h) e 4 (14 h) após a retomada do ciclo celular com a retirada da hidroxiuréia.

As tendências de expressão proteica observadas nos *clusters* dos tipos A e B (mostradas anteriormente na figura 6) também são vistas nos dois clusters mais representativos da abundância relativa de fosfoproteínas ao longo do ciclo celular (Figura 7). Sendo assim, a maior parte das proteínas presentes no fosfoproteoma encontra-se reguladas negativamente ou positivamente no ponto 6 h. Contudo, 4 proteínas fosforiladas apresentaram um perfil de expressão diferente, onde a quantidade de peptídeos fosforilados tendem a aumentar em 14h de experimento, o que justificou agrupá-las em um novo *cluster* C (Figura 7).

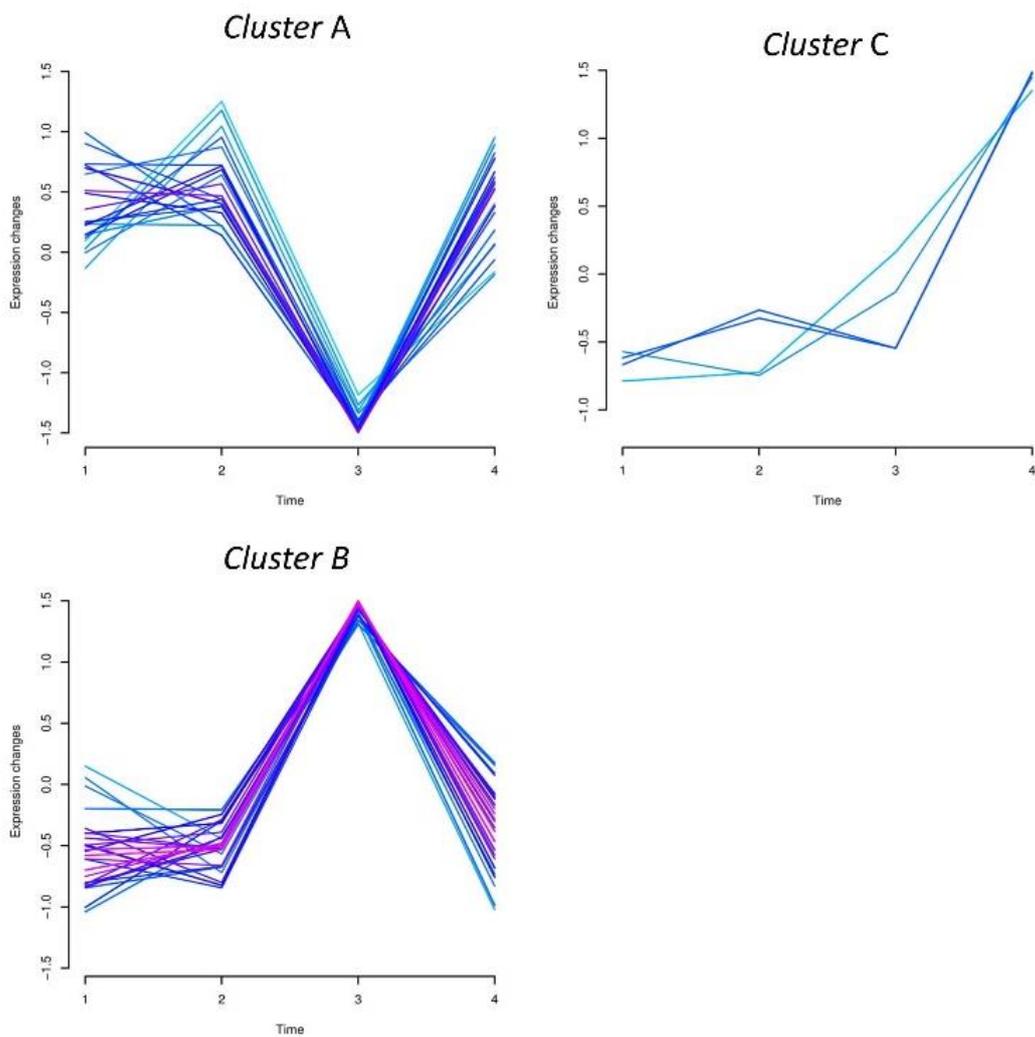


Figura 7. Linhas de tendência da abundância relativa de fosfoproteínas durante o ciclo celular nos tempos 1 (0 h), 2 (2 h), 3 (6 h) e 4 (14 h) após a retomada do ciclo celular com a retirada da HU.

A comparação entre as proteínas reguladas encontradas no proteoma total com as proteínas fosforiladas e reguladas presentes no fosfoproteoma resultou em 27 proteínas comuns a ambas análises (Figura 8).

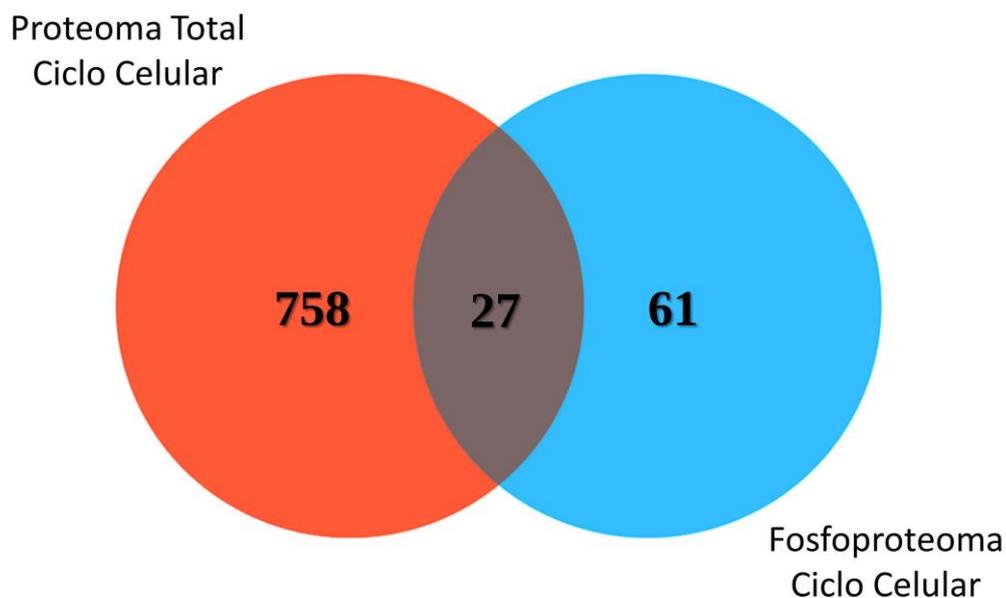


Figura 8. Diagrama de Venn mostrando as proteínas reguladas durante o ciclo celular, encontradas no proteoma total e no fosfoproteoma de *T. cruzi*.

Dentre as 27 proteínas comuns, 13 apresentaram linhas de tendências com comportamento de abundância relativa similares durante diferentes etapas do ciclo celular. Este comportamento similar nos dá indícios que o aumento ou diminuição dos peptídeos fosforilados, evidenciado no fosfoproteoma, possa ser reflexo da regulação global do nível da proteína na célula e menos provavelmente resultado de uma regulação de fosforilações (Figura 9A).

Em contrapartida, as demais proteínas encontradas em ambas abordagens proteômicas (Figura 9B), demonstram em ao menos um dos pontos analisados uma tendência de expressão divergente entre a quantificação de proteínas e fosfopeptídeos. Esse comportamento sugere que estas proteínas estão sofrendo uma regulação em nível de fosforilação durante a divisão celular, uma vez que o nível de proteínas parece não estar diretamente associado ao incremento ou decréscimo de peptídeos fosforilados.

