



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

**Análise proteômica de coração de *Gallus gallus*
com seqüências de minicírculos de kDNA de
Trypanosoma cruzi integradas no genoma**

Fábio de Araujo Schwartz Coelho

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília-DF

Novembro de 2007

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades que Ele colocou em minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Valle de Sousa pela oportunidade concedida, pela confiança, incentivo e pelo conhecimento transmitido.

Agradeço aos meus pais, Geraldo e Edna, que com muito amor me incentivaram em cada passo durante todos os momentos da minha vida, e ao meu irmão Vítor.

À minha família, minhas queridas avós Idília e Ione, meus tios e primos, cuja convivência fortaleceram minha personalidade.

Agradeço à Carol, minha namorada, amiga e eterna companheira, que com muito apoio e incentivo permitiu que eu concluísse este trabalho. À minha sogra, Antônia Maria, e a toda sua família, por acreditarem em mim e me incentivarem sem nunca cobrar algo em troca.

À professora Dr^a. Consuelo Rodrigues Lima, pelas conversas esclarecedoras e pela amizade sempre presente.

Aos professores Dr. Carlos André Ornelas Ricart, Dr. Ricardo Bastos Cunha, Msc. Pedro Portugal Zanotta, Dr^a. Mariana Sousa Castro, Dr. Wagner Fontes por contribuírem na minha formação profissional e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento especial à Flávia Melissa, pelas orientações técnicas fornecidas com paciência e pela amizade.

Agradeço ao Dr. Sebastián Charneau pelo grande auxílio e presteza para solucionar todas as minhas dúvidas.

Ao professor Antonio Raimundo Lima Cruz Teixeira do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília pela confiança no CBSP e pelo apoio para a produção deste trabalho.

Aos colegas e amigos do CBSP: Adriana, Alexandre, Aline Andrade, Aline Guimarães, Ana Carolina, Anna, Camila, Carlos Garcia, Flávia Melissa, Higor,

Jaime, Karina, Elaine, Lanuse, Leandro, Liz, Luciano, Luiz Felipe, Pollyana, Pedro Ivo, Rafael, Renan e Liudy por todos esses anos de convivência, pelos momentos divertidos, pelas discussões científicas e pela amizade.

Aos meus queridos amigos Andrea Cajueiro, João Alexandre, Leandro Rocha, Paulo Borin, Patrícia, Antônio Cruz, Diego, Thaís, Luiza, Luiz Fernando e tantos outros que há anos se tornaram também a minha família, pelo carinho, estímulo e todos os momentos maravilhosos.

A todos os meus amigos, que mesmo não citando nomes sabem sua importância e que eles estão guardados no meu coração, o meu muito obrigado pelos momentos de diversão, conversas e apoio.

Aos funcionários Nuno Manuel Domingues e Antônio Rufino por serem muito prestativos e pelo apoio técnico.

Agradeço também à CAPES, ao CNPq e ao NIH pelo apoio financeiro e à Universidade de Brasília que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos durante a fase de execução deste trabalho, os meus profundos e sinceros agradecimentos.

Índice

1	Introdução	1
1.1	A doença de chagas	1
1.1.1	Tratamentos disponíveis	2
1.1.2	Transmissão e ciclo de vida.....	4
1.1.3	Fases da doença	5
1.1.4	Patogenia da fase crônica	9
1.1.5	Integração de kDNA.....	15
1.1.6	Integração de kDNA em galinhas	17
1.2	Genômica.....	19
1.3	Transcrição em tripanosomatídeos	20
1.4	Proteômica	22
1.4.1	Eletroforese Bidimensional	23
1.4.2	Espectrometria de massa	24
2	Objetivos	27
2.1	Objetivos específicos	Error! Bookmark not defined.
3	Material e métodos.....	28
3.1	Fluxograma	28
3.2	Extração e quantificação de proteínas do tecido	29
3.3	Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)	31
3.4	Eletroforese bidimensional (2D-PAGE).....	31
3.4.1	Coloração dos géis com nitrato de prata	32
3.4.2	Análise de Imagens	33
3.4.3	Secagem de géis	33
3.5	Digestão de proteínas em gel para MALDI-TOF (MS)	33
3.6	Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF	34
4	Resultados e discussão	35
4.1	Fontes de material	35
4.2	Otimização da extração	36
4.3	Eletroforese Bidimensional	38
4.3.1	Dificuldades da técnica	38

4.3.2	Resultados dos géis.....	41
4.3.3	Resultados da análise de imagens	41
4.4	Espectrometria de massa	46
5	Considerações finais.....	52
6	Bibliografia	54

Índice de figuras e tabelas

Figura 1	2
Figura 2	4
Figura 3	7
Figura 4	15
Figura 5	18
Figura 6	28
Figura 7	30
Figura 8	35
Figura 9	37
Figura 10	39
Figura 11	40
Figura 12	42
Figura 13	43
Figura 14	44
Figura 15	45
Figura 16	47
Figura 17	49
Figura 18	49
Figura 19	50
Figura 20	51
Tabela 1	32
Tabela 2	50

Abreviaturas

2DE	eletroforese bidimensional
CCC	cardiomiopatia chagásica crônica
ddp	diferença de potencial elétrico
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DNA.....	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
ICAT	isotope coded affinity tagging
IEF	focalização isoeétrica (isoelectric focusing)
IL	interleucina
INF	interferon- γ
IPG	gradiente imobilizado de pH (Immobilized pH gradient)
LC-MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LIT	liver infusion tryptose
MALDI-TOF MS	espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz (matrix assisted laser desorption ionization time of fly mass spectrometry)
MASP	mannose-binding lectin-associated serine proteases
mRNA.....	RNA mensageiro
MTA	metiltioadenosina
MM	massa molecular
m/z	razão massa carga
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PDI	proteína dissulfito isomerase
PGK.....	fosfoglicerato quinase
pI	ponto isoeétrico
PMF.....	impressão digital do mapa peptídico (<i>peptide mass fingerprinting</i>)

PMSF fluoreto de fenil metil sulfonil (phenyl methyl sulphonyl fluoride)

PMSR peptídeo metionina sulfóxido redutase

RNA..... ácido ribonucléico

rpm..... rotações por minuto

SBF soro fetal bovino

SDS..... dodecil sulfato de sódio

SL..... seqüência líder

TFA ácido trifluoacético

TLCK..... N α -p-tosil-L lisina cloro metil cetona (N α -p-tosyl-L-lisine chloro methyl ketone)

TNF fator de necrose tumoral

TPCK..... N-tosil-L-fenil alanina clorometil cetona (N-tosyl-L-phenyl alanine chloromethyl ketone)

Tris tris-hidroximetilaminoetano

V voltagem

Vh..... volts-hora

Resumo

Análises proteômicas foram realizadas a fim de se verificar a ocorrência de modificações na expressão protéica em corações de *Gallus gallus* (galo doméstico) submetidos a integração em seu genoma de DNA cinetoplástico (kDNA) de *Trypanosoma cruzi*.

Foram utilizados galos, que são aves naturalmente refratárias à infecção por células de *T. cruzi*, contendo o kDNA integrado em seu genoma através da inoculação do parasito nos estágios iniciais do desenvolvimento. O controle negativo foram aves sem nenhum contato com o protozoário.

Extratos de tecidos de corações nessas duas condições (kDNA positivo e kDNA negativo) foram comparados por eletroforese bidimensional em busca de proteínas condição-específicas ou diferencialmente expressas. Foram selecionadas quatro manchas para identificação, sendo duas exclusivas da amostra de galo com integração positiva e duas presentes em ambas condições, como controle positivo da técnica.

Através da impressão digital do mapa peptídico (PMF), foram identificadas três manchas: proteína C-reativa, cadeia leve 3 de miosina e actina cardíaca. A primeira desempenha um importante papel no sistema imune hospedeiro, sendo, inclusive, relacionada com inflamação e cardiomiopatias. A quarta mancha protéica não rendeu identificação conclusiva.

Não foi possível ainda relacionar diretamente a diferença de expressão protéica com a integração do kDNA no genoma hospedeiro. A continuidade deste estudo com ampliação do grupo amostral e utilização de seqüenciamento por espectrometria de massa, permitirá identificar as demais proteínas diferencialmente expressas, assim como mapear quaisquer modificações em suas seqüências relacionadas a proteínas quiméricas.

Abstract

Proteomic analyses were carried out in order to verify the occurrence of modifications in the protein expression in hearts of *Gallus gallus* (domestic rooster), submitted to genomic integration of kinetoplast DNA (kDNA) of *Trypanosoma cruzi*.

The present work utilized roosters, which are refractory to the infection by *T. cruzi* cells, containing the kDNA integrated in their genome through the inoculation of the parasite early in the embryonic developmental process. Negative control birds were utilized without any contact with the protozoan.

Heart tissue extracts in those two conditions (kDNA positive and kDNA negative) were compared by two-dimensional electrophoresis for investigation of the existence of condition-specific or differentially expressed proteins. Two exclusive spots in the kDNA positive rooster sample were selected for identification, as well as two spots present in both conditions, which were taken as positive control for the validation of the technique.

Through the use of peptide mass fingerprinting (PMF), three spots were identified: c-reactive protein, slow skeletal ventricular myosin alkali light chain 3 and cardiac actin. The first one performs an important role in the host immune system, being related with inflammation and cardiomyopathies. The fourth protein spot did not yield conclusive identification.

It was not possible yet to directly relate the difference of protein expression with the integration of the kDNA into the host genome. The continuity of this work by expanding the sample group and utilization of mass spectrometry sequencing techniques will permit us to identify the further differentially expressed proteins, as well as to map any modifications in its sequences related to chimeric proteins.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é a doença parasitária endêmica mais letal do ocidente. Segundo a Organização Mundial de Saúde, ocorre apenas nas Américas e é endêmica em 18 países, afetando 18 milhões de pessoas. Cerca de 25% da população da América Latina se encontra em áreas de risco (WHO, 2002). As complicações mais severas em decorrência da doença afetam aproximadamente 30% dos pacientes e causam cerca de 50 a 100 mil mortes por ano (Kirchhoff, 2004; Teixeira, A.R.L. *et al.* 2006). Até o momento, a tripanossomíase americana não apresenta tratamento quimioterápico efetivo e nem vacina imunoprolifática.

Tripanossomas são organismos eucariotos, membros da classe Kinetoplastidea e da família Trypanosomatidae. O *Trypanosoma cruzi* é um parasita de mamíferos causador da doença de Chagas e transmitido por insetos triatomíneos hematófagos (ordem Hemiptera, família Reduviidae) como o popularmente conhecido “barbeiro” (*Triatoma infestans*), o vetor mais importante do parasito, e o *Rhodnius prolixus*, segundo vetor mais disseminado na América do Sul e Central (figura 1). Foram identificadas 40 espécies de triatomíneos com o *T. cruzi* no trato digestivo, e, portanto, são potenciais transmissores do parasita (Carcavallo, R.U. 1999). A transmissão também pode ocorrer pela via congênita, por transfusão de sangue, transplante de órgãos, comida contaminada ou por acidentes em laboratórios (WHO, 2007).

O *T. cruzi* foi identificado em estudos histológicos de corações apresentando lesões típicas da doença de chagas em ameríndios mumificados, que habitavam a América cerca de 11 mil anos atrás (Rothhammer, F. *et al.* 1985, Fornaciari *et al.* 1992). Estudos de produtos de PCR que hibridizaram com marcadores específicos de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *T. cruzi* mostram que a presença da doença de chagas na população ameríndia de Atacama chegava a 41%, desde 9 mil anos atrás até a chegada dos espanhóis à 500 anos (Aufderheide *et al.* 2004). Portanto, a doença de chagas está presente no meio

ambiente, em proximidade com a população humana da América, desde muito antes da chegada dos Espanhóis e Portugueses (Teixeira, A.R.L. *et al.* 2006).

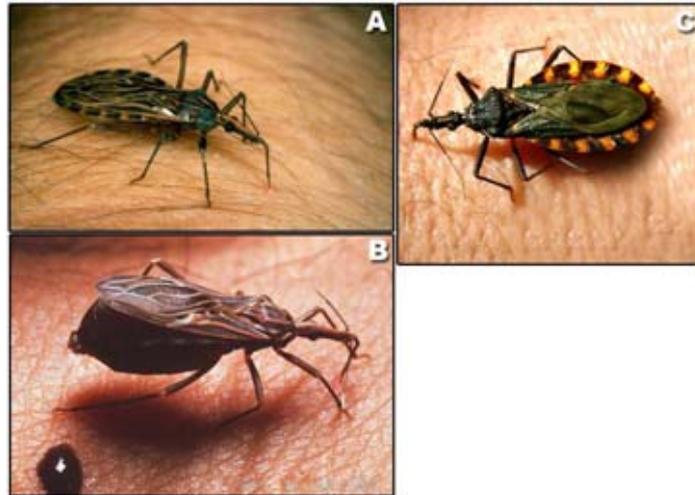


Figura 1. Exemplos de insetos triatomíneos. **A e B:** *Rhodnius prolixus*. **C:** *Triatoma infestans*. **Fonte:** www.sciencephoto.com

A Doença de Chagas é inicialmente diagnosticada de acordo com o histórico do paciente e pelas manifestações clínicas da doença. O diagnóstico é confirmado pela detecção do parasita no sangue na fase aguda da doença e pela detecção de anticorpos na fase crônica da doença. Os tratamentos disponíveis para as infecções agudas são de alta toxicidade e de variável eficácia sendo que, nas formas crônicas da doença, poucas opções terapêuticas podem ser oferecidas aos pacientes.

1.1.1 Tratamentos disponíveis

O tratamento da doença de Chagas pressupõe duas ações distintas. Uma terapêutica, contra o parasita, visando eliminá-lo na fase aguda e uma sintomática, para atenuação dos sintomas, através do uso de cardiotônicos e antiarrítmicos para o coração ou através de cirurgias corretivas do esôfago e do cólon.

Com foco na eliminação do parasita, existem três medicamentos comerciais: o *nifurtimox*, o *benznidazol* e o *alopurinol*. Eles devem ser prescritos para tratar pacientes que se encontram na fase aguda da doença, qualquer que tenha sido a forma de transmissão, por um período máximo de 60 dias de tratamento contínuo. Curas, até mesmo parasitológicas, podem ocorrer.

O *nifurtimox* é um 5-nitrofurano (N-(3-methyl-1,1-dioxo-1,4-thiazinan-4-yl)-1-(5-nitro-2-furyl)methanimine), não comercializado no Brasil, que devido aos efeitos colaterais neurológicos e gastrointestinais tem sido substituído pelo tratamento com *benznidazol*. (Coura, J. R., *et al.* 2002).

O *benznidazol* (N-benzyl-2-(2-nitroimidazol-1-yl)acetamide) é um nitrocomposto, derivado do nitroimidazol, empregado no tratamento quimioterápico da doença de Chagas no Brasil, onde atualmente é o único medicamento comercializado para tal fim. Embora o mecanismo de ação ainda não tenha sido completamente elucidado, sabe-se que a ação biológica dos nitrocompostos é dependente do processo de redução do grupo nitro com conseqüente formação de radical nitro ânion e de intermediários tóxicos ao *T. cruzi*. A falta da enzima catalase no parasita compromete a capacidade de eliminação desses radicais ao metabolizar o *benznidazol* (Docampo, R., 1984).

A presença de um repertório completo de enzimas antioxidantes nos mamíferos permite-lhes lidar com o medicamento mais efetivamente, embora existam efeitos colaterais incluindo dores abdominais, diarréia, náuseas e vômitos.

O *benznidazol* exerce vários efeitos na resposta imune do hospedeiro ao *T. cruzi*, como o aumento da fagocitose associada a macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias (Murta, S. M., 1999), a expansão seletiva da ação efetora e de memória por linfócitos T CD8+ (Olivieri, B. P., *et al.* 2002) e o decréscimo do nível de selectina P e molécula de adesão vascular 1 (VCAM1) (Laucella, S. A., *et al.* 1999). Em adição, fatores da resposta imune, incluindo a interleucina 12 (Michailowsky, V., *et al.* 1998) e o interferon γ (Romanha, A. J., *et al.* 2002), são importantes para a máxima eficácia da terapia com *benznidazol* durante a infecção.

A eliminação do *T. cruzi* durante a fase aguda através da ação de medicamentos não elimina a autoimunidade induzida pelo parasita, que pode ser restaurada com uma re-infecção ou pode persistir em alguns casos durante a fase crônica da doença (Hyland, K. V., *et al.* 2007).

1.1.2 Transmissão e ciclo de vida

O mecanismo de transmissão do *T. cruzi* para os humanos ocorre através do contato da forma flagelada tripomastigota metacíclico do parasita (figura 2-A) com células fagocitárias no local de entrada no corpo. Ocorre a fagocitose do flagelado e, apesar da destruição de alguns, vários dos parasitas internalizados conseguem sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Portanto, o sucesso da infecção depende da habilidade dos tripomastigotas em escapar dos fagolisossomos e permanecerem no citoplasma celular (Teixeira, A.R.L *et al.* 2006).

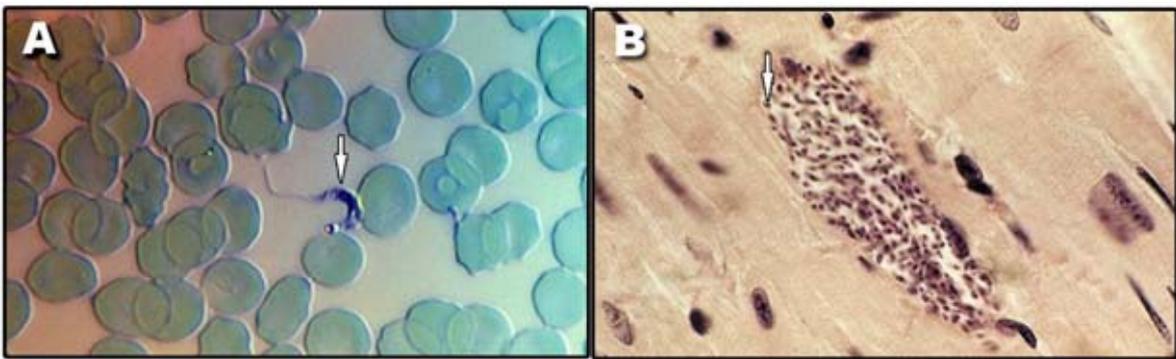


Figura 2. Estágios da forma de vida de *T. cruzi*. **A:** forma tripomastigota flagelada próxima à células sanguíneas. **B:** ninho do parasito na forma amastigota no tecido muscular. **Fonte:** www.sciencephoto.com

Em princípio o *T. cruzi* precisa sobreviver ao mecanismo de defesa dos fagócitos, baseado em oxidases e compostos nitrogenados intermediários. Um fator de virulência baseado em um fosfolipoglicano específico está relacionado com a resistência dos tripomastigotas ao sistema imune inato (Teixeira, A.R.L *et al.* 2006). Em seguida, no ambiente ácido do fagolisossomo ocorre produção de proteína semelhante à porina, que promove a saída do parasito para o citoplasma da célula fagocítica (Andrews 2002).

No citoplasma, a forma tripomastigota diferencia-se em amastigotas (figura 2-B), com forma esférica. Esses têm a capacidade de replicar, podendo dobrar sua população em apenas 15 horas, com intervalo replicativo de 18 horas. O ciclo intracelular completo dura quatro dias (Engel, *et al.* 1985).

Em seguida, os amastigotas intracelulares se diferenciam novamente na forma flagelada tripomastigota, que são liberados para o sangue após o rompimento da membrana celular e assim podem atingir outros tipos de células do hospedeiro, reiniciando o ciclo de infecção do parasita (Garcia e De Azambuja, 2000). A forma intracelular amastigota pode permanecer no corpo do hospedeiro por décadas, escondida em células musculares sem causar dano significativo ao tecido (Teixeira, A.R.L. 2007).

A forma flagelada tripomastigota presente no sangue do hospedeiro pode dar início a um novo ciclo biológico quando ocorrer a ingestão do sangue pelo inseto vetor. Neste caso, o parasita ingerido vai para o estômago do inseto triatomíneo onde as formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas poucas horas após sua ingestão. Ocorre uma segunda diferenciação do parasita quando os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos no trato digestivo do inseto. Esses são liberados através das fezes e urina do vetor e podem atingir o hospedeiro vertebrado por uma ferida na pele ou através da mucosa (Garcia e De Azambuja, 2000).

