

Helaine Grazielle Santos Vieira

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO E
DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE
TRYPANOSOMA CRUZI SOB O ESTRESSE DE
RADIAÇÃO GAMA**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glória Regina Franco

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Héliida Monteiro de Andrade

Belo Horizonte/MG
Maio de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO E DA
ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI SOB O ESTRESSE DE RADIAÇÃO GAMA**

Helaine Graziele Santos Vieira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glória Regina Franco

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Renato Machado

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Héliida Monteiro de Andrade

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

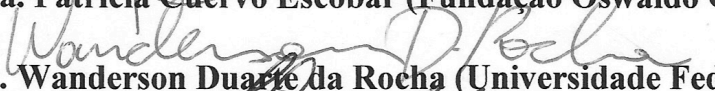
Belo Horizonte – MG

Maio/2014.




ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE HELAINE GRAZIELE SANTOS VIEIRA. Aos dezesseis dias do mês de maio de 2014 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização do perfil proteico e da atividade mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* sob o estresse de radiação gama", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Glória Regina Franco, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Fabiana Simão Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Patrícia Cuervo Escobar (Fundação Oswaldo Cruz-RJ), aprovada; Dr. Wanderson Duarte da Rocha (Universidade Federal do Paraná), aprovada; Dr. Carlos Renato Machado - Co-Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Glória Regina Franco - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de maio de 2014.


 Dra. Patrícia Cuervo Escobar (Fundação Oswaldo Cruz-RJ)

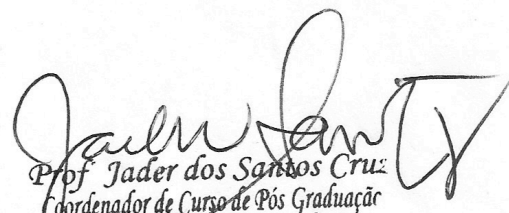

 Dr. Wanderson Duarte da Rocha (Universidade Federal do Paraná)


 Dra. Fabiana Simão Machado (UFMG)


 Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG)


 Dr. Carlos Renato Machado - Co-Orientador (UFMG)

Dra. Glória Regina Franco - Orientadora (UFMG)


 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Eu posso escalar as grandes pedras do meu caminho. São as pequenas que me fazem tropeçar.

Rute Frare

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde, força e perseverança ao longo de todos estes muitos anos de estudo e dedicação às Ciências Biológicas.

À minha família, por todo o apoio e suporte incondicional, por sempre acreditar na minha capacidade de ir além. Um agradecimento especial ao meu irmão, sem ele e sem sua ajuda financeira talvez eu não teria conseguido nem terminar a minha graduação.

À Prof. Dra. Glória Regina Franco, pela acolhida no LGB, pela confiança, a amizade, pelos conselhos e pelos ensinamentos ao longo desses quatro anos sob sua orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Renato Machado, pela co-orientação, importantes discussões de resultados e pelas inúmeras sugestões a este trabalho.

À Profa. Dra. Andrea Mara Macedo, pelas sugestões dadas durante as reuniões de laboratório do LGB.

Às minhas colaboradoras “co-orientadoras” Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade e a Dra. Simone Pires da Fonseca, pelo super apoio com os ensaios de proteômica, pelo carinho, a solicitude, os valiosos conselhos, pelas discussões e sugestões dadas a este trabalho. Agradeço à Dra Héliida especialmente pela confiança em mim e no meu trabalho, por deixar as portas do Lableish abertas para mim no sentido literal, entregando-me a chave do laboratório. E a todos os demais alunos e integrantes do Lableish agradeço o apoio, a amizade e os convites para as festas de fim de ano, que foram ótimas por sinal.

Ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), e em especial à equipe do Laboratório de Radiação Gama (LIG) Timóteo, Omar, Arthur, Pablo, Márcio, Luiz, Perpétua e Lorrane, pela prontidão em me receber para realizar as irradiações. Vou ficar com saudades de ir ao CDTN para jogar conversa fora com os amigos e tomar o cafezinho com queijo, pegar manga e jambo das plantas ao lado de fora do prédio. Irradiar parasitos no CDTN pra mim era um momento de muito trabalho (o preparo das células) e de descontração também, devido a calorosa recepção dos funcionários e do ambiente agradável que é o LIG.

À Profa. Dra Fernanda Ramos Gadelha da UNICAMP e sua equipe, o técnico Luiz Henrique Ribeiro (Kiko) e o Dr. Eduardo Peloso, pela acolhida no

laboratório (Labdat), e o auxílio no desenvolvimento dos ensaios bioquímicos de medida da atividade mitocondrial de *T. cruzi*.

À Neuza Antunes Rodrigues, pela enorme competência em gerenciar o LGB, pela amizade, a prestatividade; sem dúvida alguma ela foi a “pedra angular” para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

À Dra. Priscila Grynberg, pela grandiosa ajuda na execução dos ensaios de qRT-PCR, foram mais de 24 genes (o total de reações foram 8 placas completas de 384 wells... muita coisa), por ter dedicado seu valioso tempo na análise dos dados deste trabalho, pela paciência, pelos conselhos amigos durante meu doutorado sanduíche, por toda ajuda o meu muito obrigada.

À todos os colegas do Laboratório de Genética Bioquímica - LGB, pelos momentos divididos, pela boa convivência, as sugestões durante as reuniões e pelas festinhas de aniversário e de defesa. Aos Gloriosos (alunos da profa. Glória), especialmente o Heron Hilário por ter me ensinado a fazer o primeiro gel 2DE, Mainá Bittar pela importante contribuição nas discussões dos resultados. À amiga e hoje Dra. Daniele Durso, que agora também se tornou uma Gloriosa, agradeço a cumplicidade, o ombro amigo na hora das lamentações, os conselhos e toda a ajuda oferecida ao longo desta trajetória.

Agradeço também aos demais laboratórios, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia e do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por terem sempre aberto as portas pra mim, para utilização de equipamentos e empréstimos de reagentes. Agradecimento especial aos professores Dr. Dawidson e a profa. Dra Sílvia Guatimosin que permitiram meu acesso ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – CAPI para utilização do Typhoon. Ao prof. Dr. Adriano Pimenta responsável pelo Laboratório Multiusário de Biomoléculas onde a espectrometria de massas foi realizada. Ao prof. Dr. Fabrício Rodrigues dos Santos pela utilização da máquina de Real Time 7900HP – Applied Biosystems, prof. Aristóbolo pela utilização do luminômetro. Aos técnicos Daniel, Juliano, Jamil, Eneida e aos secretários do departamento, em especial Celise e Orlando.

Por último, mas de igual importância, gostaria de agradecer ao CNPq pelo provimento das minhas bolsas de doutorado pleno e de doutorado sanduíche (Ciência sem Fronteiras), sem o qual a concretização deste trabalho não seria possível.

Sumário

<i>Lista de Tabelas</i>	<i>x</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>xi</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>xiii</i>
<i>Resumo</i>	<i>xv</i>
<i>Abstract</i>	<i>xvii</i>
1 – Introdução	1
1.1 - Tripanossomíase Americana (doença de Chagas) e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2 - Diversidade gênica e aspectos moleculares de <i>T. cruzi</i>	5
1.3 - O proteoma de <i>T. cruzi</i>	8
1.4 - Radiação ionizante e seus efeitos em <i>T. cruzi</i>	10
1.5 - Vias de reparo em <i>T. cruzi</i>	13
1.6 - Mitocôndria de <i>T. cruzi</i> e estresse oxidativo	15
2 – Objetivos	20
2.1 - Objetivos geral	21
2.2 - Objetivos específicos	21
3 – Materiais e Métodos	23
3.1 - Cultura de <i>T. cruzi</i> clone da cepa CL Brener	24
3.2 - Irradiação das células com raios gama	24
3.3 - Tratamento de <i>T. cruzi</i> irradiado com cicloheximida e puromicina	25

3.4 - Extração de proteínas	25
3.5 - Marcação das proteínas com os fluoróforos CyDye 2, 3 e 5	26
3.6 - Eletroforese bidimensional (2D) DIGE	27
3.7 - Análise das imagens dos géis DIGE	28
3.8 - Excisão de <i>spots</i> e preparação das amostras para espectrometria de massas (MS)	30
3.9 - Identificação das proteínas, curadoria manual e análise estatística	32
3.10 - Medida do consumo de oxigênio	33
3.11 - Determinação da produção de H ₂ O ₂	34
3.12 - Determinação do ATP intracelular de <i>T. cruzi</i> irradiado e não irradiado	34
3.13 - Extração e purificação de RNA total de <i>T. cruzi</i> para síntese de cDNA	35
3.14 - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	36
4 - Resultados	40
4.1 - Avaliação do crescimento de <i>T. cruzi</i> irradiado e tratado com inibidores da tradução	41
4.2 - Obtenção dos extratos protéicos de <i>T. cruzi</i> irradiado e não irradiado	43
4.3 - Análise do perfil protéico de <i>T. cruzi</i> sob o estresse de radiação gama utilizando a metodologia DIGE	44
4.4 - Identificação por espectrometria de massa (MS/MS) das proteínas diferencialmente expressas em <i>T. cruzi</i> após o estresse de radiação gama	47

4.5 - Avaliação das alterações de tamanho das proteínas após a exposição do parasito à radiação gama	59
4.6 - Avaliação da atividade mitocondrial de <i>T. cruzi</i> após radiação gama	62
4.7 - Obtenção de RNA total de <i>T. cruzi</i> irradiado e não irradiado para realização de qRT-PCR	66
4.8 - Análise da expressão gênica em <i>T. cruzi</i> irradiado por qRT-PCR	67
5 - Discussão	73
6 - Conclusões	89
7 - Referências Bibliográficas	92
8 - Anexos	107
Anexo I - Cálculo da eficiência dos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR	109
Anexo II - Curvas de dissociação dos iniciadores dos genes usados nos experimentos de qRT-PCR	111
Anexo III - Manuscrito referente a este trabalho aceito para publicação na revista internacional indexada "PLoS ONE"	118

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Desenho experimental da marcação com os fluoróforos	27
Tabela 2 - Iniciadores para a amplificação por qRT-PCR dos genes teste	38
Tabela 3 - Iniciadores para amplificação por qRT-PCR dos genes normalizadores	39
Tabela 4 - Dados das 53 proteínas identificadas por espectrometria de massas	49

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> no intestino do hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e no hospedeiro vertebrado	3
Figura 2 – Classificação das diferentes linhagens de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 3 – Radiação ionizante e seus efeitos em moléculas biológicas	
Figura 4 – Mecanismos de reparo do DNA	10
Figura 5 – Distribuição subcelular do sistema antioxidante em <i>T. cruzi</i>	18
Figura 6 – Estratégia de análise dos géis DIGE	30
Figura 7 – Curva de crescimento <i>T. cruzi</i> irradiado (500 Gy) e não irradiado (N.I) tratado com cicloheximida 50 µg/mL (A) e puromicina 25 µg/mL (B)	42
Figura 8 - Avaliação da qualidade das proteínas totais de <i>T. cruzi</i> irradiado e não irradiado	44
Figura 9 - Géis 2D DIGE dos extratos de proteínas totais de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> irradiados e não irradiado	45
Figura 10 - Perfil de expressão protéica de <i>T. cruzi</i> ao longo dos tempos após irradiação	46
Figura 11 - Mapa de excisão de <i>Spot</i>	48
Figura 12 - Classificação das proteínas identificadas segundo a função biológica	55
Figura 13 - <i>T. cruzi</i> isoformas de HSP70 e prostaglandina F2 alfa sintase diferencialmente expressas após irradiação	59
Figura 14 - Distribuição dos <i>spots</i> super e subexpresso versus a massa molecular, pI e <i>fold-change</i>	60
Figura 15 - Boxplots do valores de massa molecular observado e esperado de <i>T. cruzi</i> irradiado	62
Figura 16 - Consumo de oxigênio (A), velocidade máxima da respiração (B) em <i>T. cruzi</i> irradiados e não irradiados	63
Figura 17 - Controle respiratório em <i>T. cruzi</i> irradiado e não irradiado	64
Figura 18 - Liberação de peróxido de hidrogênio mitocondrial em	65

parasitos irradiados (500 Gy) e não irradiados (N.I.)	
Figura 19 - Níveis de ATP em <i>T. cruzi</i> irradiado (500 Gy) e não irradiado (N.I.)	66
Figura 20 - Avaliação da qualidade do RNA total de <i>T. cruzi</i> irradiado e não irradiado após tratamento com Dnase e <i>RNeasy</i>	67
Figura 21 - Ct dos genes normalizadores da qRT-PCR	68
Figura 22 - Expressão dos genes do maxicírculo de <i>T. cruzi</i> após radiação gama	69
Figura 23 - Comparação entre os resultados de qRT-PCR e microarranjo da expressão dos genes do maxicírculo de <i>T. cruzi</i> após irradiação	70
Figura 24 - Expressão dos genes nucleares da mitocôndria de <i>T. cruzi</i> após estresse de radiação gama	71
Figura 25 - Expressão dos genes do sistema de defesa antioxidante de <i>T. cruzi</i> após estresse de radiação gama	72

Lista de Abreviaturas

8-oxoG - 7,8-diidro-8-oxoguanina

AP - Apurínicos/Apirimídínicos

ATP - Adenosina Trifosfato

BER – Reparo por excisão de base

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

CCCP - Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone

cDNA - DNA complementar

CHAPS - [*3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio*] -1-propanesulfonate])

Cy3/Cy5 – cianinas 3/cianina 5

ddNTPs - Didesoxirribonucleotídeos

DDT – Ditiotreitól

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNMP – Deoxirribonucleosídeo monofosfato

dNTP - Desoxirribonucleotídeo

dRP - Desoxirribose fosfato

DSB - Quebra de fita dupla de DNA (*Double Strand Break*)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EST - Etiqueta de sequência expressa (*Expressed Sequence Tag*)

Gy – Gray (unidade internacional para medida de absorção de doses de radiação gama)

HO• - Radical hidroxil

HRP - Peroxidase de raiz-forte (*Horseradish peroxidase*)

HR – Recombinação homóloga (*Homologous Recombination*)

kDNA – DNA do cinetoplasto

kGy – kilo-gray

LIT: Triptona de infusão de fígado (*Liver Infusion Tryptone*)

MASP – Mucinas associadas à membrana

mRNA – RNA mensageiro

MS/MS – Espectrometria de massas acoplada (*Tandem Mass Spectrometry*)
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ncRNA – RNA não codificante
NER – Reparo por excisão de nucleotídeo
NHEJ – Recombinação não-homóloga (*Non-Homologous End-Joining*)
nt - nucleotídeo
O₂^{•-} - Radical superóxido
OGG1 - glicosilase 7,8-diidro-8-oxoguanina
pb – Pares de bases
PBS - Tampão Salina Fosfato
qRT-PCR – PCR em tempo real após transcrição reversa (*Real Time quantitative Reverse Transcription PCR*)
ROS - Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
RNA – Ácido ribonucléico
RNA-Seq – Sequenciamento de RNA
SDS – Sódio dodecil sulfato
SRM – Meio de reação padrão (*Standard Reaction Medium*)
SSB – Quebra de fita simples de DNA (*Single Strand Break*)
TA – Temperatura ambiente
APX - Hemoperoxidase ascorbato-dependente
CPX - Peroxiredoxina citoplasmática
MPX - Peroxiredoxina mitocondrial
TLS - Síntese translesão (*Translesion Synthesis*)
TrxR - Tioredoxina redutase
WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

Resumo

O *Trypanosoma cruzi* é considerado um dos eucariotos mais resistentes à radiação ionizante, suportando doses sub-letais de até 1,0 kGy. A radiação ionizante do tipo gama promove a quebra das fitas simples e duplas do DNA, além de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Após a irradiação, os parasitos cessam o seu crescimento por até 96 horas, retomando-o em seguida e atingindo a fase estacionária em até 240 horas após irradiação. O padrão de bandas cromossomais, que são extensamente fragmentadas pela radiação, é restabelecido cerca de 48 horas após o estresse. Para tolerar tais danos, é necessário um eficiente aparato de reconhecimento e reparo de lesões. Neste trabalho, investigamos a radioresistência em *T. cruzi*, mediante a análise do seu perfil de expressão protéica e da sua atividade mitocondrial em diferentes tempos após uma dose de 500 Gy de radiação gama. Utilizando a metodologia 2D-DIGE, foram encontrados 543 *spots* protéicos diferencialmente expressos após a exposição do *T. cruzi* à radiação. A partir destes *spots*, 53 proteínas foram identificadas por espectrometria de massas (MS/MS) e classificadas de acordo com sua função biológica. Analizando a anotação funcional das 53 proteínas, observamos uma tendência para a superexpressão de proteínas com peso molecular abaixo do predito. Esta tendência indica a possível existência de modificações pós-traducionais e/ou de mecanismos de processamento das proteínas identificadas, que geraria polipeptídeos mais curtos do que o predito em resposta à radiação gama. Outras tendências observadas em nossas análises de proteômica incluem alterações nos seguintes processos biológicos: regulação positiva do processo de síntese de proteínas, repressão de proteínas envolvidas no processo de enovelamento (exceto pela indução de duas chaperonas do retículo endoplasmático), repressão das vias de geração de ATP por fosforilação oxidativa, da glicólise, e do metabolismo de aminoácidos. Nossos resultados também indicam que a síntese protéica *de novo* é essencial para a recuperação do *T. cruzi* após o estresse por exposição à radiação gama, pois o tratamento com inibidores de tradução interfere drasticamente no retorno ao crescimento dos parasitos irradiados. Ao avaliarmos a atividade mitocondrial de *T. cruzi*,

verificamos que parasitos irradiados produzem mais ATP do que parasitos não irradiados, além de consumirem mais O₂. Adicionalmente, a análise da expressão gênica de *T. cruzi* irradiado por qRT-PCR mostrou que os genes do maxicírculo mitocondrial foram induzidos após a irradiação. Ambos os resultados indicam uma maior atividade da mitocôndria após o estresse. Entretanto, observamos uma menor produção de H₂O₂ nos parasitos irradiados, indicando assim a existência de um mecanismo eficiente de eliminação de radicais livres. O presente estudo revela a resposta peculiar de *T. cruzi* à radiação ionizante e suscita questionamentos pertinentes sobre como este organismo é capaz de modificar seu perfil de expressão protéica e sua atividade mitocondrial para possibilitar a sobrevivência em condições tão adversas.

Abstract

The *Trypanosoma cruzi* is considered as one of the eukaryotes most resistant to ionizing radiation, enduring sub-lethal doses of up to 1.0 kGy. The ionizing radiation by gamma rays promotes double-strand and single-strand breaks on the DNA and, additionally, generates reactive oxygen species (ROS). After irradiation the parasites cease growing for as long as 96 hours, further resuming growth and reaching the stationary phase no later than 240 hours after irradiation. The pattern of chromosomal bands which are extremely fragmented by radiation exposure is restored approximately 48 hours after the stress. To enable the parasite to tolerate such damage condition, an efficient apparatus to recognize and repair lesions is necessary. In the present work we investigate *T. cruzi* radioresistance by analyzing its protein expression patterns and mitochondrial activity in different time points after a dose of 500 Gy of gamma rays. Using the 2D-DIGE methodology, 543 spots were identified as significantly differentially expressed after *T. cruzi* exposure to radiation. From these 543 spots, 53 different proteins were identified by mass spectrometry (MS/MS) and classified according to biological function. When the functional annotation of these 53 proteins was analyzed, a tendency of overexpression of proteins with molecular weight lower than predicted was observed. This tendency suggests the presence of post-translational modifications and/or processing mechanisms acting upon the identified proteins, leading to the emergence of peptides which are shorter than predicted in response to gamma radiation exposure. Other tendencies observed on proteomic analysis include alterations on the following biological processes: positive regulation of the protein synthesis process, repression of proteins involved with folding processes (except for two endoplasmic reticulum chaperones, which are induced), repression of ATP generation through oxidative phosphorylation, of glycolysis, and of the amino acids metabolism. Our results also indicate that the de novo protein synthesis is essential for *T. cruzi* recovery from gamma radiation exposure, since the treatment with translation inhibitors drastically interferes with the growth resumption on irradiated parasites. When the mitochondrial activity of *T. cruzi*

was evaluated, we verified that irradiated parasites generate higher levels of ATP than their non-irradiated counterparts, with an associated higher O₂ consumption by the former. Additionally, the gene expression analysis of irradiated *T. cruzi* using qRT-PCR showed that genes from the mitochondrial maxicircle were induced after radiation exposure. Both of these results point to a higher mitochondrial activity after irradiation-caused stress. Nevertheless, we have also observed a lower H₂O₂ production by irradiated parasites, thus indicating the existence of an efficient mechanism for free radicals clearance in the organism. The present study unravels the peculiar response of *T. cruzi* to ionizing radiation and evokes questions about the manner in which this organism is capable of performing drastic changes on its protein expression profile and mitochondrial activity to enable its survival in such adverse conditions.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Tripanossomíase Americana (doença de Chagas) e o *Trypanosoma cruzi*

A tripanossomíase americana é endêmica em 21 países da América Latina, entretanto, devido à migração de pessoas infectadas, este quadro de endemia pode se estender a outros países das Américas e do mundo. Estima-se que 15 a 17 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* e 100 milhões de pessoas estejam em risco de infecção nesta região (Coura & Borges-Pereira 2010). Dados recentes indicam que 56.000 novos casos de doença de Chagas são notificados todos os anos, levando cerca de 12.000 pessoas ao óbito por ano. A doença de Chagas é um grave problema médico-social, constituindo uma das principais causas de morte súbita em pessoas ainda em fase produtiva (WHO 2010).

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Este protozoário flagelado e digenético possui uma única mitocôndria e contém uma estrutura denominada cinetoplasto. O parasito apresenta diversas formas evolutivas ao longo do seu complexo ciclo biológico (Figura 1). Nos hospedeiros vertebrados estão presentes as formas amastigota e tripomastigota sanguínea e nos hospedeiros invertebrados as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica. A infecção pelo *T. cruzi* inicia-se quando tripomastigotas metacíclicos são eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor e penetram no local de sua picada invadindo assim as células do hospedeiro. Nos tecidos infectados, o parasito transforma-se em amastigota e passa a replicar por divisão binária. As formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas; estes são liberados no espaço intersticial podendo invadir outras células de qualquer órgão ou tecido, iniciando um novo ciclo de reprodução assexuada. As formas tripomastigotas sanguíneas ao serem ingeridas por triatomíneos transmissores transformam-se em epimastigotas. E por fim, as formas epimastigotas, induzidas pelo baixo teor nutricional do intestino posterior do barbeiro, dão origem a tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (De Souza, 2002; Duszenko *et al.* 2011).

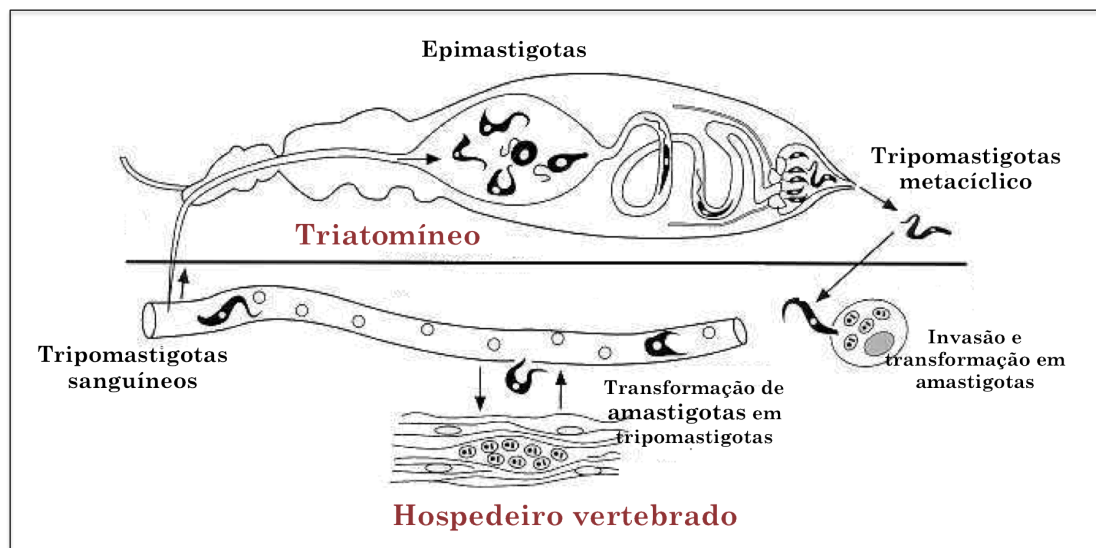


Figura 1 - Ciclo de vida de *T. cruzi* no intestino do hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e no hospedeiro vertebrado. No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas dos parasitos se diferenciam em epimastigotas que se multiplicam e migram para o reto do inseto. Na porção final do intestino do hospedeiro invertebrado as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, forma infectante do hospedeiro vertebrado. Durante o repasto sanguíneo, fezes de triatomíneos contendo tripomastigotas metacíclicos são eliminadas na pele e ou mucosa do hospedeiro vertebrado. Uma vez em contato com a corrente sanguínea, os parasitos podem invadir uma ampla variedade de células incluindo macrófagos, músculo do coração e do tecido nervoso, onde se transformam em amastigotas e replicam por divisão binária. Estas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberados na corrente sanguínea após a lise da célula hospedeira. Tripomastigotas circulantes podem invadir outras células ou serem absorvidos novamente pelo hospedeiro invertebrado no repasto sanguíneo. Adaptado de Medical Microbiology. 4^a ed. Cap. 82.

No Brasil, dentre as principais espécies vetoras da doença de Chagas estão o *Triatoma infestans* e o *Triatoma brasilienses*. Medidas de controle vetorial, assim como o controle nas doações de sangue e de hemoderivados proporcionaram uma importante redução na transmissão da doença (Costa *et al.*, 2003). Atualmente as formas de transmissão vertical (congênita) e oral ganharam importância epidemiológica, sendo responsáveis pela maior parte dos novos casos identificados (Ministério da Saúde, 2010).

Em sua fase inicial, a doença de Chagas é caracterizada por alta parasitemia, manifestações locais, chagoma de inoculação e sintomas variados como febre, edema localizado e generalizado, poliadenia, hepatomegalia e esplenomegalia (Rassi Jr *et al.*, 2010). A infecção avança para uma fase crônica,

em que se observa um decaimento dos níveis de parasitemia e persiste pelo resto da vida do paciente. Os sobreviventes passam por uma fase assintomática que pode durar de 10 a 30 anos, até começarem, eventualmente, a apresentar sintomas que caracterizem a forma cardíaca, digestiva, cardio-digestiva ou nervosa da doença (Tanowitz *et al.*, 1992).

Existe uma variação regional da doença de Chagas, quanto a severidade, prevalência e ciclos de transmissão. Na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela, a doença de Chagas é caracterizada pela presença dos ciclos doméstico, peridomiciliar e selvagem, com zonas de alta prevalência de infecção humana e a presença de miocardiopatia e alterações digestivas (com exceção da Venezuela). Já na Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá, os ciclos de transmissão são os mesmo, doméstico, peridomiciliar e selvagem, porém, os pacientes com doença de Chagas crônica não apresentam anomalias digestivas. Em Belize, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, México e mesmo nos Estados Unidos, a doença de Chagas tem principalmente ciclo silvestre e há pouca informação disponível sobre as manifestações clínicas agudas e crônicas (Coura & Viñas, 2010). Esta distribuição geográfica das formas clínicas e dos ciclos de transmissão da doença pode estar relacionada à diversidade das cepas do parasito nestas regiões (Rassi Jr *et al.*, 2010).

Ainda não existe uma vacina contra *T. cruzi* e o tratamento da doença de Chagas se restringe principalmente ao uso de duas drogas, como o nifurtimox e o benzonidazol, que têm eficácia limitada e promovem severos efeitos colaterais. Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para prevenção, ou tratamento da doença (Garg & Bhatia, 2005).

1.2 - Diversidade gênica e aspectos moleculares de *T. cruzi*

A divergência clonal é um dos principais fatores na geração da diversidade entre as cepas de *T. cruzi*, uma vez que a reprodução assexuada é prevalente nesse organismo. Em organismos assexuados é esperada grande divergência entre alelos como resultado do acúmulo independente de mutações a partir de seu ancestral (Tibayrenc *et al.*, 2002). No entanto, em *T. cruzi*, estudos com microssatélites e genes nucleares mostraram um excesso de alelos homocigotos na maioria das cepas desse organismo. Essa homocigose pode ser explicada devido à ação da troca genética, da conversão gênica e da recombinação mitótica (Machado & Ayala, 2001; Macedo *et al.*, 2004).

As diversas cepas de *T. cruzi* foram recentemente reclassificadas em seis linhagens filogenéticas denominadas *T. cruzi* I, II, III, IV, V e VI (Figura 2). A cepa CL Brener, uma linhagem híbrida de dois genomas haplótipos, está dentro do grupo *T. cruzi* VI, segundo esta classificação. Os critérios para a classificação destas cepas consideram tanto fatores eco-epidemiológicos, quanto a utilização de vários marcadores moleculares (Zingales *et al.*, 2009).