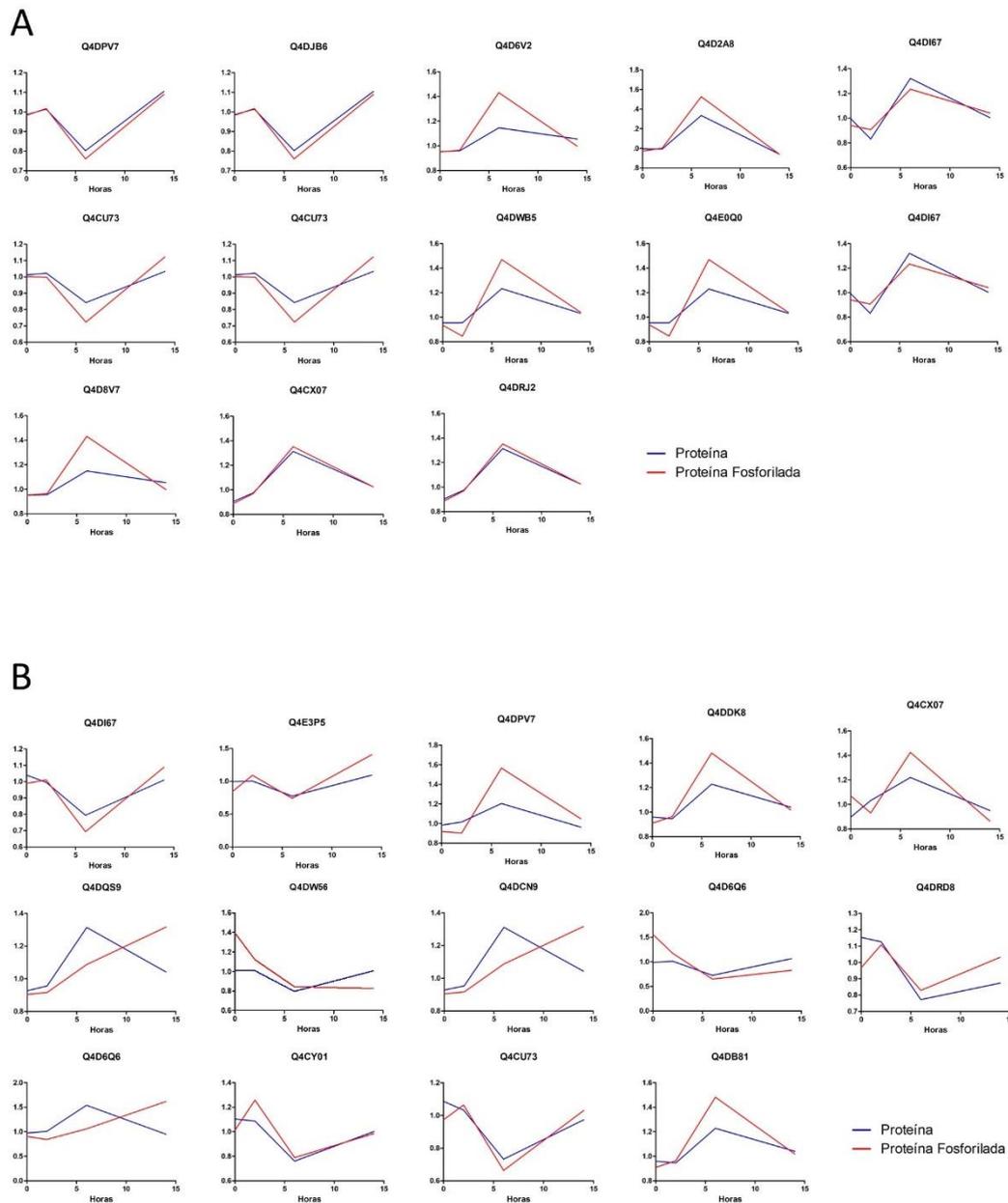


Figura 9. Comparação entre a tendência de expressão das proteínas no proteoma e no fosfoproteoma durante o ciclo celular do *T. cruzi*. A. Proteínas cujas as tendências da regulação são similares no proteoma e no fosfoproteoma. B. Proteínas cujas as tendências de regulação são divergentes no proteoma e o fosfoproteoma.

### 3.4 Proteínas reguladas durante a divisão celular de *T. cruzi*

Dentre o grupo de proteínas reguladas positivamente em 0h destacam-se proteínas não caracterizadas, proteínas ligantes ao DNA, proteína-1 stress-induzida, nucleotídeo

difosfato cinase, entre outras que já foram anteriormente associadas a divisão celular, inclusive em tripanossomatídeos.

É possível que a expressão aumentada de proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, como a nucleotídeo difosfato cinase, nucleotídeo fosforilase e a cadeia leve da ribonucleotídeo difosfato redutase fosforilada seja devida a interferência da hidroxiuréia no metabolismo do parasito. A hidroxiuréia interrompe a progressão do ciclo celular devido à inibição da ribonucleotídeo redutase e conseqüentemente há diminuição da disponibilidade de desoxiribonucleotídeos para a progressão da síntese de DNA (YOUNG; HODAS, 1964).

Outra proteína possivelmente regulada pela presença da hidroxiuréia em 0 h é a proteína 1 stress-induzida, Sti1 (Q4DYD9). A proteína-1 stress-induzida é uma co-chaperona (TcSTI-1) produzida em resposta ao estresse, e intermedia a formação de um complexo entre as proteínas de estresse HSP70 e HSP90. Trabalhos anteriores mostraram que os níveis RNAm e de proteínas se mantiveram estáveis em epimastigotas de *T. cruzi* em crescimento exponencial ou quando cultivadas sob outras condições de estresse, como variações de temperatura. Contudo, foi demonstrado que a expressão de TcSTI-1 é aumentada em *T. cruzi* quando submetido a condições de estresse durante a fase específica de crescimento (SCHMIDT et al., 2011). Como a hidroxiuréia bloqueia a replicação celular, o aumento da TcSTI-1 no tempo 0 h é justificado. Com a retomada do ciclo celular os níveis desta proteína tendem a cair mantendo-se estáveis ao decorrer de todas as etapas da divisão celular analisadas.

Na segunda hora, ponto onde o ciclo celular começa a ser retomado após a ação da hidroxiuréia, a proteína *peptidil-prolil cis trans isomerase* (Q4DNC9, Q4DPB9) está aumentada. As *peptidil-prolil cis trans isomerases* são descritas como temporizadores moleculares que ajudam a controlar a amplitude e a duração de diversos processos celulares (LU et al., 2007).

Nossos resultados também mostram que representantes da MAPK (Mitogen activated protein kinase; Q4CZQ7, Q4DC97) estão diminuídas na sexta hora após a liberação do ciclo celular. Estas são proteínas altamente conservadas em eucariotos que participam no processo de transdução de sinais modulando importantes processos fisiológicos das células como diferenciação e proliferação celular. (ERBEN et al., 2010). A superexpressão de uma MAPK em epimastigotas foi relacionada à inibição do crescimento e o desenvolvimento, levando à morte celular (BAO et al., 2010).

Outro grupo de proteínas reguladas são as proteínas putativas 14-3-3 (Q4DRH6, Q4DJB6, Q4DHC9). Estas proteínas estão reguladas negativamente no tempo 6 h, tempo em que a síntese do DNA está ocorrendo. Em *T. brucei* as proteínas putativas 14-3-3 desempenham papéis importantes na motilidade, na citocinese e no ciclo celular, sendo que na divisão celular atuam na divisão nuclear (que ocorre em G2-M) e na citocinese (que ocorre M-G1) (INOUE et al., 2005). De forma a corroborar com as funções descritas para *T. brucei*, durante o proteoma do ciclo celular, nos tempos 0h, 2h e 14h que correspondem as fases G1, G1-S e M-G1, respectivamente, os níveis de expressão para as proteínas são superiores à expressão encontrada para 6h.

Apesar das proteínas putativas 14-3-3 estarem envolvidas no processo de divisão nuclear de tripanossomatídeos, representantes desta família não estão entre as proteínas identificadas no proteoma nuclear (SANTOS JUNIOR et al., 2015). Por outro lado, a presença nuclear dessas proteínas pode ser corroborada visto que representantes desta família foram encontrados associados aos cromossomos de *T. cruzi* (LEANDRO DE JESUS et al., 2016).

Outra família de proteínas associadas a estresse e reguladas no proteoma de divisão celular de *T. cruzi* é a família das proteínas de choque térmico (HSP). De forma similar aos *clusters* de tendência de expressão preditos neste proteoma (vide figura 4) diferentes HSPs podem ser divididas em grupos regulados positivamente ou negativamente durante a síntese de DNA (6 h).

As HSPs, que junto com as actinas, tubulinas e histonas fazem parte do grupo de proteínas consideradas constitutivas, têm sido observadas por vários autores em trabalhos de proteômica de *T. cruzi* (ATWOOD et al., 2005; PABA et al., 2004; PARODI-TALICE et al., 2004). Além do mais essas proteínas estão presentes no proteoma nuclear de *T. cruzi* (SANTOS JUNIOR et al., 2015) bem como nos cromossomos (LEANDRO DE JESUS et al., 2016). A resposta ao choque térmico é um mecanismo homeostático que protege as células dos efeitos deletérios do estresse ambiental, tal como calor (FOLGUEIRA; REQUENA, 2007). Contudo, as HSPs têm sido descritas como participantes de outros importantes processos biológicos. Um exemplo é a HSPs 70, uma chaperona essencial para funções celulares tais como translocação de proteínas através das membranas das organelas, enovelamento e empacotamento de proteínas, além da proteção das células do calor e do estresse químico (SANDERS et al., 1992; TIBBETTS et al., 1994). Algumas HSPs de *T. cruzi* foram funcionalmente classificadas em trabalhos

anteriores como participantes de processos envolvidos no ciclo celular (GRAEFE et al., 2002; PÉREZ-MORALES et al., 2012).

Dentre outras proteínas consideradas como constitutivas, algumas histonas foram identificadas no proteoma da divisão celular, no nuclear, e nos cromossomos (LEANDRO DE JESUS et al., 2016). Contudo, somente a histona H4 (Q4CXR1, Q4DDL6, Q4DEL1) foi detectado entre as proteínas reguladas, com sua expressão aumentada em 6h e 14h. Apesar de a variação da abundância da histona H4 não ter sido anteriormente descrita, trabalhos anteriores mostram o aumento da acetilação destas histonas nas fases que sucedem a síntese (LEANDRO DE JESUS et al., 2016; NARDELLI et al., 2009); o mesmo comportamento predito no presente trabalho em nível de expressão proteica.

Proteínas transportadoras ABC foram encontradas com expressão regulada positivamente durante a síntese de DNA (6 h). Transportadores ABC são proteínas de membrana que mediam o transporte unidirecional de uma variedade de moléculas, através das membranas biológicas, e estão relacionadas a resistência natural a drogas anti-parasitárias em *T. cruzi* (ZINGALES et al., 2015).

A proteína transportadora ABC (Q4CX07) que é uma proteína ligante de nucleotídeo segundo análises de ontologia gênica, mostrou regulação positiva durante a síntese de DNA. Esta proteína foi encontrada associada à cromatina (LEANDRO DE JESUS et al., 2016) e presente no proteoma nuclear de *T. cruzi* (SANTOS JUNIOR et al., 2015).

Três representantes da família das proteínas transportadoras ABC (Q4CWA4, Q4DAY6, Q4DW56), cujas fosforilações também se encontram reguladas positivamente durante a síntese de DNA/G2 (6h), foram encontradas somente após o enriquecimento de fosfopeptídeos. Das três proteínas apresentadas, duas (Q4CWA4, Q4DAY6) foram previamente encontradas associadas ao núcleo (SANTOS JUNIOR et al., 2015) e também aos cromossomos *T. cruzi* (LEANDRO DE JESUS et al., 2016).