1.1.3 Fases da doença

A presença do parasita no sangue e no interior das células está associada a várias reações imunológicas e imunopatológicas no hospedeiro. Essas reações da doença de Chagas se apresentam em duas fases sintomáticas (aguda e crônica) e uma fase assintomática (indeterminada).

a) Fase Aguda

Na fase aguda a infecção ocorre pela invasão de células fagocíticas no local de entrada dos parasitas, que se multiplicam e disseminam para os tecidos e órgãos. Essa fase geralmente tem duração de 8 semanas e pode apresentar características clínicas, como o sinal de Romaña ou chagoma de inoculação (lesão cutânea endurecida, típica de hipersensibilidade tardia), miocardite e sinais gerais de processo inflamatório como febre pouco elevada, cefaléia, mal-estar geral, hipertrofia de linfonodos e outros. A fase aguda é responsável pela morte de menos de 10% dos casos sintomáticos, seja por insuficiência cardíaca decorrente de miocardite aguda ou por meningoencefalite aguda, esta última se manifestando raramente (WHO 2002).

b) Fase indeterminada

A fase indeterminada ocorre por vários anos ou décadas, podendo apresentar pequenos sinais inflamatórios no coração (Mady et al. 1982) e lise celular e degeneração esporádica em tecidos musculares esqueléticos (Sicca et al. 1995). Portanto, os sinais inflamatórios são semelhantes aos da fase crônica, porém em menor grau de intensidade. Contudo, essa fase é assintomática para a maioria dos indivíduos infectados, que permanecem soropositivos com a presença de parasitas na forma amastigota em estado latente no interior das células (Souza, 2000).

c) Fase crônica

A fase crônica afeta órgãos internos, principalmente o coração, o esôfago, o cólon e o sistema nervoso periférico, através de lesão e destruição celular e com a presença característica de infiltração de células mononucleares do sistema imune. É característica da fase crônica a patologia conhecida como Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC). Geralmente, se manifesta décadas após a infecção inicial, tendo sido estimada em 28 ± 7 anos (Prata 2001).

Um estudo com populações de pacientes com doença de chagas encontrou uma taxa de mortalidade de aproximadamente 57%, sendo que 58% desses falecem por insuficiência cardíaca, 37% por morte súbita e o restante associado a complicações digestivas da doença (Prata, A. 1999). A CCC provoca a morte dos pacientes geralmente em 5 anos após os primeiros sintomas de problemas no coração (Teixeira, A.R.L. *et al.* 2006).

A CCC normalmente afeta indivíduos entre 30 e 45 anos de idade. O coração aumenta de tamanho, ocupando a base da caixa torácica, sintoma conhecido como hipertrofia cardíaca. As cavidades internas do coração ficam dilatadas e as paredes podem ficar mais finas.

Estudos histológicos revelam que os casos de morte de pacientes por cardiomiopatia relacionam-se com inflamações provocadas por infiltrados de células mononucleares do sistema imune (figura 3). No local da inflamação, são encontrados linfócitos e macrófagos entre as fibras musculares e podem estar presentes também células plasmáticas, neutrófilos e eosinófilos (Teixeira, A.R.L. *et al.* 2006).

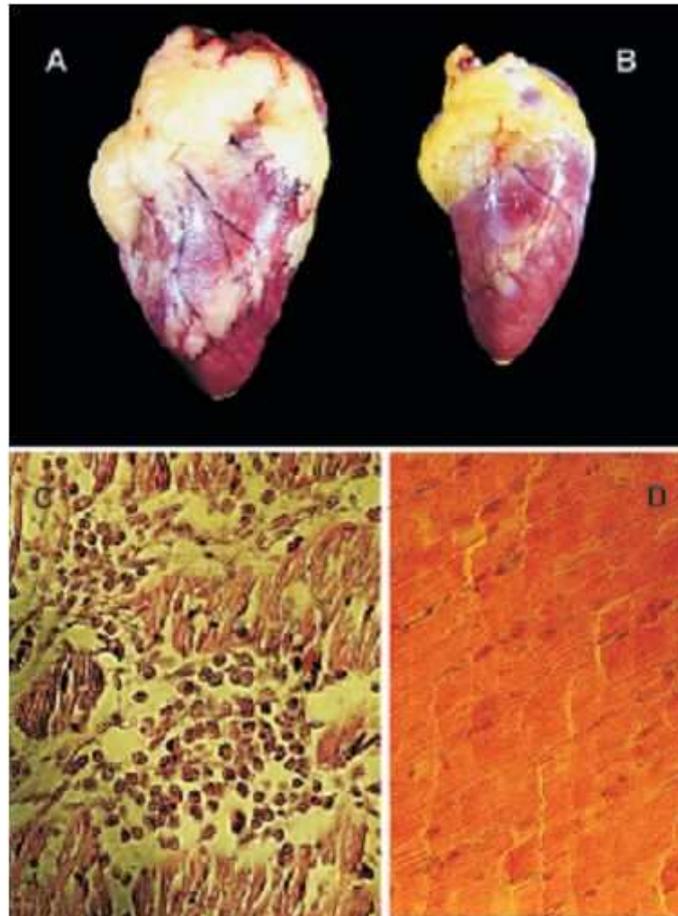


Figura 3. Cardiopatia em galinhas de seis meses de idade, proveniente da presença de integração de kDNA no genoma. **A:** coração com cardiomegalia. **B:** controle negativo de galinha sem integração de kDNA. **C:** miocardite e extensiva lise celular provocada por células imunes mononucleares infiltradas. H-E 200x. **D:** controle do tecido de galinhas saudáveis. **Fonte:** Teixeira, A.R.L. *et al.* 2006.

Durante o curso da doença de Chagas, os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ que reconhecem os antígenos de *T. cruzi* se expandem e diferenciam-se em células T efetoras ativadas de memória. Após a diferenciação, as células T efetoras penetram no tecido cardíaco e passam a mediar a inflamação e as lesões ao tecido (DosReis G. A., *et al.* 2005). Há predominância de células T $CD8^+$ em relação à $CD4^+$ na proporção de 2:1 no infiltrado cardíaco (Tostes J. S., *et al.* 1994). Nos locais de lesão, os linfócitos T $CD8^+$ se acumulam ao redor de células, inclusive as livre de parasitas, e induzem a lise celular, criando regiões com

intensa destruição celular e conseqüente substituição dessas células por tecido fibroso (Teixeira, A.R.L. *et al.* 2006).

As lesões provocadas pelo infiltrado de células mononucleares tendem a provocar episódios de insuficiência cardíaca e, nesse sentido, estudos identificaram a presença de *granzyme A* no tecido muscular de pacientes com CCC, que são proteínas relacionadas à via da apoptose mediada por linfócitos T CD8+. Identificaram também a presença de caspase 8, proteína associada à morte celular induzida por fator de necrose tumoral (TNF) (P.C., Teixeira *et al.* 2006).

Além do episódio da infiltração, o sistema imune passa por mudanças no padrão de expressão de citocinas, com a produção intensificada, por células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC), de Th1 e a supressão de Th2 (Cunha-Neto, E., *et al.* 1998). Há também produção aumentada de interferon gama (INF- γ) em pacientes com CCC, fato atribuído à diminuição da expressão de interleucina 10 (IL-10) (Gomes J. A., *et al.* 2003). Todos os pacientes infectados por *T. cruzi*, inclusive os assintomáticos, apresentam níveis plasmáticos de TNF- α elevados (Ferreira R., *et al.* 2003). O perfil pró-inflamatório descrito e a superprodução de Th1 foram relacionados ao fato dos glico-conjugados de mucina persistentes na fase crônica induzirem a produção de IL-12 (Camargo M. M., 1997).

Em adição às proteínas associadas ao sistema imune, outras proteínas normalmente não encontradas em corações sadios podem ser identificadas em pacientes com CCC. A isoforma MYL4 de miosina, encontrada normalmente no músculo atrial, foi encontrada no tecido ventricular de pacientes com hipertrofia cardíaca (Teixeira, P. C. *et al.* 2006). Esse fato pode ser atribuído à reversão dos miócitos a um estado embriogênico de transcrição gênica (Schwartz, K. *et al.* 1992). A vimentina, expressa em grande quantidade em fibroblastos, também foi identificada, corroborando o intenso processo fibrótico visualizado em pacientes com CCC (Rossi, M. A. 2001). É possível identificar também a metaloproteinase 13 (MMP13), também chamada colagenase 3, que é expressa por fibroblastos e outros tipos celulares. A MMP13 degrada o colágeno I, II e III, a fibronectina, laminina e tenascina (Creemers, E. E., *et al.* 2001). Outra MMP, a MMP9 (Ducharme A. *et al.* 2000), foi descrita como responsável por uma remodelagem

cardíaca. Portanto, foi sugerido que a MMP13 pode também estar envolvida na intensa remodelagem que ocorre no miocárdio de pacientes com CCC.

Em contrapartida, um número significativo de *heat shock proteins* (HSP) foram encontradas no miocárdio de pacientes com CCC. Identificou-se pelo menos 13 tipos de HSP, principalmente HSP60 e HSP70, esta última presente com 12 isoformas (Teixeira, P. C. *et al.* 2006). A síntese de HSPs protege a homeostase celular depois da exposição a fatores estressantes e potencialmente deletérios (Delogu G., *et al.* 2002). O mesmo estudo identificou proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, como a peroxiredoxina e superóxido dismutases, com funções antioxidantes. Pesquisas utilizando modelo animal revelaram que o comprometimento das vias antioxidantes contribui para a ocorrência de remodelação do miocárdio e insuficiência cardíaca.

Apesar de todos os sintomas mostrados, vários trabalhos relatam que a presença de células parasitadas por *T. cruzi* no coração é detectável em apenas 10 a 20% dos pacientes que sofrem de CCC, através de estudos histológicos e de detecção da presença de nDNA de *T. cruzi* nos tecidos lesionados (Braga *et al.* 2000; Lauria Pires *et al.* 2000).

Portanto, a fase crônica nem sempre pode ser explicada exclusivamente pela ação direta dos parasitas nos tecidos e órgãos afetados. Há uma falta de correlação entre a presença dos parasitas e as lesões inflamatórias observadas. (Teixeira, A.R.L. *et al.* 2006).

1.1.4 Patogenia da fase crônica

Diante do exposto, vários mecanismos são propostos para a patogenicidade da fase crônica da doença, sendo matéria de constante debate no meio científico (Levin 1996, Kierszenbaum 1999). A origem das lesões da doença de chagas ainda não foi solucionada e existem, pelo menos, seis mecanismos propostos para explicar a cardiopatia da fase crônica: (i) resposta imunológica contra parasitas ou antígenos persistentes; (ii) autoimunidade induzida por *T. cruzi*; (iii) espasmo microvascular; (iv) isquemia; (v) eosinofilia crônica; (vi) toxicidade direta do parasita (Tanowitz, H. B. *et al.* 1992; Kierszenbaum, F. 1999; Kierszenbaum, F. 1996). As duas primeiras hipóteses são mais aceitas e discutidas no meio científico.

a) Resposta imunológica contra parasitas ou antígenos persistentes

A primeira hipótese que surgiu para explicar a patogenia da doença de Chagas deriva da presença de *T. cruzi* nos tecidos, que foi precisamente descrito na fase aguda da doença. Esse fato gerou a idéia de uma infecção microbiana, em que a ruptura dos parasitas e a degeneração celular provocariam a inflamação da fase crônica. Contudo, a maior dificuldade em estabelecer uma relação direta entre a presença de *T. cruzi* e a inflamação crônica é a ausência de parasitas vivos nos tecidos afetados em aproximadamente 80% dos casos.

Estudos imunohistoquímicos para identificação indireta de parasitas através de antígenos específicos e também o uso da técnica de PCR *in situ*, com uso de marcadores genéticos para detecção de nDNA de *T. cruzi*, confirmaram a persistência deles na maior parte dos casos onde havia inflamação (Lane J. E., *et al.* 1997; Zhang L., *et al.* 1999; Braga *et al.* 2000). No entanto, é preciso ressaltar que essas técnicas não permitem distinguir entre parasitas vivos e antígenos ou DNA residuais de parasitas. Um trabalho envolvendo uma linhagem de *T. cruzi* transgênico para produção de beta-galactosidase demonstrou que parasitas vivos podem ser detectados em ratos até dez meses após a infecção inicial (Buckner, F. S. 1999). Interessante notar que o número de parasitas encontrados foi muito menor do que o estimado por outras técnicas, sugerindo que os antígenos dos parasitas destruídos podem permanecer no tecido por um longo período e provocando respostas inflamatórias.

Outra linha de evidências para explicar essa hipótese é que os parasitas podem ser localizados próximos da inflamação em alguns casos. No entanto, ainda não há evidências que correlacionem a proximidade física de antígenos de *T. cruzi* com as lesões inflamatórias (Leon, J. S., *et al.* 2003). Alguns trabalhos mostraram que inflamações são comumente encontradas em tecidos cardíacos contendo *T. cruzi* detectado por técnicas de imunohistoquímica ou PCR *in situ*. (Ben Younes-Chennoufi, A., *et al.* 1988; Zhang, L., *et al.* 1999). Por outro lado, existem relatos de que a severidade da inflamação não está associada com a presença do parasita (Palomino, S. A., *et al.* 2000). No trabalho de Castro *et al.*, 2005, foi verificado que a cardiopatia progressiva pode ser verificada em 30% dos pacientes com alta parasitemia e em 28,8% dos pacientes com parasitemia

negativa. Portanto, de acordo com o estudo, as lesões do coração não podem ser associadas com a severidade da parasitemia.

Essas observações podem ratificar tanto a hipótese da persistência do parasita como a de autoimunidade. O processo inflamatório pode ser explicado por: (i) a presença de antígenos de parasitas degradados ao redor do local; (ii) autoimunidade contra células vizinhas; (iii) isquemia do tecido com subsequente inflamação; (iv) uma ação agressiva do sistema imune em resposta à persistência crônica do parasita, entre outras hipóteses (Buckner, F. S. 1999). Em resumo, os antígenos de *T. cruzi* estão associados com a severidade da inflamação do tecido, mas não há uma forte associação entre os antígenos e a presença da inflamação, provavelmente devido às limitações técnicas ou então por razões biológicas (Leon, J. S., *et al.* 2003).

Em adição, estudos com tratamentos quimioterápicos contra *T. cruzi* indicam para uma redução da progressão da doença de Chagas em certas circunstâncias. A sua administração durante a fase aguda da doença pode reduzir a incidência da parasitose e da mortalidade em ratos (Urbina, J. A., 2001). Há relatos de que o tratamento durante a fase crônica pode reverter o desenvolvimento das lesões em animais experimentais (Segura, M. A., *et al.* 1994). Todavia, não há consenso da eficácia de tratamentos com quimioterápicos em humanos e, desse modo, é indefinida a questão de que a possível eliminação de *T. cruzi* acabaria com a doença (Lauria-Pires, L., 2000; Bahia-Oliveira, L. M., 2000; Fabbro De Suasnabar, D., 2000).

Concluindo, há fortes evidências que apóiam a hipótese de que a doença de Chagas pode ser explicada pela persistência do parasita e, em consequência, por uma ação inflamatória contra ele. Ao mesmo tempo, isso não exclui a existência da autoimunidade ou de outros mecanismos da doença (Tarleton, R. L., Zhang, L., 1999).

b) Autoimunidade induzida por *T. cruzi*

Nas últimas três décadas, a autoimunidade tem sido considerada um importante mecanismo patogênico. Com esse foco, foi questionado se a infecção por *T. cruzi* poderia induzir uma autoimunidade, uma vez que não há uma relação direta entre a presença de parasitas e as lesões encontradas em cardiopatias provocadas pela doença de Chagas.

Essa questão tem fundamentos e é bem documentada. A infecção por *T. cruzi* em humanos e em animais experimentais induz a autoimunidade humoral e celular contra antígenos do hospedeiro (Kierszenbaum, F. 1999). Na resposta imune humoral, há produção de auto-anticorpos para miosina (Leon, J. S., *et al.* 2001), receptores beta-adrenérgicos (Sterin-Borda, L., Borda, E. 2000), proteínas associadas ao citoesqueleto e microtúbulos (Kerner, N., *et al.* 1991), proteínas do sistema nervoso (Van Voorhis, W. C., *et al.* 1991) e para a proteína Cha de mamíferos (Girones, N., *et al.* 2001). Na resposta imune celular, a infecção por *T. cruzi* induz linfócitos T específicos para homogeneizados cardíacos (Ribeiro dos Santos, R., *et al.* 1992), para antígenos neuronais (Hontebeyrie-Joskowicz, M., *et al.* 1987), cardíacos (Leon, J. S., *et al.* 2001) e para o antígeno Cha (Girones, N., *et al.* 2001).

Em adição, estudos revelaram que células de coração alogênicas sofreram rejeição acelerada pelo sistema imune de coelhos sofrendo de doença de Chagas crônica, quando comparados a coelhos controle (Santos-Buch & Teixeira 1974). Outros mostraram que o *T. cruzi* compartilha alguns epitopos com as células do coração e do sistema nervoso do hospedeiro (Rizzo *et al.* 1989, Van Voorkis *et al.* 1991, Cunha-Neto *et al.* 1995). Algumas proteínas de *T. cruzi* mimetizam antígenos do hospedeiro, como a B13, cruzipain e Cha (Gironès, N. *et al.* 2005). Há ainda estudos de eletroforese bidimensional comparativa entre pacientes com cardiopatia progressiva e pacientes controle, aqueles primeiros apresentando receptores de linfócitos T, evidenciando o infiltrado celular no tecido muscular, e também algumas proteínas relacionadas à via da apoptose mediada por linfócitos T CD8+, como a *granzyme A* (Teixeira, P.C. *et al.* 2006).

Outra questão que pode ser levantada é se a autoimunidade induzida por *T. cruzi* é patogênica. Quanto a este fato, não há consenso na literatura, pois ainda não há indícios concretos que mostrem que os auto-anticorpos induzidos por *T. cruzi* causem a doença (Leon, J. S., *et al.* 2003). Muitos dos alvos desses auto-anticorpos têm expressão ubíqua, desvinculando a especificidade das lesões do coração na doença de chagas crônica. E também, vários alvos são intracelulares, dificultando a inferência de algum mecanismo que permita o acesso dos anticorpos a esses antígenos inacessíveis. Em adição, evidências de que os auto-anticorpos são mais prevalentes em pacientes com CCC do que

pacientes assintomáticos são escassos (Kierszenbaum, F. 1999). Em contrapartida, anticorpos de pacientes infectados afetaram a sinalização celular e a contração de miócitos cardíacos (Sterin-Borda, L., *et al.* 2000) e também lisaram miócitos através da sua citotoxicidade em experimentos *in vitro* (Laguens, R. P., *et al.* 1988). Outros estudos mostraram que a imunização com a proteína cruzipaína de *T. cruzi* induz auto-anticorpos contra miosina, a deposição de IgG e outras alterações cardíacas (Giordanengo, L., *et al.* 2000-1). Os autores consideraram os auto-anticorpos patogênicos devido às alterações cardíacas.

Existem algumas evidências diretas da contribuição da autoimunidade na CCC, como estudos onde esplenócitos de ratos na fase crônica da doença lisaram mioblastos isogênicos *in vitro* (Laguens, R. P., *et al.* 1989; Acosta, A. M., *et al.* 1985), ou induziram inflamações no nervo ciático (Hontebeyrie-Joskowicz, M., *et al.* 1987). A imunização de ratos com proteínas ribossomais de *T. cruzi* (Motran, C. C., 2000) ou cruzipaína provocam anormalidades em eletrocardiogramas (Giordanengo, L., *et al.* 2000-1; Giordanengo, L., *et al.* 2000-2). A imunização com cruzipaína também provoca a inflamação de miócitos da musculatura esquelética, acompanhada pela produção de auto-anticorpos contra miosina e de linfócitos T reativos. Como nenhum parasita vivo foi utilizado nos experimentos de imunização, a ocorrência de danos cardíacos e produção de células auto-reativas foi atribuída à autoimunidade por mecanismo de mimetismo molecular.

À hipótese da patogenia provocada pela autoimunidade da doença de Chagas são atribuídas duas críticas. A primeira tem relação com o uso de imunossupressores, que geralmente aliviam os sintomas de doenças autoimunes, porém neste caso aumentam a taxa de mortalidade e os sintomas da fase crônica da doença de Chagas. Como exemplos, há os casos de pacientes chagásicos submetidos a transplantes cardíacos, tratados com imunossupressores, e, também, os portadores de HIV (Leon, J. S., *et al.* 2003). Contudo, transplantes cardíacos em pacientes chagásicos geralmente ocorrem em casos graves, funcionando como último recurso. Estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia com pacientes chagásicos transplantados concluiu que não há diferença de mortalidade quando comparados com outros pacientes transplantados acometidos por cardiomiopatia idiopática ou isquêmica (Bocchi, E.