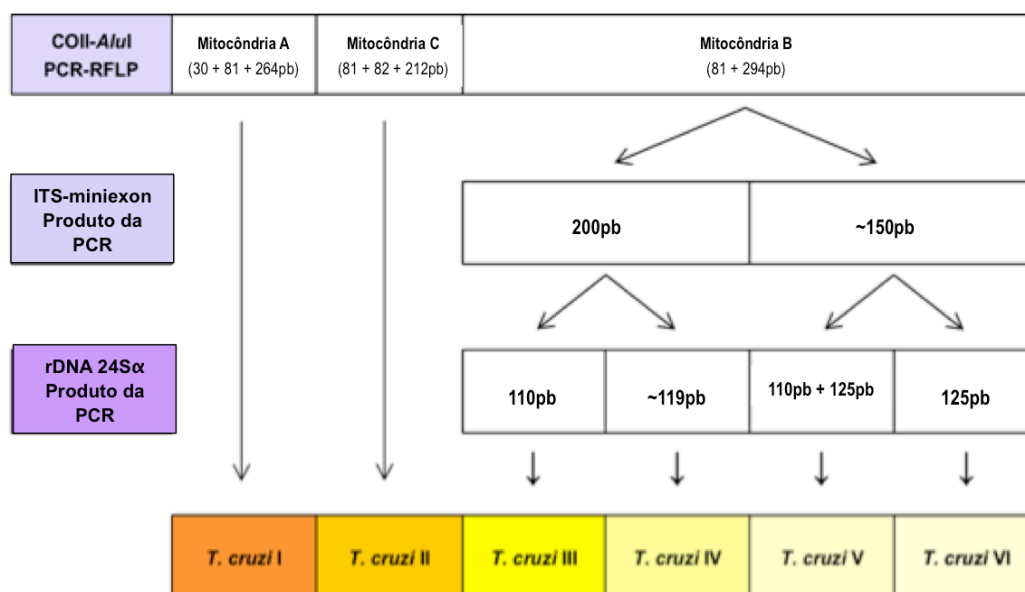


Figura 2 - Classificação das diferentes linhagens de *T. cruzi*. Segundo Zingales e colaboradores, três ensaios com marcadores moleculares são utilizados na tipagem de *T. cruzi*, que somado aos fatores eco-epidemiológicos, permitem classificar as diferentes linhagens em grupos de I a VI.

Em 2005 a sequência completa do genoma de um clone obtido da cepa CL Brener de *T. cruzi* foi publicada (El-Sayed *et al.*, 2005). Esta cepa foi selecionada como referência para o projeto genoma por ser muito bem caracterizada biologicamente e experimentalmente, objetivando assim facilitar comparações com os dados gerados no projeto de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de CL Brener que estava em andamento à época (Brandao *et al.*, 1997, Verdun *et al.*, 1998).

A anotação da sequência completa do genoma do clone da cepa CL Brener indicou a existência de 22.570 genes codificando proteínas, desse total, 6.159 representam alelos presentes no haplótipo Esmeraldo e 6.043 provenientes do haplótipo não-Esmeraldo. Cerca de 10.368 sequências não foram relacionadas a nenhum haplótipo em particular. Deste total, foi possível sugerir a função de 50,8% das sequências preditas com base na literatura e em resultados de similaridade com proteínas já caracterizadas, ou pela presença de domínios funcionais característicos (El-Sayed *et al.*, 2005). Entretanto, mais de 5.900 genes

ainda têm função desconhecida e futuras caracterizações são necessárias. O grande número de elementos repetitivos, retrotransposons, e repetições subteloméricas no genoma de *T. cruzi* dificultaram a montagem de genes codificantes de proteínas, sendo que eles respondem por pelo menos 50% do genoma de CL Brener (El-Sayed *et al.*, 2005). A finalização do genoma do *T. cruzi* e sua comparação com os genomas de *Trypanosoma brucei* (Berriman *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (Ivens *et al.*, 2005) ampliaram os conhecimentos sobre o genoma e o controle da expressão gênica nesses organismos.

Os Kinetoplastideos apresentam características biológicas únicas em relação à expressão gênica, provavelmente por terem divergido cedo na linhagem evolutiva que originou os demais eucariotos (Vickerman, 1994). Um número muito reduzido de promotores gênicos foi caracterizado, sendo o controle da expressão gênica principalmente em nível pós-transcricional. Os tripanosomatídeos têm o genoma organizado em longos grupos ou *clusters* gênicos direcionais, co-transcritos em longas unidades policistrônicas (El-Sayed *et al.*, 2005, Martinez-Calvillo *et al.*, 2003). O processamento das unidades policistrônicas em mRNA monocistrônicos ocorre pelo mecanismo de *trans-splicing* (Kramer, 2012). Dois eventos de clivagem são necessários na geração de mRNA monocistrônicos maduros, que resultam na adição de uma sequência de 39 nt denominada mini-éxon ou *spliced-leader* contendo o CAP na extremidade 5' e adição de cauda poli-A na extremidade 3' dos transcritos (Martinez-Calvillo *et al.*, 2010).

Recentemente, o sequenciamento de RNAs (RNA-seq) em *Trypanosoma brucei* permitiu identificar novas sequências de RNAs não codificadoras (ncRNAs) que têm um papel importante na estabilidade dos mRNAs e no controle da tradução. Dentre as diversas funções designadas aos ncRNAs estão o controle da resposta ao estresse, regulação metabólica e da patogenicidade, demonstrando assim sua grande importância no controle da expressão gênica em tripanosomatídeos (Michaeli *et al.*, 2012). Em adição, modificações pós-traducionais como glicosilações e fosforilações também desempenham importante papel na modulação das funções das proteínas nesse parasito (Atwood *et al.*, 2006; Nakayasu *et al.*, 2009).

Considerando as peculiaridades da regulação da expressão gênica em *T. cruzi*, a análise proteômica torna-se uma poderosa ferramenta para estudo de expressão diferencial de resposta a estresse e resistência a medicamentos.

1.3 - O proteoma de *T. cruzi*

A proteômica compreende a identificação e análise quantitativa das proteínas codificadas pelos genes expressos nos diferentes tecidos, ou estágios de desenvolvimento de um organismo. Seus objetivos envolvem não só a investigação de proteínas individuais, mas também a análise em larga escala de proteínas em amostras biológicas, o mapeamento da interação entre diversas proteínas e a contextualização biológica dessas interações (Bensmail & Haoudi, 2003, Panisko *et al.*, 2002).

A aplicação da tecnologia proteômica em tripanossomatídeos é necessária, uma vez que o conhecimento do genoma por si só, assim como os mecanismos que controlam a sua expressão, não elucidam todos os processos biológicos que regulam o ciclo de vida desses parasitos. Paba e colaboradores 2004 a, 2004 b publicaram os primeiros estudos de análise comparativa entre as formas evolutivas tripomastigota sanguínea, amastigota e epimastigota do *T. cruzi*, utilizando a técnica proteômica que envolve a combinação de eletroforese bidimensional (géis 2-DE), espectrometria de massas e análise computacional. Neste trabalho, 19 proteínas foram identificadas, incluindo as proteínas de choque térmico (HSP 60, HSP 70 e HSP 90), fatores de alongação, proteínas do metabolismo (enolase, piruvato cinase e 2,3-bisfosfoglicerato mutase) e proteínas estruturais (KMP11, tubulinas e componentes da estrutura paraflagelar). Os resultados mostraram que grande parte das proteínas identificadas apresentaram expressão conservada entre as formas evolutivas. Algumas proteínas estavam mais expressas apenas em um determinado estágio evolutivo, como exemplo, as proteínas da estrutura paraflagelar, que se mostraram mais abundantes nas formas móveis do parasito (Paba *et al.*, 2004 a e 2004 b).

Parodi-Talice e colaboradores (2004), utilizando também géis 2-DE e espectrometria de massas para analisar a fase epimastigota de *T. cruzi* identificaram outras 45 proteínas, dentre elas, desidrogenases, 3-fosfoglicerato cinase, cistationa β -sintase, triparedoxina peroxidase e peroxiredoxina, além de proteínas relacionadas ao ciclo celular (Parodi-Talice *et al.*, 2004). De forma complementar, uma análise quantitativa das proteínas das formas tripomastigota e amastigota, empregando marcadores isotópicos (ICAT), seguido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, identificou 29 proteínas com níveis semelhantes de expressão, enquanto nove proteínas foram predominantes na forma tripomastigota e três em amastigota (Paba *et al.*, 2004 a, b).

Em 2005, através da cromatografia líquida multidimensional seguida de MS/MS, foi possível identificar 2.784 proteínas das formas tripomastigota metacíclica, amastigota, tripomastigota e epimastigota de *T. cruzi*, correspondentes a 1168 grupos protéicos do genoma anotado do parasito. Nesse estudo foi observada a diminuição de proteínas ribossomais no proteoma das formas tripomastigota metacíclica, que é consistente com o estado estacionário e não replicativo desta forma. Das 50 proteínas identificadas exclusivamente na forma tripomastigota metacíclica, 30 pertenciam à família das trans-sialidases, que são proteínas capazes de transportar ácido siálico do hospedeiro vertebrado para o parasito. Pode-se ressaltar ainda as diferentes fontes energéticas requeridas nos estágios do ciclo de vida do parasito; como os ácidos graxos para a forma amastigota, devido à ausência aparente de transportadores de glicose, e histidina para os estágios presentes no inseto vetor (Atwood *et al.*, 2005). Posteriormente, a análise de glicoproteínas de *T. cruzi*, que são biomoléculas cruciais para o reconhecimento celular, invasão da célula hospedeira e evasão imune, permitiu a identificação de 36 sítios de glicosilação em 35 peptídeos correspondentes a 29 glicoproteínas. Este estudo identificou pela primeira vez 11 glicoproteínas específicas de *T. cruzi* e evidenciou que a família das proteínas mucinas associadas à proteínas de superfície (MASP) são modificadas pós-traducionalmente por ligações *N*-glicosídicas (Atwood *et al.*, 2006).

Recentemente várias estratégias utilizadas de proteômica em *T. cruzi* possibilitaram a identificação de proteínas modificadas após a tradução. Ferella e colaboradores em 2008, no intuito de encontrar novas proteínas e suas possíveis localizações, analisaram proteínas de várias organelas (glicosomo, acidocalcissomo, reservossomo, mitocôndria, retículo endoplasmático e flagelo) de *T. cruzi* da forma epimastigota, clone da cepa CL Brener. Nos resultados da análise foram encontradas várias isoformas da mesma proteína, indicando haver possíveis modificações pós-traducionais. Resultado semelhante também foi encontrado em outra análise proteômica da mesma cepa realizado por Sodré e colaboradores em 2009 (Ferella *et al.*, 2008; Sodré *et al.*, 2009).

A busca por proteínas modificadas pós-traducionalmente em *T. cruzi* produziu uma análise fosfoproteômica do estágio epimastigota. Cerca de 237 fosfopeptídeos de 119 proteínas distintas foram identificados e 220 locais de fosforilação foram mapeados: 148 em resíduos de serina, 57 em treonina e 8 em tirosina (Nakayasu *et al.*, 2009). Um trabalho recente ampliou ainda mais o banco de dados de fosfoproteínas e nesta análise foi possível identificar 1.511 novos locais de fosforilação em proteínas do *T. cruzi* (Marchini *et al.*, 2011). Estes resultados fornecem novas perspectivas dentro dos mecanismos moleculares regulados por proteínas cinases e fosfatases, sendo que as proteínas cinases são excelentes alvos para tratamento de doenças.

1.4 - Radiação ionizante e seus efeitos em *T. cruzi*

A radiação ionizante é um tipo de radiação que possui energia suficiente para remover elétrons dos átomos. Os núcleos dos átomos instáveis são fontes de radiação, pois estes átomos radioativos (radioisótopos), para se tornarem mais estáveis emitem partículas subatômicas e fótons de alta energia (raios gama). Este processo é chamado de decaimento radioativo e pode surgir naturalmente ou por atividades humanas, tais como a divisão de átomos em um reator nuclear (Unscar, 2000). Os principais tipos de radiação emitidas como resultado de um decaimento espontâneo são: partículas alfa, beta e raios gama. Raios X, um outro

tipo de radiação ionizante, surgem a partir de processos fora do núcleo. Os raios gama são muito penetrantes (Figura 3) e podem facilmente passar através do corpo humano ou serem absorvidos pelo tecido, constituindo assim, um risco de radiação para o corpo inteiro.

Tipos de radiação ionizante e seu efeito no DNA

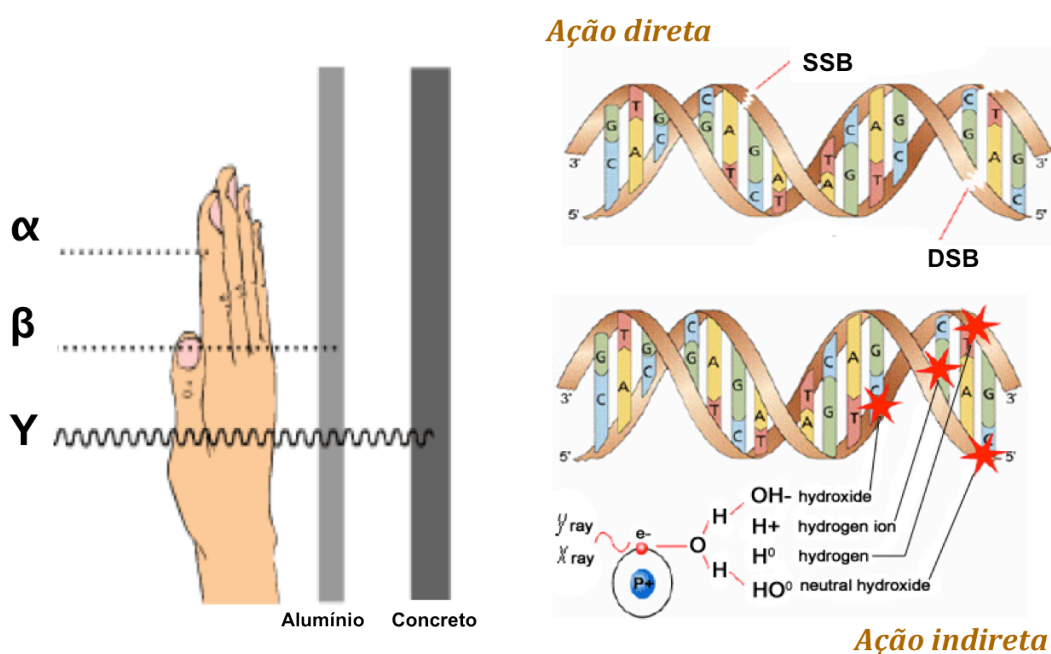


Figura 3 – Radiação ionizante e seus efeitos em moléculas biológicas. Dentre os diferentes tipos de radiação ionizante a radiação gama é a mais penetrante e danosa ao homem, podendo ser letal mesmo em doses bem pequenas. A molécula de DNA pode ser danificada devido ao contato direto com os raios ionizantes (o que gera as quebras de fita dupla no DNA), ou indiretamente, pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas. Na ação direta, partículas alfa, beta, gama ou partículas de raios-x geram íons que podem romper fisicamente uma ou ambas as ligações fosfodiéster (entre nucleotídeos) e ligações de hidrogênio no DNA (entre as bases nitrogenadas A,T, C e G). Na ação indireta, ROS, principalmente radicais hidroxila, são capazes de oxidar e danificar moléculas biológicas tais como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos (Adaptado de <http://team3rocksz.blogspot.com.br/>).

A radiação ionizante é capaz de causar quebras de fita simples (SSB) ou dupla (DSB) no DNA, sendo as DSBs letais se não forem reparadas (Pfeiffer *et al.*, 2000). Outro efeito causado pela radiação ionizante é o estresse oxidativo, devido à produção de radicais hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultante da radiólise da água (Figura 3). Uma vez que a

molécula de DNA está intimamente associada com a água, a produção de radicais hidroxila resulta em danos que vão além das DSBs, tais como oxidação de bases nitrogenadas e açúcares (Hutchinson, 1985; Riley, 1994). Aproximadamente 75-80% dos danos biológicos causados por este tipo de radiação é mediado pela formação de radicais hidroxila, que são capazes de reagir com muitas moléculas biologicamente relevantes. Cada aminoácido reage de forma diferente com HO• e os mecanismos precisos desta reação são pouco conhecidos (Anitori, 2012).

O *T. cruzi* é um dos organismos eucarióticos mais resistentes à radiação ionizante. Formas epimastigotas são capazes de tolerar doses de radiação de até 1 kGy (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Para efeito de comparação, uma radiografia de tórax gera em torno de 1 mGy e apenas 5 Gy de radiação ionizante pode matar o ser humano. Estima-se que uma dose de 5.000 Gy é capaz de gerar centenas de quebras nas fitas de DNA de um organismo (~ 0.005 DSB/Gy/Mbp de um genoma haplóide), caracterizando assim a importante capacidade de radioresistência do parasito.

Vários procariotos apresentam resistência maior que *T. cruzi*, dentre eles inúmeras espécies do gênero *Deinococcus*, especialmente a *D. radiodurans*, que não perde a viabilidade mesmo após dose de 15 kGy (Liu *et al.*, 2003), e *Kineococcus radiotolerans* que retoma o crescimento 100 horas após uma dose de 20 kGy (Bagwell *et al.*, 2010). Através da análise de microarranjo em *D. radiodurans* foi possível observar que nos primeiros momentos após a irradiação, os genes envolvidos na replicação do DNA, no reparo, na recombinação, no metabolismo da parede celular e no transporte celular foram induzidos (Liu *et al.*, 2003).

Recentemente, um estudo em larga escala foi realizado para investigar o padrão de expressão gênico de *T. cruzi* em resposta à radiação gama. Utilizando microarranjos de DNA, o perfil transcricional de epimastigotas irradiadas e não irradiadas foram comparadas em diferentes tempos (0, 4, 24, 48 e 96 horas) após irradiação. Foram encontrados 273 genes diferentemente expressos, destes 160 foram superexpressos e 113 subexpressos. A maioria dos genes com funções preditas estavam subexpressos. A tradução e as vias que geram precursores

metabólicos e energia foram afetadas. Já a categoria que compõem os genes superexpressos, estava composta por sequências obsoletas incluindo alguns genes do kDNA, genes codificantes para proteínas hipotéticas e retrotransposons. Com relação aos genes de reparo, apenas a DNA tirosil-fosfodiesterase 1, envolvida no reparo de DSB foi superexpresso após irradiação (Grynberg *et al.*, 2012). Não podemos afirmar, entretanto, que o mesmo padrão ocorra para a expressão de proteínas pelo parasito em resposta ao estresse, lembrando que nesses organismos os mecanismos de controle da expressão gênica são principalmente pós-transcricionais e mesmo traducionais.

1.5 - Vias de reparo em *T. cruzi*

Os mecanismos de reparo de DNA são fundamentais para a manutenção da fidelidade e integridade do genoma de um organismo. Da mesma forma, mecanismos envolvidos na geração de variabilidade genética em *T. cruzi*, como a taxa de mutação e recombinação homóloga, estão diretamente relacionados com a manutenção da estabilidade genômica nesses parasitos (HAKEM, 2008). Além dos agentes exógenos (por exemplo a radiação ionizante), a molécula de DNA também é susceptível a danos causados por fatores endógenos, ou seja, produtos metabólicos intrínsecos (por exemplo ROS) gerados pelo próprio organismo. Na figura abaixo estão alguns exemplos de agentes que promovem danos ao DNA e possíveis consequências se esses danos não forem reparados.

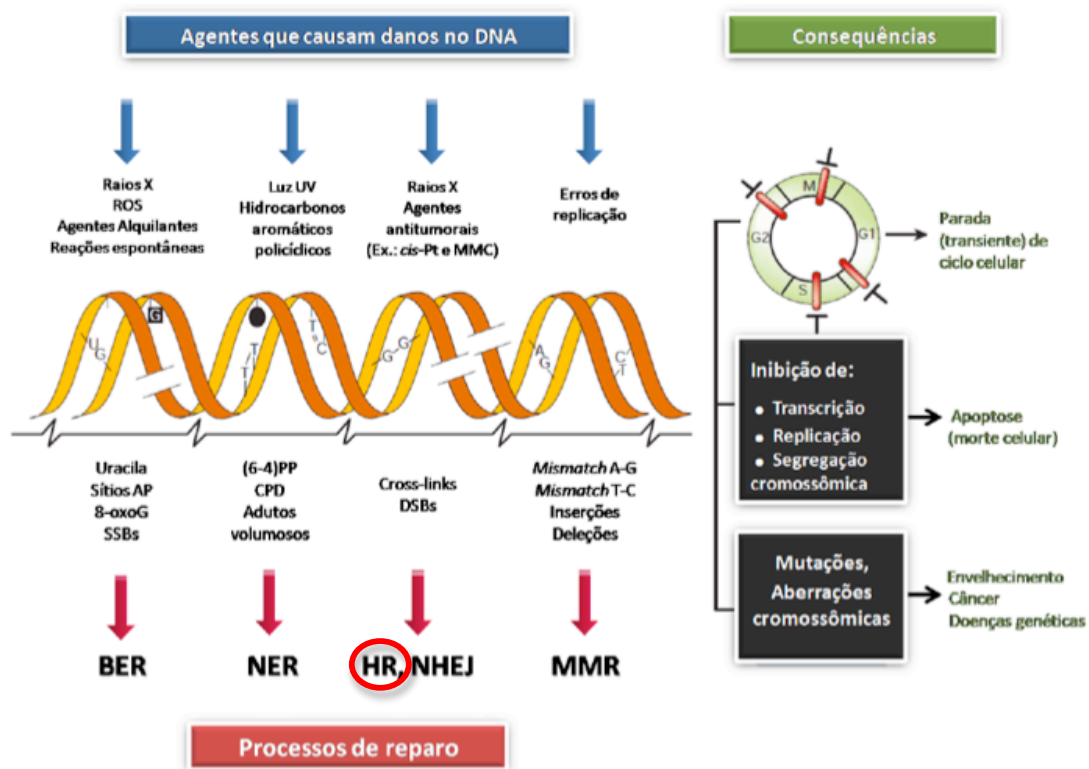


Figura 4 – Mecanismos de reparo do DNA. Agentes causadores de danos no DNA, mecanismos de reparo envolvidos e as consequências se o dano não for reparado. A recombinação homóloga (HR) é a via responsável pelo reparo de DSBs em *T. cruzi* (Adaptado de Hoeijmakers, 2001).

Em *T. cruzi* todas as vias de reparo (reparo de DNA por excisão de base - BER, por excisão de nucleotídeo - NER, por erro de pareamento, por via direta, síntese translesão e reparo de quebras de fita dupla de DNA) estão presentes (Passos-Silva *et al.*, 2010). No reparo de DSB duas vias distintas e bastante conservadas evolutivamente existem: recombinação homóloga (HR) e não-homóloga (*non-homologous end-joining* - NHEJ) (Shrivastav *et al.*, 2008).

Nos eucariotos inferiores a recombinação homóloga é a principal via de reparo de DSB (Figura 4). Os componentes essenciais desta via foram identificados no genoma de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, tais como as proteínas envolvidas nos primeiros passos da HR: MRE11, RAD50, NSB1 e RPA. As recombinases, RAD51 e DMC1 atuam no passo central da HR que é o emparelhamento de DNA homólogo e a reação de troca das fitas. RAD51 foi caracterizada nos três tripanosomatídeos, sendo sua expressão induzida em *T. cruzi* e *L. major* quando há danos no DNA (Passos-Silva *et al.*, 2010).

Na recombinação não-homóloga (NHEJ) o reparo da molécula de DNA ocorre sem a necessidade de existir qualquer similaridade entre as fitas a serem reparadas. Esta via parece estar ausente em tripanosomatídeos, uma vez que apenas quatro de oito genes pertencentes à via NHEJ (Mre11, Rad50, KU70 e KU80) foram identificados (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005).

Regis da Silva e colaboradores (2006), observaram que além de suportar a altas doses de radiação gama, com mais de 50% de sobrevivência, 48 horas após a irradiação as bandas cromossômicas dos parasitos irradiados que estavam fragmentadas é completamente restabelecida. Evidenciando assim, um poderoso sistema de reparo atuante em *T. cruzi* frente ao estresse de radiação. Ademais, vários trabalhos foram e ainda estão sendo desenvolvidos por nosso grupo, no intuito de caracterizar genes do parasito envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA (Augusto-Pinto *et al.*, 2001; Augusto-Pinto *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2006; Regis-da-Silva *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2008; Machado-Silva *et al.*, 2008; De Moura *et al.*, 2009; Rajao *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2011). Um destes genes de reparo, o RAD51, (principal via responsável pelo reparo de DSB em *T. cruzi*), foi caracterizado em *T. cruzi* (TcRAD51). A linhagem do parasito superexpressora de RAD51 foi capaz de reparar as lesões de quebra de fita dupla do DNA mais rapidamente, sendo que as bandas cromossômicas começaram a ser reconstituídas 6 horas após irradiação e foram completamente restabelecida 24 horas após a irradiação (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Em outro estudo de superexpressão em *T. cruzi*, a TcPol κ (DNA polimerase kappa), uma polimerase de baixa fidelidade, conferiu ao parasito maior resistência à radiação gama e à zeocina, outro agente causador de DSBs (Rajão *et al.*, 2009).

1.6 - Mitocôndria de *T. cruzi* e estresse oxidativo

A mitocôndria única existente em tripanossomatídeos é caracterizada por conter uma região especializada, o cinetoplasto, que concentra o DNA mitocondrial (kDNA) e representa 20 a 30% do DNA celular total. O kDNA é uma

rede densa composta por 20 a 50 maxicírculos e milhares de minicírculos. Os maxicírculos são o equivalente ao DNA mitocondrial funcional de outros eucariotos e apresentam os seguintes genes: 9S mitocondrial, 12S ribossomal, genes das subunidades I, II e III da citocromo c oxidase, NADH desidrogenase 1, 3, 4, 5, 7, 8 e 9; subunidade 6 da ATP sintase, apocitocromo b, proteína ribossomal 12S e vários outros genes com função desconhecida (Carranza *et al.*, 2009). Esta organela está envolvida não só na síntese de ATP aeróbico através da fosforilação oxidativa, mas também no equilíbrio redox celular, sendo uma das principais fontes de geração de ROS na célula (Gonçalves *et al.*, 2011).

Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram estratégias para lidar com os danos oxidativos gerados pelo próprio metabolismo, assim como danos exógenos. A primeira linha de defesa contra ROS é a inativação enzimática dos superóxidos pela superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidases e a inativação dos peróxidos de hidrogênio pela catalase. Uma segunda linha de defesa é a ação de enzimas que hidrolisam dNTPs oxidadas, prevenindo a incorporação de danos nas bases, como exemplo temos a conversão de 8-oxodGTP para o correspondente dNMP. A terceira linha de defesa é a reparação do dano oxidativo através dos diversos mecanismos de reparo do DNA (Slupphaug *et al.*, 2003). Desde bactérias a eucariotos, o reparo de danos endógenos no DNA é realizado predominantemente pelo reparo de excisão de bases (BER).

T. cruzi apresenta as enzimas necessárias para executar o BER eficazmente (El-sayed *et al.*, 2005). A via do BER consiste em várias etapas: reconhecimento de bases danificadas, remoção, clivagem do esqueleto açúcar-fosfato, excisão de sítios AP, síntese de DNA e ligação (Robertson *et al.*, 2009). Algumas glicosilases já foram caracterizadas em *T. cruzi*, como a Uracyl-DNA glicosilase (TcUNG), um homólogo funcional da glicosilase 7,8-diidro-8-oxoguanina (OGG1) (Furtado *et al.* 2012) e a AP endonuclease 1 (Passos-Silva *et al.*, 2010). Também foram caracterizadas as proteínas pol β e pol β -PAK ambas com atividades DNA polimerase e dRP liases, sendo localizadas de forma incomum na mitocôndria. A TcPol β -PAK realiza síntese através de 8-oxoG e a TcPol β discrimina entre dNTPs e ddNTPs. Estas polimerases parecem contribuir

para a manutenção da integridade do DNA mitocondrial, pela atuação em mecanismos múltiplos como o BER, preenchimento de gaps e síntese translesão (Lopes *et al.*, 2008).