Apesar de não ser confirmada nenhuma função que correlacione diretamente as proteínas transportadoras ABC ao metabolismo de ácidos nucleicos, os resultados apresentados lançam estas proteínas como possíveis detentores de funções nucleares, associadas ao metabolismo de DNA, ou mesmo na síntese de DNA. Esta relação deverá ser confirmada futuramente com testes que esclareçam a função destas proteínas.

Outro grupo de proteínas reguladas positivamente durante a síntese de DNA é o grupo das dineínas. Neste trabalho encontramos cadeias leves, intermediárias e pesadas da dineína, todas com expressão aumentada em 6h, período em que as células estão

promovendo o a síntese de DNA. Este comportamento corrobora dados anteriores, que descreveram o acúmulo das dineínas nos centrossomos durante as fases S e G2, sendo altamente enriquecidas nos polos do fuso mitótico em uma etapa de recrutamento em preparação para a mitose (QUINTYNE; SCHROER, 2002).

Algumas proteínas que fazem parte do repertório de proteínas de membrana típicas de *T. cruzi* estão entre as proteínas reguladas no proteoma de divisão celular. Entre elas três KPM11 encontradas no proteoma nuclear (Q4D3A5, Q4D3A7, Q4D7Y4) estão reguladas no proteoma de divisão celular onde estão aumentadas durante a síntese/G2 (6 h).

Entre as KPMs, a KPM11 foi anteriormente associada ao processo de divisão celular em *T. brucei*. Uma vez silenciada a expressão proteica do KPM11 nesse tripanossomatídeo, houve a inibição da segregação do corpo basal e da citocinese, a formação de novos núcleos de tamanhos diferentes que se acumularam dentro de uma mesma célula, mostrando que os parasitos silenciados possuíam uma divisão nuclear defeituosa e a sua divisão celular bloqueada (LI; WANG, 2008).

As KMPs foram encontradas no proteoma nuclear e no proteoma da divisão celular, porém ausentes na cromatina (DE JESUS et al., 2016); estas proteínas encontram-se aumentadas no tempo 6h.

Apesar de não serem evidentes funções que justifiquem este grupo de proteínas estarem regulados durante o ciclo celular, três trans-sialidasas (Q4DC15; Q4E0M9; Q4CYA8) foram encontradas diferencialmente expressas em 6h (síntese de DNA/G2). As trans-sialidasas são proteínas de membrana que estão envolvidas na interação parasito-hospedeiro sobretudo intermediando o processo de escape ao sistema imunológico (DE PABLOS; OSUNA, 2012; FRASCH, 2000). Representantes destas proteínas foram também encontradas no núcleo (SANTOS JUNIOR et al., 2015) e ligadas a cromatina de *T. cruzi* (DE JESUS et al., 2016).

A miosina e a cinesina, proteínas amplamente discutidas por seus papéis de motores durante a segregação cromossômica e a citocinese (MATSUMURA, 2005; WORDEMAN, 2010) também se mostraram reguladas durante a divisão celular. Uma cadeia pesada da miosina (Q4CNB2) bem como uma cinesina-like (Q4CWN9) estão entre as proteínas aumentadas durante a mitose/citocinese (14 h) em concordância com os trabalhos que citam seu papel fundamental nessas fases do ciclo celular. No fosfoproteoma foram identificadas outras duas cinesinas (Q4DDL0, Q4DRD6). Estas por

sua vez, apresentaram uma regulação negativa nas fosforilações durante síntese de DNA/G2 (6h).

Uma proteína ligante de RNA *Pumilio/PUF* (Q4D0T3), que normalmente é descrita como proteínas que interagem com os sistemas de regulação do mRNA (EDWARDS, 2015), foi encontrada regulada positivamente em 6h (síntese/G2). Anteriormente, proteínas desta família de ligantes de RNA haviam sido descritas como possíveis ativadoras da divisão celular em plantas (ABBASI; PARK; CHOI, 2011).

Dentre o grupo de proteínas reguladas do proteoma global ou no fosfoproteoma, um grande número possui função desconhecida e por isso são anotadas como proteínas não caracterizadas. Ao todo são 165 (21%) proteínas não caracterizadas no proteoma total e 48 (56%) proteínas no fosfoproteoma. Muitas delas também presentes também no núcleo ou associadas a cromatina de *T. cruzi* (Figura 10).

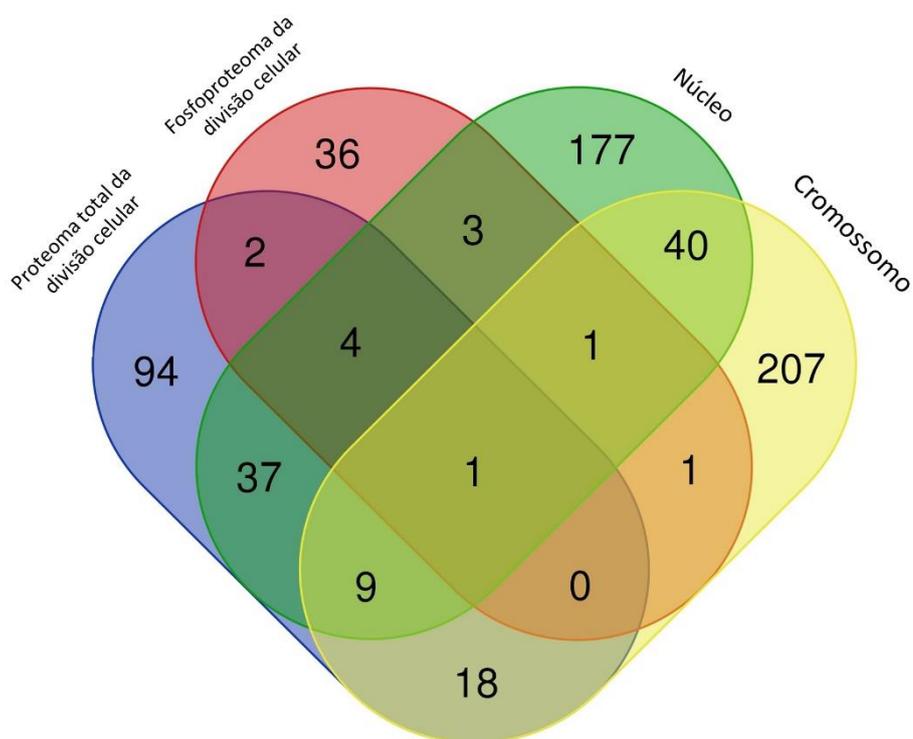


Figura 10 – Proteínas não caracterizadas com expressão ou fosforilação reguladas comuns a análise proteômica nuclear (Cap. II) e também associadas a cromatina de *T. cruzi* (LEANDRO DE JESUS et al., 2016) .

Os dados apresentados mostram que proteínas sabidamente associadas a eventos específicos no processo de divisão celular em eucariotos, também tiveram sua expressão regulada no proteoma da divisão celular do *T. cruzi*. Ou seja, proteínas que anteriormente

eram descritas como peças importantes na divisão celular de outros organismos, se mostraram-se reguladas durante a divisão celular de *T. cruzi*, dando indícios de que também possam participar de forma similar na divisão deste parasito.

As proteínas não caracterizadas reguladas durante a divisão nuclear, sobretudo aquelas também presentes no núcleo e associadas aos cromossomos podem desenvolver papel fundamental no ciclo de vida deste parasito, ajudando no entendimento do controle do processo de replicação ainda pouco conhecido e sobretudo, serem candidatas a futuros alvos terapêuticos mais específicos contra as infecções causadas por tripanosomatídeos.

#### 4. Referências Bibliográficas

ABBASI, N.; PARK, Y. IL; CHOI, S. B. Pumilio puf domain RNA-binding proteins in Arabidopsis. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 3, p. 364–368, 2011.

ATWOOD, J. A. et al. The Trypanosoma cruzi Proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473–476, 15 jul. 2005.

BAI, Y. et al. The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 10, p. 6642–51, 1999.

BAO, Y. et al. Molecular cloning and characterization of mitogen-activated protein kinase 2 in Trypanosoma cruzi. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 9, n. 14, p. 2888–96, 2010.

CHÁVEZ, S. et al. Transcriptome-wide analysis of the Trypanosoma cruzi proliferative cycle identifies the periodically expressed mRNAs and their multiple levels of control. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, 2017.

COLING, D. E.; SALISBURY, J. L. Characterization of the Calcium-Binding Contractile Protein Centrin from Tetraselmis striata (Pleurostrophyceae). **The Journal of Protozoology**, v. 39, n. 3, p. 385–391, 1992.

DE JESUS, T. C. L. et al. Chromatin proteomics reveals variable histone modifications during the life cycle of trypanosoma cruzi. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 6, p. 2039–2051, 2016.

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene families in Trypanosoma cruzi and their role in infectivity. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 7, p. 2258–2264, 2012.

DE SOUZA, C. P. C.; OSMANI, S. A. **Mitosis, not just open or closed Eukaryotic Cell**, 2007.

EDWARDS, T. A. Bespoke RNA recognition by Pumilios. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 5, p. 801–806, 2015.

ELIAS, M. C. Q. B. et al. Chromosome localization changes in the Trypanosoma cruzi nucleus. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 944–953, 2002.

ERBEN, E. D. et al. Identification of an atypical peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 9, p. 1028–1037, 2010.

FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J. M. **A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids** FEMS Microbiology Reviews, 2007.

FRASCH, A. Functional Diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in Trypanosoma cruzi. **Parasitology Today**, v. 16, p. 1–5, 8 jun. 2000.

GRAEFE, S. E. B. et al. Inhibition of HSP90 in Trypanosoma cruzi induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 936–943, 2002.