A., *et al.* 2001). Além disso, a presença dos parasitas confunde a elucidação da questão sobre a contribuição da autoimunidade para a doença, uma vez que a supressão do sistema imune do hospedeiro aumenta a proliferação dos parasitas e, conseqüentemente, intensifica a doença.

A segunda crítica afirma que a autoimunidade não contribui para a CCC pois o tratamento quimioterápico contra *T. cruzi* é, sozinho, capaz de reduzir os efeitos da doença em humanos e em animais experimentais (Leon, J. S., *et al.* 2003). No entanto, não há consenso em relação à eficácia do tratamento quimioterápico em humanos com CCC (Lauria-Pires, L., *et al.* 2000; Bahia-Oliveira, L. M., *et al.* 2000; Inglessis, I., *et al.* 1998; Parada, H., *et al.* 1997; Viotti, R., *et al.* 1994). A menos que a quimioterapia elimine completamente a enfermidade, qualquer doença residual pode ser explicada por outros mecanismos. E, os trabalhos com modelos experimentais de infecção onde os quimioterápicos são administrados imediatamente após o contato inicial, apesar de eliminarem a CCC em alguns casos (Urbina, J. A. 2001), não são relevantes para excluir a autoimunidade, uma vez que o *T. cruzi* é quem promove este mecanismo e sua eliminação precoce durante a fase aguda potencialmente impede a promoção da autoimunidade (Leon, J. S., *et al.* 2003).

Portanto, apesar da infecção por *T. cruzi* induzir auto-anticorpos e células T auto-reativas contra uma variedade de antígenos próprios do hospedeiro e existam trabalhos que apontem para o potencial patogênico da autoimunidade, não foi comprovado que a CCC é uma doença exclusivamente autoimune e nem a origem específica dessa autoimunidade.

Concluindo, não há nenhum resultado que possa descartar a existência da autoimunidade como um importante fator para o desenvolvimento da doença. Ela está presente e contribui para os sintomas observados, porém, ainda não é possível comprovar ser ela a causa primária da doença de chagas ou mesmo de outras doenças infecciosas.

Ensejando outra linha de raciocínio para explicar a origem da autoimunidade, estudos evidenciaram a ocorrência de transferência genética entre o genoma de *T. cruzi* e do hospedeiro (Teixeira, A. R. L., *et al.* 1994-a,b; Teixeira, A. R. L., *et al.* 1991; Nitz, *et al.* 2004).

1.1.5 Integração de kDNA

O DNA cinetoplástico (kDNA) de *T. cruzi* contém milhares de mini-círculos, que são polinucleotídeos dupla fita com aproximadamente 1.4 kb, e algumas dezenas de maxi-círculos de 23 kb, que juntos constituem cerca de 15% do DNA celular do *T. cruzi*, representando a maior quantidade de material genético extra-nuclear existente entre os organismos (Lukes *et al.* 2002, Liu *et al.* 2005, Junqueira *et al.* 2005). Os mini-círculos contém quatro regiões conservadas, contendo as origens de replicação, separadas por outras quatro regiões variáveis, que têm o potencial de codificar RNA guias (Avliyakov, N.K. *et al.* 2003; Ávila, H.A. *et al.* 1995).

Em células humanas, ocorre a integração de fragmentos de mini-círculos de kDNA no DNA celular, preferencialmente nos elementos LINE-1 (GenBank AF002199 to AF002203) e com maior frequência nos cromossomos 3, 6 e 11 (Teixeira, A.R.L. *et al.* 1994-a,b; Nitz *et al.* 2004). A integração ocorre naturalmente em uma infecção, como demonstrado em experimentos de hibridização com sondas de kDNA em macrófagos parasitados (Simões-Barbosa, A. *et al.* 1999). O mecanismo proposto pelo qual ocorre essa integração é o da recombinação homologa, favorecido pelas pequenas seqüências repetidas no kDNA e no DNA hospedeiro. Segundo os autores, o impacto dessa alteração genômica pelo kDNA poderia modificar a expressão de genes endógenos e também gerar produtos quiméricos dos genes combinados, ambos podendo contribuir para a Doença de Chagas crônica.

Como exemplo, foi descrita uma ORF iniciada no DNA endógeno de coelho e que se estendia através do kDNA exógeno (figura 4), podendo produzir um transcrito que codificaria uma proteína quimérica similar à r45 (GenBank AAR24603.1) (Teixeira, A. R. L., *et al.* 2006).

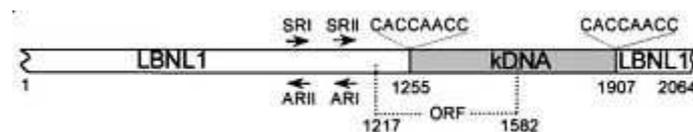


Figura 4. Região de inserção do kDNA de *T. cruzi* no genoma de coelho, demonstrando uma possível ORF iniciada na porção endógena e terminada na região exógena do DNA. Fonte: Nitz *et al.* 2004.

O genoma dos vertebrados contém trechos longos e curtos de seqüências repetitivas, denominadas elementos LINE e SINE, que têm a capacidade de transposição vertical dentro do próprio genoma (Smit *et al.* 1995, Furano *et al.* 2004). Os elementos LINE estão estimados em cerca de um milhão de cópias e são considerados como o principal fator evolutivo dos vertebrados nos últimos 150 milhões de anos (Smit *et al.* 1995, Ostertag & Kazazian 2001).

O genoma humano contém 535 cópias de LINE da família *Ta* e 415 da subfamília *Tn*. Trinta e nove elementos da família *Ta* e vinte e dois da subfamília *Tn* têm seqüência de 6,4 kb, contendo um promotor 5', duas fases abertas de leitura (ORF) e uma cauda poli-A em 3', que são características de LINE ativos (Feng *et al.* 1996). Esses 61 elementos ativos são conhecidos geradores de inserções mutagênicas por possuírem uma maquinaria que inclui transposases, DNA polimerase I e transcriptase reversa. Essa maquinaria mobiliza seqüências de DNA dentro do genoma, gerando rearranjo dos exons (Gilbert *et al.* 2002; Symer *et al.* 2002). Porém, a maioria dos LINE encontrados são incompletos, em copias menores que 0,5 kb, e próximos a regiões ricas em nucleotídeos A+T (Pavlícek *et al.* 2002).

Como a transferência horizontal de genes do kDNA tem preferência por elementos LINE, foi demonstrado que essa integração pode ser mobilizada para outras regiões do genoma hospedeiro, utilizando a maquinaria dos elementos transponíveis para isto (Simões-Barbosa *et al.* 2006). A transposição do kDNA de uma região para outra do genoma utilizando a maquinaria de LINE-1 evidencia um mecanismo intra-específico de mutação, no próprio genoma do hospedeiro, que pode afetar profundamente a expressão de genes endógenos.

Estudos com macrófagos demonstraram a ocorrência de transposição do elemento LINE-1 com origem no cromossomo 4 para o cromossomo 5, na ORF do gene p15, após três anos da infecção. Este elemento continha seqüências de mini-circulo de kDNA, além de uma seqüência do gene de β -globin do cromossomo 11, mostrando sua possível passagem por essa região. Essa transposição causou alteração do gene p15, provocando uma instabilidade no mRNA transcrito e sua conseqüente eliminação (Simões-Barbosa *et al.* 2006).

Mudanças fenotípicas similares, resultantes da mutação por kDNA/LINE-1, poderiam iniciar uma rejeição autoimune de células de pacientes com a Doença

de Chagas. Considerando que o genoma humano contém 61 elementos LINE-1 ativos, a inserção de kDNA nesses elementos poderia ocasionar múltiplas transposições para diferentes regiões do genoma, acumulando uma série de mutações ao longo de anos, que corresponderiam à fase indeterminada da doença. Essa acumulação de mutações pode ser o elemento necessário para que se inicie o processo da fase crônica da doença, através de uma resposta autoimune.

Analisando essa situação, os elementos transponíveis migram normalmente sem a seqüência do minicírculo para outras regiões do genoma, portanto, teoricamente eles próprios poderiam provocar as mutações necessárias para uma resposta autoimune. De fato, a transposição de elementos LINE em células somáticas está associada a algumas doenças genéticas (Kazazian & Moran 1998, Ostertag & Kazazian 2001). Porém, há um aumento na possibilidade de alteração do fenótipo celular com a inserção de uma seqüência exógena, presente em múltiplos locais do genoma e contendo ORFs próprias, como no caso do kDNA.

1.1.6 Integração de kDNA em galinhas

Para dissociar o evento da integração do kDNA da presença de infecções ativas de *T. cruzi*, Nitz *et al.* (2004) realizaram experimentos com galinhas.

Foi demonstrado, pelo mesmo grupo, que esses vertebrados só são susceptíveis ao *T. cruzi* durante os estágios iniciais de sua embriogênese, depois do qual eles se tornam refratários à infecção. Portanto, a integração do kDNA durante os estágios iniciais da embriogênese poderia resultar na geração de galinhas maduras com kDNA integrado ao tecido gonadal.

Com efeito, o grupo conseguiu obter animais que continham hibridização positiva, de esperma e óvulos não fertilizados, contra sondas de kDNA, através da técnica de *Southern blot*. Esses animais, a partir do décimo dia de desenvolvimento embriogênico, já não continham mais infecção ativa de *T. cruzi*, pois não era possível obter a amplificação do DNA nuclear (nDNA) do parasito (Nitz *et al.* 2004). Os pintinhos nascidos de ovos infectados com o *T. cruzi* tinham apenas as mutações de kDNA no genoma. Quando as aves kDNA+ faleciam, geralmente durante a vida adulta tardia, elas apresentavam lesões

histopatológicas musculares e no sistema nervoso periférico. Miocardite e ganglionite foram observadas com a destruição das células alvo pelo infiltrado de células mononucleares do sistema imune, produzindo lise de células do coração e de neurônios parassimpáticos na ausência do parasito.

Dando prosseguimento aos estudos, esses animais foram acasalados para dar origem a uma progênie livre do contato com *T. cruzi* no estágio inicial da embriogênese. Deste experimento, foram obtidos doze animais da progênie contendo a presença de kDNA em células sanguíneas, mesmo sem nunca terem tido contato com o parasito (Nitz *et al.* 2004).

Esses resultados demonstram que galinhas podem ter kDNA integrado em seu genoma sem a presença de uma infecção ativa, atestando o efeito da integração e a sua persistência (figura 5). Também mostraram que as mutações de kDNA estavam associadas com lesões semelhantes àsquelas da doença de Chagas humana, no coração e no sistema nervoso periférico dessas aves refratárias ao *T. cruzi*.

Sequência C43 New: 573 bp;

```

1      ATCATGCATC TCCCCGTAC ATTATTTACC TGAAAATGGG GTACGTTTGC GGGAGGTGGG
61     GTTCGATTGG GGTGGGTGTA ATATAGGGGC AGTAAGATTG TGAGTTTAAT TATGTAATAA
121    CCTATTAATA AGTTGTGTGA TTATTTGGTA GATTCGTGTT ATCAGTTTGT GTAAGTTGTG
181    TATACTGTGT ATAACCGTTA TTAAAGTTAG TTAAGTGTAT TCATTTGGGG TTTGAGTGTG
241    TAAATGGTGTG GAGGTGTAAT GGTGTGTTGG GTTATGTGTG TTATTTGATA ATAAAATTTG
301    GGGTTTGAAA ATCCTGAAGG TTTGGTTTTG GGAGGGGGCT TCTAACAGAG AGGACATCTC
361    ATAGCTGATC CTAAAGGCAG AGCTGAAAAA AAGTTGGATA CACTTACTAA GGTGCTATT
421    ATGTGATCTC AATTGAAATC TTGATTGTGG AAATTGCACC ATTGAGGAAA GGCTGAAAGC
481    TTCCGAGCCT CTGCTTTGAA AGGAAGCTCC AAAGTCTGAA AGAAAGTAAA TGAGACTCAG
541    TTCTGATAC TGACAGTTTA GGACCGCGGA GGGCCCCCCC CCCCCCCCCC GACTAGTCG
621    ACGCGTGG CC

```

Figura 5. Exemplo de integração de kDNA de *Trypanosoma cruzi* no genoma de ave nascida de ovo infectado com o protozoário. As cores revelam homologias do clone C43 com kDNA do *Trypanosoma cruzi* (em azul) e com elemento CR-1 de galinhas (em verde). (A sequência do clone c43 foi cedida pelo Dr. Clever Cardoso Gomes, LMPDC/UnB).

1.2 Genômica

O seqüenciamento de genoma de parasitas tem progredido nos últimos anos. Alguns genomas apresentam dificuldades de serem seqüenciados, ou por serem grandes ou por terem várias seqüências de DNA repetidas tornando assim um obstáculo para seqüenciar de forma compreensiva com os recursos atuais. Nesta situação, geralmente são utilizados *sequence tags* (EST) no processo de seqüenciamento, que são seqüências transcritas e expressas nas células.

Em adição, a análise genética de *T. cruzi* é uma tarefa laboriosa, pois não há condensação cromossômica durante a divisão celular. O *T. cruzi* apresenta um genoma diplóide, de aproximadamente 89 Mb, e se reproduz assexuadamente. A ausência de reprodução sexuada também dificulta a análise genética por meio de métodos convencionais.

O projeto genoma de *T. cruzi* começou oficialmente em 1994 em dois fóruns científicos independentes: CYTED – Programa Ibero-Americano para Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia financiado pelo governo espanhol, e OMS-Organização Mundial de Saúde (Levine *et al.*, 1994, Zingales *et al.*, 1997). O objetivo do projeto genoma é a obtenção da seqüência completa de nucleotídeos do genoma nuclear. Os resultados finais do genoma de *T. cruzi* foram publicados no volume 309 da revista *Science* de 2005 (El-Sayed, N. M. *et al.*, 2005).

Com base nesses estudos, definiu-se que o táxon *T. cruzi* contém dois grupos distintos, baseados em marcadores polimórficos, o *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. *T. cruzi* I está associado com o ciclo de transmissão silvestre e infecção de marsupiais (Clark, C.G. *et al.* 2003). O grupo *T. cruzi* II é formado por cinco subgrupos, denominados IIa, IIb, IIc, IId e IIe (Brisse, S. *et al.* 2000), que estão associados ao ciclo de transmissão doméstico e infecção de mamíferos (Briones, M.R.S., *et al.* 1999). E também, definiu-se que o genoma nuclear de *T. cruzi* pode ser agrupado em três classes: a) seqüências que codificam proteínas, b) seqüências que codificam RNAs e c) seqüências repetitivas, as quais não são codificadoras (Silveira, J.F. 2000).

O *T. cruzi* apresenta um genoma diplóide com cerca de 22.570 genes codificantes de proteínas. Mais de 50% do genoma do parasita consiste de seqüências repetidas, tais como os elementos retrotransponíveis e genes da

família das moléculas de superfícies, os quais incluem *trans*-sialidases, mucinas, gp63s e as proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP) (El-sayed, N. M., et al. 2005).

A recombinação homóloga tem sido bem documentada em tripanosomatídeos pelo fato de serem usadas em manipulações experimentais do genoma e é a chave do mecanismo de variação antigênica que *T. brucei* usa para a evasão do sistema imune (Clayton, C.E. 2002). Várias classes de moléculas importantes da via de sinalização celular não se encontram em tripanosomatídeos, incluindo receptores transmembrânicos, a maior parte dos receptores catalíticos, domínios SH2 e SH3 e fatores que regulam a transcrição. Alguns receptores catalíticos foram encontrados e todos são adenilato ciclases (El-Sayed, N. M., et al. 2005).

A elucidação da seqüência completa do genoma de *T. cruzi* não é suficiente para definir os processos dinâmicos relacionados à expressão de proteínas. Assim, estudos pós-genômicos visando à elucidação da expressão diferencial de proteínas em diferentes condições, incluindo as metodologias proteômicas e as de *DNA microarray*, tornaram-se uma consequência natural do seqüenciamento do genoma. Contudo, a regulação gênica em *T. cruzi* não se dá em nível transcricional, pois os genes de *T. cruzi* são transcritos constitutivamente na forma de mRNAs policistrônicos, que são processados a mRNAs monocistrônicos através de um mecanismo de *trans-splicing*. A regulação da expressão ocorre, portanto, através do controle da estabilidade e/ou da tradução específica dos mRNAs (Vanham, L. & Pays, E. 1995). Esse fato limita o uso de *DNA microarrays* e torna a abordagem proteômica bastante atrativa.

1.3 Transcrição em tripanosomatídeos

Diversas mudanças morfológicas ocorrem durante o processo de diferenciação entre os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*. Como exemplo, na diferenciação de tripomastigota para amastigota, ocorre a perda do flagelo externo, a remodelação do citoesqueleto e a redução do tamanho e volume celular (Tomlinson, S., et al. 1995).

Aliado às alterações morfológicas, ocorrem várias mudanças na expressão de proteínas. Por exemplo, há um contínuo decréscimo da proteína de filamento paraflagelar (PAR) durante o processo de diferenciação de tripomastigotas para amastigotas, provavelmente devido à perda do flagelo externo (Paba, J., *et al.* 2004-a,b).

Em epimastigotas são encontradas as proteínas gp 72 e cruzipaína (Harth, G. *et al.*, 1992, Cazzulo, J.J. *et al.* 1992); em tripomastigotas metacíclicos a gp 82, gp 90 e gp 35/50 (Teixeira, M.M. & Yoshida, N. 1986; Hart, G. *et al.*, 1992; Ramirez, M.I. *et al.*, 1993), em tripomastigotas são encontradas a trans-sialidase (Frevet, U. *et al.*, 1992), gp 83 (Villalta, F. *et al.*, 1992), os antígenos Ssp 1, Ssp 2 e Ssp 3 (Andrews, N.W. *et al.*, 1987) e uma proteína homóloga à Ran/TC4, com expressão aumentada em relação à amastigotas (Paba, J., *et al.* 2004). Em amastigotas encontram-se a amastina (Teixeira, A.R.L. *et al.*, 1994), o epitopo Ssp 4 (Burleigh, B. A. & Andrews, N. W., 1995), a gp 83 ou ASP (*amastigote surface protein*) (Pan, A. A. & McMahon-Pratt, D. 1989, Low, H. P. & Tarleton, R. L. 1997), e duas proteínas mais expressas em relação à tripomastigotas, a proteína *poly zinc finger* e a cruzipaína (Paba, J., *et al.* 2004).

Essas variações sugerem que, de alguma forma, haja regulação da expressão protéica de maneira pós-transcricional, possivelmente por mecanismos que alterem a estabilidade do mRNA ou a eficiência da tradução dos mRNAs (Clayton, C.E. 2002)

Neste sentido, os RNAs mensageiros dos tripanossomatídeos apresentam, na extremidade 5', uma seqüência extremamente conservada de 39 nucleotídeos denominada seqüência líder (SL) ou mini-exon. A SL é adicionada ao mRNA através do mecanismo de *trans*-splicing. Trata-se de uma reação intermolecular da qual participam uma molécula doadora (RNA da seqüência líder) e um receptor, que é o mRNA que está sendo sintetizado. É catalisada por um complexo multi-enzimático constituído por enzimas específicas e ribonucleases, onde o RNA que dá origem à SL é clivado e os 39 nucleotídeos resultantes são transferidos para a região 5' do mRNA nascente. (Landfear, S.M. 2003, Silveira, J.F. 2000).

A ausência de seqüências promotoras consenso nos tripanossomatídeos sugere que o controle da expressão gênica nos tripanossomas ocorre

principalmente a nível pós-transcricional e envolve o processamento e tradução dos transcritos. A SL está teoricamente presente em todos os mRNAs do tripanossoma, porém a sua função ainda não é conhecida. No entanto, há evidências de que a SL confere a estabilidade ao mRNA, impedindo a sua degradação, e auxilia também na interação do mRNA com os ribossomos.

Transcritos que não apresentam SL perdem a sua estabilidade e não são traduzidos. Tal como ocorre nos eucariontes superiores, os mRNAs dos tripanossomas apresentam na sua extremidade 3' uma cauda composta por cerca de 30 resíduos de adenina (cauda poli A). Porém, ao contrário dos eucariontes superiores, os mRNAs dos tripanossomatídeos não apresentam uma seqüência consenso para a adição de resíduos de adenina. Sabe-se que a adição de SL e da cauda poli A ocorre durante a transcrição do mRNA mas ainda existe uma certa controvérsia com relação à hierarquia desses eventos (Silveira, J.F., 2000).

1.4 Proteômica

O termo proteoma foi criado em 1994 por Marc Wilkins e refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento protéico expresso por um tecido ou células diferenciadas (Wilkins, M.R. *et al*, 1996). Enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da sua vida, o proteoma é extremamente dinâmico e variável. A análise proteômica permite saber se um gene está sendo expresso, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução. A análise proteômica pode mostrar como esses processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica (Anderson, N.L. *et al*, 2000).