Com relação ao sistema de defesa antioxidante, *T. cruzi* apresenta mecanismos bastantes peculiares. Os tripanosomatídeos possuem superóxido dismutase (SOD), mas não apresentam catalase e nem glutathione peroxidase, assim como outros organismos. O fluxo de equivalentes redutores vai da tripanotiona à triparedoxina (TXN) e finalmente à H_2O_2 via triparedoxina peroxidase (Figura 5). Este sistema é menos eficiente na detoxificação de hidroperóxidos do que o sistema das glutathione peroxidases dos mamíferos, mas tem a vantagem de ter uma especificidade para o substrato muito mais ampla, com a redução até mesmo de hidroperóxidos lipídicos. Uma atividade baixa de triparedoxinas está diretamente relacionada à maior sensibilidade dos parasitos ao estresse oxidativo (Krauth-Siegel & Coombs, 1999). A tripanotiona é sintetizada em duas etapas sequenciais, em que duas moléculas de glutathione (GSH) são covalentemente ligadas ao grupo amino terminal da espermidina por uma única enzima citosólica denominada tripanotiona sintetase (TS). Cinco peroxidases distintas foram identificadas em *T. cruzi*, diferindo entre si pela localização subcelular e especificidade de substrato. A glutathione peroxidase-I (GPXI) (localizada no citosol e no glicossomo) e a GPXII (localizada no retículo endoplasmático) conferem resistência a hidroperóxidos e a hidroperóxidos lipídicos, respectivamente, utilizando GSH e/ou TXN como substrato redutor. A triparedoxina peroxidase citosólica de *T. cruzi* (CPX) e a triparedoxina peroxidase mitocondrial (MPX) têm a capacidade de detoxificar ânions peroxinitrito ($ONOO^-$), H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos de cadeia pequena utilizando TXN. No retículo endoplasmático, uma hemoperoxidase ascorbato dependente (APX) confere resistência a H_2O_2 utilizando ascorbato como substrato redutor. *T. cruzi* também contém quatro ferro-superóxido dismutases (FeSODs) que detoxificam $O_2^{\bullet-}$ gerado no citosol (TcSODB1), glicossomo (TcSODB1-2) e mitocôndria (TcSODA e C) (Piacenza *et al.*, 2013; Piñeyro *et al.*, 2011).

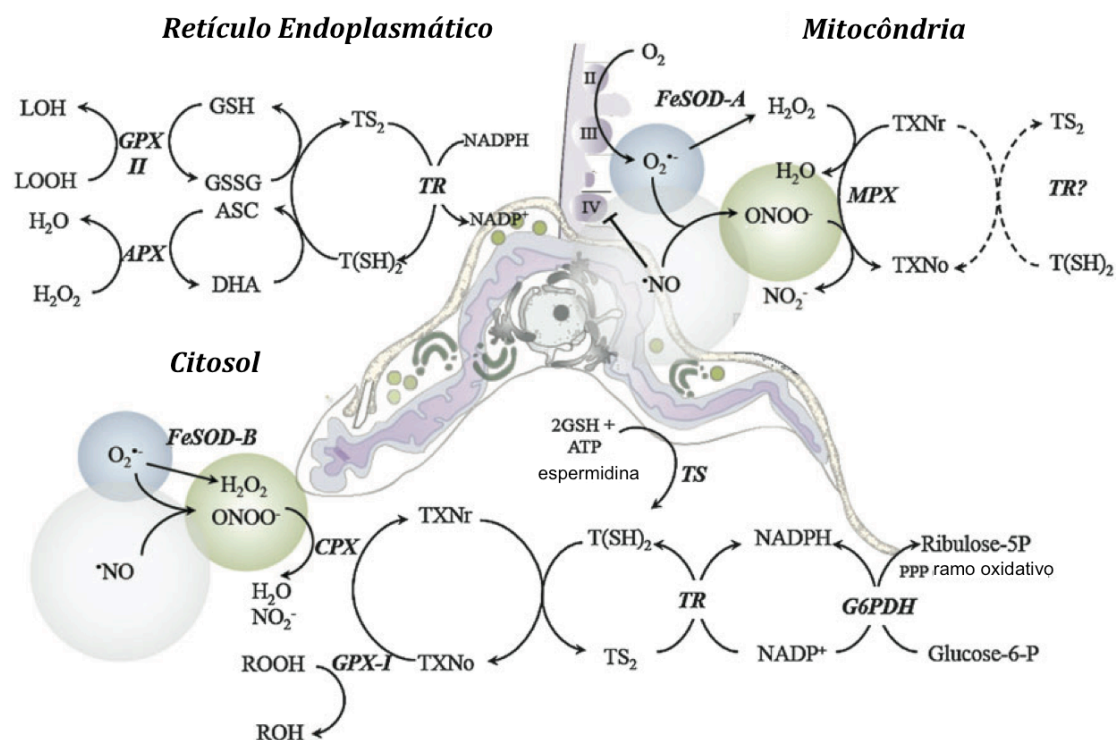


Figura 5 – **Distribuição subcelular do sistema antioxidante em *T. cruzi***. No sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi* o doador final de elétrons para todas as enzimas é o NADPH derivado da via das pentoses (PPP). Os equivalentes redutores são canalizados através dos sistemas redox da tripanotona [T(SH)₂], da glutatona (GSH), ascorbato (ASC) e/ou triparedoxina (TXN). Retículo endoplasmático: o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é metabolizado por uma hemoperoxidase dependente de ascorbato (APX) usando ASC como doador de elétrons. Dehidroascorbato (DHA) é reduzido por uma reação direta com T(SH)₂. H₂O₂ na presença de metais redox-ativos pode iniciar reações de lipoperoxidação que geram hidroperóxidos orgânicos (LOOH), os quais são substratos de GSH-peroxidase-dependente II (GPX-II) que utiliza a GSH. T(SH)₂ reduz a glutatona oxidada (GSSG) a GSH, enquanto que a tripanotona redutase (TR) reduz a tripanotona oxidada (TS₂). Mitocôndria: a cadeia transportadora de elétrons (Complexo II: succinato desidrogenase, Complexo III: ubiquinol-citocromo c redutase, e Complexo IV: citocromo c oxidase) é o local principal de formação de superóxido O₂^{•-} (esfera azul), principalmente no CIII. A isoforma mitocondrial de FeSODA catalisa a dismutação de O₂^{•-} a H₂O₂. Quando •NO derivado do hospedeiro (esfera cinza) atinge a mitocôndria, ele inibe a respiração mitocondrial no CIV (com um aumento da produção de O₂^{•-} por CIII), mediante a competição de FeSODA por O₂^{•-}, para formar ONOO[•] (esfera verde). Peroxiredoxina mitocondrial (MPX) decompõe cataliticamente H₂O₂ e/ou ONOO[•] utilizando provavelmente TXN reduzida (TXNR) e T(SH)₂ como substrato (setas tracejadas). Citosol: As enzimas antioxidantes do citosol incluem peroxiredoxina citosólica (CPX), FeSODB e GPX-I. T(SH)₂ é sintetizado a partir de duas moléculas de GSH e uma espermidina, numa reação catalisada pela enzima tripanotona sintetase (TS). O ramo oxidativo da PPP é induzido nas formas tripomastigota metacíclica, garantindo o fornecimento de equivalentes redutores de NADPH (Adaptado de Piacenza *et al.*, 2013).

Nos ensaios de microarranjo de DNA de *T. cruzi* sob o estresse de radiação ionizante (Grynberg *et al.*, 2012), os seguintes genes foram superexpressos: uma peroxidase do tipo 2 dependente de tripanotona/triparedoxina e uma triparedoxina peroxidase; entretanto, a tripanotona redutase foi subexpressa.

Esses resultados indicam que, de alguma maneira, *T. cruzi* está respondendo às espécies reativas de oxigênio.

A transformação de epimastigota de *T. cruzi* em sua forma infectante tripomastigota metacíclica implica no aumento da sua defesa antioxidante, o que pode ser visto como um importante mecanismo de evasão ao estresse oxidativo gerado pelo sistema imune do hospedeiro (Atwood *et al.* 2005). Parasitos que têm suas defesas antioxidantes aumentada são mais resistentes a ROS e conseqüentemente mais virulentos, sugerindo uma correlação direta entre o balanço redox e a infectividade (Piacenza *et al.* 2009). Trabalhos recentes mostram que existe uma significativa plasticidade funcional na mitocôndria de *T. cruzi* durante as diferentes fases do seu ciclo de vida, o que pode ser de grande importância na adaptação do parasito a sobrevivência em diferentes hospedeiros (Gonçalves *et al.*, 2011).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Caracterizar a resposta do *Trypanosoma cruzi* à radiação gama, utilizando uma abordagem proteômica, e avaliar a atividade mitocondrial do parasito sob esta condição de estresse.

2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de *T. cruzi*, clone da cepa CL Brener, irradiado com dose de 500 Gy de radiação gama e tratado com os inibidores de síntese protéica cicloheximida e puromicina.
- Extrair proteínas totais de *T. cruzi* não irradiado (N.I) e irradiado nos tempos de 4, 24 e 96 horas após irradiação.
- Comparar o perfil protéico (proteínas solúveis) dos parasitos N.I e irradiados (tempos 4, 24 e 96 horas após a irradiação).
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas e analisar esses resultados em seu contexto biológico.
- Comparar os resultados gerados das análises proteômica com os resultados de análise da expressão gênica por microarranjos de DNA.
- Avaliar a atividade mitocondrial (medida do consumo de O₂, da produção de H₂O₂ e produção de ATP) dos parasitos N.I e irradiados tempos 8, 24, 48, 72 e 96 horas após irradiação.

- Comparar a expressão gênica de alguns genes do sistema de defesa antioxidante tiol redox, genes do maxicírculo e genes dos complexos I, II, III e IV da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial de *T. cruzi* N.I e irradiado nos tempos 4, 24 e 96 horas após irradiação.

*3 – MATERIAIS E
MÉTODOS*

3.1 – Cultura de *T. cruzi* clone da cepa CL Brener

Epimastigotas de *T. cruzi* clone da cepa CL Brener foram gentilmente cedidos pelo prof. Egler Chiari do Dep. de Parasitologia da UFMG. Os parasitos foram cultivadas a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Triptose* – infusão de fígado 5 g/L, NaCl 4 g/L, triptose 5 g/L, KCl 0,4 g/L, NaH₂PO₄ 8 g/L, glicose 2 g/L, hemina 0,2% 10 mL em NaOH 0,05 M pH 7,3); suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Invitrogen). A cultura foi mantida na fase exponencial de crescimento, através de repiques semanais. A contagem do número de parasitos foi feita em câmara de Neubauer, mediante diluições de 20 e 50X em PBS 0,15 M pH 7,2 e eritrosina 4%.

3.2 – Irradiação das células com raios gama

As garrafas de cultura (triplicatas) contendo células epimastigotas no início da fase exponencial de crescimento, ou seja, $2,0 \times 10^7$ células/mL de meio LIT ($1,0 \times 10^9$ células totais), foram submetidas a uma dose de 500 Gy de radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto (⁶⁰Co), disponível no CNEN/CDTN, um instituto de pesquisa do Ministério de Ciência e Tecnologia localizado no campus da UFMG. A dose no valor de 500 Gy foi determinada por estudos anteriores do nosso grupo (Regis-da-Silva *et al.*, 2006). Essas doses foram obtidas através da exposição a uma taxa de 1500 Gy/h por 20 min. Após a irradiação, as culturas foram utilizadas nos ensaios de extração de proteínas, extração de RNA e medida da atividade mitocondrial de *T. cruzi*. Alíquotas das culturas foram retiradas para acompanhamento da curva de crescimento dos parasitos irradiados e não irradiados.

3.3 - Tratamento de *T. cruzi* irradiado com cicloheximida e puromicina

Em três garrafas (triplicatas) de cultura de epimastigotas na concentração de 1×10^7 células/mL foram adicionados 50 µg/mL de cicloheximida 4 horas após as células serem irradiadas. As culturas foram incubadas na presença da droga por 15 minutos a 28 °C, e após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com meio LIT sem soro fetal bovino e sem antibióticos, sendo incubadas novamente em meio LIT completo. A contagem do número de parasitos vivos foi realizada diariamente ou até que atingissem a fase estacionária (10^8 células/mL). O mesmo procedimento foi feito no tratamento com puromicina na concentração de 25 µg/mL e incubação com a droga por 1 hora. Também foram tratados com cicloheximida e puromicina os parasitos não irradiados, conforme descrito.

3.4 - Extração de proteínas

Aproximadamente 100 mL de cultura de epimastigotas contendo 2×10^7 parasitos/mL foram necessários na obtenção de proteínas totais para realização da eletroforese bidimensional. As culturas irradiadas (4h, 24h e 96 horas após irradiação) e não irradiadas (N.I.) foram dispensadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL e centrifugados por 5 minutos a 1.620 g em temperatura ambiente. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas duas vezes com 10 mL de meio LIT sem soro fetal bovino e sem antibióticos. Em seguida, 200 µl de tampão de lise (10 mM Tris base, uréia 8M, tiouréia 2M e CHAPS 4% [3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate]) foram adicionados ao *pellet*, juntamente com 2 µl do mix de inibidor de proteases (GE Healthcare) de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram incubadas em agitação por 2 horas à temperatura ambiente. Ao final da incubação, as amostras foram passadas em agulha para seringa de 1 mL por 10 vezes para promover a quebra de DNA genômico. Por último, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4 °C, 11.000 g; o sobrenadante foi recuperado,

aliquotado e armazenado em -80 °C até o uso. Uma alíquota de 10 µl foi retirada para dosagem das proteínas com o kit *2D Quant* (GE Healthcare), seguindo recomendações do fabricante, e visualização das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE 10%.

Os ensaios de proteômica foram realizados no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia/Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, em colaboração com a Prof^a. Dra. Héliida Monteiro de Andrade.

3.5 – Marcação das proteínas com os fluoróforos CyDye 2, 3 e 5

Para a realização da eletroforese diferencial em gel (DIGE - *Differential Gel Electrophoresis*) as amostras foram marcadas com os fluoróforos Cy3 e 5 de forma alternada, em uma estratégia denominada *dye swap* (em géis diferentes a mesma amostra é marcada ora com Cy3 ora com Cy5). A técnica DIGE permite um multiplex de amostras coradas com diferentes fluoróforos dentro de um mesmo gel, ou seja, as diferentes amostras são sujeitas a exatamente as mesmas condições na primeira e segunda dimensão da eletroforese. Dessa forma, limita-se a variação experimental das corridas eletroforética de gel para gel. As amostras individualmente marcadas podem ser visualizadas em um mesmo gel de forma independente, escolhendo os comprimentos de onda de digitalização apropriadas para cada fluoróforo. Além disso, utilizando o kit *Minimal Labelling CyDye DIGE Fluor* (Ge Healthcare), foi possível obter uma marcação mínima e quantitativa das proteínas. A alta sensibilidade dos três CyDye DIGE permite que cada proteína visualizada contenha uma única molécula de corante e cada gel contém um mix de todas as amostras em estudo marcadas com Cy2, que é o fluoróforo de padroinação da técnica, eliminando assim viés de marcação.

Seguindo as recomendações do fabricante, as amostras foram descongeladas e o pH de cada uma delas medido e, quando necessário, o pH foi ajustado para 8,5 com NaOH 500 mM ou HCl 0,05 M. Para cada 50 µg de amostra foi adicionado 400 pmol do corante Cy3 ou Cy5. Um *pool* das amostras (N.I, 4, 24 e 96 horas após irradiação) contendo 12,5 µg de cada foi marcado com 400 pmol

de Cy2. Em seguida, cada amostra foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 30 minutos. Para paralisar a marcação, 1 μ L de L-lisina 10 mM foi acrescentado por tubo, seguido de incubação no gelo por 10 minutos.

Após a marcação, as amostras foram misturadas (Tabela 1) e a elas foram adicionados 3,5 μ L de tampão IPG (10 μ L/mL) e tampão IEF (8 M de Uréia, 2 M de Tiuréia, 4% w/v de CHAPS, 0,0025% v/v de solução de azul de bromofenol a 0,5%, 10 mg/mL de Ditioneitról) suficiente para completar o volume de 350 μ L. As misturas foram mantidas em agitação por 2 horas à temperatura ambiente e centrifugadas a 11.000 g por 30 min. O sobrenadante de cada mistura foi recolhido, aplicado em uma bandeja de reidratação (*Immobiline Dry Strip ReswellingTray*, GE Healthcare) e colocado em contato com tiras de gel com pH variando de 4 a 7 (IPG strips de 18 cm - GE Healthcare), durante 16 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Tabela 1. Desenho experimental da marcação com os fluoróforos

Gel	NI	4 h	24 h	96 h	Pool
1	Cy3	Cy5			Cy2
2		Cy3	Cy5		Cy2
3			Cy3	Cy5	Cy2
4	Cy5			Cy3	Cy2
5	Cy3		Cy5		Cy2
6		Cy3		Cy5	Cy2

Pool = N.I, 4, 24 e 96 horas após irradiação.

3.6 - Eletroforese bidimensional (2D) DIGE

A eletroforese bidimensional é dividida em duas etapas. A primeira é a focalização isoeletrica (IEF), onde as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI). Após a etapa de reidratação das tiras de 18 cm, pH 4-7,

com as amostras N.I, 4, 24 e 96 horas após irradiação (Géis 1 a 6), estas foram submetidas à focalização isoeétrica no equipamento *IPGPhor* (GE Healthcare) com os seguintes parâmetros: passo 1: 200 V por 12 horas, passo 2: 500 V por 2 horas, passo 3: 1000 V por 1 hora e 30 min, passo 4: 8.000 V por 2 horas, passo 5: gradiente de 8.000 até atingir 40.000 V, passo 6: 500 V por 2 hora; passo 7: manter em 500 V até a retirada das tiras.

A segunda etapa é constituída de eletroforese tradicional desnaturante (SDS-PAGE), onde as proteínas são separadas de acordo com a mobilidade relativa. Na segunda dimensão, géis grandes de poliacrilamida 12% foram preparados. As tiras de IPG contendo as proteínas focalizadas foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, sob constante agitação, em tampão de equilíbrio (uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 8,8 e azul de bromofenol 0,001%) contendo 10 mg/mL de DTT. Outra incubação de 15 minutos foi realizada com tampão de equilíbrio e 25 mg/mL de iodoacetamida; e por último, as tiras foram lavadas rapidamente por 10 vezes em tampão Laemmli (Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%). As tiras foram seladas sob os géis de poliacrilamida com agarose 0,8% e para acompanhar a corrida foi utilizado padrão de massa molecular pré-corado (PageRuler Broad Range - Thermo Scientific). A eletroforese foi realizada no sistema *Ettan Daltsix Electrophoresis System* (GE Healthcare) a 30 mA por gel, 10 °C ao abrigo da luz. Após a eletroforese, os géis foram digitalizados usando o escaner *Typhoon* (GE Healthcare) com excitação/emissão de comprimentos de onda específicos para Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) e Cy5 (633/670 nm).

3.7 - Análise das imagens dos géis DIGE

A análise das imagens foi realizada utilizando o programa *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.0* (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante (Figura 6).

Usando a estratégia *dye swap*, 3 imagens foram geradas para cada amostra testada. No módulo do DIA (*Differential In-gel Analysis*) do programa *DeCyder*, os *spots* representando proteínas marcadas com os diferentes corantes

fluorescentes foram co-detectados e quantificados nas três imagens de cada gel. No DIA, é calculada (utilizando o padrão interno como normalizador) a abundância dos *spots* de cada imagem expressando esses valores em razão (*ratio*), quantificando assim alterações nos níveis de expressão entre as diferentes amostras dentro um gel (análise *in-gel*). Os dados gerados nesta análise de cada *spot* em cada gel podem ser usados para comparar quantitativamente os diferentes géis de forma acurada.

O módulo seguinte, BVA (*Biological Variation Analysis*), processa as imagens utilizando os arquivos gerados no DIA. O *Match* entre as imagens permite identificar proteínas comuns entre diferentes géis, assim como proteínas presentes em uma amostra e menos expressas ou ausentes em outra. Nesta parte do software, é possível realizar uma pequena edição manual das imagens, onde os *spots* espúrios são eliminados (sujeira por exemplo). O BVA realiza uma primeira análise estatística dos dados gerados, avaliando com precisão a diferença de expressão de uma proteína em diferentes condições e/ou tratamentos. Esta abordagem multi-gel, contendo sempre um controle interno, além das repetições de imagem (réplica biológica), proporciona uma maior validade estatística aos resultados da análise de expressão diferencial.

Por último, o módulo EDA (*Extended Data Analysis*), realiza análises estatísticas mais robustas. A razão média entre *spots* correspondentes foi calculada, os testes t de Student não pareado e análise de variância (one-way ANOVA) foram usados para identificar *spots* com alteração quantitativa significativa entre os grupos experimentais, sendo os valores $p \leq 0,01$ considerados estatisticamente significativos. O critério FDR - *Apply False Discovery Rate* foi usado para ajustar os valores encontrados e eliminar os resultados falso-positivos.

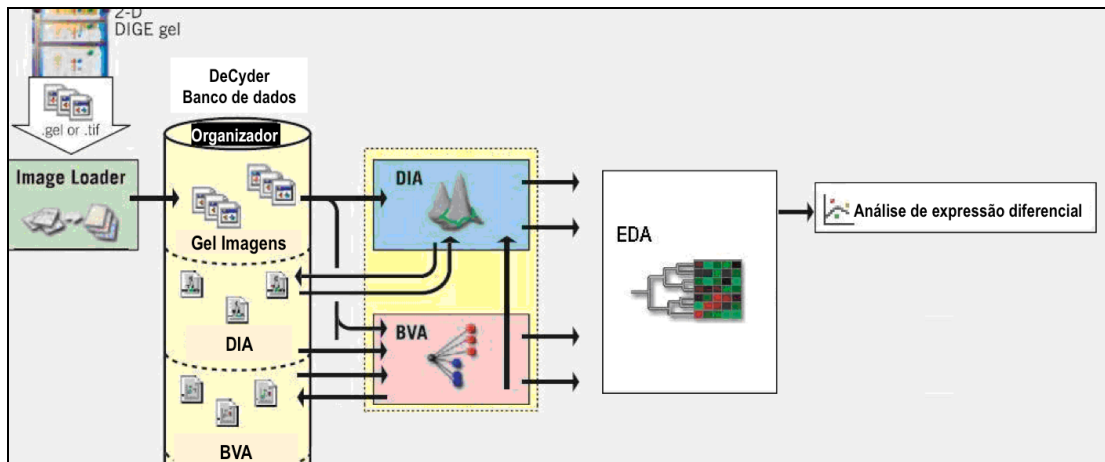


Figura 6 – Estratégia de análise dos géis DIGE. Esquema da análise das imagens obtidas dos géis DIGE usando o programa *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.0* (GE Healthcare).

3.8 – Excisão de *spots* e preparação das amostras para espectrometria de massas (MS)

Ao final das análises no *DeCyder*, um mapa (*spot pick map*) para excisão dos *spots* diferencialmente expressos é gerado no módulo BVA. Novos géis bidimensionais dos tempos analisados (N.I, 4h, 24h e 96h) foram confeccionados para a retirada dos *spots* selecionados, cada um contendo 500 µg de extrato protéico total de *T. cruzi*, mas sem a marcação com DIGE. Após eletroforese, os géis foram fixados por 30 minutos em cada uma das soluções de fixação I (ácido ortofosfórico 2% e etanol 30%), II (ácido ortofosfórico 2%) e III (ácido ortofosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 12%). Para visualização dos *spots*, os géis foram corados com azul de *Coomassie* G-250 2% (adicionado na solução III da última etapa de fixação) e incubados por 2 horas ou até o aparecimento de *spots*. Os géis foram escaneados para posterior marcação dos *spots* de interesse, seguindo o mapa de excisão de *spots* gerado no BVA. Os *spots* foram cortados com o auxílio de uma pipeta pasteur de plástico. Para excisão dos *spots* grandes, a pipeta foi cortada aumentando assim o seu diâmetro e as esferas de géis obtidas foram novamente cortadas em pedaços menores (1mm²) com um bisturi.

Em seguida, cada *spot* excisado (ou grupos de *spots* retirados de mais de um gel referente, mas contendo a mesma proteína) foi devidamente enumerado e separado em tubo eppendorf. Para descolorar os géis, 400 μL de uma solução contendo 25 mM de bicarbonato de amônio (NH_4CO_3) pH 8,0 e 50% de acetonitrila (Synth) foram adicionados a cada tubo. O processo foi repetido por 3 vezes durante 15 minutos com agitação em vórtex, o descolorante foi descartado e os *spots* desidratados com 200 μL de acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida até secar os *spots*, estes foram reidratados e as proteínas digeridas pela adição de 20 μL da solução contendo 2 mM de bicarbonato de amônio (NH_4CO_3) e 20 ng/ μL de tripsina (Promega), seguido de incubação por 16-24 h à 37 °C. Para extração dos peptídeos, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, 30 μL da solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila a 50% foi acrescentada e deixada por 30 minutos sob agitação constante em vórtex. Após esse tempo, a solução foi transferida para o tubo contendo o primeiro sobrenadante. A extração com ácido fórmico foi repetida e todos os extratos reunidos em um único tubo eppendorf. Os extratos foram concentrados (*Eppendorf Speed Vac Concentrator Plus 5305*) para um volume final de 10 μL , e passados em colunas *ZipTip® C18* (Millipore) para desalinização, purificação e concentração dos peptídeos.

Depois de preparadas as amostras, o próximo passo foi a análise dos peptídeos no espectrômetro de massas. Os peptídeos presos às colunas *ZipTip® C18* foram eluídos em 50% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético. Após, 0,5 μL de cada amostra foi misturado a 0,25 μL de uma solução de matriz saturada [10 mg/mL R-ciano-4-hidroxicinâmico (Aldrich) em 50% acetonitrila/0,1% ácido trifluoroacético] e aplicados na placa *MTP AnchorChip™ 600/384* (Bruker Daltonics). Os dados brutos para a identificação das proteínas foram obtidos com o instrumento *MALDI-TOF-TOF autoflex III™* (Bruker Daltonics) alocado no Laboratório Multiusário de Biomoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, no modo positivo/refletivo controlado pelo software *FlexControl™*. Para a calibração do instrumento foi utilizado como referência os peptídeos padrão de calibração II (Bruker Daltonics). Foram excluídos das listas de picos usadas para pesquisa em banco de dados os picos da autólise da tripsina, da matriz e picos de

contaminação com queratina. Cada espectro (modo MS e o MS/MS) foi produzido pelo acúmulo de dados gerados através dos 200 disparos consecutivos do laser *Smartbeam*.

3.9 – Identificação das proteínas, curadoria manual e análise estatística

Utilizando o software MASCOT® *MS/MS ion search tool* - versão 2.1 (<http://www.matrixscience.com>), os espectros MS/MS obtidos foram comparados aos do banco de dados de sequências de proteínas não redundante do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os parâmetros usados na identificação das proteínas foram: não há restrições relativas ao peso molecular da proteína, um sítio de clivagem da tripsina perdido, modificações variáveis da metionina (oxidação) e da cisteína (carbamidometilação), formação de piroglutamato na extremidade N-terminal da glutamina sem outras modificações pós-traducionais. Os peptídeos foram considerados como identificados, quando o valor de pontuação (*score*) calculado pelo software MASCOT® excedeu o valor limiar de identidade ou homologia ($p < 0,05$), ou seja, a chance da identificação gerada ser um evento ao acaso é de 5%.

As sequências de peptídeos obtidas no MASCOT® foram alinhadas às anotadas do genoma de *T. cruzi* usando a ferramenta *BLAST* disponível no banco de dados TriTrypDB (<http://www.tritrypdb.org>). Uma curadoria manual dos dados foi realizada, principalmente nos casos em que a mesma sequência de peptídeos para uma dada proteína estava anotada parcialmente no MASCOT® e completa no TriTrypDB. Após esta curadoria manual das proteínas identificadas e divisão das mesmas em grupos (subexpressas e superexpressas), foi possível avaliar para cada proteína a relação entre sua massa molecular esperada (dados encontrado no TriTrypDB) e a massa observada (posição no 2D DIGE).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote R, um modelo linear foi aplicado para testar a correlação entre massa molecular das proteínas identificadas e *fold-change* (utilizamos o *cut off* de 1,5 para o *fold-change*). O teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar a presença de diferenças estatisticamente significativas entre: 1) as massas moleculares observadas das

proteínas superexpressas e subexpressas e 2) massas moleculares observados e esperadas de proteínas superexpressas e subexpressas. Por último, as proteínas foram manualmente anotadas de acordo com sua função biológica e agrupadas em diferentes classes funcionais com base em dados da literatura.

3.10 - Medida do consumo de oxigênio

Culturas de epimastigotas a 5×10^7 parasitos/mL foram irradiadas (dose 500 Gy) e incubadas a 28 °C, assim como as culturas não irradiadas. A medida do consumo de oxigênio, determinação da produção de H_2O_2 e de ATP para cada uma das condições N.I e irradiadas foram realizadas 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a irradiação. Para cada dia de experimento, alíquotas das culturas (N.I e irradiadas) foram dispensadas em tubos Falcon de 50 mL, centrifugados por 5 minutos a 1.620 g em temperatura ambiente e, ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas uma vez com 10 mL de PBS 0,15 M pH 7.2 e o número de parasitos foi estimado por contagem em câmara de Neubauer, mediante diluições dos parasitos de 20 e 50X em PBS 0,15 M pH 7.2 e eritrosina 4%.