- HAMMARTON, T. C. et al. Trypanosoma brucei MOB1 is required for accurate and efficient cytokinesis but not for exit from mitosis. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 104–116, 2005.
- HAMMARTON, T. C.; MONNERAT, S.; MOTTRAM, J. C. Cytokinesis in trypanosomatids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 520–527, 2007.
- INOUE, M. et al. The 14-3-3 proteins of Trypanosoma brucei function in motility, cytokinesis, and cell cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 14085–14096, 2005.
- JENSEN, S. S.; LARSEN, M. R. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 22, p. 3635–3645, 2007.
- JIANG, W. et al. An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules. **Molecular and cellular biology**, v. 13, n. 8, p. 4884–4893, 1993.
- LEANDRO DE JESUS, T. C. et al. Chromatin proteomics reveals variable histone modifications during the life cycle of trypanosoma cruzi. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 6, p. 2039–2051, 2016.
- LEANDRO DE JESUS, T. C. et al. Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 1, p. 23–38, 2017.
- LI, Z.; WANG, C. KMP-11, a Basal Body and Flagellar Protein, Is Required for Cell Division in Trypanosoma brucei. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 11, p. 1941–1950, 4 nov. 2008.
- LU, K. P. et al. **Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer** *Nature Chemical Biology*, 2007.
- MATSUMURA, F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 371–377, 2005.
- NARDELLI, S. C. et al. Distinct acetylation of Trypanosoma cruzi histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. **Chromosoma**, v. 118, n. 4, p. 487–499, 2009.
- NTRANOS, A.; CASACCIA, P. **Bromodomains: Translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair** *Neuroscience Letters*, 2016.
- 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. 517–524, 2004.
- 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. 881–886, 2004.
- PÉREZ-MORALES, D. et al. Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi epimastigotes subjected to heat shock. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

- QUINTYNE, N. J.; SCHROER, T. A. Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. **Journal of Cell Biology**, v. 159, n. 2, p. 245–254, 2002.
- SANDERS, S. L. et al. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell**, v. 69, n. 2, p. 353–365, 1992.
- SANTOS, C. et al. Trypanosoma cruzi transcriptome during axenic epimastigote growth curve. **Parasitology**, v. 113, n. 5, p. In preparation., 2016.
- SANTOS JUNIOR, A. DE C. M. DOS et al. Unveiling the trypanosoma Cruzi nuclear proteome. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.
- SCHMIDT, J. C. et al. Characterization of TcSTI-1, a homologue of stress-induced protein-1, in trypanosoma cruzi. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 70–77, 2011.
- SELVAPANDIYAN, A. et al. Centrin1 Is Required for Organelle Segregation and Cytokinesis in Trypanosoma brucei □ D. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, p. 3290–3301, 2007.
- SHI, J. et al. Centrin4 coordinates cell and nuclear division in T. brucei. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 18, p. 3062–3070, 2008.
- SOUZA, W. Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269–285, 2002.
- STAVRIDIS, E. S. et al. Crystal structure of a human Mob1 protein: Toward understanding Mob-regulated cell cycle pathways. **Structure**, v. 11, n. 9, p. 1163–1170, 2003.
- TAYLOR, J. M. et al. Parkin Co-regulated Gene (PACRG) is regulated by the ubiquitin-proteasomal system and is present in the pathological features of parkinsonian diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 27, n. 2, p. 238–247, 2007.
- THINGHOLM, T. E. et al. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1929–1935, 2006.
- TIBBETTS, R. S. et al. Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of Trypanosoma cruzi. **Infection and immunity**, v. 62, n. 6, p. 2499–2507, 1994.
- TYANOVA, S. et al. **The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data** *Nature Methods*, 2016.
- VILLANOVA, G. V. et al. Trypanosoma cruzi bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 6, p. 665–673, 2009.
- VITULO, N. et al. Characterization and evolution of the cell cycle-associated mob domain-containing proteins in eukaryotes. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 3, p. 121–158, 2007.
- WISNIEWSKI, J. R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 377–362, 2009.

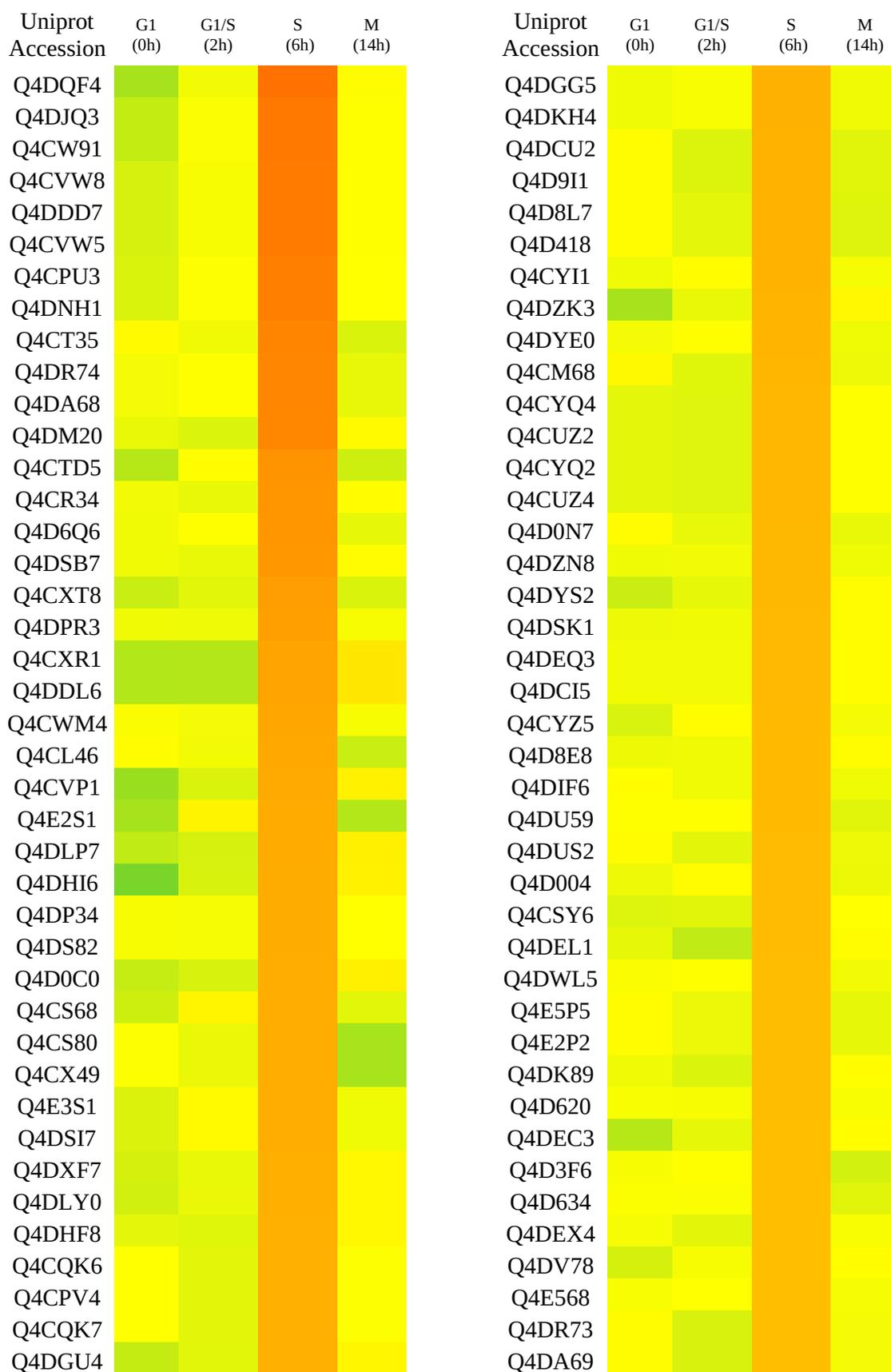
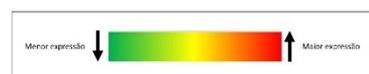
WORDEMAN, L. **How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: Lessons from molecular assays** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2010.