O objetivo inicial dos estudos proteômicos foi a identificação em larga escala de todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Atualmente, consistem na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão protéica (Westermeier, R.,

Naven, T. 2002). Seus objetivos se diversificaram para a análise de vários aspectos funcionais das proteínas, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, existência de isoformas, atividades e estruturas. O campo de atuação desta ciência estende-se à descoberta de novas drogas, diagnósticos, terapias, microbiologia, bioquímica. A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (Cash, P. 2002).

A análise de proteomas geralmente começa com a eletroforese em géis de poliacrilamida, principalmente os géis bidimensionais (2-DE), e técnicas de espectrometria de massa. Na última década, tem sido grandemente facilitada pelo desenvolvimento de novas técnicas de espectrometria de massa (MS) e a disponibilidade de informação genômica (Westermeier, R., Naven, T. 2002).

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2-DE é geralmente o método de escolha, gerando dados em um formato que possibilita uma boa avaliação visual e fornece comparações quantitativas (Rabilloud, T. 2002).

A proteômica também avançou com o desenvolvimento da espectrometria de massa (MS) voltada aos aspectos biológicos e o aumento do número de seqüências armazenadas em bancos de dados. O princípio da MS é a medição da razão massa/carga (m/z) dos íons na fase gasosa, resultantes da ionização da amostra, e constitui um método analítico destrutivo, significando que a amostra é consumida pela ionização de biomoléculas termicamente lábeis, no caso peptídeos, que são transferidos para a fase gasosa sem dissociação (Jonsson, A.P. 2001).

1.4.1 Eletroforese Bidimensional

Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas com base em duas das suas propriedades: numa primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI) e, numa segunda dimensão, em gel desnaturante de

poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com a sua massa molecular (MM) (O'Farrell, P.H. 1975). Em géis bidimensionais os polipeptídeos aparecem formando manchas (*spots*) após serem corados. Diferentes manchas podem conter isoformas da mesma proteína com coordenadas específicas de pI e MM. Em 1982, Angelika Görg introduziu o uso de gradientes imobilizados de pH (IPG) (Bjellqvist, B. *et al.* 1982; Görg, A. *et al.* 1988), nos quais tampões especiais são co-polimerizados com acrilamida e bisacrilamida, acarretando uma melhor reprodutibilidade dos perfis bidimensionais. 2D-PAGE é uma técnica que pode ser usada para a obtenção de perfis bidimensionais completos de uma amostra como também para estudos comparativos entre amostras. O aparecimento ou desaparecimento de manchas podem fornecer informações acerca de proteínas estágio-específicas, enquanto a intensidade das manchas fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídeos (Graves, P. *et al.* 2002).

A técnica de 2-DE ainda é a principal plataforma para a separação de proteínas e possui limitações técnicas inerentes, como a habilidade limitada para fracionar classes específicas de proteínas (Rabilloud, T. 2002) e a dificuldade de automatização (Rose, J.K.C. 2004), o que resulta em grande variabilidade experimental pela manipulação necessária. A 2-DE é um processo caro, trabalhoso e demorado, limitando análises em larga escala da expressão protéica (Park, 2004). Existem limitações também com relação à baixa resolução de proteínas hidrofóbicas e à dificuldade de visualizar proteínas com poucas cópias por célula (Gygi, S.P. *et al.* 2000). Existe também dificuldade de se obter padrões eletroforéticos reprodutíveis para proteínas com ponto isoelétrico muito alcalino (Hoving *et al.*, 2000).

1.4.2 Espectrometria de massa

A espectrometria de massas (MS) determina as massas moleculares de compostos químicos através da separação dos íons moleculares de acordo com sua relação massa-carga (m/z). Um espectrômetro de massa é composto basicamente de duas partes: o sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporizá-las e carregá-las eletricamente, e o analisador de massa

propriamente dito, que separa os íons resultantes de acordo com a massa (Siuzdak, 1996).

Duas técnicas de ionização são amplamente utilizadas: a desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI), onde a amostra é irradiada com um feixe de laser que causa a ionização e a desorção da molécula, e a eletropulverização (ESI - *electro spray ionization*), na qual a amostra em uma solução acidificada é pulverizada na forma de gotículas altamente carregadas na presença de um campo elétrico forte. Uma corrente de gás é aplicada às gotículas que, com a evaporação do solvente, decrescem de volume ocasionando a repulsão mútua entre as cargas e a liberação dos íons na direção do analisador de massa.

Dois tipos de analisadores de massa comumente acompanham esses sistemas de ionização: o de tempo de voo (*time of flight* ou TOF) que é usualmente associado à ionização tipo MALDI, mas pode também ser utilizado com eletropulverização, e o quadrupolo, que é geralmente usado com eletropulverização, mas pode estar associado também a desorção a laser (Cunha, 2003). Existem outros tipos de analisadores de massa, porém, a função comum a todos eles é a de separar os íons gerados e, em seguida, detectar-los digitalmente.

As proteínas podem ser identificadas por comparação entre mapas peptídicos (PMF) que consiste na digestão das proteínas de interesse com tripsina ou outro agente proteolítico e posterior determinação das massas moleculares dos peptídeos resultantes por espectrometria de massa, normalmente do tipo MALDI-TOF. Os valores de massas moleculares obtidos são usados em buscas computacionais em que são comparados com resultados de digestão *in silico* das proteínas existentes em bancos de dados utilizando *softwares* específicos. Na ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI), a amostra é solubilizada em uma matriz ionizante, que serve de suporte e transfere a energia do laser para a ionização da molécula. A identificação é realizada combinando as massas observadas dos peptídeos com as massas resultantes da digestão teórica (Siuzdak, 1996).

Outra técnica de espectrometria de massa muito importante para a análise proteômica é o seqüenciamento, através do uso da Espectrometria de Massa Seqüencial, ou *in tandem* (MS/MS). Nela, são acoplados dois analisadores de

massa em série e, entre eles, ocorre a fragmentação dos íons de peptídeos ou proteínas. Isto é obtido com a introdução de uma câmara de colisão, contendo um gás neutro como Argônio, Xenônio ou Hélio, que proporcionará a geração de fragmentos filhos (íons filhos) via choque cinético. Esses íons filhos serão detectados pelo segundo analisador, seja por quadrupolo ou TOF, determinando assim a sua razão massa/carga (Siuzdak, 1996).

2 OBJETIVO E METAS

2.1 Objetivo

Pretende-se verificar se a introdução espontânea de kDNA de *T. cruzi* no genoma de *Gallus gallus* induz alterações na expressão protéica das células do miocárdio deste.

2.2 Metas

- Definir uma metodologia padrão de extração protéica a partir de coração de *Gallus gallus*;
- Padronizar as condições para separação por eletroforese bidimensional de proteínas de amostras de coração das aves;
- Obter perfis protéicos bidimensionais de corações das aves com e sem integração de kDNA de *T. cruzi*;
- Realizar análise digital comparativa dos diferentes perfis eletroforéticos bidimensionais obtidos;
- Comparar os perfis proteômicos em busca de proteínas específicas de cada condição ou diferencialmente expressas;
- Identificar as proteínas selecionadas por espectrometria de massa;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma

A figura 6 representa o fluxograma de trabalho utilizado e consiste na extração das proteínas do organismo de interesse, seguido pela separação das proteínas com o uso de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE), sua digitalização e análise. Posteriormente, manchas protéicas selecionadas dos géis serão digeridas e analisadas por espectrometria de massa e os mapas peptídicos resultantes usados para buscas em bancos de dados disponíveis.

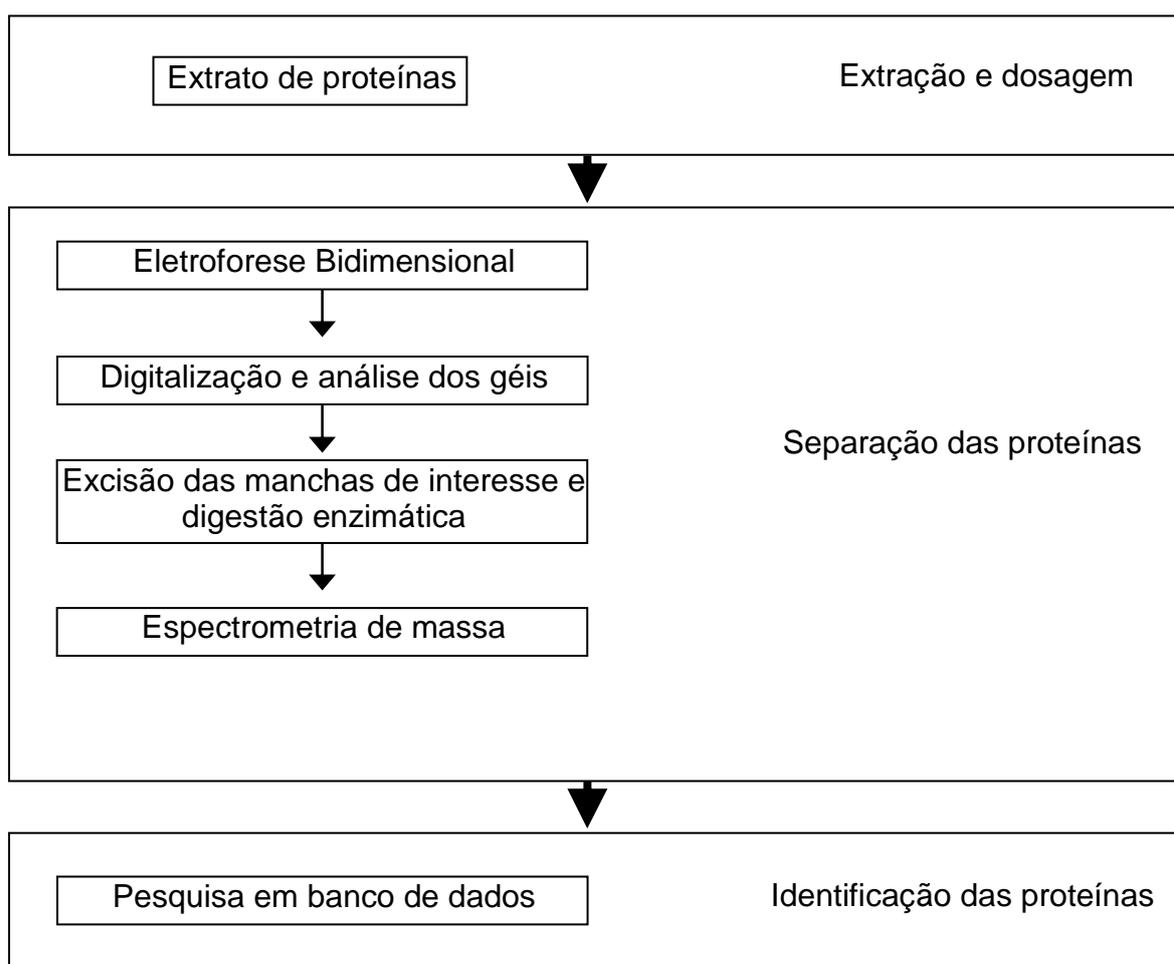


Figura 6. Fluxograma de trabalho utilizado.

3.2 Extração e quantificação de proteínas do tecido

O material utilizado como fonte de proteínas foi tecido muscular de coração de *Gallus gallus*. Foram realizados vários procedimentos de extração até obtermos a otimização, visando a maior quantidade de proteínas e o menor nível de degradação.

No procedimento comum a todos os métodos de extração, o tecido era cortado com bisturi em fragmentos de aproximadamente 1 mm de comprimento e lavado com solução PBS, contendo coquetel de inibidores de proteases (EDTA 5 mM, PMSF 100 μ M, TLCK 100 μ M, TPCK 100 μ M, pepstatina A 1 μ M, leupeptina 100 μ M), à 4 °C, para remoção do sangue e de restos celulares. Posteriormente era realizada centrifugação a 10.000 rpm (centrifuga de mesa Eppendorf) com descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por três vezes ou até o material ficar livre da pigmentação decorrente da hemoglobina do sangue.

No método 1, era adicionado tampão de lise na proporção de 1g para 6mL ao tecido lavado, contendo: uréia 7 M, tiouréia 2 M, Triton X-100 2%, DTT 1% e coquetel de inibidores de proteases (EDTA 5 mM, PMSF 100 μ M, TLCK 100 μ M, TPCK 100 μ M, pepstatina A 1 μ M, leupeptina 100 μ M). Esse material era misturado em um vortex por 2 min e submetido a sonicação em banho de ultra-som (resfriado) por mais 2 min, repetindo-se o procedimento por três vezes. Esse material era então posto em repouso a 4°C por 20 min e ao final centrifugado em 14.000 rpm por 15 min. O sobrenadante, chamado de extrato final, era estocado em freezer a -20 °C.

No método 2, ao tecido lavado era adicionado SDS 0,2% na proporção 1:1 e em seguida fervia-se por 5 min. Posteriormente seguia-se os mesmos passos do método 1.

No método 3, seguia-se os mesmos passos do método 1, porém o tampão de lise continha 10% de metanol.

No método 4, ao tecido lavado foi adicionado tampão Hepes 0,1 M, pH 7.9, DTT 1 mM, NP-40 1% e coquetel de inibidores de proteases (EDTA 5 mM, PMSF 100 μ M, TLCK 100 μ M, TPCK 100 μ M, pepstatina A 1 μ M, leupeptina 100 μ M). Esse material era misturado em um vortex por 2 min e submetido a sonicação por mais 2 min, repetindo-se o procedimento por três vezes. Esse material era então

posto em repouso a 4°C por 20 min e ao final centri fugado em 14.000 rpm por 15 min.

Para a estimativa do conteúdo de proteína utilizou-se o método Plus One 2D Quant-Kit (Amersham Pharmacia) usando-se albumina de soro bovino como padrão.

O extrato final era agitado em vortex e centrifugado a 14.000 rpm por 10 min antes da sua utilização. O esquema dos métodos de extração é mostrado na figura 7.

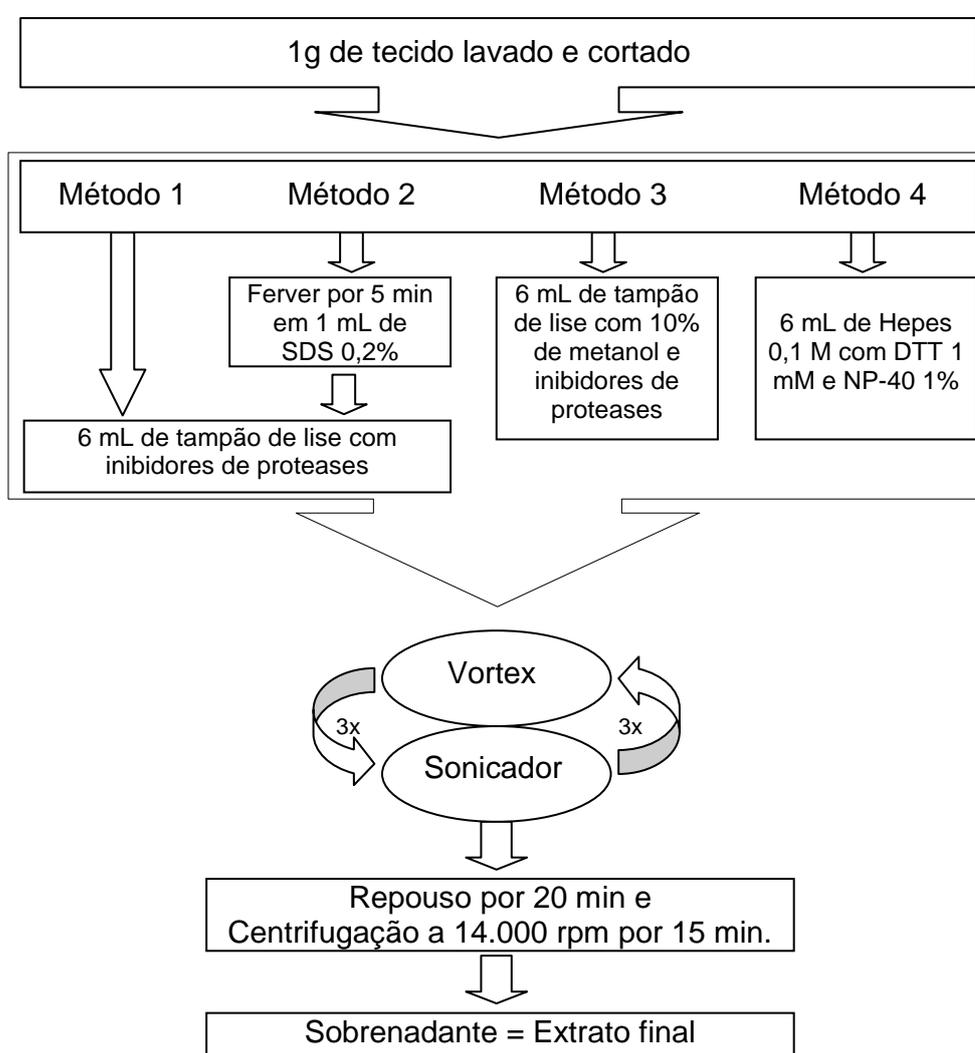


Figura 7. Fluxograma dos métodos de extração utilizados. Tampão de lise: uréia 7 M, tiouréia 2 M, Triton X-100 2%, DTT 1%. Coquetel de inibidores de proteases: EDTA 5 mM, PMSF 100 µM, TLCK 100 µM, TPCK 100 µM, pepstatina A 1 µM, leupeptina 100 µM.

3.3 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Foram realizadas eletroforeses desnaturantes (SDS-PAGE) para a análise inicial dos perfis protéicos. Aplicava-se 40 μL do extrato final, correspondendo a 40 μg de proteínas, nos géis de 0,75 mm de espessura e com concentração de 12% de poliacrilamida. Utilizou-se o sistema Hoeffer SE-600 (Pharmacia Biotech) para separação eletroforética, realizada a 20°C e corrente constante de 50 mA.

3.4 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Para a focalização isoeétrica (IEF), tiras de géis de 18 cm com gradiente imobilizado (IPG) de pH 3-10 (*Immobiline Drystrip*, Amersham Biosciences) foram reidratadas em tampão de lise contendo as amostras a serem analisadas (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 1%, Triton X-100 2%, Pharmalyte PI 3-10 1%), totalizando 370 μL , durante 6 horas (Sanchez *et al.*, 1997, modificado). O volume de amostra adicionada à reidratação depende de sua concentração em solução, para que resulte em um valor otimizado de 100 μg de proteínas por tira. Essa quantidade foi otimizada a partir de testes de 30 até 250 μg .

Após a reidratação, as tiras eram submetidas à IEF em equipamento IPGPhor III (Amersham Biosciences) à 20 °C, máximo de 70 μA por IPG e em quatro escalas de tensão: 30 v, 500 v, 1000 v e 8000 v. À essas tensões referiam-se os passos de focalização, onde variam-se o tempo de aplicação e o modo de gradiente das tensões, esta última com duas possibilidades: *Step and Hold* e *Gradient*. Na primeira, a voltagem máxima é atingida rapidamente, logo que se inicia o procedimento e, na segunda, a voltagem é elevada gradualmente. A IEF foi otimizada para cinco passos, totalizando 18 h e 24 min de procedimento, de acordo com a tabela 1.

Finalizada a IEF, os géis foram submetidos à redução e alquilação por incubação consecutiva em 3 mL de DTT 125 mMol.L^{-1} e iodoacetamida 125 mMol.L^{-1} em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mMol.L^{-1} pH 6.8, 6 M de uréia, glicerol a 30% (v/v), SDS a 4% (p/v)) durante 45 min cada etapa.

Para a separação na segunda dimensão foi realizada eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 12% T usando o sistema *PROTEAN II* (Bio-Rad®) conectado a um sistema de resfriamento MultitempII (Amersham).

Cada gel IPG foi fixado horizontalmente na extremidade superior do gel de poliacrilamida com a ajuda de aproximadamente 1 mL de gel de agarose (0,02% de agarose e 8 µg de azul de bromofenol). Utilizou-se como padrão de massa molecular proteínas puras entre 14 e 94 kDa (Bio-Rad®). A separação eletroforética foi conduzida com corrente constante de 30 mA por gel e à temperatura de 15°C.

Tabela 1. Procedimento de focalização isoeétrica (IEF) otimizado para amostras de células de coração de galos.