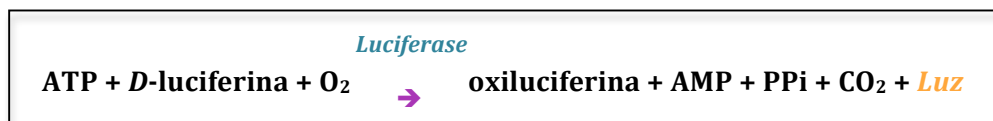
O consumo de O_2 pela mitocôndria de *T. cruzi* irradiado e não irradiado foi monitorado em um oxígrafo (Hansatech® Systems Inc.), com agitação contínua a 28°C. Neste experimento, 10^8 parasitos/mL foram incubados em um meio de respiração SRM - *Standard Reaction Medium* (125 mM sacarose, 65 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , 0,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes pH 7.2 e 1 mM EDTA) na presença ou não de 40µM de digitonina e 5 mM de succinato. O controle respiratório (CR) (estado 3/estado 4) foi determinado pela adição de 300µM de ADP – difosfato de adenosina (estado 3) e 1µg/mL de oligomicina (estado 4). A velocidade máxima da cadeia respiratória mitocondrial foi determinada na presença de 1µM de CCCP (*Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R.

3.11 - Determinação da produção de H₂O₂

Para determinar a produção de peróxido de hidrogênio em parasitos irradiados e não irradiados, 10⁸ células/mL foram incubadas em PBS 0,15 M /1 mM MgCl₂ pH 7.2, na presença de 5mM de succinato, 40μM de digitonina, 1U/mL da enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP) e 25μM de *Amplex Red* (Molecular Probes®). A oxidação do *Amplex Red* na presença da peroxidase HRP e H₂O₂ gera o resorufin, composto fluorescente cuja excitação foi monitorada no espectrômetro de fluorescência (Hitachi F2500) no comprimento de onda 563nm e emissão a 587nm. A quantidade de resorufin formada é igual ao H₂O₂ liberado. A correlação entre unidade de fluorescência e H₂O₂ produzido pelas células foi determinada como descrito por Barros *et al.* 2004. O pacote estatístico R também foi utilizado neste ensaio para análise estatística.

3.12 - Determinação do ATP intracelular de *T. cruzi* irradiado e não irradiado

Na determinação do ATP intracelular de *T. cruzi* foi utilizado o kit EATP-100 *EnzyLight™ ATP Assay* (BioAssay System), seguindo as recomendações do fabricante. As células (10⁸) foram centrifugadas brevemente (5 minutos a 4 °C, 1.620 g) e lavadas em PBS 1X. O princípio básico do kit é a geração de luz mediante a reação do ATP liberado pelas células incubadas com o substrato D-luciferina, na presença da enzima luciferase.



A luminescência gerada foi detectada por um luminômetro (Lumicount Packard), e quantitativamente correlaciona a uma curva padrão de concentração

de ATP. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.03.

3.13 – Extração e purificação de RNA total de *T. cruzi* para síntese de cDNA

O número de parasitos utilizado na extração de RNA total de *T. cruzi* foi $1,0 \times 10^9$. Neste experimento foram obtidas triplicatas de extração e três réplicas biológicas para cada uma das condições (N.I, 4, 24 e 96 horas após irradiação). Cerca de 50 mL de cultura de epimastigota a 2×10^7 /mL foram dispensadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL, centrifugados por 5 minutos a 1.620 g em temperatura ambiente e ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 10 mL de PBS 1X pH 7.2. O processo de lavagem foi repetido e, após a última centrifugação, 1 mL do reagente *Trizol* (Invitrogen) foi adicionado ao *pellet*. A extração do RNA foi realizada conforme recomendações do fabricante. As amostras de RNA obtidas foram quantificadas no *NanoDrop ND-100 UV/Vis* (NanoDrop Technologies, USA) e visualizadas em gel de agarose desnaturante 1%. Para garantir uma boa qualidade dos RNAs a serem utilizadas nos experimentos de qRT-PCR, as amostras foram primeiramente tratadas com DNase (Ambion – cat: AM1906) e em seguida purificadas com *RNeasy® MiniElute™ Cleanup Kit* (Qiagen). Para cada amostra foram tratados 45 µg de RNA, consistindo de um *pool* de RNA contendo 15µg de cada uma das triplicatas. Os tratamentos foram realizados segundo as recomendações dos fabricantes da enzima e do kit. As amostras de RNA livres de impurezas e contaminantes foram quantificadas novamente no *NanoDrop ND-100 UV/Vis* (NanoDrop Technologies) e visualizadas em gel de agarose desnaturante 1%. Por fim, os RNAs totais de *T. cruzi* extraídos e purificados foram usados na síntese de cDNA com o kit *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR®* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para cada cDNA sintetizado foi feita uma reação de controle negativo contendo todos os reagentes utilizados no kit, o RNA total e sem a adição da enzima transcriptase reversa.

3.14 - PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Alguns genes de *T. cruzi* foram selecionados e tiveram sua expressão sob o estresse de irradiação avaliada por qRT-PCR. Os genes escolhidos foram: representantes do sistema de defesa antioxidante tiol redox, alguns genes do maxicírculo e genes dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial de *T. cruzi* (Tabela 2). Os iniciadores foram desenhados usando os softwares *GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design* (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>) e *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). As sequências de iniciadores geradas foram alinhadas utilizando o BLASTN contra o banco de dados de sequências de nucleotídeos do NCBI. Foram mantidos apenas os iniciadores que se alinharam em uma única região genômica do *T. cruzi* e com alto grau de similaridade. O software *oligoAnalyzer* 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) foi utilizado para verificar a possível formação de dímeros de iniciadores. No total, 24 pares de iniciadores (Tabela 2) foram sintetizados e a confirmação da capacidade de amplificação e do tamanho do produto gerado (90 - 150 pb) foi realizada utilizando DNA genômico de *T. cruzi* como molde. A qRT-PCR foi padronizada mediante testes com nove diferentes combinações de concentrações de iniciadores (300/300, 300/600, 300/900, 600/300, 600/600, 600/900, 900/300, 900/600, 900/900 nM) e cinco quantidades iniciais de cDNA (10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng e 0,001 ng). Curvas de dissociação e padrão foram geradas, assim como, os valores de inclinação, taxa de eficiência e valores de co-eficiência R^2 para cada iniciador (material anexo). A qRT-PCR foi padronizada para 1 ng de cDNA, 300 nM de cada iniciador, 2,5 μ L de *SYBr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), sendo o volume final do mix ajustado para 5 μ L com água milliQ. As amostras (N.I, 4, 24 e 96 horas após irradiação) foram aplicadas em placas de 384 wells (Applied Biosystems) em triplicata, juntamente com os controles positivos (amplificação do gene actina e GPI-anchor transamidase subunit 8 - GPi8 usados como normalizadores) (Tabela 3). Também foram aplicados nas placas reações onde os moldes usados foram os controles negativos das reações

de cada cDNA obtido, funcionando como branco da qRT-PCR. As reações foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade e Ecologia Molecular - LBEM/UFMG utilizando o aparelho AB7900 (Applied Biosystems), com o seguinte programa: dois passos iniciais de 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. A expressão relativa de cada gene de *T. cruzi* analisado nos tempos 4, 24 e 96 horas após irradiação foi calculada em relação à amostra selvagem (N.I). Os resultados foram normalizados pela expressão dos genes controle aplicando o método $-2\Delta\Delta Ct$. O software *GraphPad Prism V5.04* foi usado nas análises estatísticas.

Tabela 2 - Iniciadores para a amplificação por qRT_PCR dos genes teste

	GENE	IDENTIFICADOR	F (direto) R (Reverso)	Produto Esperado (nt)
Genes do sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i>	thioldR1 - Thiol-dependent reductase 1 putative, thiol transferase putative	Tc00.1047053509105.70	(F) 5' GCAGTGGTACAAGGAGCTGA 3' (R) 5' GGAGAAGAA ATGCGGTCAAT 3'	117
	Thioredox34 – Thioredoxin	Tc00.1047053506559.200	(F) 5' CAGGAGAGCATCCACAAGAA 3' (R) 5' AACAACTGTGCGGTAGTCTCG 3'	118
	TryS - Trypanothione synthetase	Tc00.104705350 9319.90	(F) 5' ATTATCCCAGCAACAAGGC 3' (R) 5' CAGCTCAACCGTGAGTTTCAAT 3'	99
	Tryredox – Tryparedoxin	Tc00.1047053509997.20	(F) 5' GGTATTCCGATGTTGCTCCT 3' (R) 5' TCCTTCACCGTCTGTATTGC 3'	132
	glperox - Glutathione peroxidase putative	Tc00.1047053511019.99	(F) 5'CGCTGTTTTGACA AGGTGA AG3' (R) 5' CCTTCACGGTCCGATATA AA 3'	118
	glredoxL - Glutaredoxin-like protein	Tc00.1047053508501.230	(F) 5' GCAGCATCCATCAAGACAT 3' (R) 5' TACTGGACTCCCATCTGCTG 3'	128
	Peroxi - Tryparedoxin peroxidase putative	Tc00.1047053508649.5	(F) 5' CAACACCCTGCGACTTCTTA 3' (R) 5' TCA AGCTGATGTCCTGGATT 3'	122
	SOD - Superoxide dismutase	Tc00.1047053511521.30	(F) 5' CTTGTCTGGACAGGA AAGCA 3' (R) 5' GGACCGTAGTCGAGGGAATA 3'	128
SDH2C - Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	Tc00.1047053504949.30	(F) 5' GGAGGGTCTTTATGA ATGCG 3' (R) 5' TCGTAGTCACGGTCA AGA GG 3'	144	
Genes do Maxicirculo	Cyb - Apocytochrome b	gb DQ343645.1 :8881-9960	(F) 5' CCATGAAGAATCTTGGGTCA 3' (R) 5' CCCATA AATTTGTCAAGGCACT 3'	117
	ATPase 6	gb DQ343645.1 :9998-10333	(F) 5'GAATTTTATGCA AAGGGGAAA A3' (R) 5' AAA ATGGGA AAATGCTTTCAA 3'	105
	MURF1 – Mitochondrial unidentified reading frame 1	gb DQ343645.1 :10381-11721	(F) 5' AAATAAAATGATGCA AACACCAA 3' (R) 5' GGTACTATCCCCATTGCCTTT 3'	90
	ND1 - NADH dehydrogenase subunit I	gb DQ343645.1 :11822-12763	(F) 5' CAAGCCCTGCAACTAATCA 3' (R) 5'AGACTTGTGTGTTAACCA ACTATCATT3'	149
	COI – Cytochrome oxidase subunit I	gb DQ343645.1 :14477-16126	(F) 5' CAATAGGCA ACCATTTATCA 3' (R) 5' GGGCTTGATATA ATGCTACACG 3'	127
	ND5 – NADH dehydrogenase subunit 5	gb DQ343645.1 :18274-20043	(F) 5' GGGCAACCGCAATAATAGTT 3' (R) 5'CAGCCTACATAA AGATCAAACAA AGA3'	139
Genes nucleares da mitocôndria	NDuboxi - NADH ubiquinone oxidoreductase 20kDa subunit mitochondrial precursor	Tc00.1047053503893.80	(F) 5' ACAGAATGGTGCTCACGTA 3' (R) 5' AATAATTTCCGCTGACGAG 3'	150
	NDefl2 -NADH ubiquinone oxidoreductase flavoprotein 2	Tc00.1047053506513.190	(F) 5' AACACAGACACGAACAACACC 3' (R) 5' TGGGAATTTCCGGAGAATAG 3'	90
	SUCC - Succinate dehydrogenase flavoprotein, putative	Tc00.1047053506399.89	(F) 5' GTA AGGCGTACCCGATGATT 3' (R) 5' ATGGTGTGTGACCTTGATGG 3'	148
	Ubcyt - Ubiquinol cytochrome c reductase, putative	Tc00.1047053504575.15	(F) 5' CCTATAATGGGTGCTGGAG 3' (R) 5' AGTGTGCGCCATAACTTCG 3'	127
	Cytc1 - Cytochrome c 1, heme protein, mitochondrial precursor	Tc00.1047053511391.160	(F) 5' ACGACA AGTCAA ATGGCA AA 3' (R) 5' ATGCCTCCAGA ACATGACA 3'	94
	CytcVI - Cytochrome c oxidase subunit VI, putative	Tc00.1047053504069.20	(F) 5' GAGAAGTGGGAAGAGAAGCG 3' (R) 5' TCTTCTCACGGGCTGGTA 3'	106
	ATPsynTF1 - ATP synthase F1 subunit gamma protein, putative	Tc00.1047053511145.60	(F) 5' TCATGCCTCTTTGCGATAC 3' (R) 5' TGCTCAAGGTGCTGATGTT 3'	111
	epsilonATP - ATP synthase, epsilon chain putative	Tc00.1047053506945.240	(F) 5' CTTTAGGTTCCGCAAAGGAC 3' (R) 5'GATGCTTCAAAGCAGCAAT 3'	90
	betaATPase - ATPase beta subunit, putative	Tc00.1047053509233.180	(F) 5' CGACAACATTTCCGCTTTA 3' (R) 5' CTGTCCAAGATCCTCAGCAA 3'	109

Tabela 3: Iniciadores para amplificação por qRT-PCR dos genes normalizadores

GENE	IDENTIFICADOR	F (direto) R (Reverso)	Produto Esperado (nt)
Actin	Tc00.1047053510945.30	(F) 5'GTGACGCCTGTGTACGATTC 3' (R) 5' TATCCTGCCGTGAAGTGAAG 3'	133
GPI8 - GPI-anchor transamidase subunit 8, putative	Tc00.1047053511277.450	(F) 5'CACGCTGGTCACTTGAATCT 3' (R) 5'GAAGACTCGCACGTTCTTCA 3'	126

4 – RESULTADOS

4.1 - Avaliação do crescimento de *T. cruzi* irradiado e tratado com inibidores da tradução

Uma vez que decidimos avaliar o perfil protéico de *T. cruzi* sobre o estresse de radiação gama, um dos primeiros passos adotados foi verificar a importância da síntese protéica ativa nos parasitos sob esse tipo de estresse. Dessa forma, realizamos o tratamento das culturas de epimastigotas de *T. cruzi* clone da cepa CL Brener irradiadas ou não com cicloheximida e puromicina e avaliamos o seu crescimento. As curvas de crescimento dos parasitos irradiados apresentaram padrão semelhante ao observado por Regis-da-Silva *et al.*, 2006. Os parasitos irradiados com 500 Gy de radiação gama cessaram seu crescimento por até 4 dias (96 horas) após irradiação, retomando em seguida o crescimento normal até atingirem a fase estacionária (Figura 7).

Os nossos resultados mostraram que o processo de tradução é essencial para a recuperação do parasito ao estresse causado pela radiação gama, como pode ser visto na figura 7, que representa um experimento típico de três ensaios realizados.

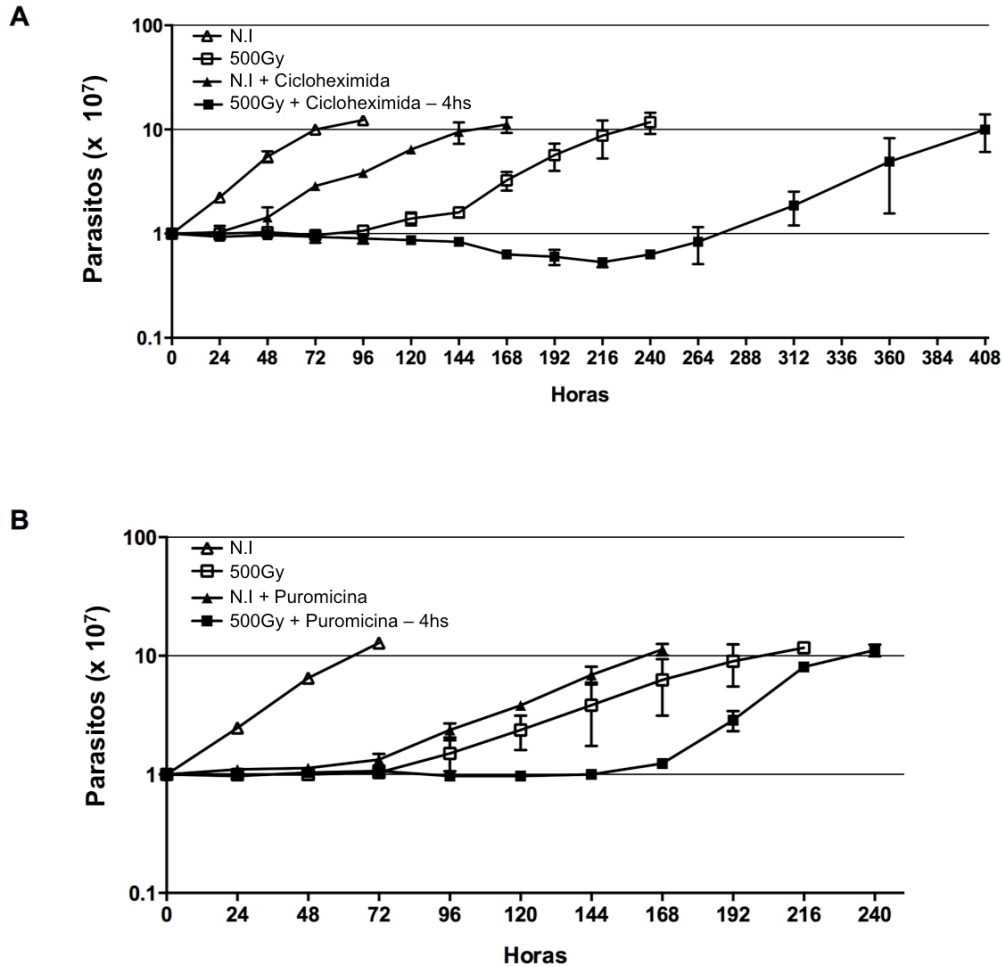


Figura 7 - Curva de crescimento *T. cruzi* irradiado (500 Gy) e não irradiado (N.I) tratado com cicloheximida 50µg/mL por 15 min (A) e puromicina 25µg/mL por 1 hora (B). O controle do experimento é o não irradiado (N.I.), representando o crescimento normal do parasito. 500 Gy - parasitos irradiados. N.I. + Cicloheximida/Puromicina - parasitos não irradiados e tratados com droga. 500 Gy + Cicloheximida/Puromicina 4hs - parasitos irradiados e tratados com droga 4 horas após a irradiação. Os dados correspondem à média de um ensaio realizado em triplicata.

Nas culturas irradiadas, quando bloqueada a tradução de proteínas com cicloheximida (Figura 7A), o parasito levou um tempo consideravelmente maior (atraso de 12 dias, ou em torno de 288 horas) para retomar o crescimento. Também foi observada uma pequena morte dos parasitos irradiados e tratados com cicloheximida, ao longo dos tempos 144 horas e 240 horas. No ensaio realizado com puromicina (Figura 7B) resultado semelhante foi observado, porém, a retomada do crescimento dos parasitos foi mais rápida (após 7 dias, ou 168 horas), quando comparada a dos parasitos tratados com cicloheximida. Esse

retorno ao crescimento diferenciado pode ser devido ao modo de ação de cada droga. É importante observar que o tratamento com as drogas por si só causou um atraso no crescimento dos parasitos de dois (cicloheximida) ou três (puromicina) dias em relação às células não tratadas com drogas. Outro fato curioso observado nos parasitos irradiados e tratados com cicloheximida é que no momento da retomada do ciclo (parasitos irradiados somente) o parasito permanece com seu crescimento estagnado. Além disso uma morte de quase 50% dos parasitos é notada. Durante as contagens das curvas de crescimento, tratamos as lâminas com eritrosina que é um corante que permite avaliar a viabilidade das células. Por outro lado essa morte dos parasitos não é observada quando irradiamos e tratamos *T. cruzi* com puromicina. A falta da síntese de certas proteínas logo após a irradiação faz com que a retomada do crescimento dos parasitos 96 horas após a irradiação se torne inviável.

4.2 – Obtenção dos extratos protéicos de *T. cruzi* irradiado e não irradiado

Após a irradiação, os extratos protéicos totais de *T. cruzi* foram obtidos nos diferentes tempos (4h, 24h e 96h), assim como o extrato protéico dos parasitos não irradiados. As amostras foram quantificadas utilizando o kit *2D Quant* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade das amostras foi verificada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%, com pode ser visto na figura 8.

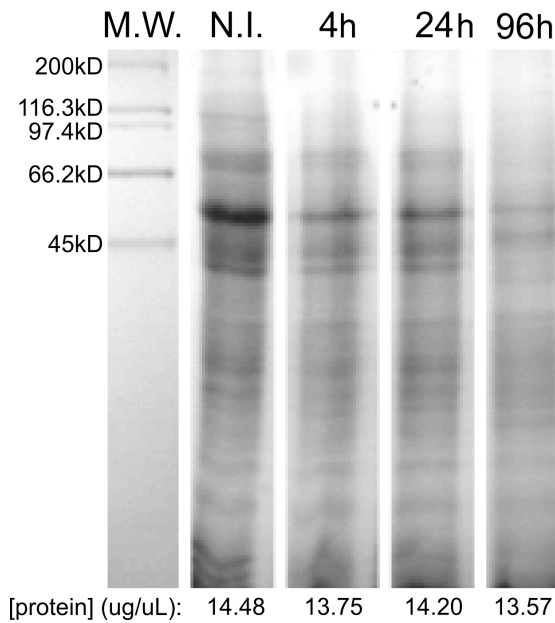


Figura 8 - Avaliação da qualidade das proteínas totais de *T. cruzi* irradiado e não irradiado. SDS-PAGE 10% corado com azul de coomassie. N.I. - extrato protéico de parasitos não irradiados. 4h, 24h, e 96h - parasitos irradiados com uma dose de 500 Gy, sendo os extratos protéicos obtidos 4, 24 e 96 horas após irradiação. MW - padrão de massa molecular *Biorad - Standard High range*.

4.3 - Análise do perfil protéico de *T. cruzi* sob o estresse de radiação gama utilizando a metodologia DIGE

Utilizando a abordagem de eletroforese bidimensional (2D) DIGE, seis géis foram produzidos seguindo o delineamento experimental especificado na tabela 1. Esta técnica foi escolhida devido a sua maior sensibilidade, por ser capaz de reduzir a variação gel-a-gel, além de permitir uma análise quantitativa da abundância relativa de cada um dos *spots* protéicos em uma amostra complexa. A figura 9 ilustra os géis 2D - DIGE de todas as condições estudadas. Para cada condição 3 imagens (Cy3 ou Cy5) foram geradas.

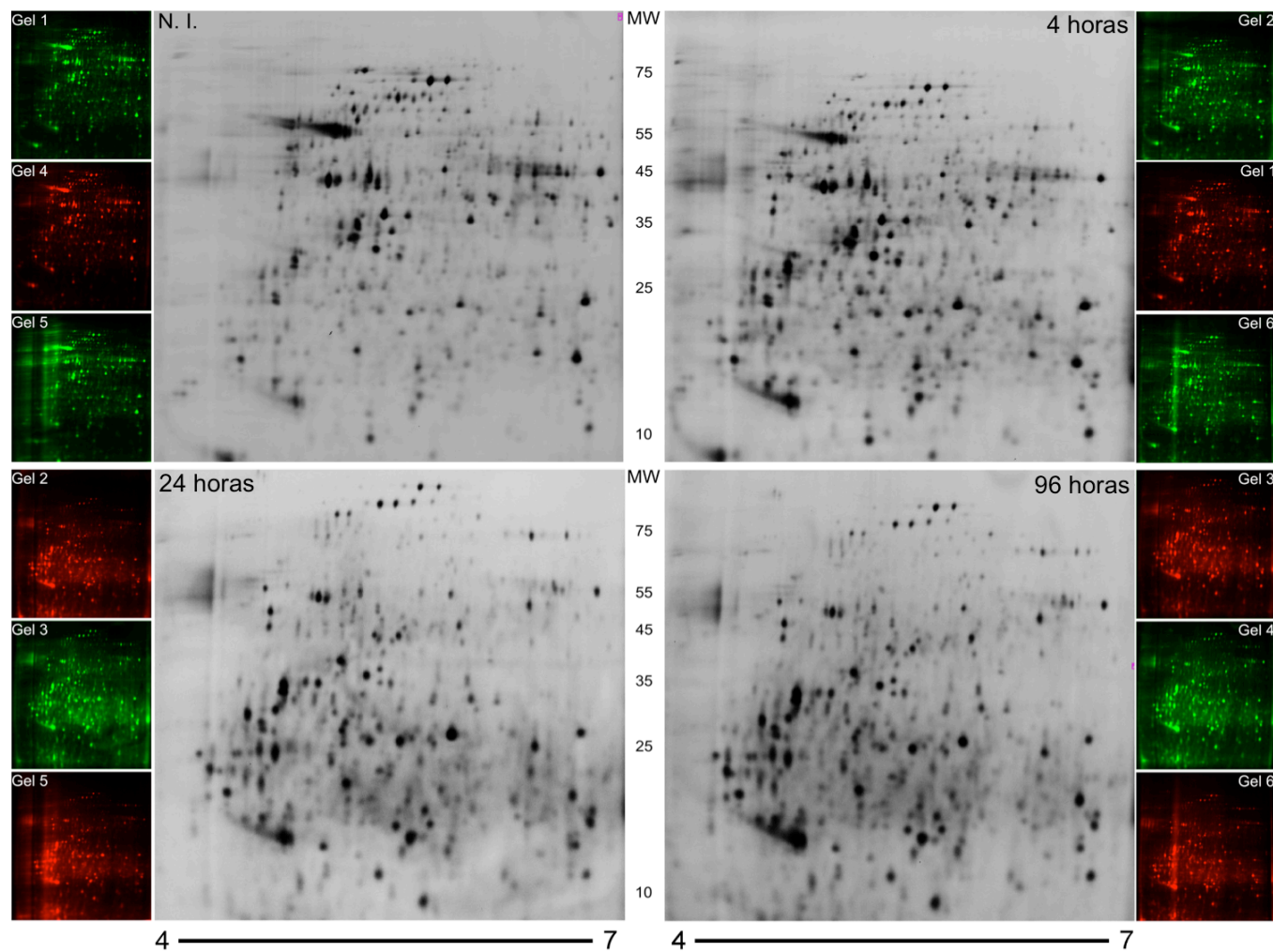


Figura 9 - Géis 2D DIGE dos extratos de proteínas totais de epimastigotas de *T. cruzi* irradiados e não irradiado. Imagens dos géis 1-6 (ver o desenho experimental na Tabela 1), mostrando a marcação das proteínas totais de *T. cruzi* com Cy3 (verde), Cy5 (vermelho). No total, 3 imagens (triplicata) para cada condição (N.I., 4, 24 e 96 horas após irradiação) foram geradas. As proteínas foram separadas na primeira dimensão ao longo de um gradiente de pH (pH 4-7, *Immobiline DryStrip* - 18 cm - GE Healthcare), e na segunda dimensão em gel de poliacrilamida a 12%. O padrão de massa molecular (MW) está indicado em kDa.

Como resultado, 2.186 *spots* foram identificados. Desses, 543 foram diferentemente expressos entre os tempos analisados 4, 24 e 96 após irradiação quando comparados ao N.I. (controle). A figura 10A representa o número de *spots* protéicos sub e superexpressos encontrados em cada tempo analisado, onde a diferença no perfil de expressão protéica é mais evidente 24 horas (292 *spots* subexpresso e 227 *spots* superexpresso) e 96 horas (266 *spots* subexpresso e 217 superexpresso) após a irradiação.

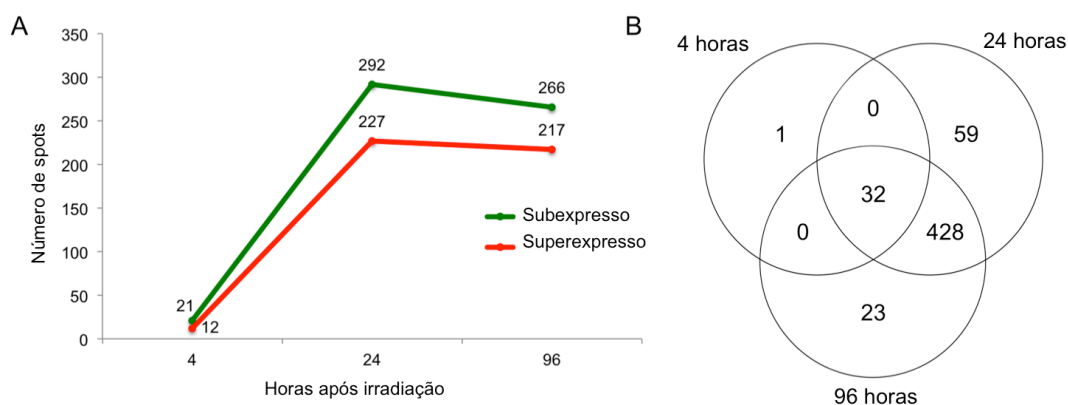


Figura 10 – Perfil de expressão protéica de *T. cruzi* ao longo dos tempos após irradiação. A) Número de *spots* subexpresso e superexpresso ao longo dos tempos após irradiação. B) Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de 32 *spots* diferencialmente expressos entre os 3 tempos analisados e de 428 *spots* entre os tempos 24 e 96 horas.