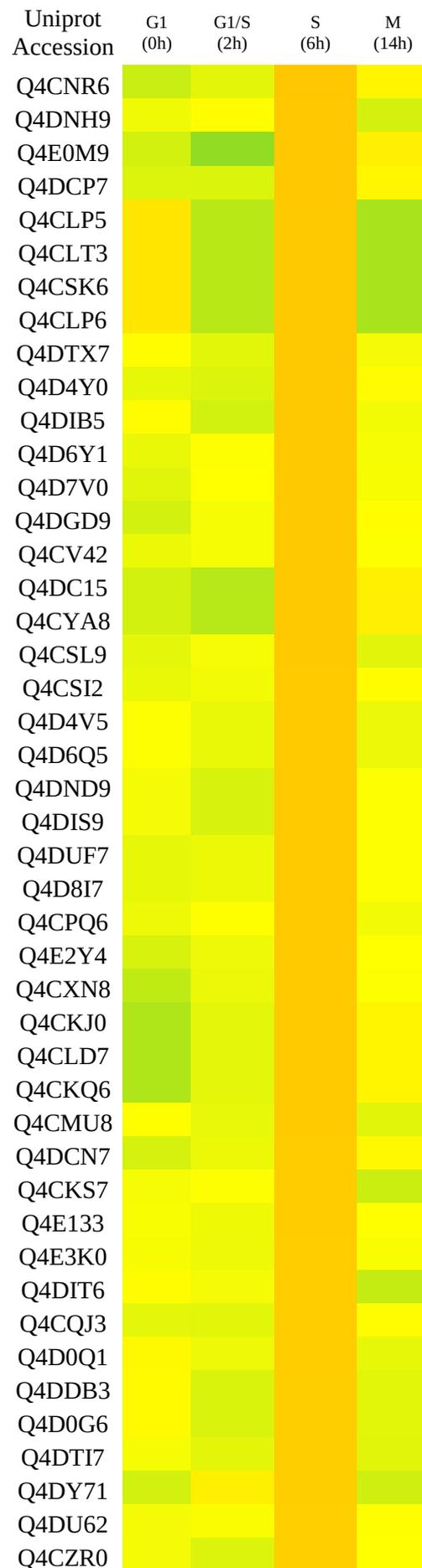
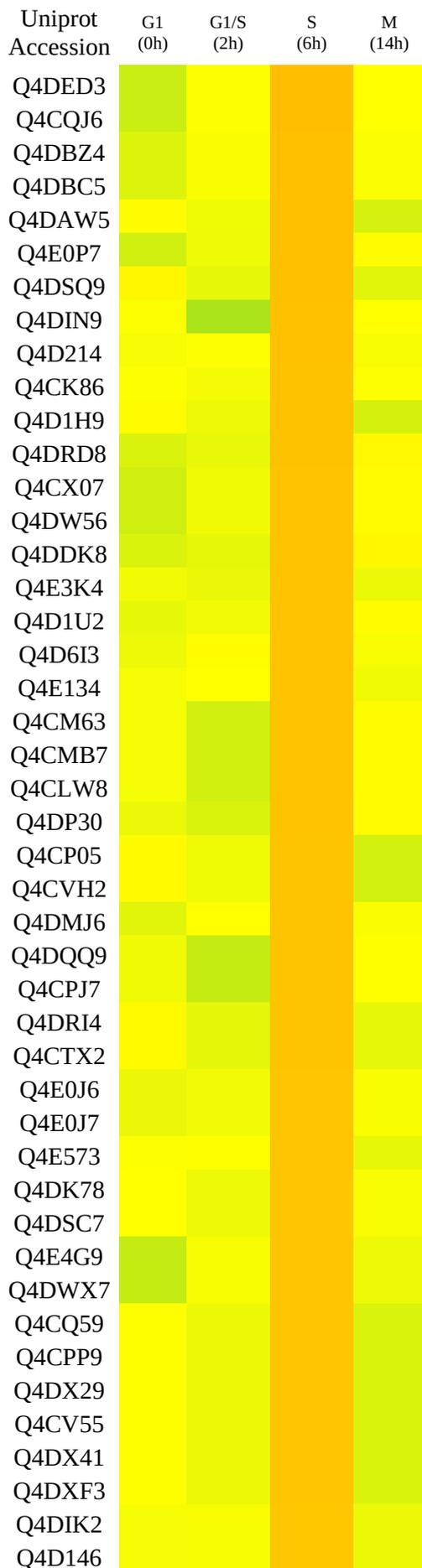
WORLD HEALTH ORGANISATION. **WHO Chagas disease (American trypanosomiasis) Factsheet.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

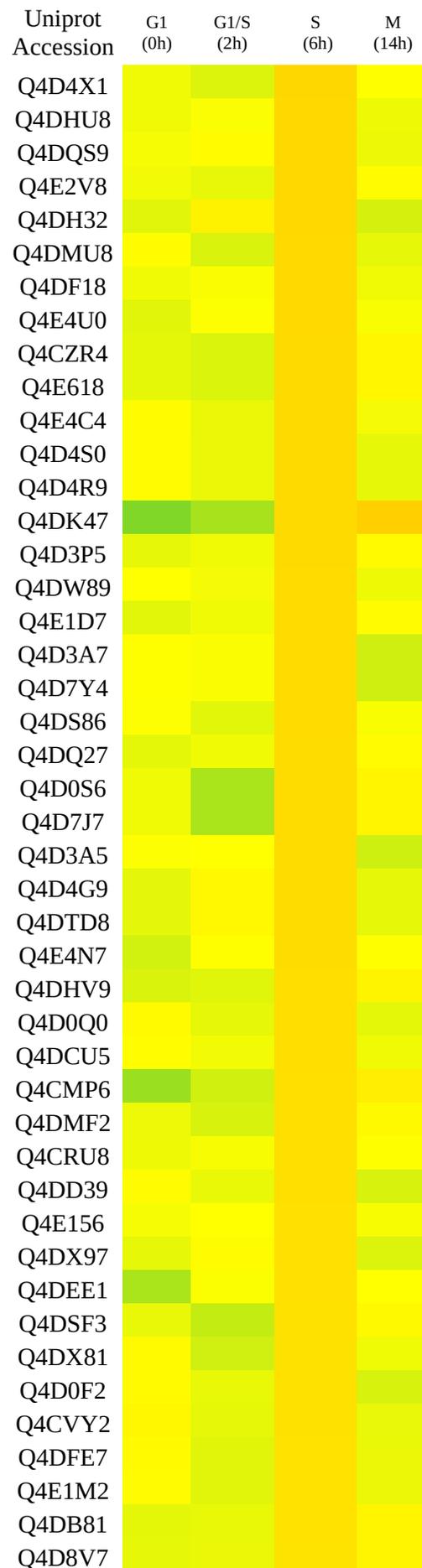
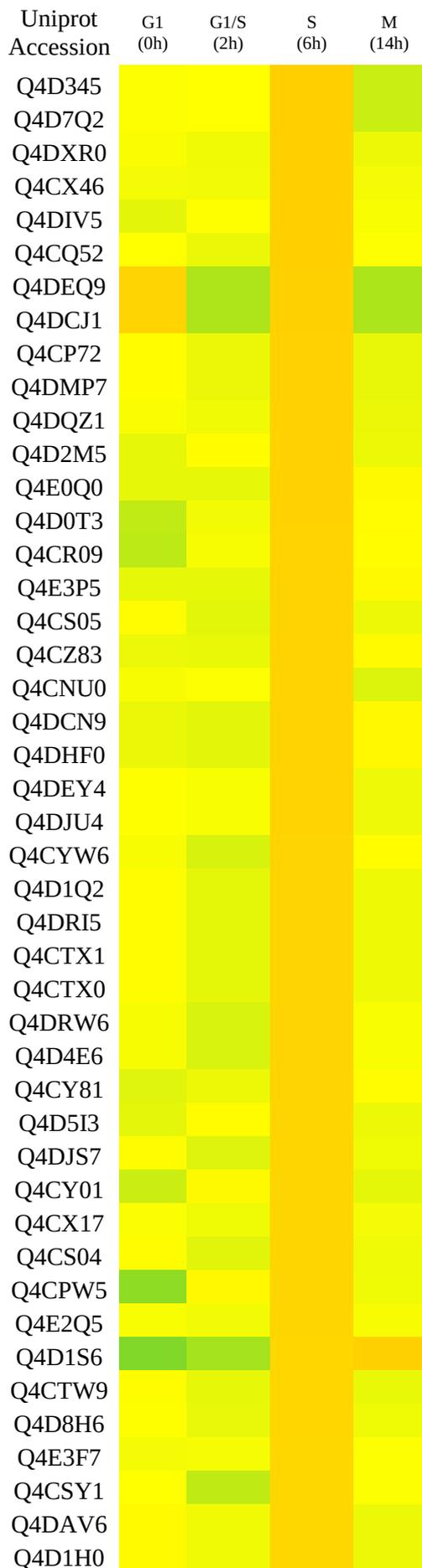
YOUNG, C. W.; HODAS, S. HYDROXYUREA: INHIBITORY EFFECT ON DNA METABOLISM. *Science (New York, N.Y.)*, v. 146, n. 3648, p. 1172–4, 1964.

ZINGALES, B. et al. A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 3, p. 433–444, 2015.