Passo	Gradiente	Tensão (v)	Tempo (h)	Voltagem Total (vh)
1	<i>Step and hold</i>	30	6:00	180
2	<i>Gradient</i>	500	1:00	500
3	<i>Gradient</i>	1000	1:04	800
4	<i>Gradient</i>	8000	3:20	15000
5	<i>Step and hold</i>	8000	2:00	16000
Total	-	-	19:24	32480

3.4.1 Coloração dos géis com nitrato de prata

Após a eletroforese, as proteínas dos géis foram coradas com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). Eles foram tratados de acordo com o seguinte procedimento: 1) fixação com metanol a 50% (v/v), ácido acético a 12% (v/v), formaldeído a 0,05% (v/v) durante a noite; 2) nova fixação com álcool etílico a 50% (v/v) por 20 min; 3) sensibilização por tiosulfato de sódio a 0,02% (p/v) por 1 minuto; 4) três lavagens de 30 segundos com água deionizada; 5) impregnação por 20 min em nitrato de prata (AgNO₃) a 0,2% (v/v) e formaldeído a 0,075% (v/v); 6) lavagem por 1 minuto com água deionizada; 7) revelação das proteínas com carbonato de sódio a 6% (p/v) e formaldeído a 0,05% (v/v). A reação de revelação foi interrompida com a mesma solução utilizada para a primeira fixação e os géis foram armazenados em solução de ácido acético a 1% até a digitalização da imagem.

3.4.2 Análise de Imagens

Os géis corados com prata foram digitalizados usando-se um *scanner* (*ImageScanner* – Amershan Biosciences) em modo transparência com resolução de 300 dpi (*dotch per inch*). As imagens geradas em formato *tif* foram analisadas pelo programa *ImageMaster Platinum v.5* (Amershan Biosciences). A detecção de cada mancha de proteína foi validada por inspeção manual e editada quando necessário. Géis consenso foram criados usando no mínimo 2 géis replicas por condição. O volume das manchas foi normalizado contra a intensidade total das manchas presentes em cada gel. Somente as manchas apresentando uma diferença de volume normalizado de pelo menos três vezes foram consideradas como diferencialmente expressas.

3.4.3 Secagem de géis

Após a digitalização dos géis e a excisão de manchas de interesse, os géis foram submetidos a um processo de desidratação para conservação do mesmo, através da incubação em metanol 30%, 7.5% glicerol durante 2h e posteriormente eram colocados entre duas folhas de celofane e deixados à temperatura ambiente por 1 a 2 dias.

3.5 Digestão de proteínas em gel

Manchas de interesse foram cortadas do gel e descoradas por incubação em uma solução 15 mM de ferrocianeto de potássio e 50 mM de tiosulfato de sódio durante 10 min (Gharahdaghi et al 1999). Os fragmentos de gel foram lavados com 100 mM de NH_4HCO_3 por 10 min, e também com água e acetonitrila por 2 vezes de 10 min cada uma. Na ultima lavagem, os fragmentos de gel foram macerados com pistilo e secados a vácuo em aparelho *Speed Vac* durante 20 min. Os géis secos foram reidratados por adição de 5 μL de solução 100 mM de NH_4HCO_3 , 5 mM de CaCl_2 contendo tripsina modificada (Promega) a $12,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e incubados no gelo durante 50 min. Foram adicionados 10 μL da mesma solução, porém sem tripsina, seguido de incubação a 37 °C durante a noite. Os digestos resultantes foram extraídos por duas lavagens em sonicador com 40 μL

de solução acetoneitrila:água:ácido trifluoroacético, na proporção 66:33:0,1 (v/v/v), durante 20 min e então secos a vácuo.

3.6 Espectrometria de massa por MALDI-TOF

Após a secagem a vácuo, cada digesto extraído foi solubilizado em 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e em seguida foram dessalinizados utilizando-se microcolunas de fase reversa Zip Tip (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

Foi misturado 1 µL do digesto dessalinizado em 1 µL de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico saturada (10 mg.mL⁻¹ em 50% de acetoneitrila e 0,1% de TFA) na placa de aço do espectrômetro de massa.

A fim de se obterem os mapas peptídicos de cada amostra, análises de MALDI-TOF MS foram realizadas em um espectrômetro de massa Autoflex II (Bruker Daltonics).

Os espectros foram obtidos em modo refletor com ionização positiva. Para que os espectros obtidos tivessem a maior precisão e confiabilidade possíveis, foram realizadas calibrações externas, com peptídeos padrões em diferentes poços da placa, e também calibrações internas, com peptídeos do mesmo poço de análise das amostras. Os calibrantes externos utilizados foram a angiotensina I, acetil-colina (ACTH 1-17), substância P e Bombesina e os calibrantes internos foram os peptídeos da autólise de tripsina e, quando possível, de queratina.

Os espectros foram editados manualmente usando os programas FlexAnalysis e Biotoools, com seleção dos picos monocarregados apenas. As buscas em bancos de dados foram realizadas através do programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50-100 ppm; restrição ou não de massa molecular de acordo com a observada na separação eletroforética; máximo de um sítio tríptico de corte não clivado; carbamidometilação como modificação constante de cisteínas e oxidação de metionina como modificação variável.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fontes de material

No início do trabalho foram utilizados tecidos de dois galos não singênicos, com genótipos diferentes, como fonte de material. O primeiro galo foi denominado 4938 e continha integração de kDNA em seu genoma, determinado por hibridização no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (Nitz *et al.* 2004). O segundo animal, controle, foi denominado 4976 e não possuía DNA exógeno em seu genoma de acordo com as sondas utilizadas. O galo 4938 morreu em virtude do desenvolvimento dos sintomas de cardiopatia e, portanto, seu coração continha infiltração celular acentuada (Figura 8).

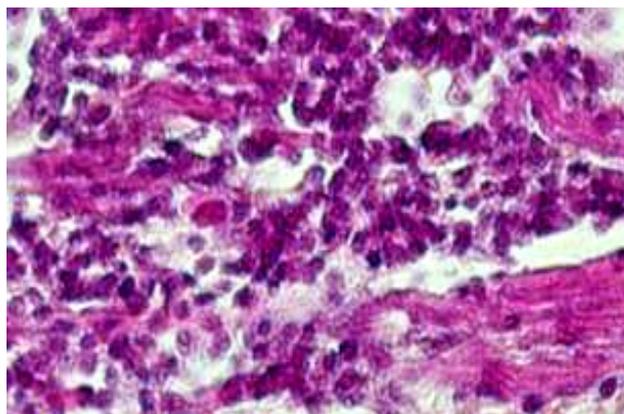


Figura 8. Histopatologia do coração de galo com integração de kDNA no seu genoma. Veja miocardite difusa, destruição de fibras cardíacas por múltiplas, confluentes unidades mínimas de rejeição. Fonte: Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas.

Supomos que a resposta inflamatória destrutiva poderia alterar a expressão protéica das células do tecido, de forma que não poderíamos afirmar que as diferenças encontradas em relação ao controle fossem relacionadas à integração do kDNA exclusivamente (Gomes, CC, Tese Universidade de Brasília, 2006).

Além disso, as diferenças na expressão de proteínas também poderiam ser associadas à diferença genética entre os galos analisados. Com efeito, nossos resultados mostraram uma grande discrepância na expressão de ambos os galos, resultando em uma difícil análise comparativa (figura 14).

Após um ano trabalhando com essas amostras, passamos a utilizar galos singênicos, com genótipo similar, que foram importados pelo Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas. Com aproximadamente seis meses de criação e tratamento, obtivemos o tecido de duas aves: número 035, contendo integração de kDNA em seu genoma, determinada por hibridização contra sondas de kDNA (*Southern blot*). E número 044, controle negativo, sem integração. A ave com integração positiva foi sacrificada antes que desenvolvesse uma resposta inflamatória acentuada no coração, que provocaria uma mudança na expressão proteica das células cardíacas.

A utilização das aves singênicas facilitou a comparação dos perfis proteômicos que, supostamente, deveriam ser semelhantes em função de terem sido gerados a partir de genótipos muito próximos, o que não era esperado para as aves não singênicas. Essa homogeneidade de perfis proteômicos também pode ser atribuída às aves terem sido sacrificadas antes da evolução da resposta inflamatória e, conseqüentemente, antes de modificações proteômicas significativas.

Nos experimentos com as aves 4938 e 4976, utilizou-se tecido muscular do coração e também do baço. Posteriormente este último foi excluído dos experimentos, inclusive nos casos 035 e 044, no intuito de reduzir o número de géis necessários, de diminuir os problemas com a otimização da extração e para facilitar a comparação das amostras.

4.2 Otimização da extração

Foram realizados vários procedimentos de extração até se chegar a um método adequado, visando obter a maior quantidade de proteínas, com o menor nível de degradação do extrato.

Inicialmente foi utilizado um procedimento de extração fracionada, com o objetivo de obtenção de extratos separados de núcleo, citoplasma e membrana

plasmática das células. Porém, esse método se mostrou tecnicamente difícil e sua utilização implicaria na comparação de três vezes mais géis em relação à utilização de um extrato total. Isto tornaria a análise proteômica muito mais complexa e susceptível a erros experimentais.

Por essas razões, era necessário um método com menos manipulações da amostra e com condições que não permitissem a ação de proteases, a fim de evitar a degradação das proteínas extraídas. E também, o meio de extração precisaria solubilizar o maior número possível de proteínas, evitando-se perdas de material.

Para tanto, foram testados quatro métodos diferentes, mostrados na figura 9. No primeiro poço, foi aplicado material do método de extração 2 (0,89 mg.mL⁻¹); no segundo, do método 3 (0,77 mg.mL⁻¹); no terceiro, do método 1 (1,04 mg.mL⁻¹); no quarto, do método 1 com diluição de 1:12 ao invés de 1:6; e no quinto, do método 4 (0,73 mg.mL⁻¹).

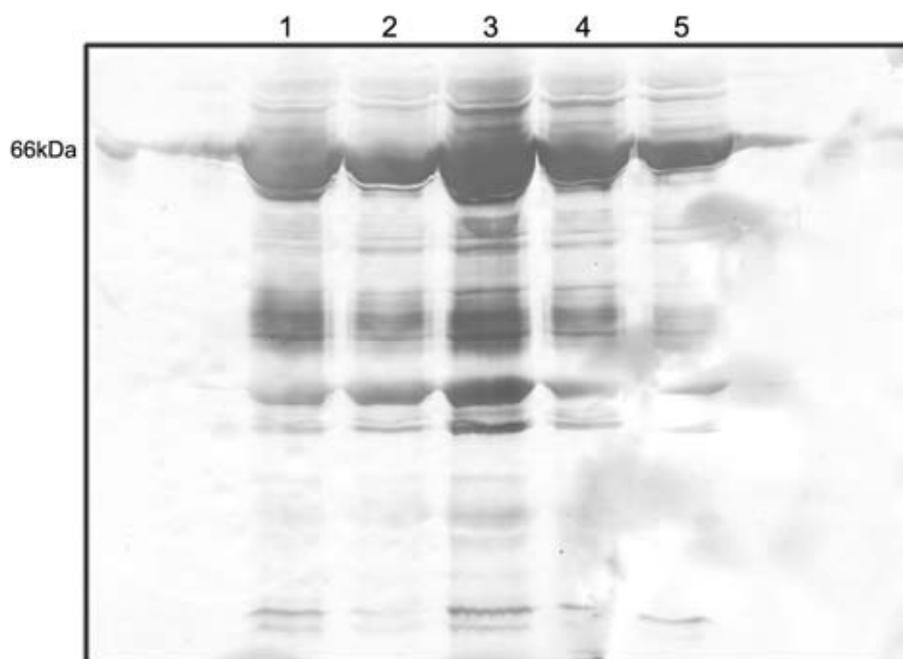


Figura 9. Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) de materiais extraídos por diferentes métodos, com aplicação de 50 μ L. Poço 1 – método 2 (44,5 μ g); poço 2 – método 3 (38,5 μ g); poço 3 – método 1 (52 μ g); poço 4 – método 1 com diluição 1:12 (26 μ g); poço 5 – método 4 (36,5 μ g). Coloração com nitrato de prata e malha a 12% T.

Com esses resultados, foi escolhido o método de extração 1, cujo perfil do extrato está representado no poço 3 no gel unidimensional (figura 9), tendo em

vista o maior rendimento de extração (concentração de proteínas=1,04 mg.mL⁻¹) e o baixo grau de degradação protéica evidenciado.

4.3 Eletroforese Bidimensional

4.3.1 Dificuldades da técnica

A técnica de eletroforese bidimensional (2DE) é trabalhosa, demandando muitas intervenções manuais do pesquisador, e possui algumas limitações.

Primeiramente, uma célula animal contém milhares de cópias de proteínas, mas nem todas são evidenciadas por esta técnica. Apenas uma fração é separada. Proteínas com reduzido número de cópias ou que não se solubilizam nas condições utilizadas não são detectadas. Em adição, os vários passos de manipulação da amostra podem promover a alteração das proteínas, modificando suas características originais. Além disso, as condições utilizadas limitam determinadas proteínas com características particulares, como ocorre com as proteínas hidrofóbicas, que possuem baixa resolução nas condições padrões da técnica. Também há dificuldade de se obter padrões eletroforéticos reprodutíveis para proteínas com ponto isoelétrico muito alcalino (Hoving *et al.*, 2000), que se apresentam com baixa resolução e com migração alterada em géis com condições padrão.

Portanto, foi necessário aperfeiçoar as condições para cada amostra, evitando ao máximo a degradação das proteínas em virtude da manipulação. Para tanto, foi utilizado tampão de lise para solubilizar as proteínas extraídas do tecido, que possui ampla ação e é compatível com a corrida eletroforética, evitando-se a manipulação excessiva com a troca de soluções.

A utilização de tiras de IPG com faixa de pH 3 a 10 permite a separação mais abrangente das proteínas, todavia, o excesso de proteínas na faixa ácida tende a acumular-se na tira e com isso diminui a resolução de separação das manchas. Assim sendo, foi preciso obter uma quantidade apropriada de amostra a ser aplicada nas tiras para que não sobrecarregasse a sua capacidade de carga, mas que também não comprometesse a visualização de proteínas com baixa concentração. Outra característica da utilização desta faixa de pH é a dificuldade de separação de proteínas com ponto isoelétrico básico.

Em adição, outra dificuldade encontrada foi a presença de algumas proteínas com concentração em excesso, que dificultaram a separação e a visualização das demais. Posteriormente, elas foram identificadas como sendo actina cardíaca e cadeia leve 3 de miosina, representando 10,7 e 11,8 % do volume das manchas, respectivamente, dos géis. Os experimentos com redução da quantidade de amostra aplicada não melhoraram o perfil dos géis, pois, proporcionalmente, a concentração dessas duas proteínas é muito maior que as demais.

Ao longo do projeto, foram desenvolvidos três protocolos gerais diferentes para os experimentos de eletroforese. O primeiro protocolo seguiu as especificações do fabricante, porém mostrou uma baixa resolução e a formação de linhas horizontais, evidenciando problemas na primeira dimensão, ou seja, a focalização isoeletrica - IEF (figura 10).

Para contornar o problema, foi criado um segundo protocolo para a primeira dimensão, no qual foi reduzida a quantidade de proteínas aplicadas de 180 µg para 100 µg, aproximadamente, com objetivo de diminuir a precipitação e formação de agregados protéicos na tira de IPG; a voltagem total ao qual foi submetida foi elevada de 18.400 para 24.480 v.h, com a tentativa de aumentar a separação de proteínas com ponto isoeletrico próximos; e foi adicionado isopropanol a 10% ao tampão de lise com intenção de abrandar o efeito eletrosmótico, que ocorre normalmente na focalização isoeletrica devido à diferença de concentração iônica nos pólos da tira de IPG, acarretando a migração da água com conseqüente deslocamento das proteínas neste processo.



Figura 10. Região de gel de eletroforese bidimensional do proteoma cardíaco do galo 035, com integração positiva de kDNA. Vide linhas horizontais em decorrência da IEF não otimizada. Aplicação de 100 µg de amostra e utilização do protocolo 1 de IEF. Coloração por nitrato de prata e malha a 12% T.

Apesar de melhorar a resolução dos géis, o segundo protocolo se mostrou insatisfatório. Havia, ainda, a presença de linhas horizontais. Provavelmente, a

quantidade de proteínas ainda era um fator crítico, pois, apesar da redução em 45%, algumas proteínas da amostra possuem uma concentração relativa muito alta, a exemplo da actina e miosina, que são proteínas abundantes no tecido muscular. A alta concentração provoca a precipitação na malha do gel das tiras de IPG, bloqueando a migração. Em adição, ocorre o espalhamento para os lados quando a malha do gel não suporta a carga de proteínas. Entretanto, reduzir a quantidade de proteínas significa a perda de manchas de proteínas menos abundantes na amostra. Teste realizado com a aplicação de 70 µg de proteínas mostrou uma perda de um grande número de manchas, principalmente na região de 30 a 45 kDa com pI aproximado entre 3 e 7, em relação aos demais géis realizados com a mesma amostra (figura 11).

No terceiro e último protocolo utilizado, manteve-se a quantidade de proteínas aplicadas em 100 µg, elevou-se a voltagem total para 32.480vh e criou-se um passo a mais na focalização isoeletrica, com a finalidade de permitir uma melhor absorção das proteínas com alta concentração e alta massa pela malha do gel, conforme mostrada anteriormente na tabela 1. Este protocolo final foi adotado para todos os experimentos realizados com os galos singênicos.

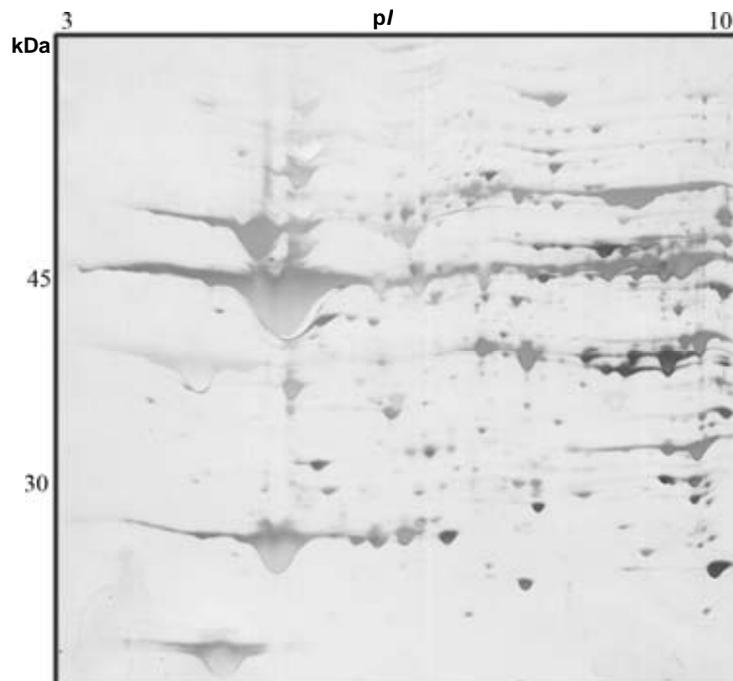


Figura 11. Eletroforese bidimensional do proteoma cardíaco do galo 035 com integração positiva de kDNA. Teste com aplicação de 70 µg de amostra. Detecção de 290 manchas. Coloração por nitrato de prata e malha a 12% T.

4.3.2 Resultados dos géis

Os experimentos realizados com amostras dos galos não singênicos, com integração positiva e controle, são mostrados na figura 14. Foi utilizado o segundo protocolo de eletroforese bidimensional, com as mesmas condições para ambas as amostras. Foram detectadas 366 manchas nas amostras do galo 4938 com integração positiva e 348 manchas nas amostras do galo controle 4976. Visualmente há expressão diferenciada de uma grande quantidade de proteínas nos galos analisados, que pode ser explicada pela resposta imunológica do galo com integração positiva e conseqüente presença de células do sistema imune no tecido, podendo alterar a expressão de células adjacentes, e, também, devido às diferenças inerentes de cada galo, que tem genomas diferentes, assim como pela resposta inflamatória intensa. Essas possíveis causas dificultam a análise para se verificar diferenças provocadas por integração do kDNA.

Com intuito de diminuir as variáveis que estariam influenciando na expressão das proteínas, foram utilizados aves singênicas. Os corações foram coletados dos animais ainda jovens, supondo-se que apresentariam resposta imunológica pouco intensa. Um resultado representativo dos géis realizados é mostrado na figura 15, sendo que foram detectadas 390 manchas no galo 044, controle negativo, e 350 manchas no galo 035, com integração positiva. Os demais géis desses galos, realizados em triplicata, contém um perfil similar, apresentando maior ou menor resolução em algumas regiões.