O diagrama de Venn (Figura 10B) mostra que 32 *spots* comuns entre os três tempos após irradiação apresentaram diferença de expressão após irradiação e 428 *spots* foram encontrados diferentemente expressos nos tempos 24 e 96 horas. No tempo 4 horas após irradiação apenas um *spot* diferentemente expresso foi exclusivo desse *time-point*. Ao analisar o proteoma de *T. cruzi* 24 horas após a irradiação, verificamos que 59 *spots* foram exclusivos desse *time-point*, sendo que 66% foram reprimidos e 34% induzidos. No entanto, 61% dos 23 *spots* exclusivos do *time-point* 96 horas após a irradiação foram induzidos.

4.4 – Identificação por espectrometria de massa (MS/MS) das proteínas diferencialmente expressas em *T. cruzi* após o estresse de radiação gama

Após a análise do perfil de expressão protéica de *T. cruzi* sob o estresse de radiação gama, foram selecionados no gel 2D os *spots* para excisão (mapa de excisão – Figura 11) e identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas. No total 215 *spots* foram identificados por MS/MS correspondendo a 53 proteínas distintas (Tabela 4). Quase metade (26) dessas 53 proteínas identificadas foram representadas por mais de um *spot* (variando de 2-12 *spots* por proteína), indicando a presença de várias formas alternativas da mesma proteína. Estes resultados sugerem que modificações pós-traducionais ou processamento de proteínas estão ocorrendo durante a resposta ao estresse de radiação gama. Uma anotação manual foi realizada, agrupando as 53 proteínas identificadas em 15 classes diferentes segundo a sua função biológica (Figura 12).

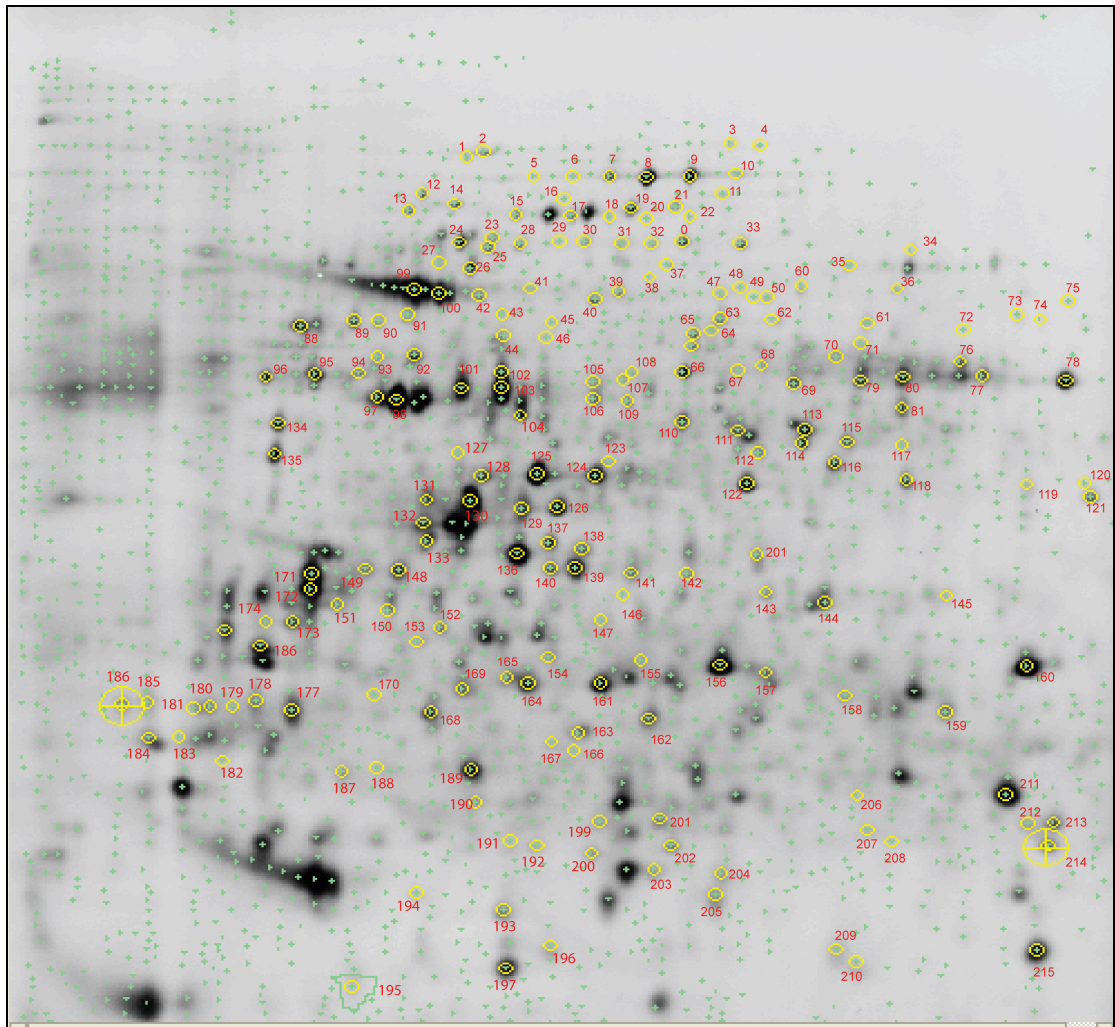


Figura 11 - Mapa de excisão de spots. 215 spots diferencialmente expressos ao longo dos tempos após irradiação foram excisados dos géis 2D, tripsinizados e os peptídeos analisados no espectrômetro de massas para identificação posterior das proteínas.

Tabela 4. Dados das 53 proteínas identificadas por espectrometria de massas

Descrição	TriTrypDB ID (TeCLB.)	Ref. Spot	Observado/Esperado		Fold-change				Mascot MS/MS ion search		
			pI	MW	4hs	24hs	96hs	Anova	Núm. de peptídeos	Cobertura	Pontua- ção
14-3-3 protein; putative	511167.90	153	5.00/4.78	24.3/29.1	-1.35	1.08	-1.16	5.61E-5	2	12%	73
40S ribosomal protein S12, putative	508551.20	195	4.82/4.78	10.9/15.9	1.45	3.52	2.92	1.32E-5	2	24%	110
Actin, putative	510571.39 or 510127.79 or 510571.30	66	5.75/5.46	45.9/41.2	-1.64	-14.92	-12.65	8.20E-9	3	10%	136
Alpha tubulin, putative	411235.9	69	6.07/4.7	44.7/49.8	-1.01	-12.65	-10.53	2.00E-7	5	16%	248
		99	5/4.7	55.6/49.8	-1.94	-31.15	-48.82	2.97E-8	11	42%	89
		100	5.06/4.7	55.2/49.8	-2.11	-47.2	-45.08	1.34E-9	5	15%	275
		136	5.29/4.7	29.9/49.8	1.54	-2.02	-1.68	8.44E-9	4	14%	247
		138	5.47/4.7	30.4/49.8	1.09	-2.34	-2.21	8.55E-7	3	9%	155
		139	5.45/4.7	28.9/49.8	1.36	-1.95	-1.63	6.52E-8	4	13%	237
Aminopeptidase, putative,metallo-peptidase, Clan MF, Family M17, putative	508799.240	35	6.22/6.44	58.9/55.9	-1.55	-1.53	-1.73	5.40E-5	1	2%	52
ATPase beta subunit	509233.180	26	5.15/5.07	58.6/55.7	-2.42	-21.04	-18.44	7.26E-7	5	18%	253
Beta tubulin, putative	506563.40	107	5.58/4.43	45.0/49.7	-1.36	-4.9	-5.17	1.02E-7	3	7%	156
		129	5.30/4.43	33.3/49.7	-1.01	-4.35	-3.99	1.53E-7	5	13%	242
		130	5.15/4.43	33.8/49.7	-1.31	-10.73	-9.26	4.56E-8	6	17%	438
		171	4.71/4.43	28.6/49.7	1.8	1.69	2.07	1.49E-8	7	22%	73
		173	4.65/4.43	25.5/49.7	2.53	6.33	5.29	8.44E-9	4	11%	237
		174	4.58/4.43	25.5/49.7	1.16	2.59	2.43	1.17E-6	4	11%	290
		176	4.47/4.43	25.0/49.7	1.7	3.58	3.52	2.60E-7	3	9%	216
		183	4.34/4.43	19.4/49.7	1.15	2.38	1.93	1.27E-5	2	6%	101
		184	4.25/4.43	19.4/49.7	1.56	5.97	5.14	3.49E-8	2	6%	116
		185	4.25/4.43	21.2/49.7	1.67	4.39	4.22	3.61E-6	2	6%	133
Calreticulin, putative	510685.10	81	6.37/4.49	42.2/46.2	-1.07	1	1.52	1.81E-5	2	6%	89

Descrição	TriTrypDB ID (TeCLB.)	Ref. Spot	Observado/Esperado		Fold-change				Mascot MS/MS ion search		
			pI	MW	4hs	24hs	96hs	Anova	Núm de peptídeos	Cobertura	Pontua- ção
Chaperonin containing t-complex protein, putative	511725.250	12	5.02/4.80	69.7/59.2	-1.95	-12.81	-16.4	4.12E-7	3	9%	113
Chaperonin HSP60;	507641.290 or	17	5.44/5.14	66.2/59.2	-4.9	-19.19	-19.86	1.27E-8	9	24%	470
mitochondrial precursor;	507641.300 or	18	5.55/5.14	66.0/59.2	-4.07	-9.24	-10.18	1.75E-8	3	20%	111
groEL protein; heat shock	510187.551	20	5.65/5.14	65.8/59.2	-3.99	-8.83	-9.9	1.25E-7	7	18%	354
protein 60 (HSP60)		23	5.22/5.14	62.3/59.2	-2.03	-8.02	-9.51	6.42E-8	7	18%	191
		24	5.13/5.14	62.2/59.2	-1.72	-11.52	-13.96	9.42E-8	11	31%	533
		25	5.21/5.14	61.5/59.2	-1.78	-16.99	-15.1	1.61E-7	6	16%	205
		28	5.29/5.14	62.0/59.2	-2.16	-9.12	-9.25	3.25E-8	5	14%	195
		88	4.68/5.14	51.2/59.2	-1.06	-3.44	-2.79	9.76E-7	3	18%	112
		89	4.83/5.14	51.8/59.2	-1.28	-7.85	-7.58	3.21E-7	3	18%	150
		106	5.5/5.14	43.1/59.2	1.23	-5.57	-4.86	2.11E-7	6	15%	177
		131	5.03/5.14	34.0/59.2	-1.76	-9.8	-7.3	3.45E-8	1	5%	76
		162	5.66/5.14	20.3/59.2	1.97	1.81	1.97	4.31E-7	2	10%	62
Chaperonin; Tcomplex-protein 1; theta subunit; putative	506247.50	16	5.42/5.12	68.9/58.3	-2.42	-4.81	-5.44	6.21E-8	3	7%	138
Cystathionine beta-synthase, cysteine synthase, serine sulfhydrylase (CBS)	508177.120 or 506905.50 or 508175.360 or 511691.10	78	6.83/7.14	45.0/47.0	-1.1	-2.96	-2.21	1.61E-7	4	13%	206
		80	6.37/7.14	45.3/47.0	-1.98	-10.23	-12.17	1.75E-8	2	7%	88
Cytochrome c oxidase subunit IV; putative	506529.360 or 510889.50	124	5.51/5.96	36.0/38.9	-1.01	-1.92	-1.58	5.98E-7	2	7%	105
Cytochrome c oxidase subunit V, putative	510565.30 or 508503.20	200	5.5/6.4	14.8/22.2	1.99	6.2	5.12	1.53E-7	2	14%	69
D-isomer specific2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	510099.120	119	6.72/6.41	35.2/38.5	-1.46	-6.4	-5.31	6.69E-7	12	36%	103
		197	5.26/6.41	11.2/38.5	1.13	-4.38	-3.75	9.76E-9	6	20%	321
Dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	509717.20 and 510105.170	0	5.75/6.39	62.2/49.6	-1.32	-7.65	-5.03	1.75E-8	1	3%	61
		33	5.91/6.68	62.1/49.6	-1.49	-7.45	-6.79	4.65E-9	4	14%	167
Dihydrolipoyl dehydrogenase; putative (GCVL-2)	507089.270 or 511025.110	73	6.69/7.4	52.5/54.9	1.01	-2.41	-2.34	2.36E-7	3	7%	98

Descrição	TriTrypDB ID (TeCLB.)	Ref. Spot	Observado/Esperado		Fold-change				Mascot MS/MS ion search		
			pI	MW	4hs	24hs	96hs	Anova	Núm de peptídeos	Cobertura	Pontua- ção
Dipeptidyl-peptidase	508601.141 or 509205.120	29	5.40/5.60	62.4/74.4	-2.19	-5.73	-4.96	5.14E-8	2	3%	58
		30	5.48/5.63	62.3/74.4	-1.9	-7.12	-8.88	1.75E-8	3	6%	139
Drug resistance protein	444777.10	123	5.54/4.05	37.2/50.3	-1.18	1.68	2.34	5.72E-6	1	5%	26
Elongation factor 2, putative	510963.90	36	6.36/5.86	55.8/94.2	-1.82	-6.16	-5.58	5.78E-8	4	6%	197
		49	5.95/5.86	54.6/94.2	-1.99	-7.15	-6.91	2.60E-7	3	4%	130
		50	5.99/5.86	54.6/94.2	-1.93	-11.21	-11.53	3.72E-9	4	6%	146
		65	5.78/5.86	50.2/94.2	-1.4	-12.96	-9.24	3.48E-7	6	8%	325
		125	5.34/5.86	36.0/94.2	-1.2	-7.53	-7.72	1.34E-9	5	9%	293
		112	5.96/5.86	38.0/94.2	1.11	-2.38	-1.3	6.35E-4	4	6%	151
		137	5.38/5.86	30.7/94.2	1.83	1.32	1.98	2.44E-7	3	2%	92
Enolase	504105.140	72	6.54/6.2	50.6/46.4	-2.63	-5.28	-6.37	6.94E-8	2	7%	73
Eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6); putative	506679.70	168	5.04/6.09	20.7/33.2	1.55	1.31	1.27	3.90E-5	2	9%	127
Glucose-regulated protein 78, putative	506585.40	2	5.19/4.82	76.9/71.3	-2.45	-23.64	-16.54	1.02E-7	4	12%	198
		13	4.98/4.82	67.1/71.3	1.21	-2.77	-2.68	1.91E-6	2	4%	88
		95	4.72/4.82	45.7/71.3	-1.08	-4.09	-3.33	7.81E-7	2	3%	74
		96	4.58/4.82	45.4/71.3	1.52	1.68	1.52	4.25E-5	4	9%	297
Glutamamyl caboxypeptidase; putative	507689.40 or 507657.20 or 507657.10	70	6.18/6.51	47.6/43.4	-1.22	-2.15	-2.41	1.66E-6	2	6%	92
		76	6.53/6.51	47.0/43.4	-1.28	-2.09	-2.19	5.13E-7	2	6%	110
		77	6.59/6.51	45.5/43.4	-1.23	-2.99	-2.31	1.36E-7	3	9%	129
Glutamate dehydrogenase	508111.30	212	6.72/8.05	15.9/45.0	1.62	1.64	2	6.63E-6	2	7%	77
		213	6.79/8.05	15.9/45.0	1.88	2.39	2.64	4.83E-8	2	7%	110
		214	6.78/8.05	15.1/45.0	1.86	3.66	4.03	6.54E-9	4	13%	173
Glycerate kinase, putative	508741.170	159	6.49/8.21	20.7/56.1	1.37	-1.87	-2.19	1.43E-6	1	3%	37
Heat-shock protein 70kDa, putative	506135.9 or 509543.50 and 510439.61 or 511211.160 or 511257.10	1	5.14/4.55	76.1/70.0	-2.15	-9.69	-10.51	3.28E-8	2	11%	70
		7	5.55/5.85	72.7/70.9	-1.34	-4.53	-3.34	1.15E-7	4	15%	191
		90	4.90/4.55	51.8/70.0	-1.16	-4.64	-5.4	2.91E-7	2	11%	79
		91	4.98/4.60	52.6/70.0	-1.12	-4.52	-3.7	2.44E-7	4	18%	205
		92	5.00/5.85	47.8/70.9	-1.11	-5.67	-5.23	8.47E-8	2	11%	67
		101	5.13/5.85	44.1/70.9	1.3	-3.49	-3.28	4.17E-9	2	4%	67
		105	5.50/5.85	44.9/70.9	-1.49	-4.58	-3.7	1.75E-7	2	4%	78
		155	5.63/6.56	23.4/30.2	1.7	2.79	2.2	5.79E-5	2	10%	88

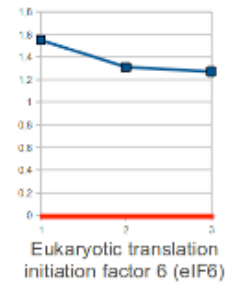
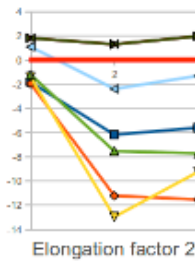
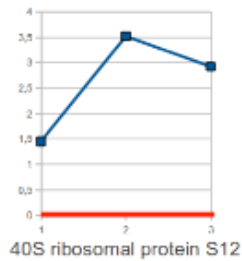
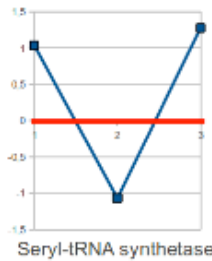
Descrição	TriTrypDB ID (TcCLB.)	Ref. Spot	Observado/Esperado		Fold-change			Mascot MS/MS ion search			
			pI	MW	4hs	24hs	96hs	Anova	Núm de peptídeos	Cobertura	Pontua- ção
		156	5.86/5.85	23.1/70.9	1.87	2.21	1.66	2.44E-7	4	19%	181
		160	6.72/5.85	23.0/70.9	1.08	-2.66	-2.99	2.96E-8	13	48%	107
		164	5.32/5.85	22.1/70.9	1.65	1.87	1.5	8.47E-7	4	14%	214
		175	4.56/5.85	24.1/70.9	1.23	1.34	1.38	8.68E-5	1	2%	66
		177	4.65/5.85	20.8/70.9	2.01	5.22	4.11	5.33E-8	1	2%	72
Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	507029.30	8	5.65/5.71	72.4/71.0	-1.39	-4.87	-3.73	9.36E-9	2	4%	81
		9	5.77/5.71	72.7/71.0	-1.42	-5.3	-4	9.88E-9	6	14%	293
		10	5.90/5.71	73.1/71.0	-1.32	-3.83	-3.08	7.83E-8	3	7%	85
		11	5.87/5.71	69.7/71.0	-1.05	-1.87	-1.94	1.55E-5	4	10%	152
		19	5.60/5.71	67.4/71.0	1.18	-1.4	-1.53	1.17E-6	5	12%	285
		21	5.73/5.71	67.7/71.0	1.26	-1.42	-1.58	1.70E-7	4	10%	109
Heat-shock protein 85kDa, putative	509643.130 or 507713.30 or 509105.140	93	4.89/4.79	47.6/80.7	-1.44	-5.4	-4.32	7.81E-7	2	3%	87
		97	4.90/4.79	43.2/80.7	1.43	-1.5	-1.15	3.25E-7	3	5%	114
		98	4.95/4.79	43.0/80.7	1.02	-3.01	-3.37	1.49E-8	2	3%	145
		104	5.30/4.79	41.5/80.7	-1.63	-16.15	-18.55	2.26E-8	3	5%	143
		126	5.40/4.79	33.5/80.7	1.2	-3.77	-3.74	4.34E-8	2	3%	89
		134	4.62/4.79	40.6/80.7	1.39	2.58	2.18	7.35E-6	4	6%	258
		148	4.95/4.79	28.8/80.7	1.76	2.78	2.47	3.49E-8	1	1%	100
149	4.86/4.79	28.9/80.7	1.67	3.55	3.23	6.89E-8	1	1%	62		
Hypothetical protein, conserved	505989.110	182	4.46/4.50	18.4/22.2	-1.25	3.47	3.51	1.92E-5	2	11%	62
		202	5.72/4.99	15.1/28.6	2.75	7.08	7.83	1.34E-9	4	22%	174
		203	5.67/4.99	14.2/28.6	1.87	3.96	3.33	3.66E-6	9	41%	92
Hypothetical protein	508817.20 or 503801.70	204	5.86/4.99	14.1/28.6	1.48	2.12	2.78	1.88E-7	6	31%	326
		154	5.38/8.58	23.5/66.7	1.78	4.80	4.29	3.96E-8	1	1%	17
Nucleoside phosphorylase, putative	508989.9 and 509569.100	121	6.90/6.42	34.2/37.0	-1.18	-5.59	-4.38	2.96E-8	3	16%	190
		118	6.38/6.42	35.6/37.0	-1.12	-3.17	-2.56	1.17E-8	1	4%	23
Oligopeptidase B, putative	503995.50	47	5.86/6.1	55.2/80.8	-1.71	-5.94	-7.55	9.76E-9	2	3%	68
		63	5.86/6.1	52.0/80.9	-1.12	-2.26	-2.47	8.01E-7	2	3%	69
Paraflagellar rod protein 3	509617.20	60	6.09/5.96	56.1/68.6	1.21	-3.51	-4.33	6.89E-8	1	2%	24
Peptidase M20/M25 /M40	510257.80	39	5.57/5.19	55.4/51.2	-1.74	-5.55	-7.07	8.47E-7	2	6%	66

Descrição	TriTrypDB ID (TcCLB.)	Ref. Spot	Observado/Esperado		Fold-change				Mascot MS/MS ion search		
			pI	MW	4hs	24hs	96hs	Anova	Núm de peptídeos	Cobertura	Pontua- ção
Peroxiredoxin; tryparedoxin peroxidase	509499.14	189	5.50/5.19	54.4/51.2	-1.64	-5.35	-9.41	2.26E-8	1	3%	31
Phosphoglycerate kinase, putative or 3-phosphoglycerate kinase, glycosomal (PGKA)	511419.40 or 505999.90 or 511419.50 or 505999.100	74	6.76/7.4	51.9/54.9 0	-2.99	-5.56	-5.35	2.46E-7	1	3%	78
Prostaglandin F2 alpha synthase (TcPGFS)	508461.80	14	5.11/6.43	68.1/42.2	-1.19	-6.45	-7.01	1.59E-6	4	14%	169
		111	5.91/6.43	40.0/42.2	-1.31	-11.76	-7.75	1.74E-8	5	17%	284
		113	6.10/6.43	40.0/42.2	-1.11	-10.19	-6.05	1.75E-8	8	38%	116
		114	6.09/6.43	38.7/42.2	1.12	-6.24	-5.06	3.12E-7	4	13%	188
		144	6.15/6.43	26.7/42.2	1.49	-1.65	-1.39	5.49E-8	4	13%	217
		161	5.52/6.43	22.1/42.2	1.74	1.88	1.99	6.34E-8	9	31%	92
Protein disulfide isomerase	506247.10 or 507611.370	180	4.42/4.6	20.9/53.5	1.46	3.7	3.6	2.44E-7	2	4%	44
Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit; putative	510091.80	132	5.03/5.02	30.9/37.8	1.08	-2.21	-1.88	1.27E-6	5	20%	191
		133	4.62/5.02	40.7/37.8	1.02	-4.58	-3.83	4.13E-7	2	6%	108
Pyruvate kinase 2, putative	507993.390 or 511281.60	68	5.97/7.44	46.6/54.6	-1.3	-4.94	-4.8	1.73E-7	1	2%	29
Pyruvate phosphate dikinase	510101.140	194	5.00/8.27	13.5/100. 8	1.83	10.51	7.42	7.88E-9	2	3%	94
Receptor for activated C kinase 1, putative	511211.120 or 511211.130	122	5.93/6.04	35.4/35.0	-1.22	-6.66	-6.06	2.31E-9	3	11%	122
S-adenosylhomocysteine hydrolase	511229.50 or 511589.200	193	5.25/6.64	12.9/48.4	1.41	-1.23	-1.1	3.74E-6	2	7%	80
Seryl-tRNA synthetase	511163.1 or 506777.80	140	5.38/5.41	28.9/25.7	1.4	-1.07	1.28	3.36E-6	3	19%	97
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative	507767.10	150	4.92/5.58	26.2/34.5	1.63	2.03	2.25	1.08E-6	2	7%	87
Thiol-dependent reductase 1; putative; thiol transferase;	509105.70 or 503419.30	62	6.00/5.83	51.9/50.7	-1.18	-2.07	-1.56	4.56E-6	2	6%	86

Descrição	TriTrypDB ID (TcCLB.)	Ref. Spot	Observado/Esperado		Fold-change				Mascot MS/MS ion search		
			pI	MW	4hs	24hs	96hs	Anova	Núm de peptídeos	Cobertura	Pontua- ção
putative; glutathione s- transferase; putative		158	6.21/5.83	21.5/50.7	-1.32	-2.17	-2.64	4.48E-6	1	3%	32
Trans-sialidase	509927.10	186	4.18/6.67	21.0/54.7	1.67	4.7	4.71	6.10E-9	1	4%	25
Tryparedoxin peroxidase	487507.10 or	210	6.24/6.75	11.5/22.4	2.17	3.18	3.42	8.05E-5	1	5%	33
	509445.10 or	211	6.66/6.75	17.0/22.4	-1.52	-3.96	-1.82	3.25E-8	3	22%	105
	504839.28 or	215	6.75/6.75	11.8/22.4	1.44	-1.3	1.25	1.83E-6	3	19%	109
	507259.10										
Tyrosine aminotransferase	510187.20 and	64	5.83/7.2	50.6/46.1	-1.22	-1.77	-1.51	5.02E-5	1	2%	58
	510187.50 or	79	6.25/6.14	44.9/46.1	-2.36	-31.03	-28.73	1.34E-9	4	16%	160
	510187.40 or	115	6.21/6.14	38.9/46.1	-1.05	-7.27	-7.38	9.64E-9	4	11%	110
	510187.30	116	6.18/6.14	37.0/46.1	1.09	-5.43	-4.73	8.44E-9	2	14%	128
Vacuolar ATP synthase subunit B	506025.50 or	37	5.71/5.29	59.1/55.5	-1.69	-3.54	-4.01	2.44E-7	6	21%	207
	511209.10										

Destacado em negrito estão as proteínas superexpressas em todos os tempos analisados. Mw – massa molecular; pI – ponto isoelétrico..

Síntese Proteica



Enovelamento proteico

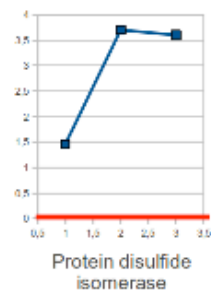
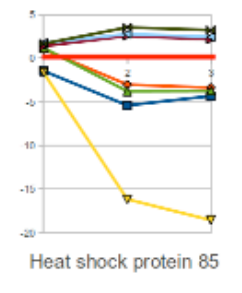
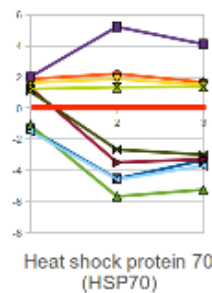
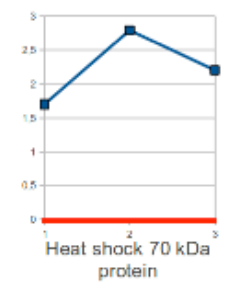
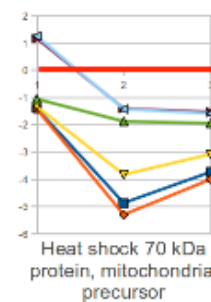
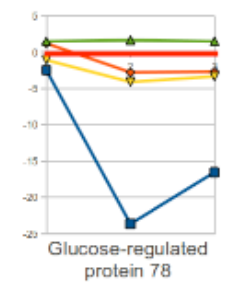
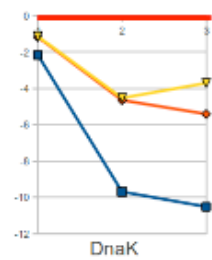
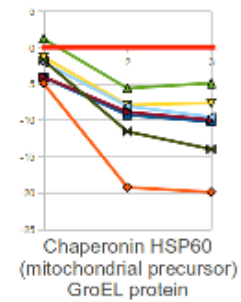
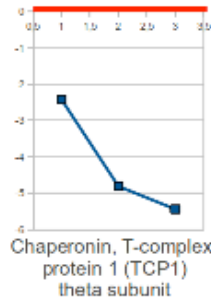
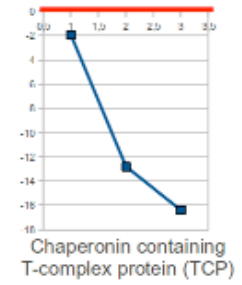
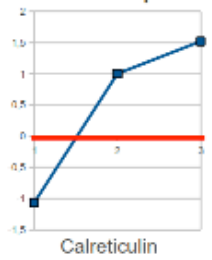
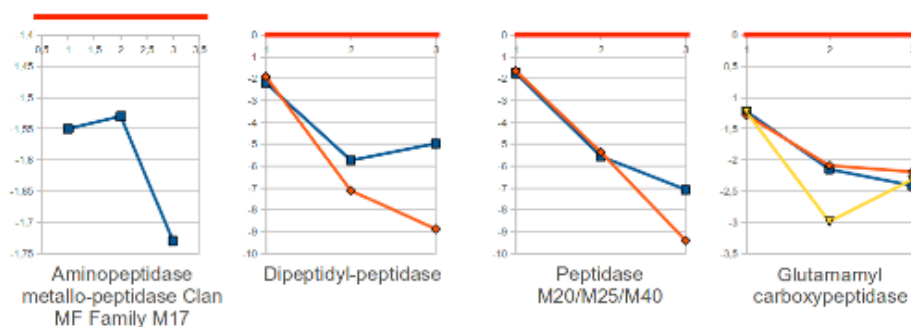
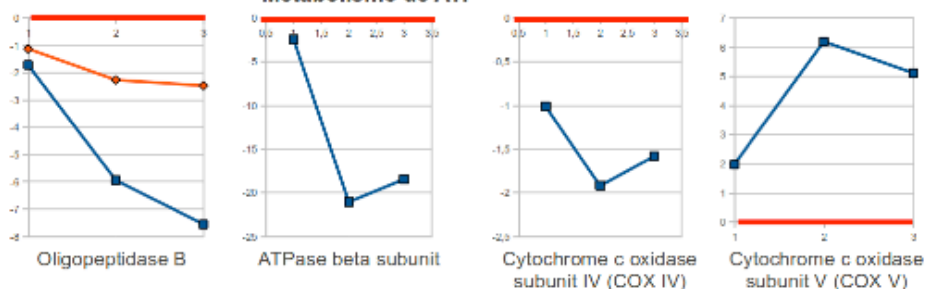


Figura 12 - Classificação das proteínas identificadas segundo a função biológica. A expressão é dada de acordo com o *fold-change* de cada proteína. O eixo x representa os tempos após irradiação 4h (1), 24h (2) e 96h (3), o eixo y representa o *fold-change*. As várias formas de uma mesma proteína estão representados em linhas de cores diferentes. A linha vermelha em todos os gráficos representa a referência não irradiado (N.I) cujo *fold-change* é determinado como sendo zero.