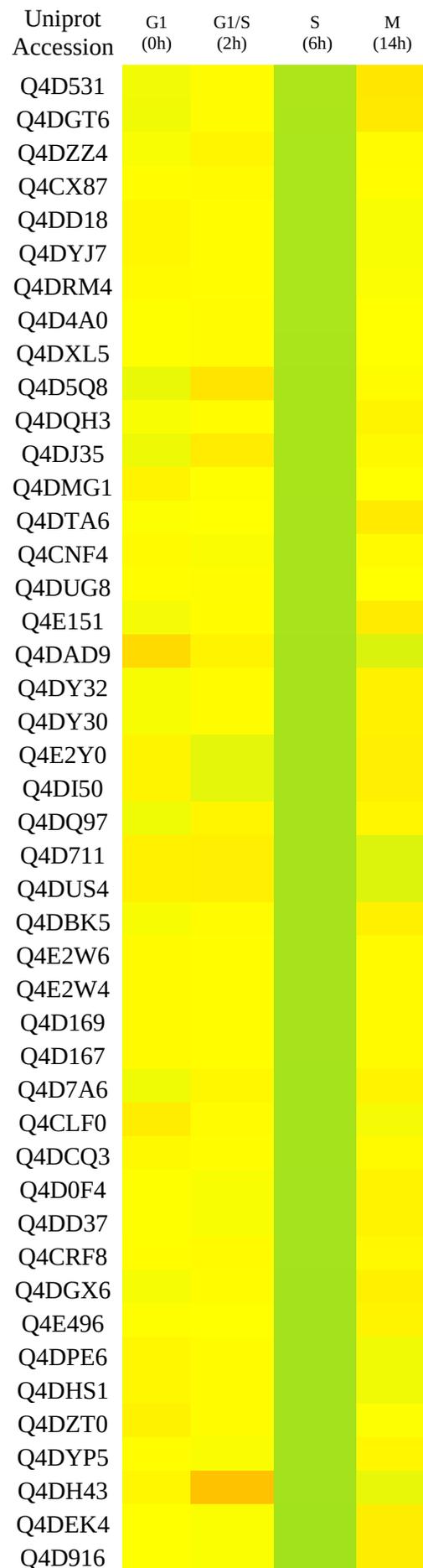
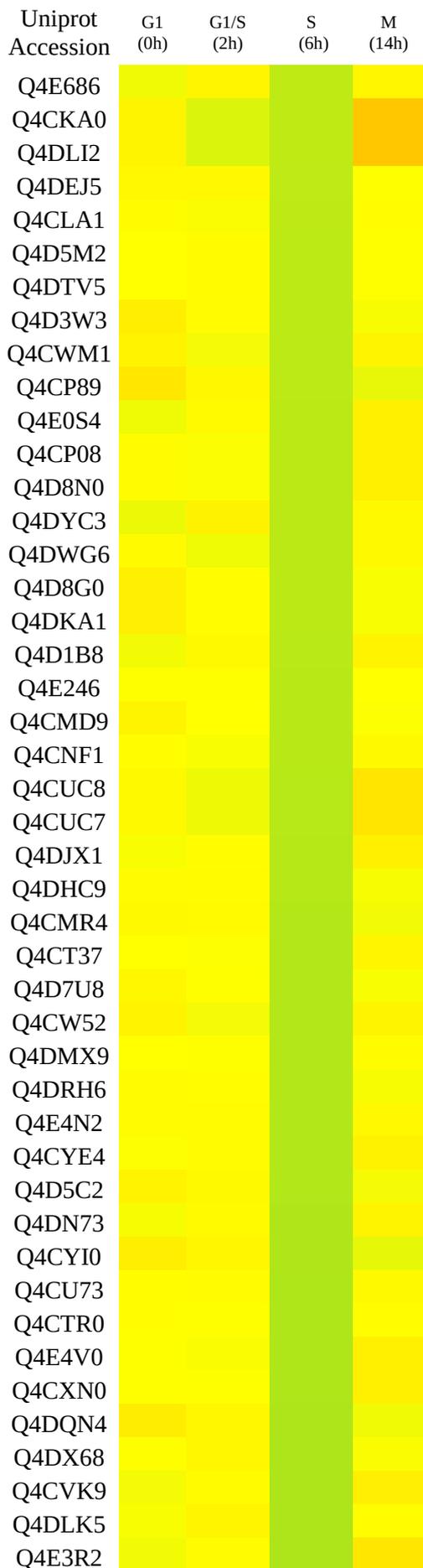
**Anexo I** – Heatmap das proteínas diferencialmente expressas durante a divisão celular do *T. cruzi*.

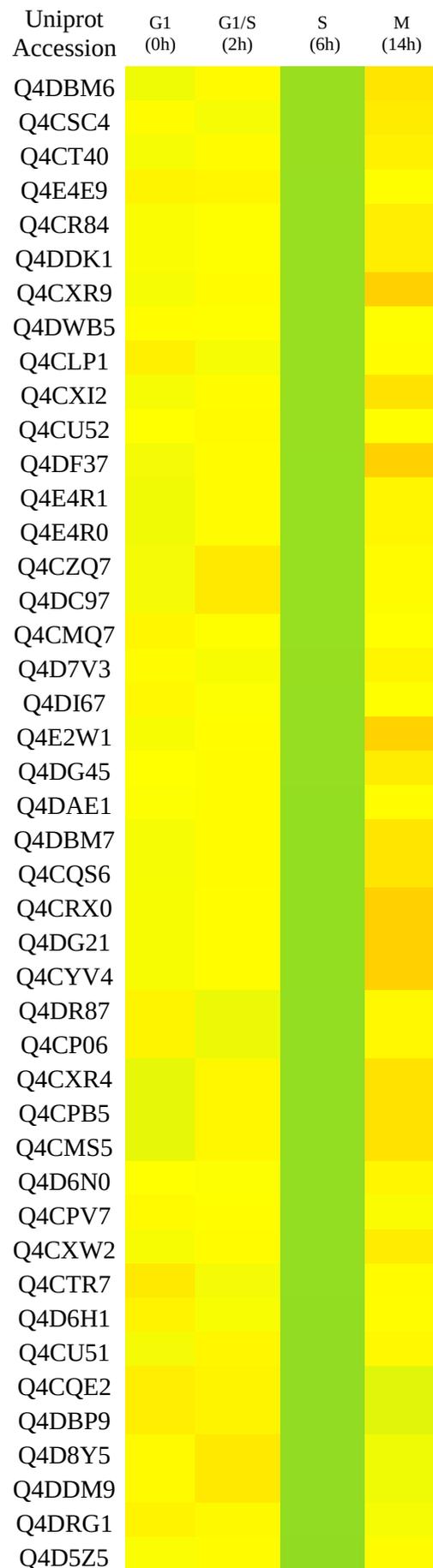
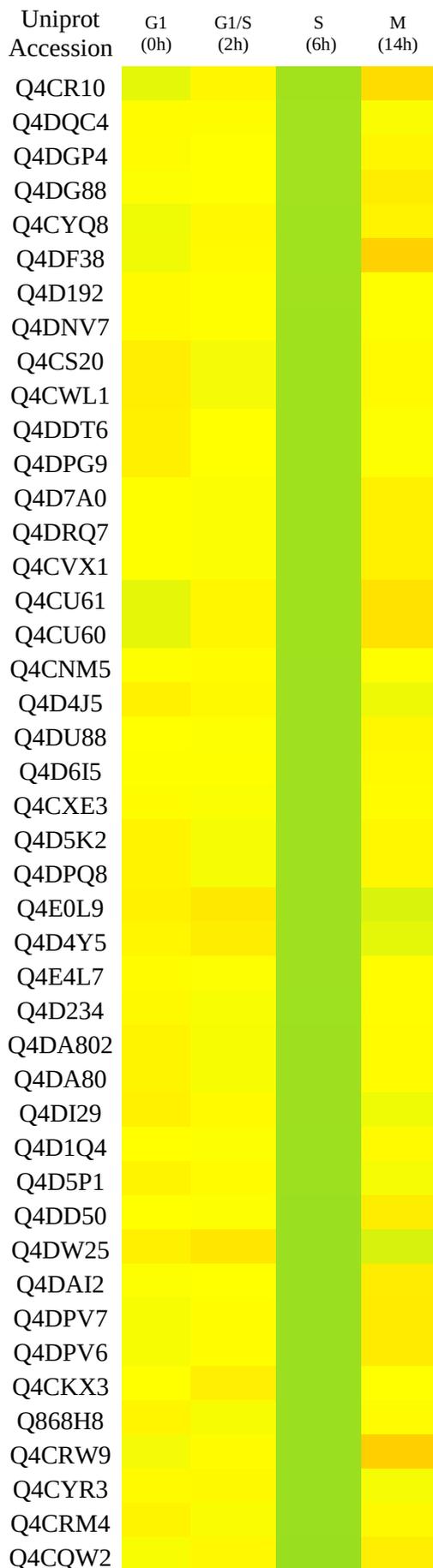


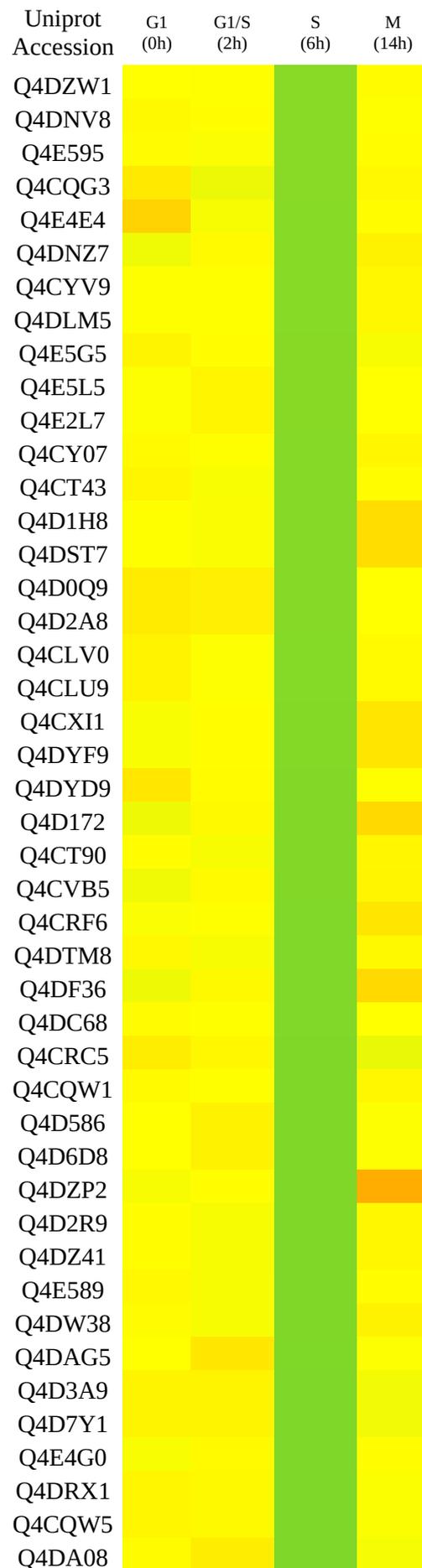
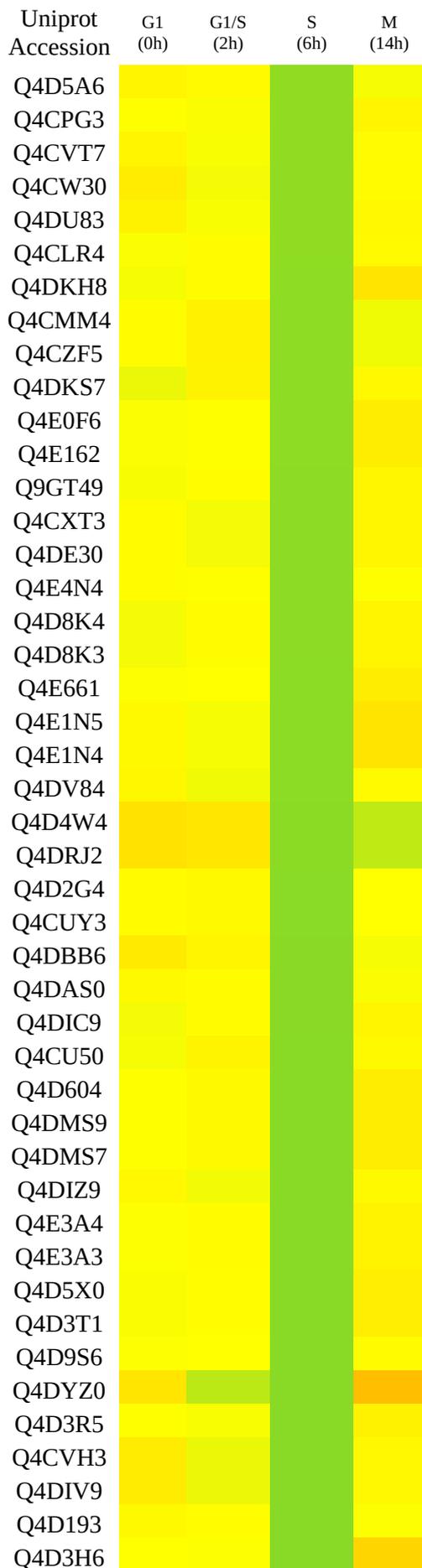