4.3.3 Resultados da análise de imagens

Apesar da melhora nos resultados dos géis, a análise das imagens se mostrou uma tarefa difícil. Manchas bem resolvidas são simples de serem analisadas, porém, quando há rastros, como as linhas horizontais observadas nas manchas de maior concentração, a separação delas se torna complicada. O programa de computador ImageMaster 2D Platinum oferece ferramentas para auxiliar a identificação de cada mancha individual do gel, se baseando na intensidade da escala de cinza de cada *pixel* da imagem. Para isso, ele define uma escala de 256 tons de cinza, que corresponde ao limite da maioria dos monitores existentes. Essa escala é muito mais sensível do que o olho humano

consegue perceber, contudo não é suficiente para separar os rastros das proteínas mais concentradas. Esses rastros tendem a manter uma intensidade muito alta em sua faixa e com isso ocultam outras proteínas com mesmo *pI*.

Os géis em triplicada foram utilizados para fabricar um gel sintético no programa ImageMaster 2D Platinum (figura 12), contendo todas as manchas, minimizando os erros experimentais. Utilizando esse gel como referência, foram encontradas 377 manchas coincidentes com o gel do galo 044 da figura 15 e 321 manchas com o gel do galo 035 da mesma figura. Esses resultados representam uma melhora em termos de homogeneidade entre amostras com integração e controle, diminuindo a complexidade da comparação. Porém, a análise das coincidências ficou comprometida devido à baixa resolução dos géis, principalmente na região de proteínas básicas. Este fato dificulta a separação precisa das manchas e com isso a comparação fica comprometida. Portanto, apesar da análise computacional auxiliar bastante, análises estatísticas mais elaboradas não puderam ser realizadas.

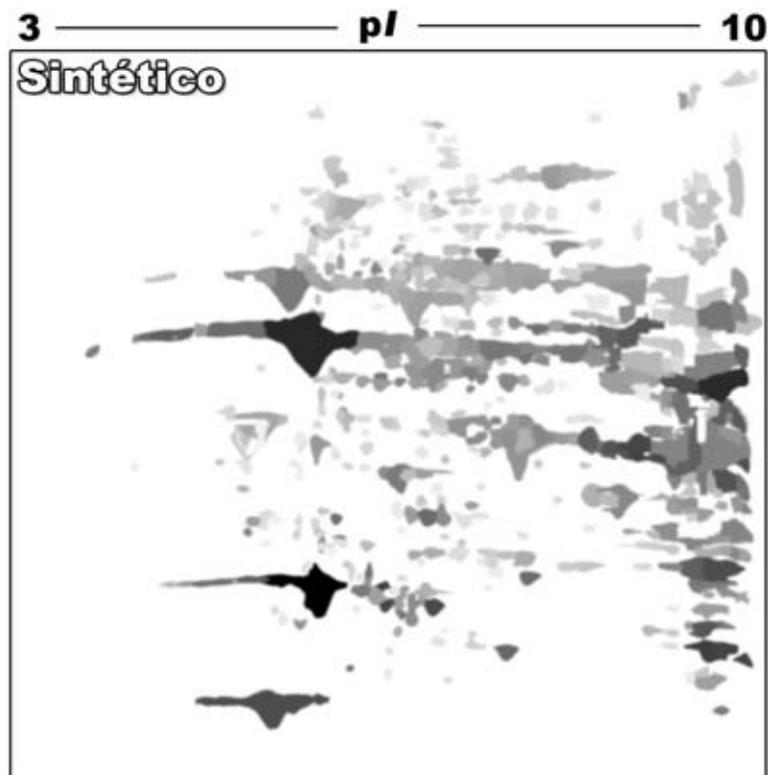


Figura 12. Imagem sintética elaborada pelo programa ImageMaster 2D Platinum a partir de seis imagens de géis dos proteomas cardíacos dos galos 035 e 044. Essa imagem foi utilizado como referência para comparação das manchas diferencialmente expressas.

Destes resultados, manchas de interesse foram escolhidas para que fossem excisadas e submetidas à digestão com tripsina, com a finalidade de identificação por impressão digital do mapa peptídico (PMF), conforme mostrado na figura 15. A escolha foi baseada na necessidade de se identificar um controle positivo, garantindo a viabilidade do método aplicado, e, principalmente, na necessidade de se identificar as proteínas diferencialmente expressas. Portanto, foram escolhidas duas manchas presentes em todos os géis, tanto controle como com integração positiva, que apresentaram concentração relativa elevada e que serviriam de controle positivo para a técnica. Foram escolhidos também outras duas manchas, presentes apenas nos géis do galo 035, com integração positiva. Outras manchas, contendo diferenças de expressão da ordem de pelo menos três vezes em volume, foram selecionadas, porém ainda não analisadas neste trabalho (figura 15).

A figura 13 demonstra a análise comparativa pelo programa ImageMaster 2D Platinum de uma mancha exclusiva das amostras com integração positiva de kDNA, denominada mancha A.

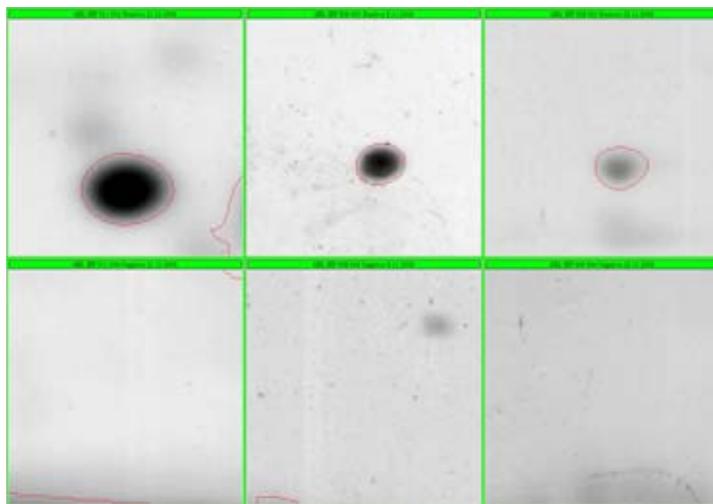


Figura 13. Análise da mancha A, exclusiva das amostras com integração positiva de kDNA de *T. cruzi*, pelo programa ImageMaster 2D Platinum. Os três géis superiores são de amostras positivas enquanto os três inferiores são amostras negativas para integração.

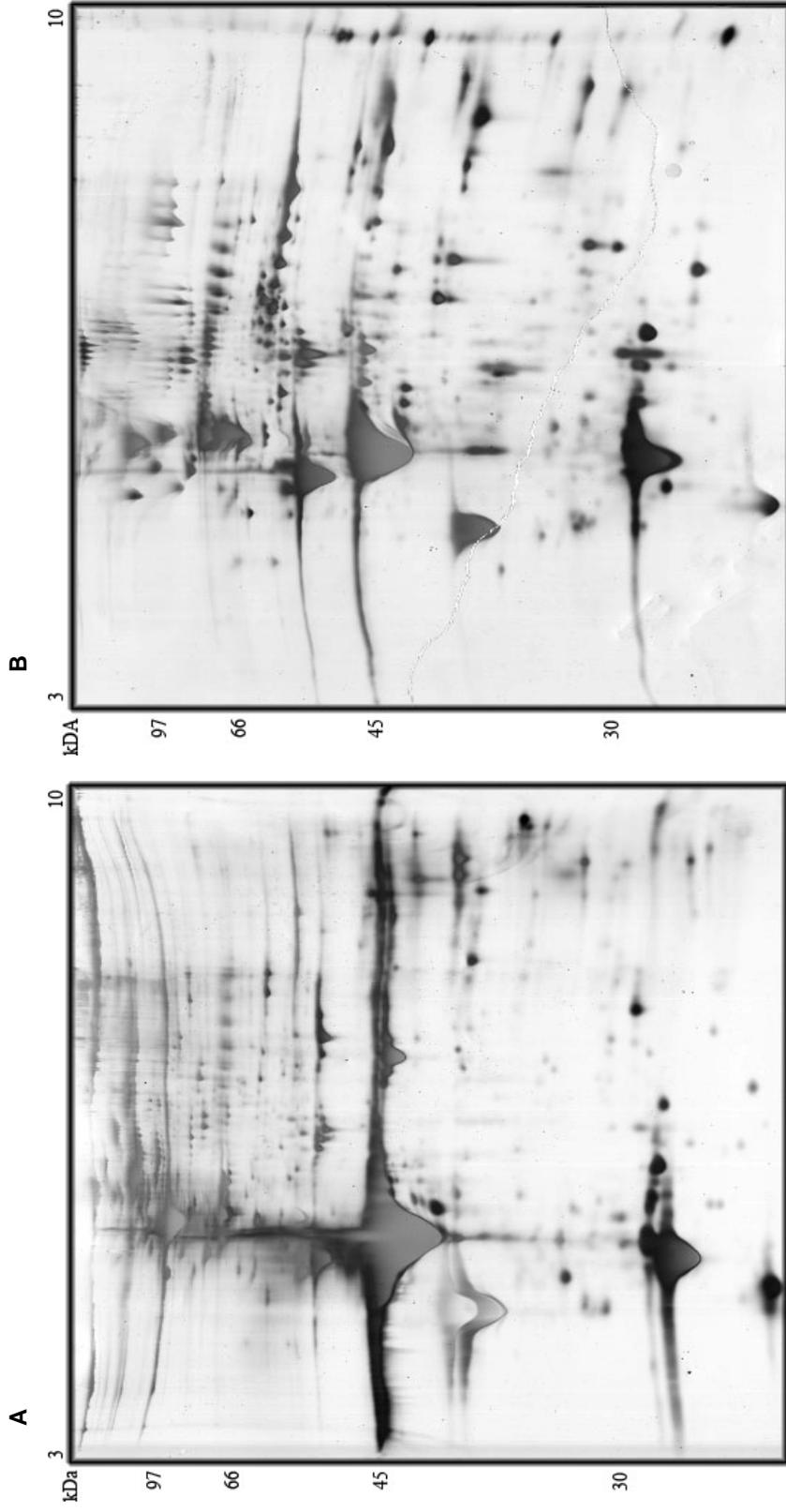


Figura 14. Eletroforese bidimensional dos proteomas cardíacos dos galos não singênicos. **A:** galo 4938 com integração positiva, 366 manchas únicas detectadas. **B:** galo 4976 controle, 348 manchas únicas detectadas. O número de manchas coincidentes é 209. Vide as diferenças do perfil, com grandes diferenças de expressão, principalmente na região de pI entre 4 a 7, aproximadamente. Aplicação de 180 µg de amostra e utilização do protocolo 1 de IEF. Coloração por nitrato de prata e malha a 12% T.

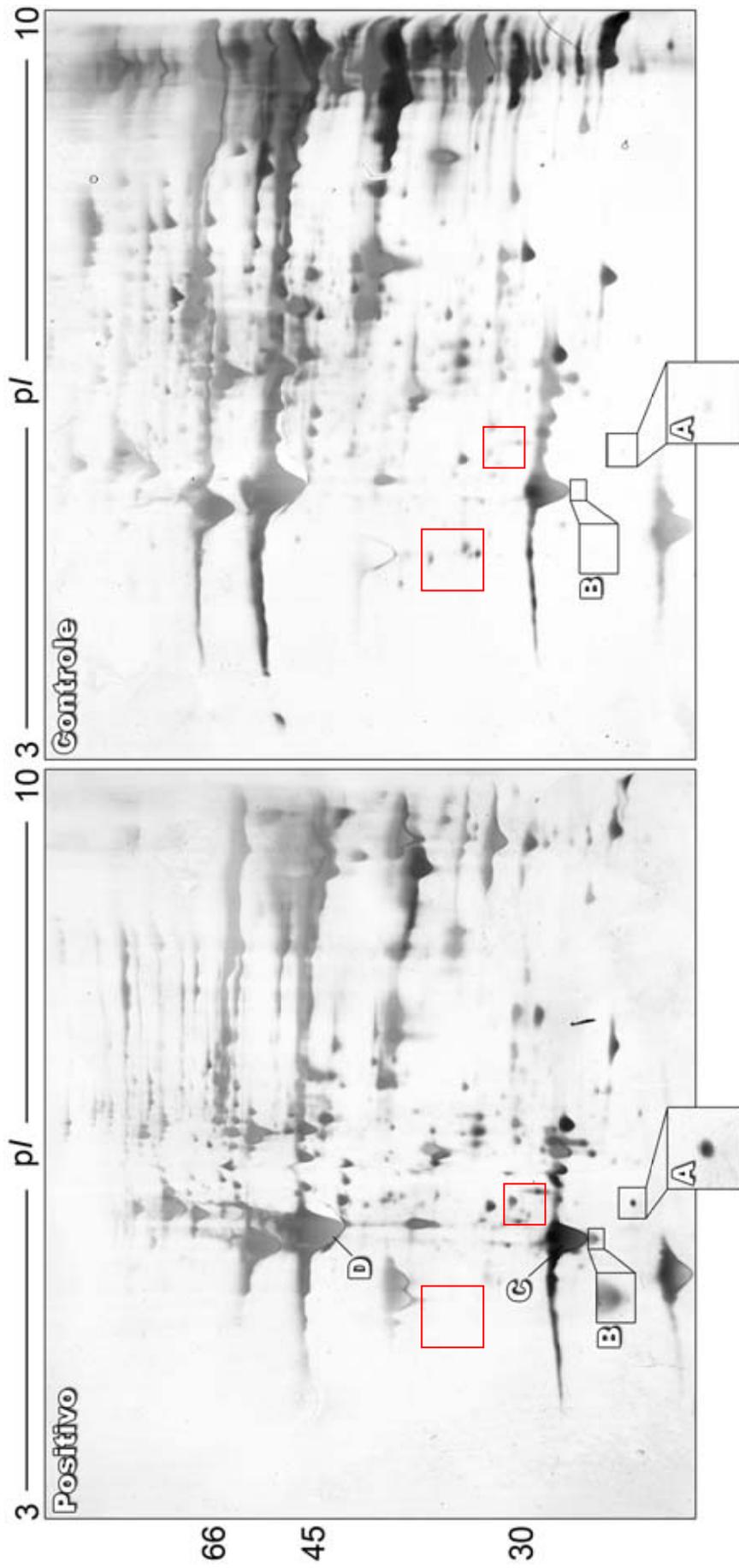


Figura 15. Eletroforese bidimensional dos proteomas cardíacos dos galos singênicos. **Positivo:** galo 035 com integração positiva de kDNA, 350 manchas detectadas. **Controle:** galo 044 controle negativo, sem integração do kDNA, 390 manchas detectadas. As manchas **A**, **B**, **C** e **D** foram selecionadas para os experimentos de identificação proteica por espectrometria de massa. Regiões destacadas em vermelho representam manchas diferencialmente expressas não analisadas neste trabalho Aplicação de 100 µg de amostra e utilização do protocolo 3 de IEF. Coloração por nitrato de prata e malha a 12% T.

4.4 Espectrometria de massa

As manchas de interesse selecionadas para o procedimento de digestão por tripsina estão indicadas na figura 15. Foram escolhidas de acordo com os seguintes critérios: presença na amostra com integração positiva e ausência na amostra controle (manchas A e B); e necessidade da presença de controles positivos para corroborar a eficácia desta técnica, tal que, algumas proteínas abundantes e presentes em ambas as amostras foram selecionadas (manchas C e D)..

Após a digestão com tripsina das manchas de interesse, foi realizada análise por espectrometria de massa com objetivo de identificação das proteínas através da técnica de impressão digital do mapa peptídico (PMF), ou seja, a comparação das massas dos peptídeos do digesto com um banco de dados de digestão (MASCOT - <http://www.matrixscience.com>).

As figuras 16, 17, 18 e 19 representam espectros de massa dos digestos trípticos correspondentes às manchas A, B, C e D, respectivamente, da figura 15. Com as informações obtidas a partir desses espectros, foi possível pesquisar nos bancos de dados a identidade das proteínas em questão, cujos resultados são resumidos na tabela 2.

De acordo com os resultados alcançados, a mancha A foi identificada como proteína C-reativa (*Meleagris gallopavo* ou Peru selvagem) - gi|157060731, como mostrado pela figura 16. Esta pesquisa foi realizada contra o banco de dados não redundante do NCBI e foi obtido uma nota estatística de 120 com uma área de cobertura de 48%. Este resultado garante uma identificação positiva.

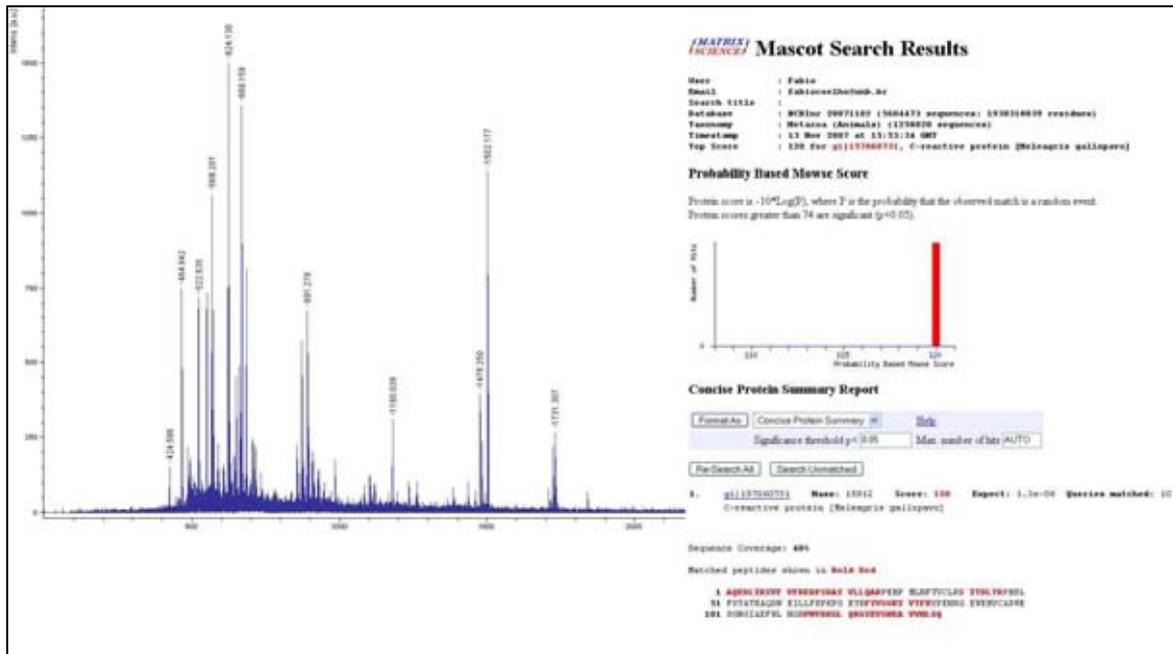


Figura 16. Espectro de massa do digesto triptico da mancha A. Proteína identificada por pesquisa em banco de dados como proteína C-reativa (*Meleagris gallopavo*) - gi|157060731, com nota 120 e área de cobertura de 48%. Espectro obtido pelo instrumento Bruker Daltonics Autoflex II, analisado pelo programa FlexAnalysis e confrontado contra o banco NCBI nr através da ferramenta Mascot.

A proteína C-reativa (*C-reactive protein* ou CRP) é encontrada no plasma e produzida por hepatócitos e adipócitos (Lau, D.C. *et al.* 2005). Pertence à família das pentraxinas, caracterizada por proteínas dependentes de ligação ao cálcio e com estrutura de folhas beta achatadas (Emsley J. *et al.* 1994). A CRP aumenta drasticamente sua concentração plasmática durante processos inflamatórios agudos. Este aumento é atribuído ao aumento da presença de IL-6, que é produzido por macrófagos, linfócitos T (Jones, S.A. 2005) e, também, adipócitos (Lau, D.C. *et al.* 2005). Supõe-se que a CRP desempenha um importante papel na imunidade inata, como uma forma de defesa inicial contra infecções, através do auxílio ao sistema complemento (Rattazzi, M., *et al.* 2004). Estudos associaram a CRP à doenças cardiovasculares e mostraram que ela pode aumentar a necrose isquêmica. Sua inibição pode ser uma terapia efetiva para infartos do miocárdio (Pepys, M.B. 2006).

Outros estudos demonstram que anticorpos policlonais e monoclonais anti-CRP humana se ligam à superfície das células de *T. cruzi*, indicando uma reação cruzada. Possivelmente uma molécula similar à CRP é expressada na superfície do parasita. Um anticorpo policlonal anti-CRP humana apresentou efeitos inibitórios para a invasão de células musculares pelo *T. Cruzi*. O nível sérico de

CRP aumenta apenas durante os estágios mais avançados da doença de Chagas, tendo um importante valor para avaliar a progressão da deterioração das funções cardíacas (López, Lyankis, *et al.* 2006).