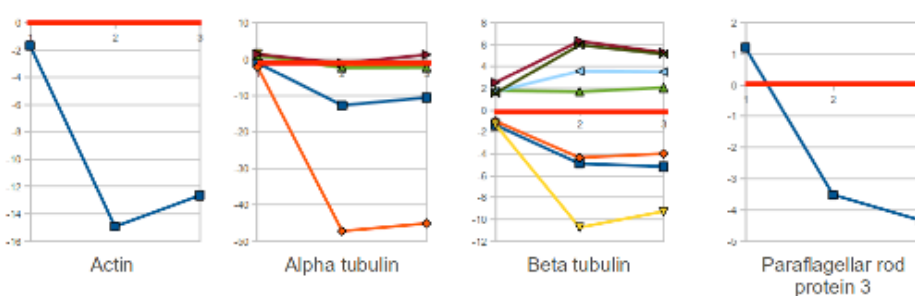
Processamento e degradação proteica



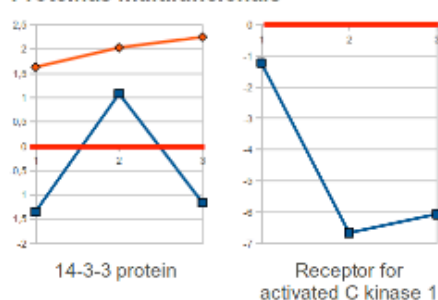
Metabolismo de ATP



Estrutura celular e motilidade



Proteínas multifuncionais



Pumps moleculares

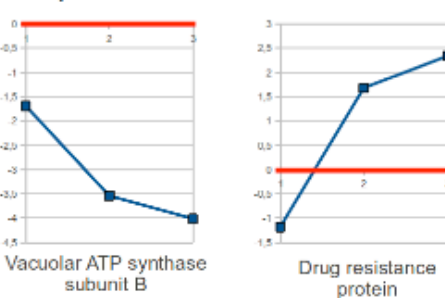
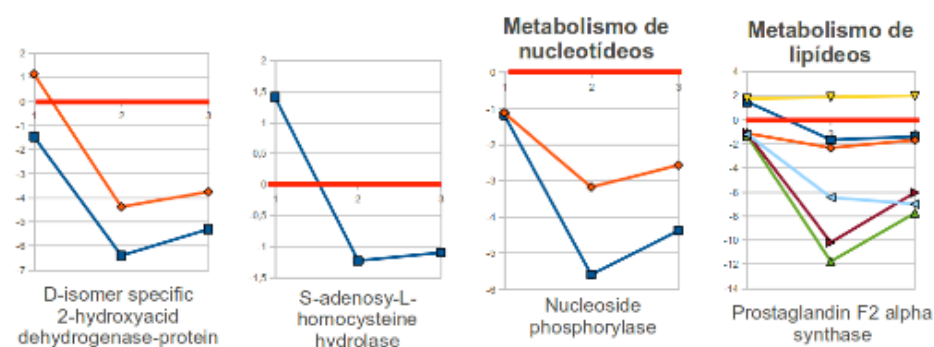
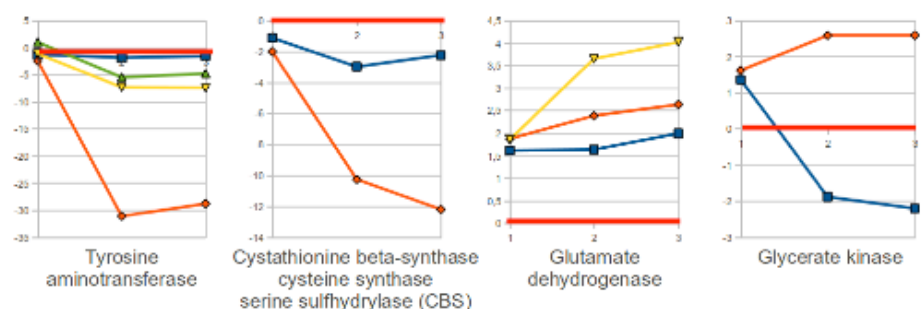


Figura 12 (Continuação) – Classificação das proteínas identificadas segundo a função biológica. A expressão é dada de acordo com o *fold-change* de cada proteína. O eixo x representa os tempos após irradiação 4h (1), 24h (2) e 96h (3), o eixo y representa o *fold-change*. As várias formas de uma mesma proteína estão representados em linhas de cores diferentes. A linha vermelha em todos os gráficos representa a referência não irradiado (N.I) cujo *fold-change* é determinado como sendo zero.

Metabolismo de aminoácidos



Glicólise e Gliconeogênese

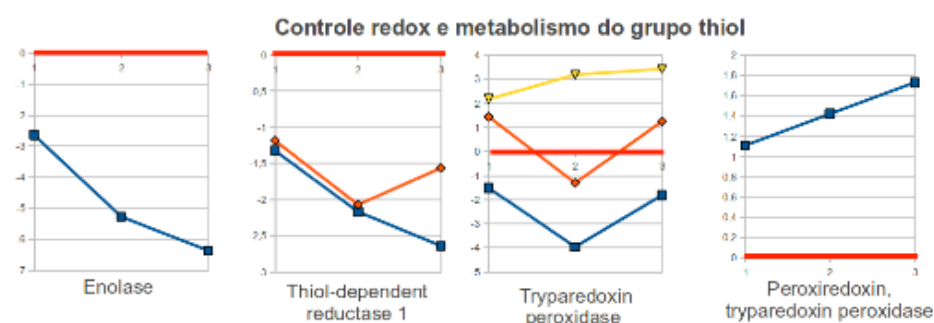
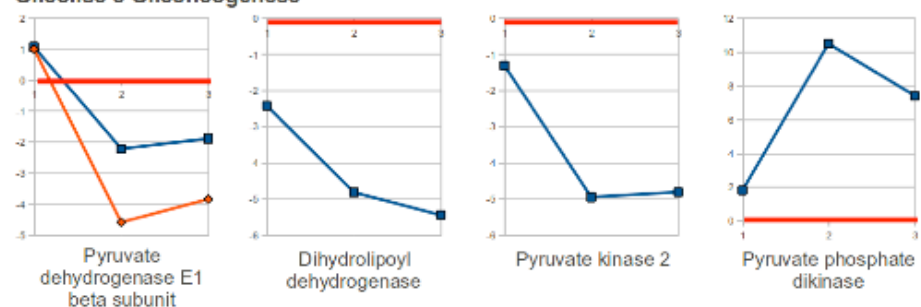


Figura 12 (Continuação) – Classificação das proteínas identificadas segundo a função biológica. A expressão é dada de acordo com o *fold-change* de cada proteína. O eixo x representa os tempos após irradiação 4h (1), 24h (2) e 96h (3), o eixo y representa o *fold-change*. As várias formas de uma mesma proteína estão representadas em linhas de cores diferentes. A linha vermelha em todos os gráficos representa a referência não irradiado (N.I) cujo *fold-change* é determinado como sendo zero.

Proteínas hipotéticas

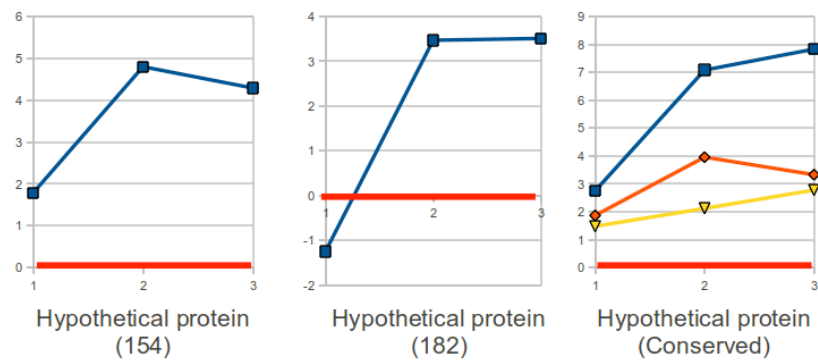


Figura 12 (Continuação) - Classificação das proteínas identificadas segundo a função biológica. A expressão é dada de acordo com o *fold-change* de cada proteína. O eixo x representa os tempos após irradiação 4h (1), 24h (2) e 96h (3), o eixo y representa o *fold-change*. As várias formas de uma mesma proteína estão representados em linhas de cores diferentes. A linha vermelha em todos os gráficos representa a referência não irradiado (N.I) cujo *fold-change* é determinado como sendo zero.

4.5 - Avaliação das alterações de tamanho das proteínas após a exposição do parasito à radiação gama

Como mencionado anteriormente, várias formas de uma mesma proteína foram identificadas por MS/MS, curiosamente, elas apresentam perfis de expressão diferentes. A figura 13 representa graficamente dois (HSP70 e prostaglandina F2 alfa sintase) de vários casos onde formas superexpressas de uma dada proteína apresentam massa molecular bem menor que a predita.

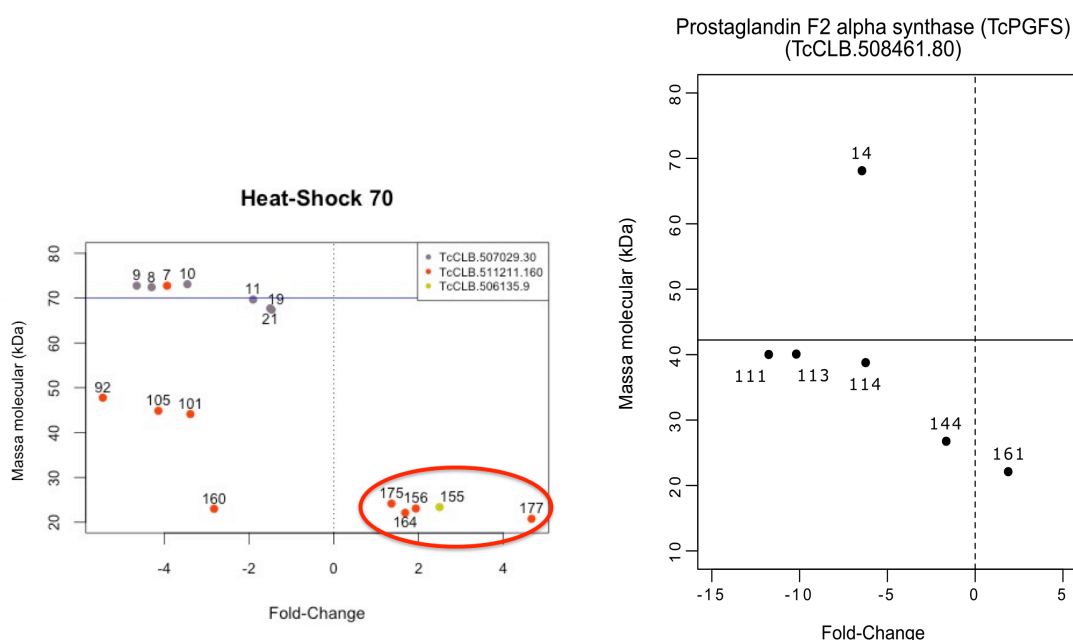


Figura 13 - Formas distintas das proteínas HSP70 e prostaglandina F2 alfa sintase diferencialmente expressas após irradiação. Nos gráficos estão representados os números dos *spots* referentes a HSP70 (isoformas protéicas codificadas pelos genes TcCLB.507029.30, TcCLB.511211.160 e TcCLB.506135.9) e prostaglandina F2 alfa sintase (codificada pelo gene TcCLB.508461.80). As formas de HSP70 superexpressas (fragmentos protéicos correspondentes aos *spots* 155, 156, 164, 175 e 177) apresentam massa molecular em torno de 25 kDa, bem menor que a massa molecular predita de 70 kDa para essa proteína. O mesmo pode ser visto para prostaglandina F2 alfa cuja forma superexpressa (fragmento protéico correspondente ao *spot* 161) tem massa molecular de 22,1 kDa e a massa predita é de 42 kDa.

Ao analisarmos o conjunto de *spots* (proteínas identificadas no MS/MS e *spots* não identificados), principalmente 24 e 96 horas após a irradiação, observou-se uma tendência para a superexpressão de moléculas com massa

molecular menor (Figura 14). Os *spots* identificados na análise do *DeCyder* como superexpressos (pontos de cor vermelha figura 14) estão localizados principalmente na parte inferior do gel 2D (massa molecular menor), enquanto os *spots* subexpressos (pontos de cor verde) estão mais esparsamente distribuídas em todo o gel (Figura 14A). Além disso, *spots* com massa molecular menor tendem a apresentar *fold-change* maior e *spots* com maior massa molecular tendem a apresentar menor *fold-change* (Figura 14B).

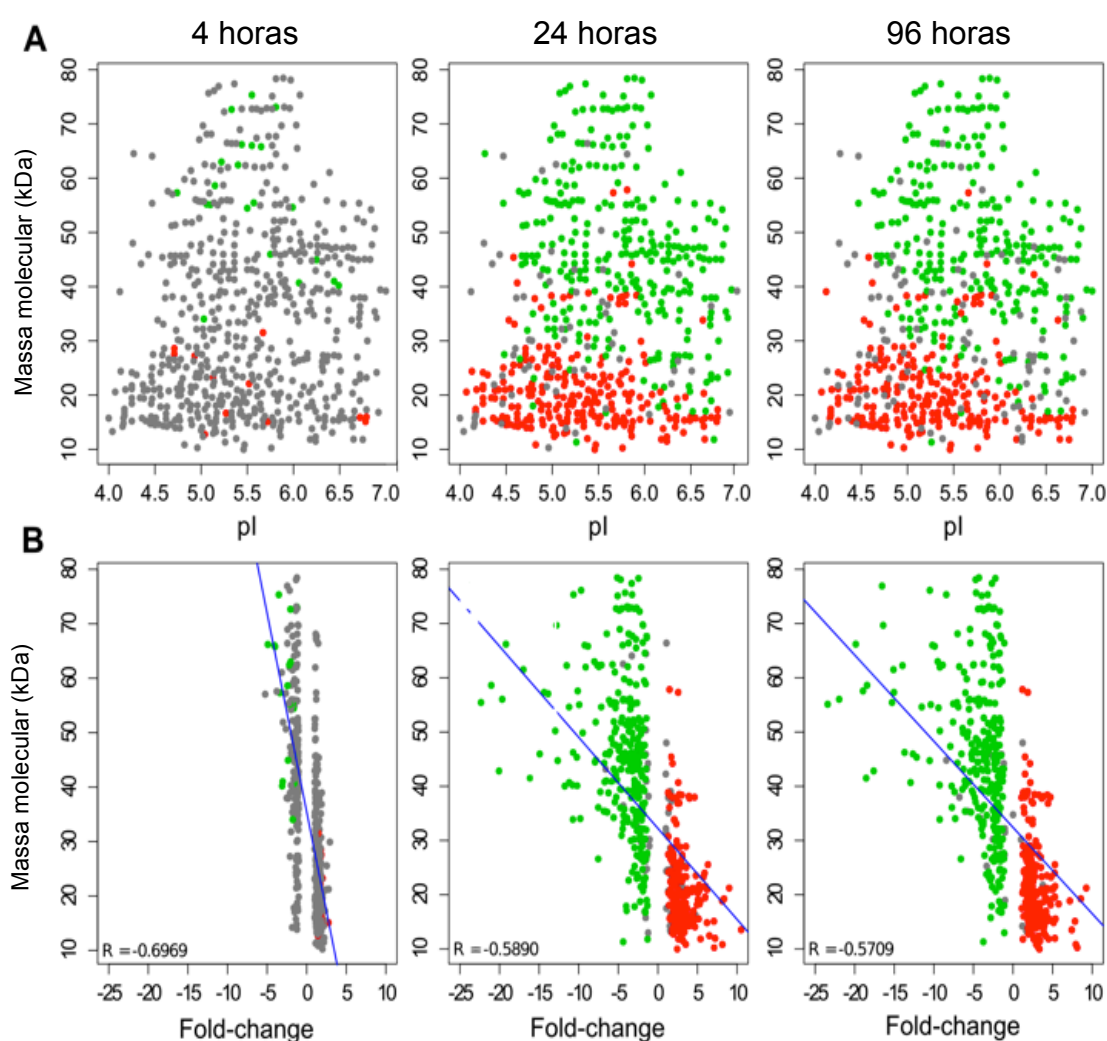


Figura 14 – Distribuição dos *spots* super e subexpresso versus a massa molecular, pI e *fold-change*. Nos gráficos de dispersão os *spots* superexpressos estão representados em vermelho e os subexpressos em verde. *Spots* com nenhuma diferença significativa na expressão estão representados pela cor cinza. A linha azul indica a correlação negativa entre massa molecular e *fold-change*.

O teste de Wilcoxon foi aplicado e confirmou que os valores médios de massa molecular observada para os *spots* superexpressos e subexpressos foram diferentes em cada tempo após irradiação ($p < 1e-09$; valores de mediana 55.45 para proteínas subexpressas em relação à 19.39 para proteínas superexpressas, 45.64 para proteínas subexpressas em relação à 19.38 para proteínas superexpressas e 46.51 para proteínas subexpressas em relação à 19.42 para proteínas superexpressas nos tempos 4, 24 e 96 horas após irradiação, respectivamente (Figura 15A).

Quando comparamos a massa molecular esperada (massa predita para as proteínas obtida do banco de dados TriTryDB) com a massa molecular observada (experimental) das proteínas identificadas por MS/MS nos tempos de 24 e 96 horas após irradiação, observou-se uma diminuição significativa no tamanho das proteínas superexpressas (Figura 15B). É importante mencionar que estes resultados não parecem ser uma consequência da degradação de proteínas, uma vez que os *spots* das proteínas identificadas podem ser observados claramente no gel de 2D. Isto não ocorreria se as proteínas estivessem degradadas; nesta situação, peptídeos de tamanho variável seriam gerados e nenhum *spot* poderia ser visualizado de forma nítida no gel.

Por fim, uma análise de regressão linear entre os níveis de mRNAs e de proteínas identificadas concomitantemente em ambos os estudos (microarranjo e proteômica), foi realizada para cada tempo após a irradiação estudado. A correlação foi extremamente pobre em todos os tempos analisados $R^2 = 0,064$ em 4 horas, $R^2 = 0,27$ e $0,24$ em 24 e 96 horas após a irradiação, respectivamente

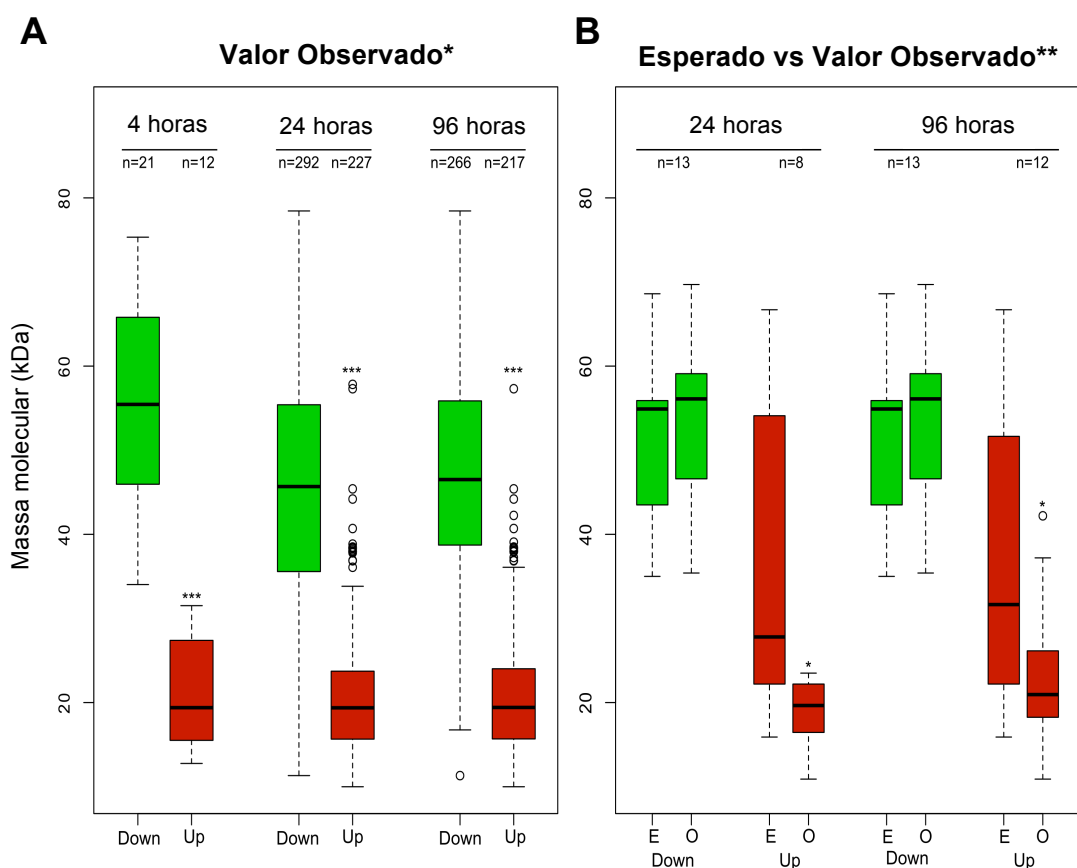


Figura 15 - Boxplots do valores de massa molecular observados e esperados de *T. cruzi* irradiado. A) Distribuição da massa molecular observada em *spots* subexpressos (Down - verde) e superexpressos (Up - vermelho) em cada tempo após irradiação. B) Comparação entre a massa molecular esperada (E) e a observada (O) das proteínas identificadas por MS/MS, sub e superexpressas nos tempos após irradiação 24 e 96 horas. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.001$.

4.6 – Avaliação da atividade mitocondrial de *T. cruzi* após radiação gama

A mitocôndria desempenha um papel especial na viabilidade celular, por ser o principal sítio intracelular de geração de ATP e fonte de moléculas de sinalização que controlam o ciclo celular e a apoptose (Cadenas, 2004). Para avaliar a atividade mitocondrial do parasito sob o estresse de radiação gama foi realizada a medida do consumo de oxigênio mitocondrial (Figura 16A) a partir do complexo II da cadeia transportadora de elétrons, uma vez que utilizamos nos ensaios o succinato como substrato. O complexo II mitocondrial (succinato: quinona redutase - SQR) tem um papel central na adaptação do parasito aos seus

hospedeiros (Morales *et al.*, 2009). Outro parâmetro analisado foi a velocidade máxima da respiração (Figura 16B). Como pode-se observar na figura 16, o consumo de oxigênio e a velocidade máxima da respiração tendem a ser maiores nos parasitos irradiados quando comparados ao controle não irradiado, em todos os tempos após irradiação (Figuras 16A e B).

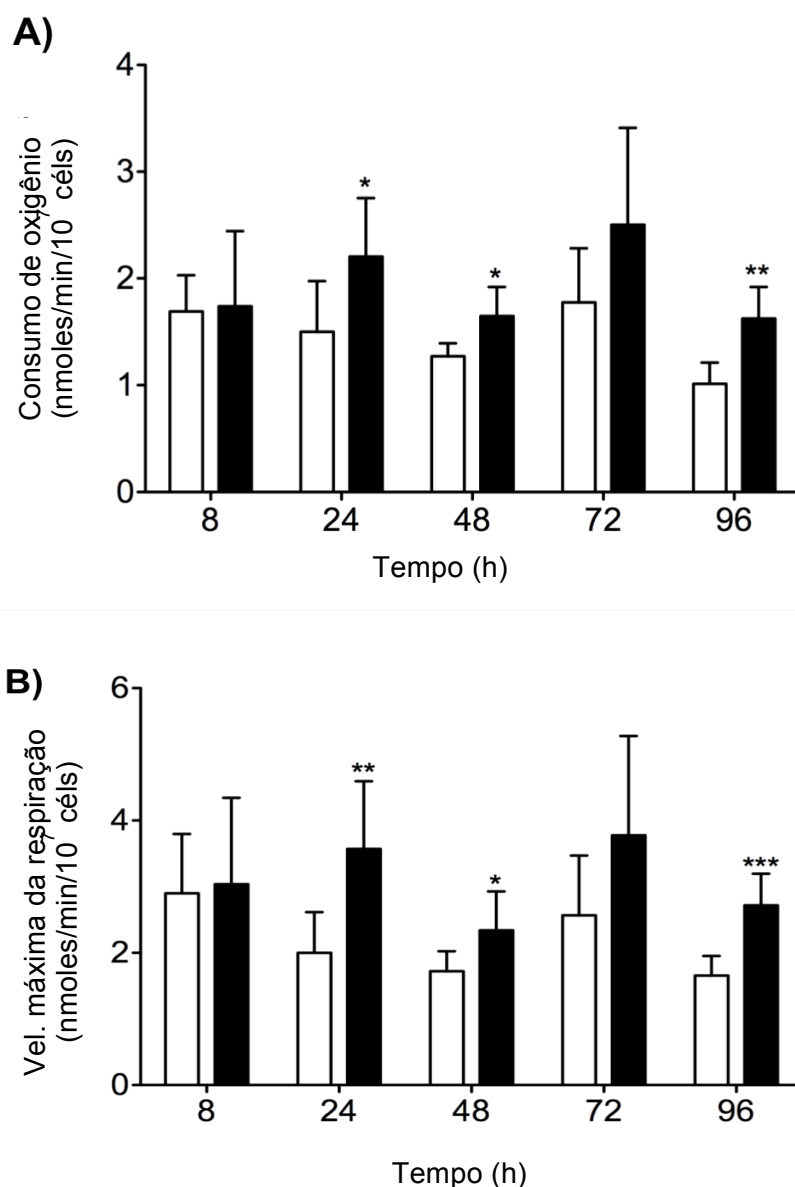


Figura 16 - Consumo de oxigênio (A), velocidade máxima da respiração (B) em *T. cruzi* irradiados e não irradiados. Os gráficos A e B representam respectivamente o consumo de oxigênio e a velocidade máxima da respiração dos parasitos não irradiados (em branco) em relação aos parasitos irradiados (em preto) na dose de 500 Gy. Valores de média e desvio padrão referentes a dois experimentos independentes realizados em triplicata. *Análise estatística:* teste t de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ para os grupos indicados.

O controle respiratório (CR) (Figura 17) é obtido mediante a razão do estado 3 (valor do consumo de O_2 depois da adição de ADP) pelo estado 4 (consumo de O_2 após adição de oligomicina, um inibidor da ATP sintase). Esta razão indica o grau de acoplamento entre fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória mitocondrial. Os resultados do controle respiratório demonstram que os parasitos irradiados apresentaram menor CR que os não irradiados nos tempos 48, 72 e 96 horas após a irradiação.