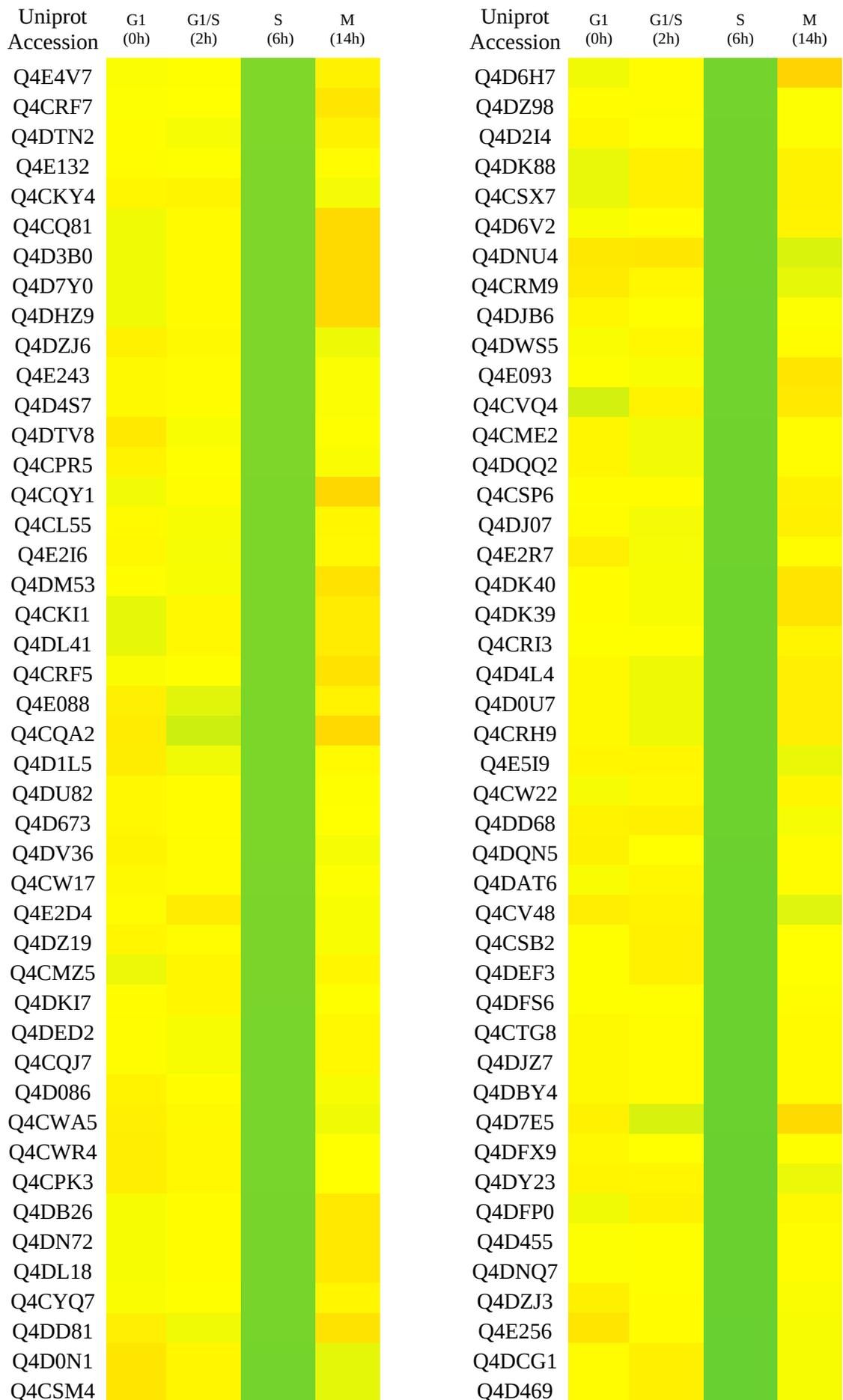


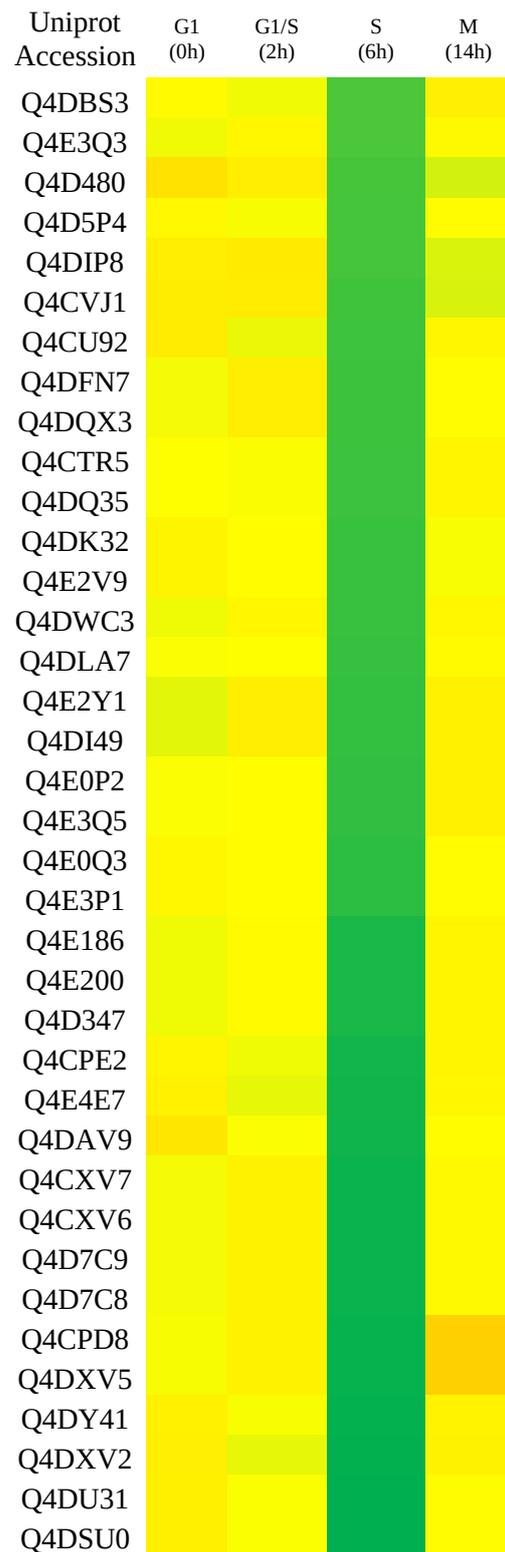
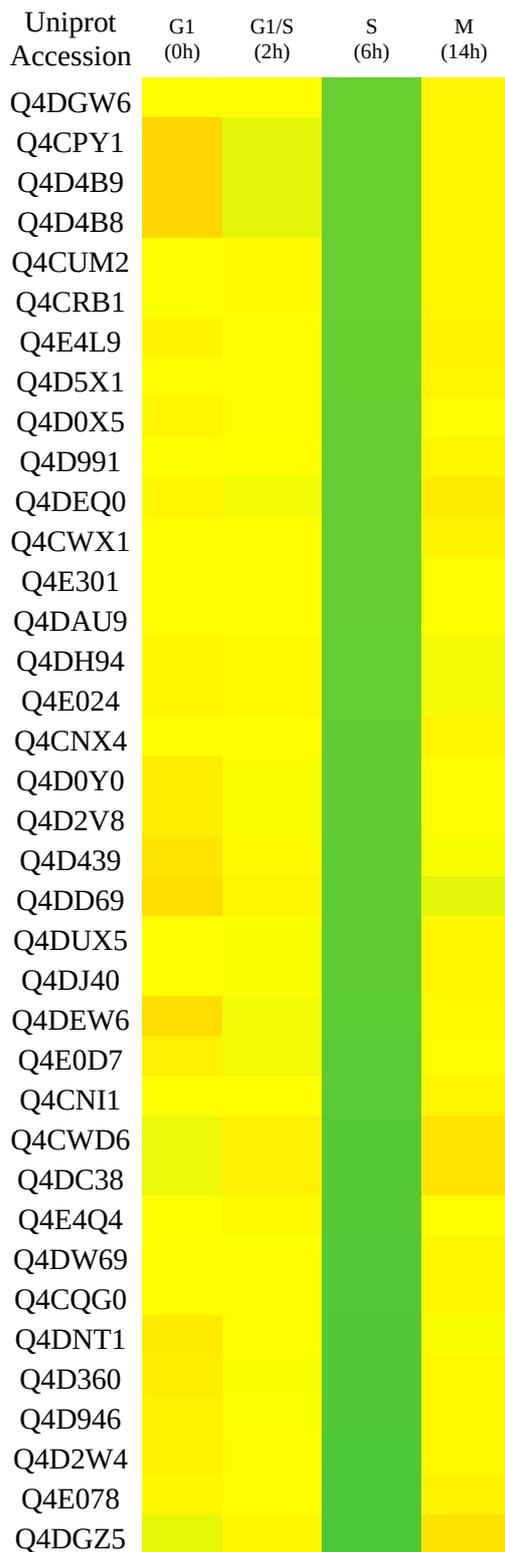