Este resultado, apesar de não corroborar a presença de proteínas quiméricas devido à integração do kDNA, é importante por demonstrar a presença de uma proteína relacionada ao processo inflamatório nos galos infectados por kDNA de *T. cruzi*, ao contrário do galo controle. E mais importante, CRP é uma proteína associada a doenças cardíacas, mostrando a estreita relação de sua presença com a hipótese de que a integração do kDNA está relacionado com a cardiomiopatia da doença de chagas.

A mancha B não obteve identificação positiva apesar do espectro de massa conter diversos fragmentos únicos e não similares à queratina ou à autólise da tripsina (figura 17). Este resultado pode significar que a proteína em questão ainda não possui correspondência no banco de dados e, portanto, não foi possível obter uma nota estatisticamente significativa. Como o banco de dados é constantemente atualizado e alimentado com dados novos, é possível que futuramente se obtenha uma identificação positiva.

Outra possibilidade é que esta seja uma proteína nova, modificada pela mutação provocada pela infecção por kDNA. Como já foi mencionado, as seqüências de minicírculo de *T. cruzi* que se inserem no DNA hospedeiro possuem pelo menos uma ORF descrita (figura 4). Portanto, estudo futuros de seqüenciamento dessa e de outras proteínas poderão revelar se elas são produtos quiméricos, decorrentes da presença do kDNA. Há ainda a possibilidade de existir mais de uma proteína nessa mancha, dificultando a identificação.

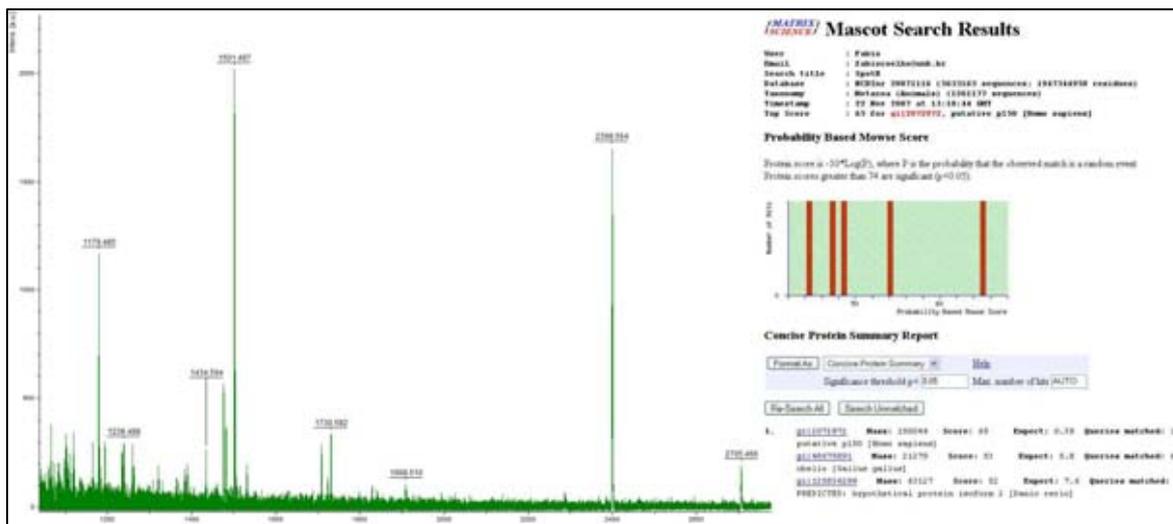


Figura 17. Espectro de massa do digesto triptico da mancha B. Proteína não identificada no banco de dados, com nota máxima 65, não significativa, e área de cobertura de 23%. Veja o gráfico da ferramenta Mascot, onde o resultado com maior nota fica na região hachurada. Espectro obtido pelo instrumento Bruker Daltonics Autoflex II, analisado pelo programa FlexAnalysis e confrontado contra o banco NCBI nr através da ferramenta Mascot.

A mancha C foi identificada como cadeia alcalina leve 3 de miosina do músculo esquelético ventricular (*Gallus gallus*) - gi|45384044, como mostrado pela figura 18. E a mancha D foi identificada como actina cardíaca - gi|10505177, mostrado na figura 19. Estas identificações serviram como controles positivos da técnica utilizada e, também, como identificadores da escala de p/ no gel.

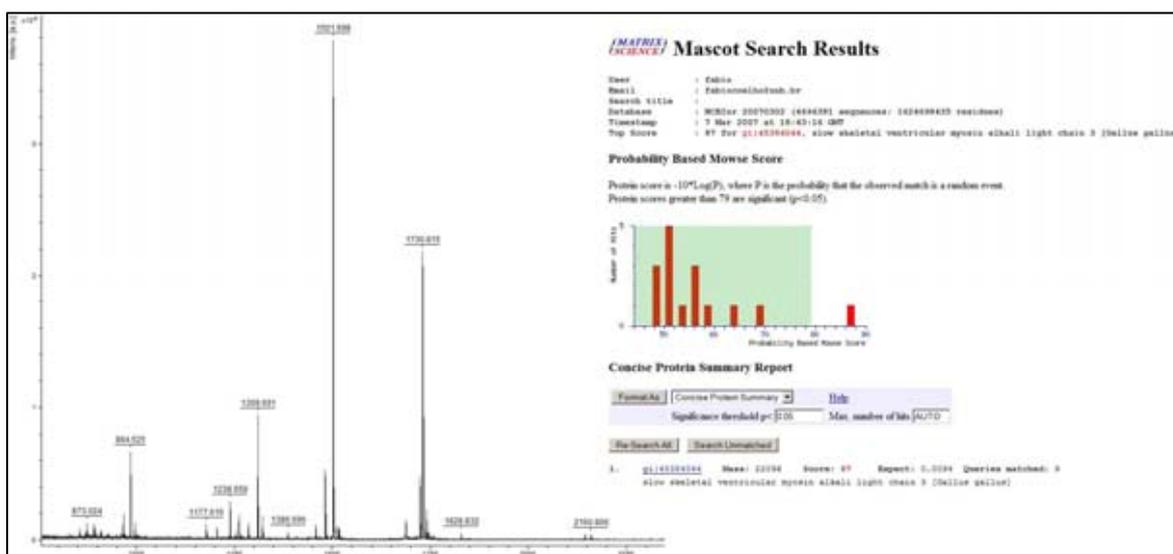


Figura 18. Espectro de massa do digesto triptico da mancha C. Proteína identificada como cadeia alcalina leve 3 de miosina do músculo esquelético ventricular (*Gallus gallus*) - gi|45384044, com nota 87 e área de cobertura de 42%. Espectro obtido pelo instrumento Bruker Daltonics Autoflex II, analisado pelo programa FlexAnalysis e confrontado contra o banco NCBI nr através da ferramenta Mascot.

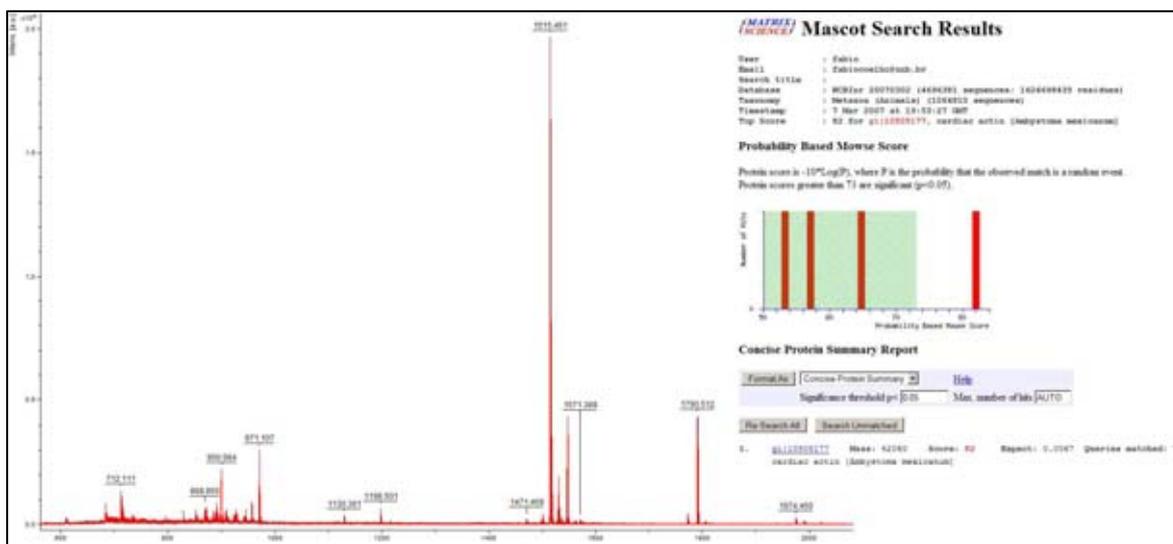


Figura 19. Espectro de massa do digesto trípico da mancha D. Proteína identificada como actina cardíaca - gj|10505177, com nota 82 e área de cobertura de 26%. Espectro obtido pelo instrumento Bruker Daltonics Autoflex II, analisado pelo programa FlexAnalysis e confrontado contra o banco NCBIInr através da ferramenta Mascot.

Tabela 2. Características das proteínas identificadas.

Nome/Origem	Organismo	Identificador	Score	Cobertura	MM	p/
Proteína C-reativa / Mancha A	<i>Meleagris gallopavo</i>	gj 157060731	120	48%	15.912	7.05
Mancha B	Não identificada	–	–	–	–	–
Cadeia leve 3 de miosina / Mancha C	<i>Gallus gallus</i>	gj 45384044	87	42%	22.096	5.22
Actina Cardíaca / Mancha D	<i>Ambystoma mexicanum</i>	gj 10505177	82	26%	42.060	5.23

Um gel que representa os resultados alcançados pelo trabalho é mostrado na figura 20. Nele é possível observar as manchas selecionadas e suas correspondentes identificações.

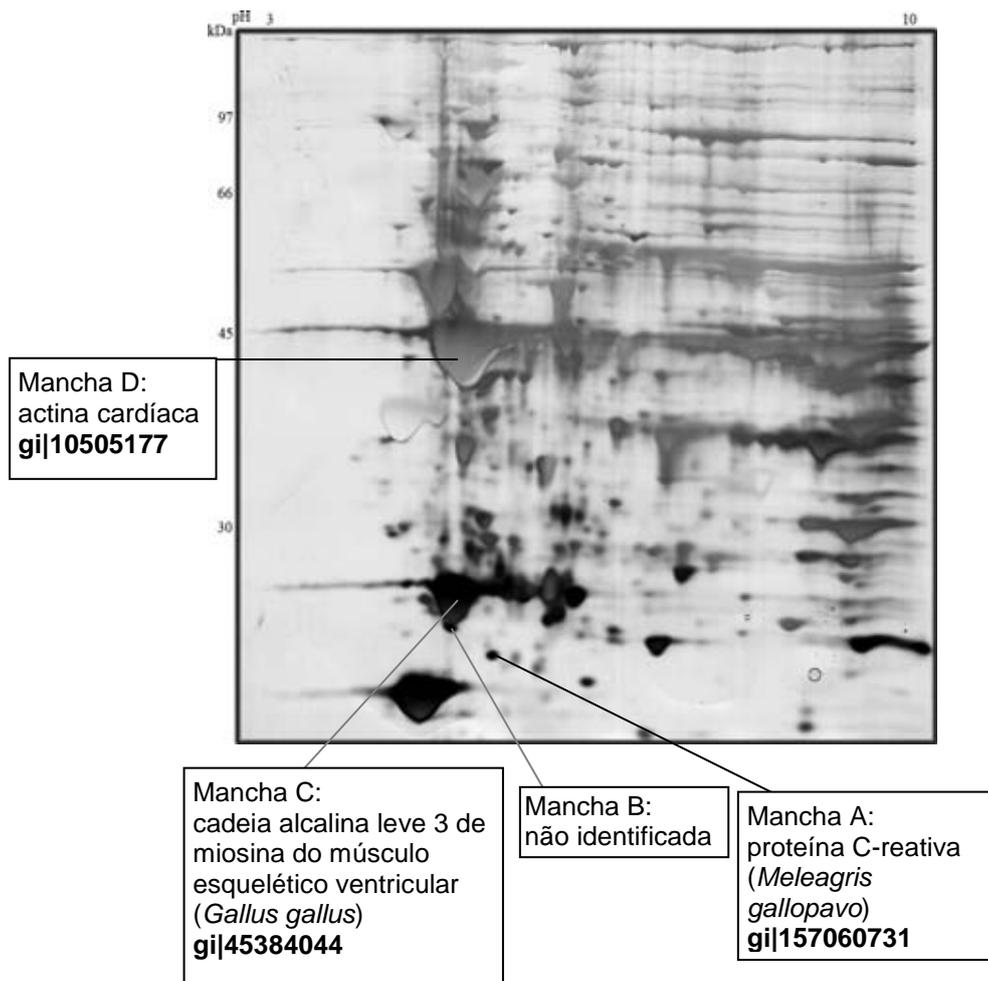


Figura 20. Eletroforese bidimensional do proteoma cardíaco do galo singênicos 035, com integração de kDNA. São indicadas as manchas selecionadas para procedimento de impressão digital do mapa peptídico e o respectivo resultado. Aplicação de 100 µg de amostra e utilização do protocolo 3 de IEF. Coloração por nitrato de prata e malha a 12% T.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados alcançados, foi definida uma metodologia padrão de extração protéica de coração de galos, com resultados satisfatórios. Foram padronizadas as condições para separação das proteínas das amostras de coração de galos por eletroforese bidimensional, adequando-as às características da amostra. Foram obtidos perfis reprodutivos dos géis bidimensionais de galos com e sem integração do kDNA de *T. cruzi*, contribuindo para a comparação das duas situações. Foi realizada a análise digital comparativa dos diferentes perfis bidimensionais obtidos em busca de proteínas condição-específicas ou diferencialmente expressas, selecionando-se duas manchas exclusivas da amostra de galo com integração positiva e duas manchas presentes em ambas condições, para controle positivo da técnica. Foram identificadas três manchas: a proteína C-reativa, cadeia leve 3 de miosina e actina cardíaca. A quarta mancha não rendeu identificação conclusiva. Apesar dos avanços alcançados, ainda não foi possível relacionar diretamente a diferença de expressão com a integração kDNA no genoma hospedeiro a partir dos resultados obtidos.

As otimizações da extração e das condições eletroforéticas realizadas permitiram estabelecer uma metodologia confiável para estudos futuros, facilitando comparações e agilizando o processo de identificação. Com relação à metodologia de trabalho utilizada, pode-se dizer que a comparação de amostras distintas por eletroforese bidimensional é uma técnica viável e aceita pela comunidade científica. Porém, neste trabalho e em outros que buscam identificar uma modificação específica de determinada condição biológica, essa técnica é passível de críticas pela dificuldade de isolamento da variável causadora das modificações encontradas. Portanto, todas as diferenças de expressão identificadas precisam ser muito bem analisadas e confrontadas com suas prováveis causas, a fim de não se cometer equívocos de interpretação dos resultados.

Em adição, a continuidade deste estudo com ampliação do grupo amostral e utilização de seqüenciamento por espectrometria de massa, permitirá identificar

as demais proteínas diferencialmente expressas, assim como mapear quaisquer modificações em suas seqüências.

O mapeamento dessas modificações de seqüências protéicas é importante devido às prováveis conseqüências provocadas pela integração do kDNA no genoma hospedeiro. Dentre elas, há a hipótese de produção de proteínas quiméricas, com seqüências exógenas de *T. cruzi*, a exemplo da figura 4. Outra possibilidade é a ocorrência de supressão da expressão protéica, devido à mutações em promotores, códons iniciadores, efetores ou mesmo na maquinaria de transcrição e tradução. É possível também a expressão de proteínas próprias de ORFs dos minicírculos integrados, caso a região do genoma onde tenha ocorrido forneça as condições de expressão necessárias.

Essas mutações podem ocorrer tanto pelo mecanismo de integração exógena no genoma como pelo mecanismo de mutação intra-específica, utilizando a maquinaria de transposição de elementos tipo LINE, como descrito por Simões-Barbosa *et al.* 2006.

Portanto, somente com a evolução deste trabalho será possível discriminar qual a real conseqüência da integração do kDNA, dentre tantas hipóteses.

6 BIBLIOGRAFIA

Acosta, A. M., C. A. Santos-Buch (1985). *Autoimmune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi*. **Circulation**. 71:1255-1261.

Anderson, N. L., Matheson, A. D. and Steiner, S. (2000). *Proteomics: Applications in basic and applied biology*. **Curr Opin in Biotechnology**. 11(4):408-412.

Andrews, N. W., Hong, K. S., Robbins, E. S., Nussenzweig, V. (1987). *Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol**. 64:474-484.

Andrews, N.W. (2002). *Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship*. **J Cell Biol**. 158:389-394.

Aufderheide, A.C., W. Salo, M. Madden, J. Streit, J. Buikstra, F. Guhl, B. Arriaza, C. Renier, L.E. Wittmers, G. Fornaciari, M. Allison (2004). *A 9,000-year record of Chagas' disease*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 101: 2034-209.

Avila, H.A., Simpson, L. (1995). *Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in Trypanosoma cruzi*. **RNA**. 1:939-947.

Avliyakov, N.K., Hines, J.C., Ray, D.S. (2003). *Sequence elements in both the intergenic space and the 3' untranslated region of the Crithidia fasciculata KAP3 gene are required for cell cycle regulation of KAP3 mRNA*. **Euk Cell**. 2:671-677.

Bahia-Oliveira, L. M., Gomes, J. A., Cancado, J. R., Ferrari, T. C., Lemos, E. M., Luz, Z. M., Moreira, M. C., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R. (2000). *Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection 14- 30 years ago*. **J Infect Dis**. 182:634-638.

Ben Younes-Chennoufi, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Tricottet, V., Eisen, H., Reynes, M., Said, G. (1988). *Persistence of Trypanosoma cruzi antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 82:77-83.

Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. (1982). *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. **J Biochem Biophys Methods**. 6(4):317-39.

Bocchi, E. A., A. Fiorelli (2001). *The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by Trypanosoma cruzi*. *First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology*. **Ann. Thorac. Surg**. 71:1833-1838.

Braga, M.S., Lauria-Pires, L., Arganaraz, E.R., Nascimento, R.J., Teixeira, A.R.L. (2000). *Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives*. **Rev Inst Med Trop**. 42:157-161.

Briones, M.R.S., Souto, R.P., Stolf, B.S., Zingales, B. (1999). *The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity*. **Mol. biochem. parasitol**. 104:219-232.

Brisse, S., Barnabé C., Tibayrenc, M. (2000). *Identification of six Trypanosoma cruzi phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis*. **Int. J. Parasitol**. 30:35-44.

Buckner, F. S., Wilson, A. J., Van Voorhis, W. C. (1999). *Detection of live Trypanosoma cruzi in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase*. **Infect Immun**. 67:403-409.

Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. (1995). *The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells*. **Annu. Rev. Microbiol**. 49:175-200.

Camargo M. M., Almeida I. C., Pereira M. E., Ferguson M. A., Travassos L. R., Gazzinelli R. T. (1997). *Glycosylphosphatidylinositolanchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages*. **J Immunol**. 158:5890–5901.

Carcavallo, R.U. (1999). *Climatic Factors Related to Chagas Disease Transmission*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 94:367-369

Cash, P. (2002). *Proteomics: the protein revolution*. **Biologist**. 2:49.

Cazzulo, J. J. & Frasch, A. C. (1992). *SAPA/ trans-sialidade and cruzipain: two antigens from Trypanosoma cruzi contain immunodominant but enzymatically inactive domains*. **FASEB. J.** 6(14):3259-3264.

Clark, C.G., Pung, O.J. (1994). *Host-specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic Trypanosoma cruzi from North America*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 66: 175-179.

Clayton, C. E. (2002). *Life without transcriptional control? From fly to man and back again*. **EMBO J.** 21:1881-1888.

Coura, J. R., de Castro, S. L. (2002). *A critical review of Chagas disease chemotherapy*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 97: 3-24.

Creemers E. E., Cleutjens J. P., Smits J.F., Daemen M. J. (2001). *Matrix metallo-proteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure?*. **Circ. Res.** 89: 201-210.

Cunha, R.B. (2003). *Caracterização e sequenciamento de peptídeos e proteínas por espectrometria de massa*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília-DF.

Cunha-Neto E., Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myo-sin specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3541-3545.