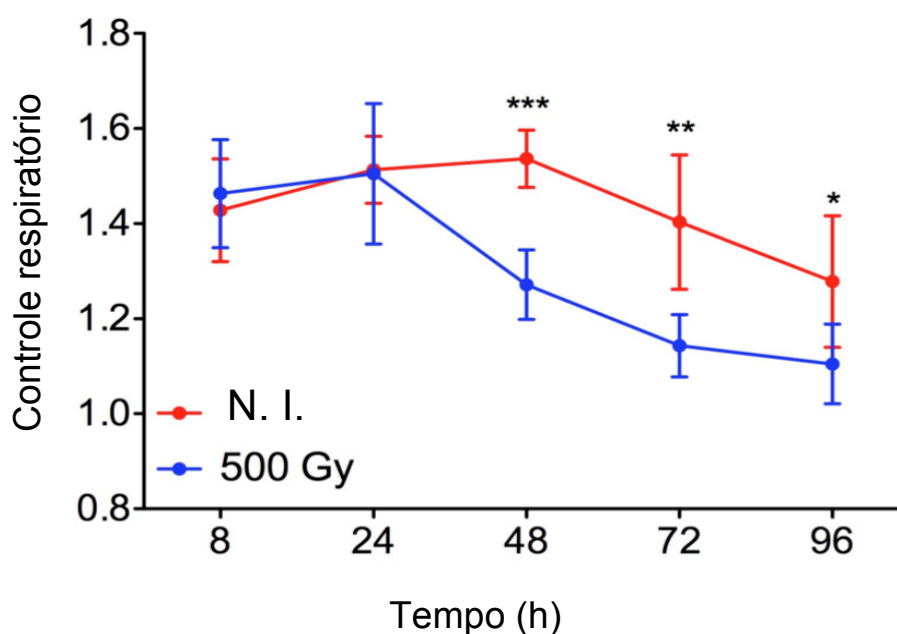


Figura 17 - Controle respiratório em *T. cruzi* irradiado e não irradiado. No gráfico estão representados os controles respiratórios dos parasitos não irradiados (em vermelho) e irradiados (em azul). Valores de média e desvio padrão referentes a dois experimentos independentes realizados em triplicata. *Análise estatística*: teste t de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ para os grupos indicados.

Apesar do consumo de O_2 em *T. cruzi* irradiado estar aumentado (Figura 16A), a liberação de H_2O_2 apresenta uma diminuição ao longo dos tempos após irradiação, como pode ser observado na figura 18. A menor liberação de H_2O_2

por parte dos parasitos irradiados pode estar relacionada à maior velocidade da respiração destes parasitos (Figura 16B). Outra hipótese seria que o *T. cruzi* irradiado poderia apresentar um sistema de defesa antioxidante mais efetivo que o parasito em seu estado normal.

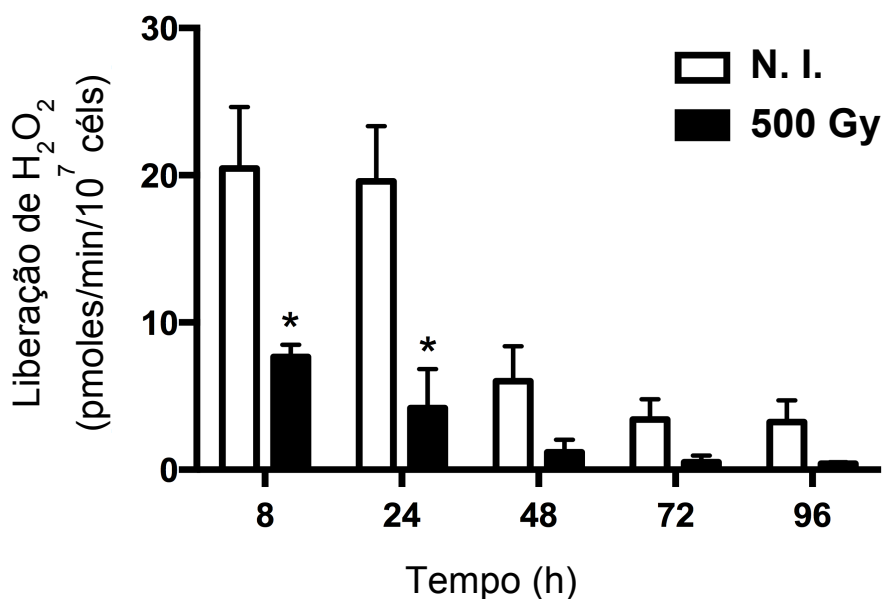


Figura 18 - Liberação de peróxido de hidrogênio mitocondrial em parasitos irradiados (500 Gy) e não irradiados (N.I.). Os dados são referentes à média e desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. *Análise estatística:* teste t de Student $p < 0.05$.

Os níveis de ATP dos parasitos irradiados foram significativamente maiores que dos parasitos não irradiados em todos os tempos analisados, como mostra a figura 19. Considerando os severos danos que a radiação gama causa ao material genético do parasito e a eficiência que *T. cruzi* apresenta em reparar essas lesões, é esperado que ocorra um aumento na sua demanda energética. Dessa forma, uma maior produção de ATP por *T. cruzi* irradiado pode ser necessária para suprir as vias de reparo atuantes.

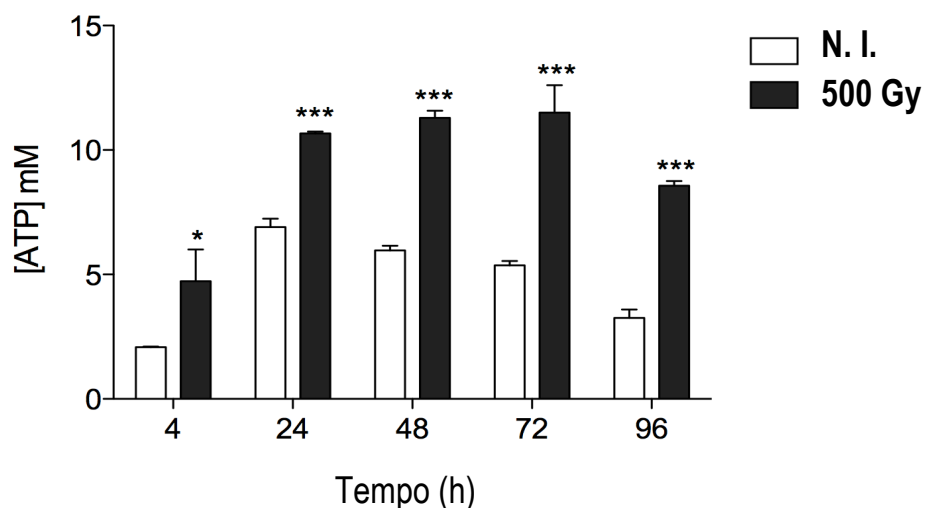
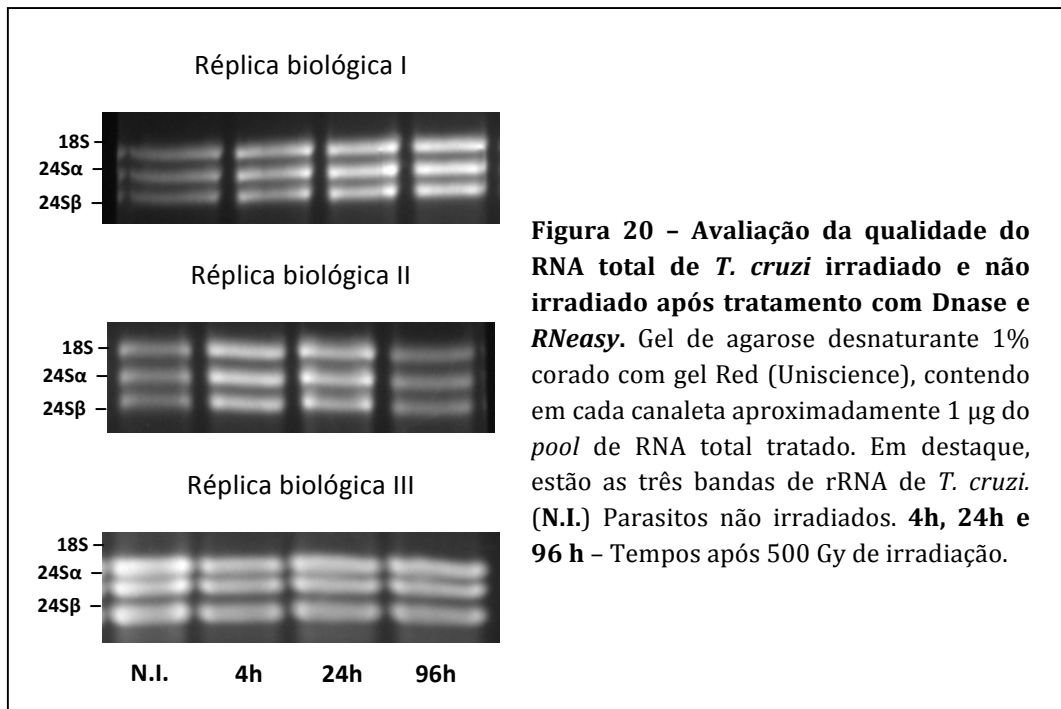


Figura 19 – Níveis de ATP em *T. cruzi* irradiado (500 Gy) e não irradiado (N.I). Os níveis de ATP foram determinados em 10^8 céls/mL. Foram realizados 4 ensaios independentes, os dados acima são representativos de um ensaio. *Análise estatística:* teste t de Student * $p < 0.05$ e $p < 0.001$ ***.

4.7 – Obtenção de RNA total de *T. cruzi* irradiado e não irradiado para realização de qRT-PCR

Considerando os achados prévios de nossos ensaios bioquímicos (aumento da atividade mitocondrial de *T. cruzi* irradiado e menor liberação de H_2O_2), decidimos avaliar por qRT-PCR, a expressão de alguns genes mitocondriais e de genes do sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi* sob o estresse de radiação gama. Para tal, culturas de epimastigostas de *T. cruzi* foram irradiadas e o RNA total dos tempos após irradiação extraídos, assim como o RNA total dos parasitos não irradiados. Três ensaios de extração de RNA total foram realizados (três réplicas biológicas). As amostras foram devidamente tratadas para remoção de impurezas que pudessem vir a comprometer a qRT-PCR. A qualidade dos RNAs após o tratamento foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% desnaturante corado com gel Red (Uniscience) (Figura 20).



4.8 - Análise da expressão gênica em *T. cruzi* irradiado por qRT-PCR

Nas reações de qRT-PCR foram utilizados dois genes normalizadores, actina e GPI8. A média dos valores de Ct (*threshold cycle*) para os dois genes a cada tempo analisado foi obtida e a expressão (*fold-change*) calculada usando a fórmula $-2\Delta\Delta Ct$. Os genes actina e GPI8 de *T. cruzi* mostraram-se bons normalizadores para a reação de qRT-PCR, uma vez que não houve variação significativa na expressão destes após a irradiação. Como pode ser visto na figura 21 não houve diferença nos valores de Ct obtidos para esses genes.

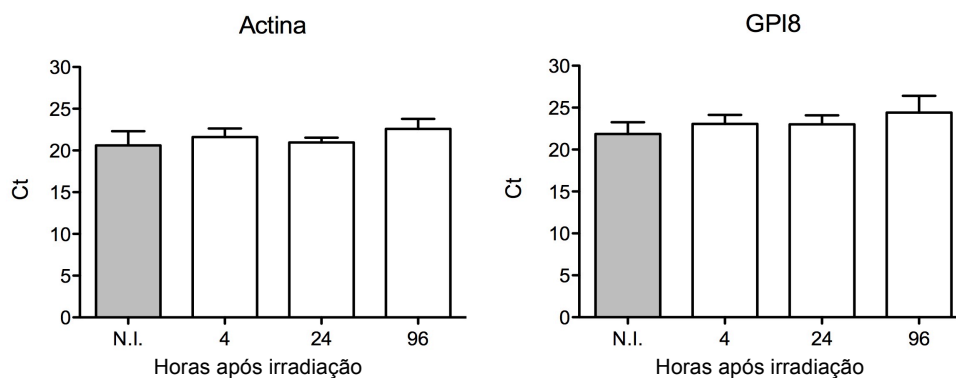


Figura 21 – Ct dos genes normalizadores da qRT-PCR. O valor de Ct não variou (Ct em torno de 20) ao longo dos tempos após irradiação. Também não foi observada diferença significativa nos valores de Ct entre os genes normalizadores.

Os genes do maxicículo de *T. cruzi* analisados neste trabalho (COI, ND1 e 5, MURF1, Cyb), foram induzidos após a irradiação, como pode ser observado na figura 22, sendo esta indução mais evidente no tempo 96 horas após irradiação. O único gene cuja indução não foi estatisticamente significativa foi o da ATPase subunidade 6. Estes resultados são confirmatórios àqueles encontrados pela análise prévia por microarranjo realizada para os mesmos genes pelo nosso grupo (Grynberg *et al.*, 2012). Na figura 23, está representada graficamente a comparação dos resultados obtidos para os genes em estudo utilizando as duas técnicas. O perfil de expressão para os genes do maxicículo é bastante parecido quando analisado por microarranjos e por qRT-PCR. Uma única discrepância pôde ser observada para o gene ND5 que na técnica de microarranjo apresentou uma diminuição na expressão no tempo 96 horas.

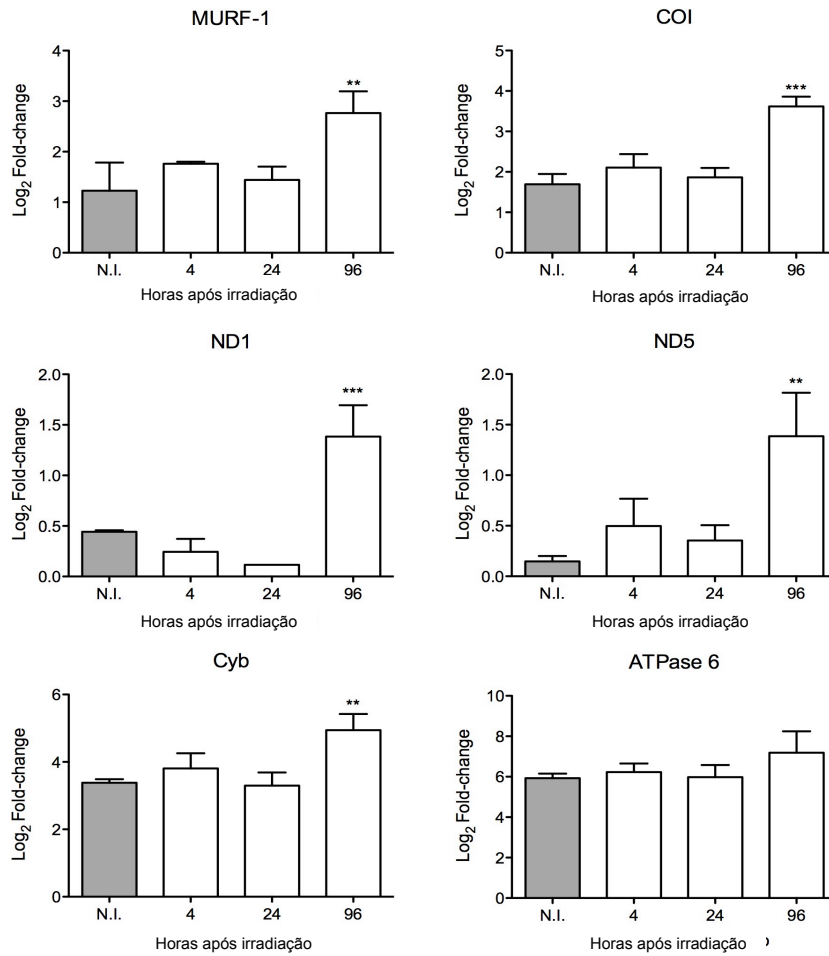


Figura 22 - Expressão dos genes do maxicirculo de *T. cruzi* após radiação gama. Os gráficos representam a expressão dos genes do maxicirculo de *T. cruzi* após irradiação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

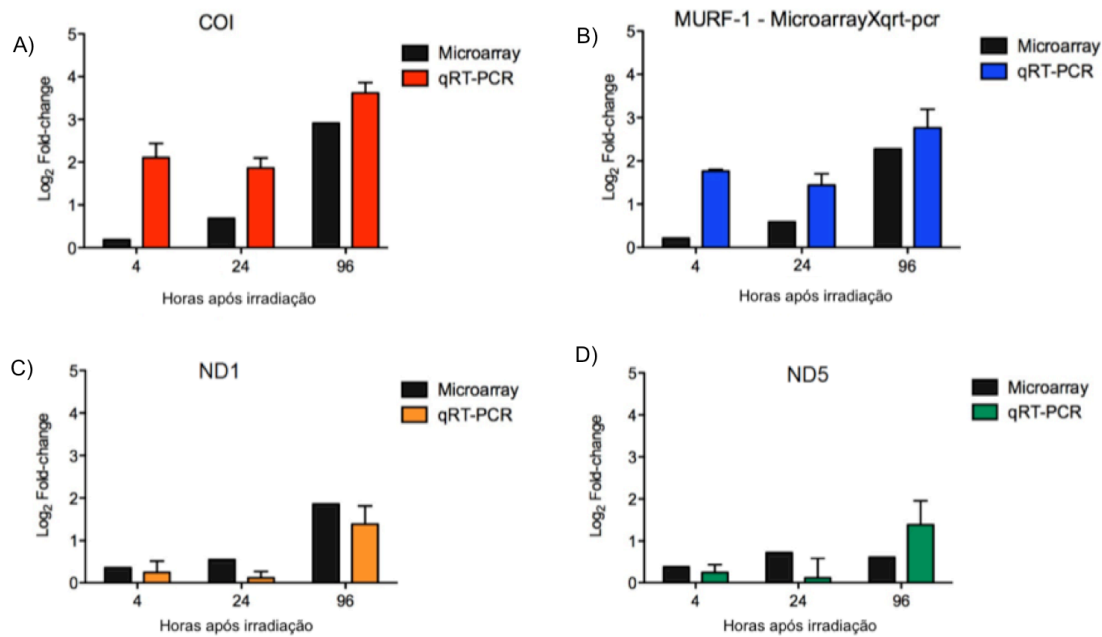


Figura 23 – Comparação entre os resultados de qRT-PCR e microarranjo da expressão dos genes do maxicirculo de *T. cruzi* após irradiação.

Os resultados obtidos na qRT-PCR para a expressão dos genes nucleares para proteínas mitocondriais (Figura 24) e para os genes do sistema de defesa antioxidante (Figura 25) aparentemente não mostraram alterações na expressão desses genes nos diferentes tempos após irradiação. Os resultados devem ser repetidos, uma vez que tivemos problemas com a grande variação de expressão gênica entre as réplicas biológicas. Nenhum dos resultados tiveram significância estatística para que pudéssemos concluir sobre o padrão de expressão dos genes analisados.

Infelizmente, não foi possível mostrar em *T. cruzi*, sob estresse de radiação gama, a superexpressão de genes antioxidantes através da qRT-PCR; o que poderia explicar a menor liberação de peróxido de hidrogênio por esses parasitos nessa condição. Entretanto, o estudo de microarranjo realizado anteriormente por nosso grupo (Grynberg *et al.*, 2012) mostrou que duas peroxidases estão superexpressas após a irradiação, a Peroxidase 2 tripanotione/triparedoxina dependente e a triparedoxina, indicando que o parasito pode estar respondendo ao estresse oxidativo causado pela radiação.

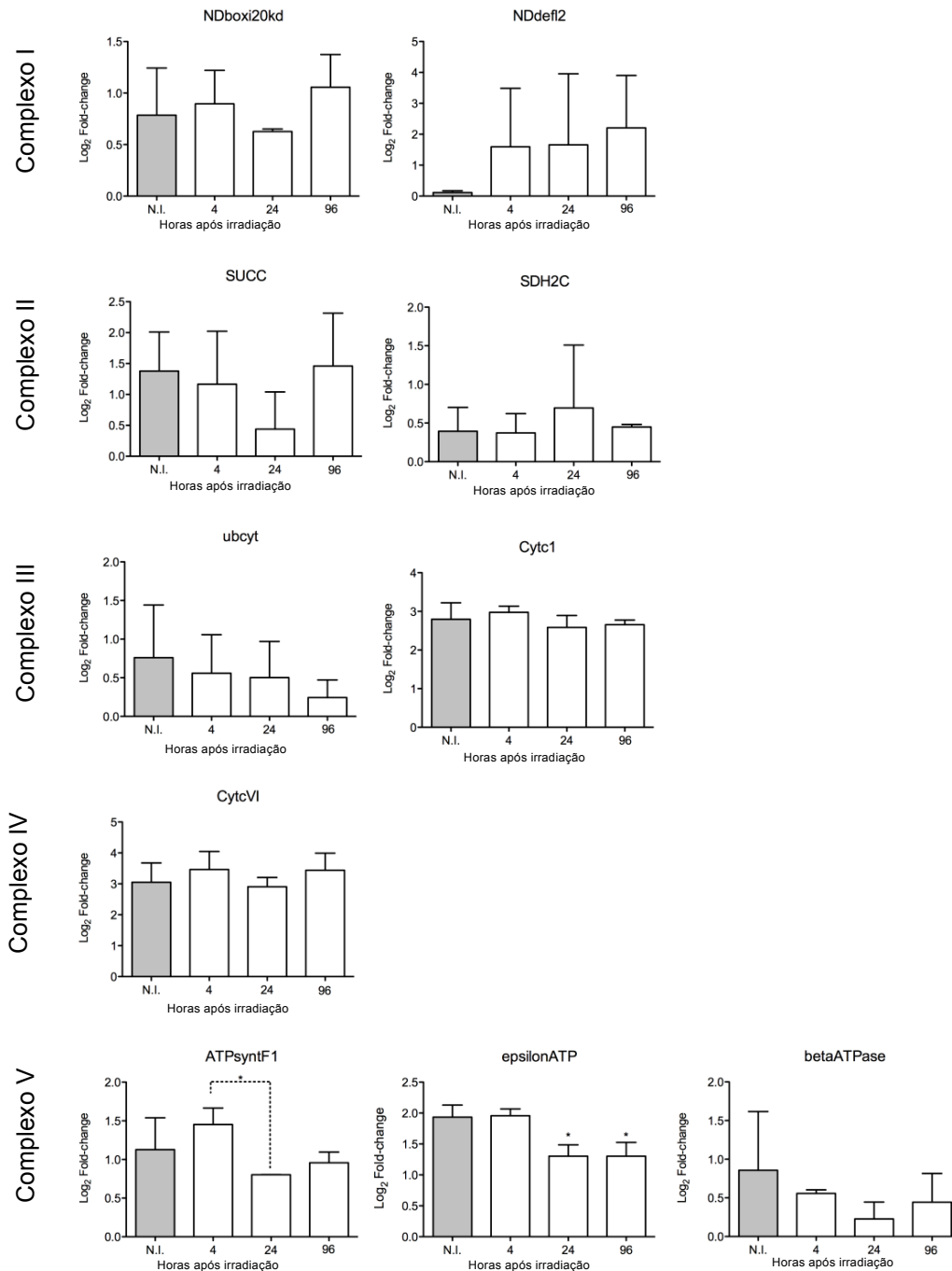


Figura 24 – Expressão dos genes nucleares da mitocôndria de *T. cruzi* após estresse de radiação gama. Resultado da análise da expressão dos genes nucleares da mitocôndria de *T. cruzi* por qRT-PCR. N.I – Não irradiado. NDboxi20kd - NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit. SDH2C - Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit. SUCC - Succinate dehydrogenase flavoprotein. – Nddefl2 - NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2. Ubcyt - Ubiquinol-cytochrome-C-reductase. CytcVI - Cytochrome c oxidase subunit VI, putative. Cytc1 - Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial precursor. ATPsynF1 - ATP synthase F1 subunit gamma protein. epsilonATP - ATP synthase, epsilon chain, putative. betaATPase - ATPase beta subunit, putative. * $p < 0,05$.

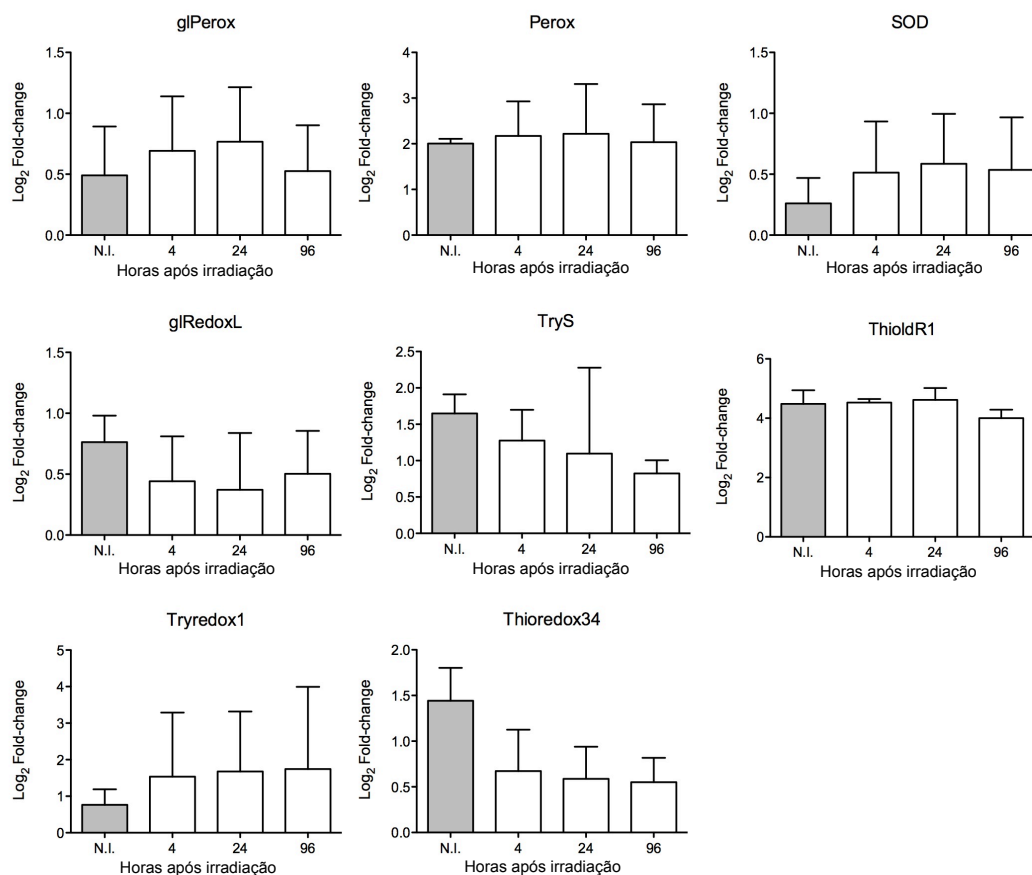


Figura 25 - Expressão dos genes do sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi* após estresse de radiação gama. Resultado da análise da expressão dos genes do sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi* por qRT-PCR. N.I - Não irradiado. glPerox - glutathione peroxidase, putative. glRedoxL - glutaredoxin-like protein. TryS - Trypanothione synthetase, putative. ThioldR1 - Thiol-dependent reductase 1. Tryredox1 - Tryparedoxin, putative TcChr36-P. Thioredox34 - Thioredoxin, putative TcChr34-P. Perox - Peroxidoxin. SOD - Superoxide dismutase.

5 – DISCUSSÃO

Assim como a bactéria *D. radiodurans*, o *T. cruzi* é altamente resistente a radiação gama, sendo capaz de resistir até 1 kGy (Regis-da-Silva *et al.*, 2006), característica essa pouco comum em eucariotos. Além de promover quebras de fita simples (SSB) ou dupla (DSB) no DNA, a radiação ionizante é capaz de gerar ROS e esses danos podem ser letais se não forem reparados (Pfeiffer *et al.*, 2000; Daly, 2012). Um sistema eficiente de reparo contra esses danos se faz necessário para assegurar tal tolerância e os diferentes mecanismos de reparo de lesões definem o grau de resistência dos vários organismos a este tipo de estresse.

Na natureza, o *T. cruzi* não está exposto à radiação ionizante, mas ainda assim ele apresenta uma radioresistência. Entretanto, devido às adversidades ambientais ao longo do ciclo de vida desse parasito, essa tolerância pode ser explicada por adaptações evolutivas que foram adquiridas. A passagem pelo sistema intestinal do barbeiro é um importante fator de estresse gerado ao parasito, sendo um desafio à integridade do seu genoma. No inseto vetor a digestão do sangue é responsável pela promoção do estresse oxidativo, por ser uma fonte de grupos heme (moléculas que contém íons de ferro) fundamentais na reação de Fenton. Esta reação química gera bastante radicais hidroxila que, conseqüentemente, causam o estresse oxidativo ao parasito. Além disso, após o repasto sanguíneo do barbeiro, a água presente no sangue é excretada pelos túbulos de Malphigi, e o sangue desidratado é estocado na cavidade intestinal (Kappagoda *et al.*, 1979), causando também uma situação de dessecação para o parasito. Situação semelhante ocorre com a bactéria *D. radiodurans*, que também não é naturalmente exposta à radiação ionizante, mas resiste à dessecação causada por longos períodos de desidratação (que causam DSB) e a sua sobrevivência é diretamente dependente da habilidade deste organismo de reparar o dano causado (Mattimore e Battista, 1996).