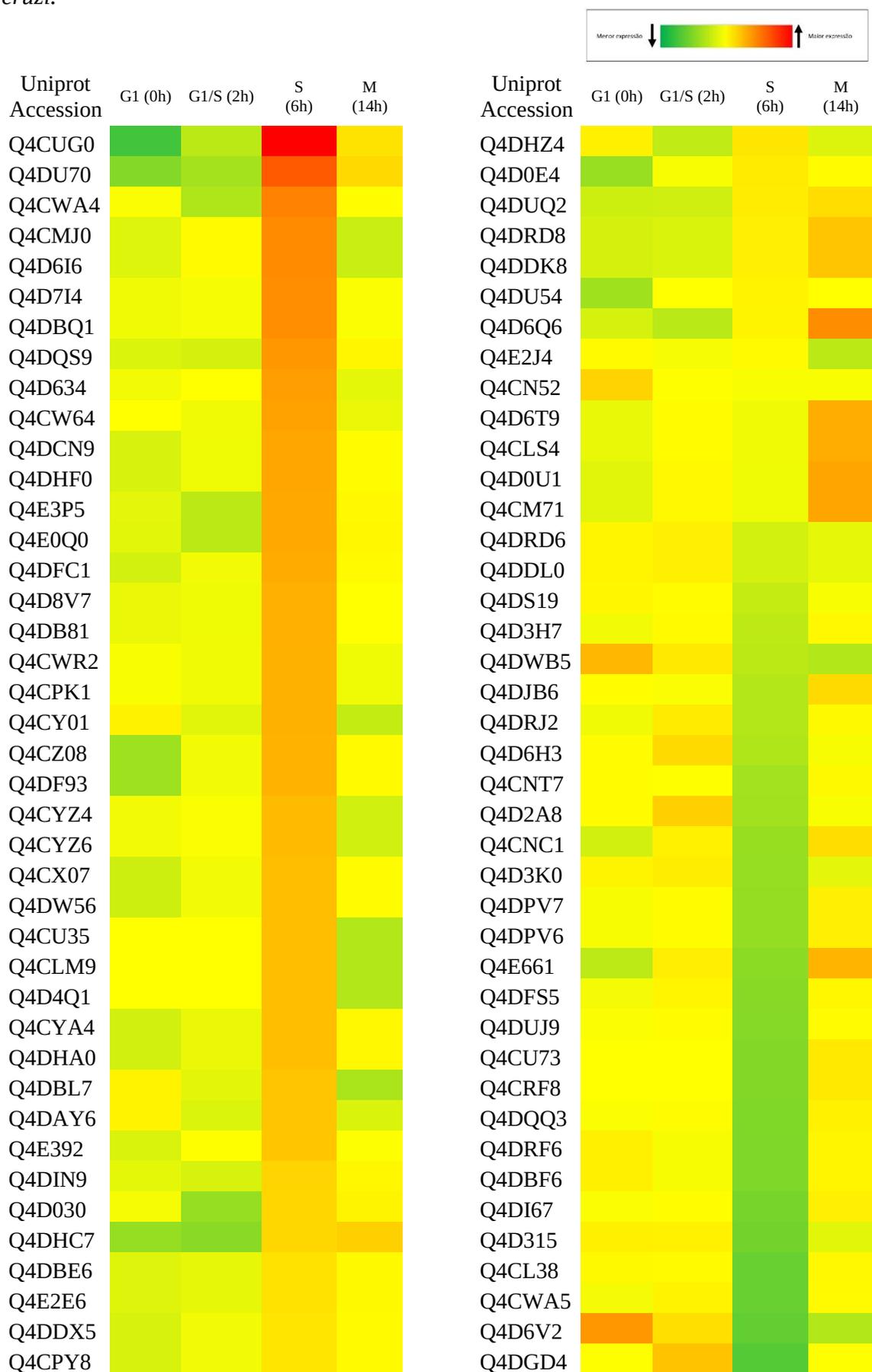








**Anexo II** - Heatmap das proteínas fosforiladas reguladas durante a divisão celular do *T. cruzi*.



Uniprot Accession	G1 (0h)	G1/S (2h)	S (6h)	M (14h)
Q4D436	Yellow	Orange	Green	Yellow
Q4E1M8	Yellow	Orange	Green	Yellow
Q4CN49	Orange	Yellow	Green	Yellow
Q4DNH6	Orange	Yellow	Green	Yellow
Q4DDG3	Yellow	Yellow	Dark Green	Yellow
Q4D8U0	Yellow	Yellow	Dark Green	Yellow



**CAPÍTULO IV**  
**ANÁLISE PROTEÔMICA DE**  
***PHYTOMONAS SERPENS***

*O manuscrito que compõem este capítulo da tese encontra-se submetido em revista científica que exige ineditismo. Imediatamente após sua publicação a análise proteômica de *Phytomonas serpens* será disponibilizada.*

**CONSIDERAÇÕES  
FINAIS**

O principal objeto de estudo desta tese, o *T. cruzi*, é o agente etiológico da doença de Chagas, a qual ainda acomete milhares de pessoas, principalmente as populações pobres que vivem na América Latina, onde ainda figura como um importante problema de saúde pública. Apesar de políticas de vigilância epidemiológica terem possibilitado uma importante diminuição da transmissão vetorial nas últimas décadas, esta não está completamente controlada, visto que não são raras as notificações da presença de insetos infectados, que ocorrem até em grandes cidades como Brasília. Somente no ano de 2016, últimos dados disponíveis, foram notificados 335 casos de doença de Chagas em fase aguda (dados do sistema de informação e agravos de notificação do Ministério da Saúde do Brasil) frente a 39 casos notificados em 2015. Ademais, vias de contágio alternativas como a alimentar e a transfusão sanguíneas também tem se tornado cada vez mais importantes.

Apesar de terem se passado mais de 100 anos da descrição da doença, bem como da descoberta do seu agente etiológico por Carlos Chagas, poucos recursos terapêuticos estão disponíveis. A indisponibilidade de vacinas, a ausência de sinais clínicos durante a fase indeterminada, e de medicamentos mais efetivos e bem toleradas dificultam a redução do número de novos casos e de mortes em decorrência da infecção.

Dado este panorama, este trabalho propôs, em diferentes frentes, o uso da proteômica como uma ferramenta no estudo molecular do *T. cruzi*. No que tange o subproteoma nuclear do *T. cruzi*, apresentamos proteínas não encontradas no estudo proteômico global bem como muitas proteínas ainda não caracterizadas que possivelmente desempenham funções relevantes naquela organela. Em outra frente, a análise quantitativa do proteoma e do fosfoproteoma durante diferentes etapas do ciclo celular, nos forneceu dados sobre proteínas que, possivelmente, participam da divisão celular deste parasito.

Os dados advindos da subproteômica da fração nuclear e da proteômica comparativa do *T. cruzi* durante a divisão celular, de forma conjunta, poderão contribuir para o entendimento de diferentes processos celulares, como a mitose fechada, a segregação dos cromossomos, síntese de DNA, controle da divisão celular, sendo que alguns destes processos ainda carecem de maior elucidação.

Apesar dos estudos proteômicos em questão terem abordado a forma de vida epimastigota, presente no inseto vetor, acreditamos que os dados obtidos também serão de grande importância para o estudo da organização nuclear e divisão nuclear da forma replicativa amastigota, presente em células do hospedeiro.

Ademais, proteínas que atuam de forma específica na divisão celular ou de processos nucleares são elegíveis como bons alvos terapêuticos no desenvolvimento de novas drogas. Nesse sentido, uma atenção maior deve ser dada as proteínas não caracterizadas ou próprias dos cinetoplastídeos, encontradas no proteoma nuclear ou reguladas durante a divisão celular.

Em outra frente de trabalho, mas objetivando o estudo de uma alternativa terapêutica para doença de Chagas, nós estudamos o proteoma de *P. serpens*, que apesar de ser um parasito de plantas, tem ganhado importância médica pela sua capacidade de promover imunidade contra *T. cruzi* em modelos laboratoriais.

O proteoma de *P. serpens* nos traz um arsenal de proteínas que podem ser as responsáveis pela reatividade imunológica cruzada contra *T. cruzi*. Além disso, mostra que sequências de *T. cruzi* contribuíram com um número maior de proteínas identificadas que sequências do gênero *Leishmania*, mesmo que alguns estudos filogenéticos tenham mostrado uma proximidade maior entre estes últimos e *P. serpens*.

Em breve, pretendemos aplicar a abordagem proteômica ao estudo das diferenças entre o proteoma de formas amastigotas não replicativas de cultivos axênicos e amastigotas em replicação, cujos dados se somarão ao entendimento da divisão celular do *T. cruzi*. Finalmente, dentre as linhas de pesquisa desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa, estão já em andamento estudos funcionais que procuram evidenciar o papel das proteínas centrinas, algumas delas encontradas por neste trabalho no proteoma nuclear de *T. cruzi* e *P. serpens*.