Cunha-Neto, E., Rizzo, L.V., Albuquerque, F., Abel, L., Guilherme, L., Bocchi, E., Bacal, F., Carrara, D., Ianni, B., Mady, C., Kalil, J. (1998). *Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy*. **Braz J Méd Biol Res.** 31:133–137.

Delogu, G., Signore M., Mechelli A., Famularo G. (2002). *Heat shock proteins and their role in heart injury*. **Curr. Opin. Crit. Care.** 8:411-416.

Docampo, R., S. N. Moreno (1984). *Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on Trypanosoma cruzi*. **Rev Infect Dis.** 6:223-38.

DosReis G. A., Freire-de-Lima C. G., Nunes M. P., Lopes M. F (2005). *The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease*. **Trends Parasitol.** 21:237–243.

Ducharme A., Frantz S., Aikawa M., Rabkin E., Lindsey M., Rohde L. E., et al. (2000). *Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction*. **J. Clin. Invest.**; 106: 55-62.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., et al. (2005). *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. **Science**. 309:409-415.

Emsley, J., White, H.E., O'Hara, B.P., Oliva, G., Srinivasan, N., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Pepys, M.B. and Wood S.P. (1994). *Structure of pentameric human serum amyloid P component*. **Nature**. 367:338-345.

Engel, J.C., P.S. Doyle, J.A. Dvorak (1985). *Trypanosoma cruzi: biological characterization of clones derived from chronic chagasic patients. II. Quantitative analysis of the intracellular cycle*. **J Protozool**. 32: 80-83.

Fabbro De Suasnabar, D., Arias, E., Streiger, M., Piacenza, M., Ingaramo, M., Del Barco, M., Amicone, N. (2000). *Evolutionary behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients*. **Rev. Inst. Med. Trop**. 42:99-109.

Feng, Q., Moran, J., Kazazian, H., Boeke, J.D. (1996). *Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition*. **Cell**. 87:905-916.

Ferreira R., Ianni B., Abel L. C. J., Buck P., Mady C., Kalil J., Cunha-Neto E. (2003). *Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/“indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 98:407–411.

Fornaciari, G., M. Castagna, P. Viacava, A. Tognetti, G. Bevilacqua, E.L. Segura (1992). *Chagas disease in Peruvian Incan mummy*. **Lancet**. 339: 128-129.

Frevert, U., Schenkman, S., Nussenzweig, V. (1992). *Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun**. 60(6):2349-2360.

Furano, A.V., Duvernell, D.D., Boissinot, S. (2004). *L1 (LINE-1) retrotransposon diversity differs dramatically between mammals and fish*. **Trends Genet**. 20:9-14.

Garcia, E. S., P. De Azambuja (2000). *Fisiologia de triatomíneos: Desenvolvimento, reprodução e interação com o Trypanosoma cruzi*. In: **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2.ed. Brener Z., Andrade Z. A., Barral-Neto M. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 41-46.

Gilbert, N., Lutz-Prigge, S., Moran, J.V. (2002). *Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition*. **Cell**. 110:315-325.

Giordanengo, L., C. Maldonado, H. W. Rivarola, D. Iosa, N. Girones, M. Fresno, S. Gea (2000-1). *Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring*. **Eur J Immunol**. 30:3181-3189.

Giordanengo, L., R. Fretes, H. Diaz, R. Cano, A. Bacile, E. Vottero-Cima, S. Gea (2000-2). *Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice*. **Muscle Nerve**. 23:1407-1413.

Gironès N., Cuervo H., Fresno M. (2005) *Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease*. **Curr Top Microbiol Immunol**. 296:89-123.

Gironès, N., Rodriguez, C. I., Carrasco-Marin, E., Hernaez, R. F., de Rego, J. L., Fresno, M. (2001). *Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease*. **J Clin Invest**. 107:985-993.

Gomes J. A., Bahia-Oliveira L. M., Rocha M. O., Martins-Filho O. A., Gazzinelli G., Correa-Oliveira R (2003). *Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response*. **Infect Immun**. 71:1185–1193.

Görg, A., Postel, W., Günther. S. (1988). *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. **Electrophoresis**. 9:531-546.

Graves, P., Haystead, R. T. A. J. (2002). *Molecular Biologist's Guide to Proteomics*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 1:39-66.

Gygi, S. P. and Aebersold, R. (2000). *Mass spectrometry and proteomics*. **Current Opinion in Chemical Biology**. 4:489-494.

Hart, G., Haidaris, C. G., So, M. (1992). *Purification and characterization of stage-specific glycoproteins from Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun**. 60(6):2349-2360.

Harth, G., Mills, A. A., Souto-Padron, T., de Souza, W. (1992). *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72: immunological analysis and cellular localization. **Mol. Cell. Biochem.** 109(1):25-36.

Hontebeyrie-Joskowicz, M., G. Said, G. Milon, G. Marchal, H. Eisen (1987). *L3T4 T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease.* **Eur J Immunol.** 17:1027-1033.

Hoving, S., B. Gerrits, H. Voshol, D. Muller, R.C. Roberts, J. Van Oostrum (2002). *Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients.* **Proteomics.** 2(2):127-134.

Hoving, S., H. Voshol, J. Van Oostrum (2000) *Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels.* **Electrophoresis.** 21(13):2617-2621.

Hyland, K. V., Leon, J. S., Daniels, M. D., Giasis, N., Woods, L. M., Bahk, T. J., Wang, K., Engman, D. M. (2007). *Modulation of Autoimmunity by Treatment of an Infectious Disease.* **Infect. Immun.** 75:3641-50.

Inglessis, I., H. A. Carrasco, N. Anez, C. Fuenmayor, H. Parada, J. A. Pacheco, H. R. Carrasco (1998). *Clinical, parasitological and histopathologic follow-up studies of acute Chagas patients treated with benznidazole.* **Arch Inst Cardiol Mex.** 68:405-410.

Jones, S.A. (2005). *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6.* **J. Immunol.** 175(6):3463-8.

Jonsson, A.P. 2001. *Mass spectrometry for protein and peptide characterisation.* **CMLS.** 58:868-884.

Junqueira, A.C., Degraeve, W., Brandão, A. (2005). *Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi populations.* **Trends Parasitol.** 21:270-272.

Kazazian, H.H., Moran, J.V. (1998). *The impact of L1 retrotransposons on the human genome.* **Nature Genet.** 19:19-24.

Kerner, N., Liegeard, P., Levin, M. J., Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991). *Trypanosoma cruzi: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton.* **Exp Parasitol.** 73:451-459

Kierszenbaum, F. (1996). *Chronic chagasic tissue lesions in the absence of Trypanosoma cruzi: a proposed mechanism.* **Parasitol Today.** 12, 414-415.

Kierszenbaum, F. (1999). *Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis*. **Clin Microbiol Rev**. 12:210-223.

Kirchhoff, L. V., L. M. Weiss, M. Wittner, H. B. Tanowitz (2004). *Parasitic diseases of the heart*. **Front Biosci**. 9:706–723.

Laguens, R. P., P. C. Meckert, J. G. Chambo (1988). *Antiheart antibody-dependent cytotoxicity in the sera from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi**. **Infect Immun**. 56:993-997.

Laguens, R. P., P. M. Cabeza Meckert, J. G. Chambo (1989). *Immunologic studies on a murine model of Chagas disease*. **Medicina**. 49:197-202.

Landfear, S. M. (2003). *Trypanosomatid transcription factors: Waiting for Godot*. **PNAS**. 100:7-9.

Lane, J. E., Olivares-Villagomez, D., Vnencak-Jones, C. L., McCurley, T. L., Carter, C. E. (1997). *Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and in situ hybridization in infected murine cardiac tissue*. **Am J Trop Med Hyg**. 56:588-595.

Lau, D.C., Dhillon, B., Yan, H., Szmítko, P.E., Verma, S. (2005). *Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis*. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. 288(5):H2031–41

Laucella, S. A., E. L. Segura, A. Riarte, and E. S. Sosa. 1999. *Soluble platelet selectin (sP-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) decrease during therapy with benznidazole in children with indeterminate form of Chagas' disease*. **Clin Exp Immunol** 118:423-427.

Lauria-Pires, L., Braga, M.S., Vexenat, A.C., Nitz, N., Simões-Barbosa, A.S., Tinoco, D.L., Teixeira, A.R.L. (2000). *Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives*. **Am J Trop Med Hyg**. 63:43-55.

Leon, J. S., Engman, D. M. (2003). *The significance of autoimmunity in the pathogenesis of chagas heart disease*. **Frontiers in Bioscience**. 8:315-322.

Leon, J. S., Godsel, L. M., Wang, K., Engman, D. M. (2001). *Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas heart disease*. **Infect Immun**. 69:5643-5649.

Levine, M. J., Ferrari, I., Vazquez, M., Franco da Silveira, J., Cano, M. I., Degrave, W., Requena, J. M., Alonso, C., Zingales, B., Gonzalez, A., Hernandez,

R., Ramirez, J. L., Aldao, R. R., Saumier, A., Billaut, A., LePaslier, D., Conhen, D. (1994). *Toward the physical map of Trypanosoma cruzi nuclear genome*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 89(1):17-18.

Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E., Englund, P.T. (2005). *Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA*. **Trends Parasitol**. 21: 363-369.

López, Lyankis, Kaduo Arai, Esther Giménez, Mariela Jiménez, Carmine Pascuzo, Claudina Rodríguez-Bonfante, Rafael Bonfante-Cabarcasb (2006). *C-Reactive Protein and Interleukin-6 Serum Levels Increase as Chagas Disease Progresses Towards Cardiac Failure*. **Rev Esp Cardiol**. 59(1):50-6.

Low, H. P. & Tarleton, R. L. (1997). *Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the Trypanosoma cruzi sialidase superfamily*. **Mol. Biochem. Parasitol**. 88:137-149.

Lukes, J., Guilbride, D.L., Votypka, J., Zikova, A., Benne, R., Englund, P.T. (2002). *Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure*. **Eukaryot Cell**. 1:495-502.

Michailowsky, V., S. M. Murta, L. Carvalho-Oliveira, M. E. Pereira, L. R. Ferreira, Z. Brener, A. J. Romanha, and R. T. Gazzinelli. 1998. *Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother** 42:2549-2556.

Motran, C. C., R. E. Fretes, F. M. Cerban, H. W. Rivarola, E. Vottero de Cima (2000). *Immunization with the C-terminal region of Trypanosoma cruzi ribosomal P1 and P2 proteins induces long-term duration cross-reactive antibodies with heart functional and structural alterations in young and aged mice*. **Clin Immunol**. 97:89-94.

Murta, S. M., C. Ropert, R. O. Alves, R. T. Gazzinelli, and A. J. Romanha. 1999. *In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant Trypanosoma cruzi population*. **Parasite Immunol** 21:535-44.

O'Farrell, P. H. (1975). *High resolution two-dimensional electrophoresis of protein*. **J. Biol. Chem**. 250:4007-4021.

Olivieri, B. P., V. Cotta-De-Almeida, and T. Araujo-Jorge. 2002. *Benznidazole treatment following acute Trypanosoma cruzi infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection.* **Antimicrob. Agents Chemother.** 46:3790-3796.

Ostertag, E.M., Kazazian, H.H. (2001). *Biology of mammalian L1 retrotransposons.* **Ann Rev Genet.** 35:501-508.

Paba, J., Santana, J.M., Teixeira, A.R., Fontes, W., Sousa, M.V., Ricart, C.A. (2004-a). *Proteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi.* **Proteomics.** 4(4):1052-9.

Paba, J., Santana, J.M., Teixeira, A.R.L., Fontes, W., Sousa, M.V., Ricart, C.A. (2004-b). *Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents.* **J Proteome Res.** 3:517-24.

Palomino, S. A., Aiello, V. D., Higuchi, M. L. (2000). *Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and Trypanosoma cruzi antigens.* **Ann Trop Med Parasitol.** 94:571-579.

Pan, A. A. & McMahon-Pratt, D. (1989). *Amastigote and epimastigote stage-specific components of Trypanosoma cruzi characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein.* **J. Immunol.** 143 (3):1001-1008.

Parada, H., H. A. Carrasco, N. Anez, C. Fuenmayor, I. Inglessis (1997). *Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study.* **Int J Cardiol.** 60:49-54.

Park, K.O. 2004. *Proteomic studies in plants.* **J. of Biochemistry and Molecular Biology.** 37:133-138.

Pavlíček, A., Paces, J., Z1ka, R., Hejnar, J. (2002). *Length distribution of long interspersed nuclear elements (LINEs) and processed pseudogenes of human endogenous retroviruses: implications for retrotransposition and pseudogene detection.* **Gene.** 300:189-194.

Pepys, M.B., Hirschfield, G.M., Tennent, G.A., Gallimore, J.R., Kahan, M.C., Bellotti, V., Hawkins, P.N., Myers, R.M., Smith, M.D., Polara, A., Cobb, A.J., Ley, S.V., Aquilina, J.A., Robinson, C.V., Sharif, I., Gray, G.A., Sabin, C.A., Jenvey, M.C., Kolstoe, S.E., Thompson, D., Wood, S.P. (2006). *Targeting C-*

reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. Nature. 440:1217–1221.

Prata, A. (1975). *Natural history of Chagasic Cardiomyopathy.* In: *America Trypanosomiasis Research. Pan Am Hlth Org Sci Publ.* 318: 191-193.

Rabilloud, T. (2002). *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. Proteomics.*2:3-10.

Ramirez, M. I., Ruiz, R. de C., Araya, J.E., da Silveira, J. F., Yoshida, N. (1993). *Involvement of the stage-specific 82 kilodalton adhesion molecule of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. Infect. Immun.* 61(9):3636-3641.

Rattazzi, M., Puato, M., Faggin, E., Bertipaglia, B., Zambon, A., Pauletto, P. (2004). *C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders?. J. Hypertens.* 21(10):1787-803.

Ribeiro dos Santos, R., M. A. Rossi, J. L. Laus, J. S. Silva, W. Silvino, J. Mengels (1992). *Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. J Exp Méd.* 175:29-39.

Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira ARL 1989. Autoimmunity in Chagas disease: specific inhibition of re-activity of CD4+T cells against myosin in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi. *Infect Immun* 57: 2640-2644.

Romanha, A. J., R. O. Alves, S. M. Murta, J. S. Silva, C. Ropert, and R. T. Gazzinelli. 2002. *Experimental chemotherapy against Trypanosoma cruzi infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. J Infect Dis.* 186:823-828.

Rose, J.K.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M., Saranavan, R.S. 2004. *Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. The Plant Journal.* 39:715-733.

Rossi, M. A. *The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease.* (1991). *Int. J. Cardiol.* 30:335-340.

Rothhammer, F., M.J. Allison, L. Nuñez, V. Staden, B. Arriza (1985). *Chagas disease in pre-Columbian South America. Am J Phys Anthropol.* 68: 495-498.

Schwartz, K., Boheler, K. R., de la Bastie, D., Lompre, A. M. , Mercadier, J.J. (1992). *Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload*. **Am. J. Physiol.** 262:364-369.

Segura, M. A., Molina de Raspi, E., Basombrio, M. A. (1994). *Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, Trypanosoma cruzi infected mice after late trypanomicidal treatment*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 89:213-216.

Silveira, J. F. (2000). *Biologia Molecular do Trypanosoma cruzi. In:Trypanosoma cruzi e doença de Chagas (2a. Edição)*. Brener, Z., Andrade, Z.A., Barral Neto, M. (orgs.). Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan Editora.** 128-147.

Simões-Barbosa, A., Argañaraz, A.R., Barros, A.M., Rosa, A.C., Louvandini, P., Nitz, N., D'Souza-Ault, M.R., Nascimento, R.J., Teixeira, A.R.L. (2006). *Hitchhiking Trypanosoma cruzi minicircle DNA affects gene expression in human host cells via LINE-1 retrotransposon*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 101(8):833-843.

Simões-Barbosa, A., Barros, A.M., Nitz, N., Arganaraz, E.R., Teixeira, A.R.L. (1999). *Integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircle sequence in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94:249-252.

Siuzdak, G. (1996). *Mass Analyzers and ion detectors (capítulo 2). Mass spectrometry for biotechnology*. **Academic press em San Diego-Califórnia.**

Smit, A.F.A., Toth, G., Riggs, A.D., Jurka, J. (1995). *Ancestral mammalian wide subfamilies of LINE-1 repetitive sequences*. **J Mol Biol.** 246:401-417.

Sterin-Borda, L., Borda, E. (2000). *Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia*. **Ann NY Acad Sci.** 917:273-280.

Sturm, N.R., Vargas, N.S., Westenberger, S.J., Zingales, B., Campbell, D.A. (2003). *Evidence for multiple hybrid groups in Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.** 33:269-279.

Symer, D.E., Connely, C., Szak, S.T., Capúto, E.M., Cost, G.J., Parmigiani, G., Boeke, J.D. (2002). *Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo*. **Cell.** 110:327-338.

Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M. and Wittner, M. (1992). Chagas' disease. *Clin Microbiol.* 5, 400-419.

Tarleton, A.R.L., Zhang, L. (1999). *Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?*. **Parasitol Today.** 15:94-99.

Teixeira, A.R.L. (2007). *Doença de Chagas e evolução.* 1.ed. **Brasília: UNB.** 309p.

Teixeira, A.R.L., Argañaraz, E.R., Freitas, L.H., Lacava, Z.G., Santana, J.M., Luna, H. (1994-b). *Possible integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircles into the host cell genome by infection.* **Mutat Res.** 305(2):197-209.

Teixeira, A.R.L., Calixto, M.A., Teixeira, M.L. (1994-a). *Chagas' disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice.* **Mut Res.** 305:189-196.

Teixeira, A.R.L., Lacava, Z., Santana, J.M., Luna, H. (1991). *Insertion of Trypanosoma cruzi DNA in the genome of mammal host cell through infection.* **Rev Soc Bras Med Trop.** 24:55-58.

Teixeira, A.R.L., Nascimento, R.J., Sturm, N.R. (2006). *Evolution and pathology in Chagas disease - A Review.* **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 101(5): 463-491.

Teixeira, M. M. & Yoshida, N. (1986). *Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi identified by monoclonal antibodies.* **Mol. Biochem. Parasitol.** 18(3):271-282.

Teixeira, P.C., Iwai, L.K., Kuramoto, A.C., Honorato, R., Fiorelli, A., Stolf, N., Kalil, J., Cunha-Neto, E. (2006). *Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy.* **Braz J Med Biol Res.** 39(12):1549-62.

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

Tostes J. S., Lopes E. R., Pereira F. E., Chapadeiro E. (1994). *Human chronic Chagasic myocarditis: Quantitative study of CD4+ and CD8+ lymphocytes in inflammatory exudates.* **Rev Soc Bras Med Trop.** 27:127-134.

transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94: 367-369.

Urbina, J. A. (2001). *Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments*. **Curr Opin Infect Dis**. 14:733-741.

Van Voorhis, W. C., Schlekewy, L., Trong, H. L. (1991). *Molecular mimicry by Trypanosoma cruzi: the FI-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide*. **Proc Natl Acad Sci**. 88:5993-5997.

Vanhame, L., Pays, E. (1995). *Control of gene expression in trypanosome*. **Microbiology**. 59:223-240.

Villalta, F., Lima, M. F., Ruiz-Ruano, A., Zhou, L. (1992). *Attachment of Trypanosoma cruzi to host cells: a monoclonal antibody recognized a trypomastigote stage-specific epitope on the gp 83 required for parasite attachment*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 182(1):6-13.

Viotti, R., C. Vigliano, H. Armenti, E. Segura (1994). *Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up*. **Am Heart J**. 127:151-162.

Westermeier, R., Naven, T. (2002). *Expression proteomics* (capítulo 2). In: *Proteomics in Practice - A Laboratory Manual of Proteome Analysis*. **Amershan Biosciences Europe GmbH**, Germany.

WHO - World Health Organization (2002). *Control of Chagas' disease: Second report of a WHO Expert Committee*. **WHO Tech Rep Ser**. 905: 1-109.

WHO - World Health Organization (2007). *Statistical Information System Website*. <http://www.who.ch> (Acesso em Junho/2007).

Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L., Hochstrasser, D. F (1996). *From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional gel electrophoresis and amino-acid analysis*. **Biotechnology**. 14:61-65.

Zhang, L., Tarleton, R. L. (1999). *Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease*. **J Infect Dis**. 180:480-486.

Zingales, B., Rondinelli, E., Degraeve, W., Franco da Silveira, J., Levin, M., LePaslier, D., Modabber, F., Dobrokhotov, B., Swindle J., Kelly, J. M., Aslund, L., Hoheisel, J. D., Ruis, A. M., Cazzulo, J. J., Pettersson, U., Frasch, A. C. C. (1997). *The Trypanosoma cruzi genome initiative*. **Parasitology Today**. 13:16-22.