Considerando os fatos descrito acima, o nosso grupo vem tentando entender os mecanismos envolvidos na radioresistência de *T. cruzi*. Vários avanços foram alcançados até o momento, principalmente com relação aos genes envolvidos nos mecanismos de reparo em *T. cruzi*. Em um recente trabalho de análise da expressão gênica de *T. cruzi* irradiado pela técnica de microarranjo de

DNA foi evidenciada a expressão diferencial de genes que estariam envolvidos de alguma forma na resposta ao estresse (Grynberg *et al.*, 2012). Porém, não se pode afirmar que o mesmo ocorra para a expressão de proteínas, uma vez que nesses organismos os mecanismos de controle da expressão gênica são principalmente pós-transcricionais. Dessa forma, objetivamos no presente trabalho analisar o perfil protéico de *T. cruzi* sob o estresse de radiação gama. A análise do proteoma é capaz também de produzir uma variedade de informações que não podem ser obtidas simplesmente através da investigação das sequências dos genes (como exemplo modificações pós-traducionais), ou dos seus perfis de expressão como transcrito.

Uma das primeiras abordagens adotadas neste trabalho foi verificar a importância da síntese protéica na resposta do *T. cruzi* frente ao estresse de irradiação. Para isso, irradiamos as culturas de *T. cruzi* com 500 Gy e em seguida tratamos com inibidores da tradução (puromicina e cicloheximida). O parasito apresentou um atraso significativo na retomada do ciclo celular quando comparado àqueles que foram apenas irradiados, o que nos leva a concluir que a tradução de novas proteínas é essencial na recuperação de *T. cruzi* e na retomada do seu ciclo celular após o estresse de radiação gama. Curiosamente, o efeito da inibição da tradução em *T. cruzi* irradiado foi diferente para cada uma das drogas utilizadas. O atraso na retomada do crescimento pelo parasito irradiado é muito maior (com considerável morte de células) nas culturas tratadas com cicloheximida do que nas culturas tratadas com puromicina. Esse retorno anterior ao crescimento dos parasitos irradiados tratados com puromicina pode ser explicado pelo modo de ação de cada droga.

A cicloheximida é uma droga que inibe a elongação das cadeias polipeptídicas bloqueando até 90% da síntese protéica. De forma semelhante, a puromicina, que é um análogo do tRNA, bloqueia o sítio A do ribossomo, impedindo o alongamento da cadeia polipeptídica. A puromicina, diferentemente da cicloheximida, ao inibir a tradução, não agrega os mRNAs aos polissomos, liberando-os para a formação de grânulos de estresse (Holetz *et al.* 2007). Os grânulos de estresse são estruturas citoplasmáticas transientes contendo agregados de mRNA ligados a fatores de pré-iniciação 48S. Esses grânulos são formados em situações de estresse no intuito de proteger mRNAs da degradação

(Cassola *et al.*, 2007). A formação dessa reserva de mRNAs nos parasitos irradiados e tratados com puromicina pode ter favorecido sua rápida recuperação frente ao estresse de radiação e bloqueio de tradução. Contrariamente, os parasitos irradiados e tratados com cicloheximida tiveram um longo atraso na retomada do ciclo celular, provavelmente devido ao fato da formação dos grânulos de estresse ter sido impedida; uma vez que a cicloheximida agrega mRNA aos polissomos. Cassola *et al.* 2007, observaram o aparecimento de grânulos de estresse contendo mRNAs e ribonucleoproteínas em *T. cruzi* e *T. brucei* frente a um estresse nutricional. Como perspectiva, investigaremos se há realmente a formação de grânulos de estresse em *T. cruzi* sob o estresse de radiação gama.

Visto que a síntese *de novo* tem um importante impacto na recuperação do parasito sob o estresse de irradiação, o passo seguinte foi analisar as alterações no proteoma induzidas pela irradiação. Foram escolhidos três tempos após a irradiação para essa análise, 4, 24, e 96 horas, além dos parasitos não irradiado. As proteínas foram diferencialmente expressas em cada tempo após irradiação analisado, quando comparado a amostra NI. O número total de *spots* de proteínas subexpressas foi maior que o de *spots* superexpressos. Estes resultados são diferentes dos descritos anteriormente em nosso estudo de microarrajo. Vinte e quatro horas após a irradiação, o número de genes subexpressos se reduz em comparação ao número de genes superexpressos e 96 horas após a irradiação os genes superexpressos são a grande maioria dos genes que tiveram sua expressão alterada (Grynberg *et al.*, 2012).

Apesar da baixa correlação encontrada entre os resultados de expressão da proteômica e do ensaio de microarrajo (análise de regressão linear entre os níveis de mRNAs e de proteínas), este resultado está de acordo com outros estudos realizados em procariotos e eucariotos utilizando metodologias clássicas, como microarrajo, *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) e RNA-Seq para dados de transcrito e eletroforese 2D, *Multidimensional Protein Identification Technology* (MudPIT) e MS para dados de proteômica (Gygi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; Washburn *et al.*, 2003; Nie *et al.*, 2006; Ning *et al.*, 2012). Esta análise reforça a ideia de que as abordagens transcriptoma e proteoma são complementares e não confirmatória (Nie *et al.*, 2006).

As mudanças na expressão protéica em *T. cruzi* sob o estresse de radiação foram mais evidentes nos tempos 24 e 96 horas após irradiação. Este cenário sugere que epimastigotas de *T. cruzi* apresentam uma resposta imediata a radiação porém sutil, caracterizada por 12 *spots* sendo induzidos e 21 reprimidos no tempo 4 horas. Entre os tempos após a irradiação 4 e 24 horas, uma resposta ao estresse mais intensa foi observada. A maioria dos *spots* de proteínas induzidas e reprimidas permaneceram alterados de forma significativa até o tempo 96 horas após irradiação.

Ao analisar o conjunto de proteínas superexpressas (principalmente 24 e 96 horas após a irradiação), observamos uma tendência da superexpressão de proteínas com massa molecular muito menor que a predita. Esse aumento de proteínas com massa molecular menor que a massa predita indica a ocorrência de processamento e/ou uma síntese *de novo* de proteínas truncadas como uma resposta ao estresse de radiação. Processos como *splicing* alternativo de mRNAs e locais alternativos de início/parada da tradução também podem estar envolvidos na emergência de novas formas de proteínas em *T. cruzi* após o estresse de irradiação.

O *splicing* alternativo de transcritos tem o potencial de expandir o repertório de proteínas. Estudos recentes estimam que todos os genes humanos multi-exônicos são capazes de produzir pelo menos dois transcritos de mRNA por *splicing* alternativo, gerando diferentes isoformas de proteínas com estruturas e funções biológicas alteradas (Ezkurdia *et al.*, 2012). Em tripanosomatídeos, mRNAs maduros são gerados após dois eventos de processamento: *trans-splicing* para adicionar o *spliced leader* (SL) à extremidade 5' dos transcritos e a poliadenilação (Jäger *et al.*, 2007). Uma ampla análise do genoma comparando o local de adição de SL ao longo do ciclo de desenvolvimento do parasita sugere que *trans-splicing* alternativo desempenha um papel importante na expressão diferencial de genes (Michaeli 2011). A ocorrência de *trans-splicing* alternativo pode ser uma explicação para a presença de tantas formas protéicas diferentes em *T. cruzi* após irradiação.

Evento parecido foi descrito em *D. radiodurans*, uma vez que diferentes formas da proteína *single-strand binding* (SSB) foram produzidas após estresse

de radiação ionizante. Proteínas SSB são vitais para a sobrevivência da célula, devido ao seu envolvimento em processos como a replicação do DNA, recombinação e reparo. Os *spots* de proteínas SSB no gel 2D seguiu um padrão dinâmico de surgimento, indicando um processamento progressivo da porção ácida da região C-terminal, talvez por causa de sua interação com ssDNA. O ponto isoelétrico observado (pI) e o peso molecular das isoformas de SSB estavam de acordo com o pI e peso molecular preditos *in-silico* para as proteínas SSB encurtadas a partir da extremidade do C-terminal (Basu & Apte 2012).

Dentre as proteínas identificadas por MS/MS, citamos a proteína anotada como prostaglandina F2 alfa sintetase, que é similar a NADH-flavinoxidoreductase. Esta foi processada gerando um total de 6 formas distintas. Entre as formas observadas dessa proteína, a maioria apresentou massa molecular experimental menor que a predita e apenas duas formas possuíam massa molecular experimental próxima à predita (40 kDa), sendo as mais subexpressas dentre todas as formas. Uma das formas apresentou a massa molecular de 68 kDa, bem acima do tamanho esperado (42 kDa). Os peptídeos identificados por MS/MS de cada forma foram mapeados em sua porção C-terminal e não há nenhuma informação que permita caracterizar o N-terminal destas proteínas naturalmente maiores nos parasitos NI e cuja expressão protéica diminui após a exposição à radiação gama. Observamos também que, uma forma de massa molecular menor que a predita (29 kDa) foi expressa em níveis aproximadamente iguais antes e depois da exposição à radiação, enquanto que outra forma ainda menor (22 kDa), estava presente exclusivamente em células irradiadas. Este é um exemplo interessante, representativo de vários casos, em que observamos o surgimento de formas com massa molecular menor que a predita após o estresse de radiação gama em epimastigota de *T. cruzi*. A lista de proteínas que apresentam expressão diferencial de formas com massa molecular menor que a predita após irradiação inclui: alfa e beta-tubulina, 2-hidroxiacido desidrogenase D-isômero específica, fator de alongação 2, glicerato cinase, piruvato desidrogenase E1 subunidade beta, tirosina aminotransferase, e várias proteínas de choque térmico (HSPs), tais como: HSP60, DnaK, HSP70s, e proteína regulada por glicose 78.

Interessantemente, Parodi-Talice e colaboradores em 2007, observaram um padrão semelhante em *T. cruzi* para as proteínas glutamato desidrogenase (GluDH), HSP70, e alfa e beta-tubulinas, onde formas de massa molecular menor que a predita foram diferencialmente expressas durante a metaciclogênese. A transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclica é um processo complexo de diferenciação, que requer uma produção controlada de diversas proteínas (Parodi-Talice *et al.*, 2007). Da mesma forma, uma análise proteômica quantitativa de diferentes tempos do estágio esquizonte de *Plasmodium falciparum* (34 a 46 horas após a invasão), demonstrou que a actina-I, enolase, HSPs, e o fator de iniciação 4A e 5A em eucariotos apresentaram mais de uma forma. As formas também mostraram diferentes padrões de expressão ao longo dos tempos após invasão. Assim como *T. cruzi*, *P. falciparum* é caracterizado por um ciclo de vida complexo, passando por grandes alterações morfológicas e metabólicas, o que reflete a sua capacidade de sobreviver em diferentes hospedeiros (Foth *et al.*, 2008). De acordo com os autores, as modificações pós-traducionais podem ser uma estratégia muito importante dos parasitos para controlar a expressão de genes durante a diferenciação (Parodi-Talice *et al.*, 2007; Foth *et al.*, 2008).

Em relação às demais proteínas diferencialmente expressas, muitas estão envolvidas com o processo de síntese protéica, que parece estar induzido, exceto por alguns *spots* do fator de alongação 2 que mostram uma redução dos seus níveis. A indução da tradução pode ser uma resposta para compensar o processamento de proteínas que ocorre após a irradiação. Esta resposta deve também aumentar a síntese de proteínas específicas que possivelmente desempenham um papel importante na resposta ao estresse de radiação gama. Os resultados obtidos a partir das análises de inibição da tradução e perfil protéico após irradiação colocam a síntese *de novo* de proteínas como uma importante resposta celular do parasito à radiação gama. Padrão semelhante é observado em *D. radiodurans*, onde as proteínas relacionadas a tradução e enovelamento de proteínas tiveram sua expressão aumentada na primeira hora após irradiação. As proteínas envolvidas no reparo do DNA e na resposta ao estresse oxidativo também foram induzidos em *D. radiodurans* sob estresse

radiação ionizante (Basu & Apte 2012).

Quanto às proteínas envolvidas em processos de enovelamento, tais como chaperonas, a grande maioria encontrou-se reprimida após irradiação. Isso representa um resultado inesperado, uma vez que estas proteínas são classicamente envolvidos na resposta ao estresse ao estabilizar proteínas recém-sintetizados. No entanto, este resultado está de acordo com os dados transcriptoma de *T. cruzi* irradiado, observados nos ensaios de microarranjo (Grynberg *et al.*, 2012). É importante notar que, apesar das HSPs em sua maioria estarem subexpressas após irradiação, formas processadas destas moléculas estão superexpressas, podendo ainda ser funcionais. Curiosamente, as duas chaperonas localizados no retículo endoplasmático (calreticulina e proteína disulfato-isomerase) foram induzidas após exposição à radiação gama, o que pode indicar um importante papel desta organela na resposta a esse tipo de estresse (Conte *et al.*, 2003).

Sghaier e colaboradores publicaram recentemente um estudo sobre a composição dos aminoácidos das proteínas de bactérias radioresistentes (Sghaier *et al.*, 2013). Segundo os autores, essas proteínas apresentam maior quantidade de aminoácidos pequenos e poucos anéis aromáticos. Nós também verificamos a composição dos aminoácidos das proteínas de *T. cruzi*, em uma perspectiva ligeiramente diferente. Uma contagem de aminoácidos foi realizada para proteínas de *T. cruzi* que foram superexpressas após irradiação e para as proteínas ortólogas em *T. brucei*. Consideramos como superexpressas as proteínas que foram mais abundantes quando comparadas ao parasito não irradiado em pelo menos um dos tempos após irradiação. Em ambos os casos, a contagem dos aminoácidos foi normalizada pela contagem realizada no conjunto de proteínas anotadas das respectivas espécies de *Trypanosoma*. A hipótese era de que proteínas de *T. cruzi* com importante papel após a irradiação deveria ter uma composição de aminoácidos diferente da que era observada no conjunto de proteínas em *T. cruzi* não irradiado e de seu ortólogo *T. brucei*, que não tem a mesma capacidade de radioresistência. Quando comparamos as proteínas de *T. cruzi* superexpressas após a irradiação com todas as proteínas anotadas para este parasito, observamos que elas apresentam, no geral, pouca hidrofobicidade,

poucas são polares, e com aminoácidos pequenos (embora alguns aminoácidos nesta classe sejam mais frequentes). Além disso, as proteínas superexpressas têm poucos aminoácidos aromáticos (com exceção da tirosina, que é mais frequente) e menos resíduos de cisteínas.

Talvez, a observação mais notável dessa análise do proteoma de *T. cruzi* após irradiação é o provável declínio na atividade glicolítica do parasito e em seu metabolismo de aminoácidos. Várias enzimas importantes da glicólise foram reprimidas após exposição à radiação gama. Por conseguinte, uma única enzima (piruvato dicinase fosfato) da gluconeogênese foi induzida após irradiação. A maioria das enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos também foram subexpressa, mas formas menores de GluDH foram superexpressa após irradiação. Elas consistem em três formas com massa moleculares experimentais (15 kDa) menores que os valores de massa predito (45 kDa), sugerindo mais uma vez a ocorrência de modificações pós-transcricional/e ou processamento de enzimas metabólicas importantes durante a resposta ao estresse. GluDH catalisa a desaminação reversível de L-glutamato NAD- e/ou NADP-dependente para formar α -cetoglutarato, sendo essencial para a geração de grupos amino, como amônia livre, em organismos que vão desde de bactérias a mamíferos (Benachenhou-Lafha *et al.*, 1993). *T. cruzi* tem um metabolismo que é em grande parte baseado no consumo de aminoácidos, principalmente prolina, aspartato e glutamato, que constituem as principais fontes de carbono e de energia das formas epimastigotas. Os epimastigotas catabolizam preferencialmente glicose e depois da exaustão desse metabólito, ocorre o catabolismo de proteínas e aminoácidos com produção de amônia (Caldas *et al.*, 1980; Cazzulo, 1992, 1994). Os aminoácidos podem ser obtidos por transporte, biossíntese a partir de precursores metabólicos e/ou pela degradação de proteínas (Cazzulo, 1984). Dessa forma, estes resultados sugerem que o parasito sofre uma redução global no seu metabolismo energético, como consequência de sua parada do crescimento após a irradiação.

Outro resultado inesperado é o fato de proteínas envolvidas no metabolismo de ATP (subunidade beta da ATP sintase e a subunidade IV da citocromo c oxidase) também estarem subexpressas após a irradiação do

parasito. Os resultados encontrados nos levam a acreditar que o parasito após a irradiação encontra-se num estado de “quiescência”, caracterizado pela parada do ciclo celular e como estratégia de sobrevivência passa a poupar energia mantendo seu metabolismo em estado basal. Entretanto, um estudo mais aprofundado do metabolismo energético celular seria importante, uma vez que outro membro desta classe de proteínas (citocromo c oxidase subunidade V) encontra-se superexpresso após irradiação. Estes resultados não são muito claros, principalmente quando os confrontamos com os resultados dos nossos ensaios bioquímicos de medida de ATP em *T. cruzi* após irradiação, que será discutido a seguir.

Considerando o metabolismo aeróbico do próprio *T. cruzi* como uma fonte geradora de ROS, decidimos por avaliar a atividade mitocondrial do parasito sob o estresse de radiação gama. Para tal, realizamos as medidas de consumo de O₂, ATP e produção de H₂O₂. Os resultados obtidos nos mostraram que após a irradiação, o parasito aumenta significativamente a sua produção de ATP, contrariando os resultados observados nos ensaios de proteômica. Após a irradiação é de se esperar que a demanda energética pelo parasito aumente, visando suprir as vias de reparo atuantes frente às lesões no seu DNA. Mais curioso ainda, e corroborando os achados de uma maior produção de ATP no *T. cruzi* irradiado, foram os resultados do ensaio de consumo de oxigênio e velocidade máxima da respiração após irradiação. As células irradiadas respiram mais que as não irradiadas. Entretanto, o controle respiratório entre os parasitos irradiados e não irradiados são inversamente proporcionais, sugerindo que o grau de acoplamento entre a fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória mitocondrial nos parasitos irradiados é menor do que no *T. cruzi* não irradiados. Dessa forma, podemos sugerir que a produção aumentada de ATP após a irradiação não é necessariamente via fosforilação oxidativa (isso explicaria a subexpressão da ATP sintase, por exemplo, após irradiação, no ensaio de proteômica).

As células eucarióticas desenvolveram vários mecanismos de controle da fosforilação oxidativa, incluindo a sua regulação pela disponibilidade de substratos tal como o oxigênio, ADP e equivalentes redutores. O grau de

acoplamento entre a respiração e a fosforilação oxidativa também é controlado. Dois processos regulatórios distintos foram descritos em eucariotos: I) um sistema de dissipação do potencial eletroquímico de prótons, representado por proteínas desacopladoras e II) um sistema de dissipação do potencial redox, representados por oxidases alternativas (Brown, 1992). Em tripanossomatídeos somente o sistema II foi descrito. Neste caso, o fluxo de elétrons do ubiquinol (Coenzima Q) para a via oxidase alternativa de tripanossomas (TAO) não está acoplada à produção de ATP, enquanto que a transferência de elétrons mediada por citocromos (complexos III e IV) está acoplada à produção de ATP, através da geração de um gradiente de prótons. Este sistema duplo pode fornecer grande flexibilidade para modular a geração de um gradiente de prótons e, assim, regular a fosforilação oxidativa (Besteiro *et al.*, 2005; Bringaud *et al.*, 2006; Riviere *et al.*, 2009; Coustou *et al.*, 2003).

Durante muitos anos considerou-se que a maioria dos tripanossomatídeos, que crescem em meio rico em glicose, produzem ATP primariamente pela ATP sintase mitocondrial F₀/F₁, explorando o gradiente de prótons entre ambos os lados da membrana mitocondrial interna gerado através da cadeia respiratória. No entanto, alguns estudos questionaram estas conclusões e um novo modelo foi proposto (Besteiro *et al.*, 2005; Coustou *et al.*, 2008).

Quando formas procíclicas de *T. brucei* são expostas a um excesso de oligomicina, não são observadas alterações significativas nas concentrações intracelulares de ATP e nem na viabilidade dos parasitos crescidos em meio rico em glicose. No entanto, quando cultivados em meio pobre em glicose, tornam-se 1000 vezes mais sensíveis à oligomicina. Isto suporta a idéia de que, na presença de glicose, as formas procíclicas não são dependentes da fosforilação oxidativa para a produção de ATP, e que a maior parte do ATP é produzido por fosforilação a nível do substrato, através das enzimas chave, tais como a fosfoglicerato quinase (PGK), piruvato quinase (PK) e succinil CoA sintase mitocondrial (SCS). Já na ausência de glicose, quando as células desviam seu metabolismo para o catabolismo de aminoácidos, a fosforilação oxidativa torna-se essencial (Lamour *et al.*, 2005).

Considerando a taxa de consumo de glicose e/ou prolina e o número de moléculas de ATP produzidas e consumidas, estima-se que a produção de ATP pela fosforilação a nível do substrato é pelo menos três vezes maior em meio rico em glicose do que em meio pobre em glicose. Isto indica que a ATP sintase mitocondrial (F₀/F₁) possui um papel menos relevante na produção de energia, e que a maior parte do ATP é produzido por fosforilação a nível do substrato (Barrett *et al.*, 2003; Coustou *et al.*, 2003; Besteiro *et al.*, 2005).

No intuito de reafirmar os nossos resultados bioquímicos de maior atividade mitocondrial dos parasitos irradiados, realizamos ensaios de PCR em tempo real. Os resultados obtidos para os genes do maxicículo corroboraram aqueles encontrados previamente em na análise de microarranjo de *T. cruzi* irradiado (Grynberg *et al.*, 2012). Em ambos ensaios observamos uma indução na expressão dos genes do maxicículo de *T. cruzi* testados, após radiação gama, indicando assim uma maior atividade mitocondrial dos parasitos irradiados. Entretanto, não foi possível chegar a mesma conclusão para os genes nucleares codificadores de proteínas da mitocôndria de *T. cruzi*, selecionados para análise neste trabalho. Devido a uma grande variação entre as réplicas biológicas, não foi possível encontrar significância estatística nos ensaios de qRT-PCR realizados para os genes nucleares das proteínas mitocondriais de *T. cruzi*.

Com relação a produção de H₂O₂, também analisada nos ensaios de avaliação da atividade mitocondrial de *T. cruzi* sob o estresse de irradiação gama, observamos que, apesar do maior consumo de O₂, os parasitos irradiados liberam menos H₂O₂. A menor liberação de H₂O₂ por parte dos parasitos irradiados sugere que *T. cruzi* apresenta um eficiente sistema de defesa antioxidante, e sob o estresse de radiação gama este sistema se torna ainda mais efetivo. Estes dados corroboram com estudos prévios de aumento da expressão de CPX e MPX, enzimas atuantes no sistema de detoxificação de *T. cruzi*, quando a cultura de parasitos segue em direção a fase estacionária; lembrando que a mudança de estágio evolutivo também envolve vários fatores de estresse ao parasito (Peloso, *et al.* 2011). Contudo, nossa tentativa de avaliar a indução na expressão do sistema de defesa antioxidante de *T. cruzi* após irradiação não obteve sucesso. Assim como na qRT-PCR para os genes nucleares da mitocôndria

de *T. cruzi* irradiado, não foi possível obter resultados com significância estatística para a qRT-PCR dos genes do sistema tiol redox de *T. cruzi* avaliados.

Entretanto, em nosso estudo de proteômica de *T. cruzi* sob o estresse de radiação gama foram identificadas quatro proteínas classificadas como sensor redox, uma vez que 75 a 80% dos danos à macromoléculas causados pela radiação gama são consequência da formação de ROS (Anitori, 2012). Duas oxidoredutases apresentaram-se subexpressas em nossas análises e duas triparedoxinas, que reduzem eficientemente espécies reativas de oxigênio, foram superexpressas em *T. cruzi* após irradiação (Krauth-Siegel & Comini, 2008). Quando dirigimos nossa atenção para as duas triparedoxinas referidas, observamos que, ao longo dos tempos após a irradiação analisados, o *fold-change* torna-se ainda mais positivo, indicando que estas proteínas estão sendo induzidas em resposta a irradiação.

Como mencionado no início da discussão, a passagem através do sistema intestinal de seu hospedeiro invertebrado, assim como o próprio metabolismo aeróbico de *T. cruzi* são importantes fatores geradores de ROS. Uma das consequências mais prejudiciais do estresse oxidativo é a formação de lesões no DNA. Guanina é a base nitrogenada mais susceptível à oxidação, devido ao seu baixo potencial redox, e 7,8-di-hidro-8-oxoguanina (8-oxoG) é a lesão mais comum. Quando 8 oxoG é inserida durante a replicação do DNA, pode gerar quebras das fitas duplas, o que torna esta lesão seriamente deletéria. Neste sentido, o nosso grupo vem trabalhando com o papel da maquinaria de reparo do DNA na recuperação de *T. cruzi* frente aos danos oxidativos. Em uma publicação recente Aguiar e colaboradores (2013), demonstraram que parasitos superexpressores do gene MutT são mais resistentes ao estresse oxidativo causado pelo tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Eles também apresentaram um aumento na taxa crescimento *in vitro* e melhor capacidade de infecção *in vivo* quando comparados à cepa selvagem. Esta maior resistência e capacidade de crescimento destas cepas mutantes deve-se ao produto da enzima MutT, 8-oxod-GMP, que sinaliza o estresse oxidativo, gerando assim uma resposta efetiva ao estresse pelos parasitos. MutT hidrolisa 8-oxo-dGTP no *pool* de nucleotídeos, devolvendo-o para sua forma de monofosfato, impedindo assim

que este seja incorporado no DNA pelas polimerases. Parasitos superexpressores de MutT heteróloga também aumentam os seus níveis de peroxidases citosólica e mitocondriais (Cpx e MPx) após o tratamento com H₂O₂. Considerando que, os parasitos submetidos ao estresse oxidativo promovido pela radiação gama também aumentam os níveis de expressão de algumas enzimas antioxidantes, não imediatamente, mas horas após a irradiação; podemos sugerir que o *T. cruzi* não responde diretamente a produção de ROS como consequência da irradiação, mas sim devido a 8-oxo- dGMP que é gerado subsequentemente. O nucleotídeo 8-oxo-dGMP, ou outro metabólito secundário gerado a partir deste processo, pode estar atuando como um segundo mensageiro para a célula, indicando a presença de estresse oxidativo, e induzindo o aumento da expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante.

Assim como em outros tripanosomatídeos, *T. cruzi* tem um intrigante sistema de defesa antioxidante que varia de acordo com os estágios do seu ciclo de vida. Como exemplo, um aumento significativo de tripanotiona sintetase (TryS) e de isoformas de triparedoxina peroxidase citosólica e mitocondriais são notados durante a diferenciação de epimastigota na forma infecciosa tripomastigota metacíclica (Irigoín *et al.*, 2008; Paes *et al.*, 2011). Mais ainda, as elevações nas enzimas antioxidantes mostraram-se mais pronunciado nas estirpes virulentas do que nas mais atenuadas (Piacenza *et al.*, 2009). A resistência de *T. cruzi* à drogas tripanocidas também pode ser associada a uma maior expressão de enzimas antioxidantes. Em um estudo, foi verificado que a indução *in vitro* de resistência de *T. cruzi* a benzonidazol também levou a um aumento na expressão das isoformas citosólicas e mitocondriais de triparedoxina peroxidase e de isoformas de FeSOD, em comparação com a cepa sensível a droga. Curiosamente, este evento não foi observado nas cepas naturalmente resistentes (Nogueira *et al.*, 2009; Murta *et al.*, 2008).

Recentemente, Krisko & Radman propuseram um novo paradigma: o proteoma ao invés do genoma é o alvo principal na indução da morte celular devido à radiação ionizante. Este paradigma foi fundamentado em vários experimentos que mostraram que *D. radiodurans* tem uma forma de proteger suas proteínas contra os danos oxidativos gerados pela radiação (Krisko &

Radman, 2013). Além disso, uma forte correlação entre as concentrações intracelulares de Mn/Fe e a resistência da bactéria a radiação foi mostrada. Bactérias mais resistentes toleram 300 vezes mais Mn²⁺ e três vezes menos Fe²⁺ que bactérias mais sensíveis a radiação ionizante (15). Íons manganês previnem a formação de ROS ferro-dependente através da reação de Fenton, atuando como um antioxidante químico. Medidas de grupos carbonila em *D. radiodurans* revelaram que acúmulo de Mn²⁺ previne a oxidação de proteínas e esses resultados foram também observados em outras bactérias radioresistentes (Daly *et al.*, 2004; Krisko & Radman, 2010; Daly *et al.*, 2010; Robison *et al.*, 2011).

O nível de danos oxidativos causados às proteínas durante a irradiação controla a sobrevivência de muitos organismos (*Bdelloid rotifers*, uma classe de invertebrados de água doce, *Caenorhabditis elegans*, as bactérias *D. radiodurans*, e *Halobacterium salinarum*), que são extremamente resistentes à radiação ionizante (Zhang *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2011; Daly, 2012; Krisko *et al.*, 2012). O principal fator responsável por essa radioresistência extraordinária é a grande proteção antioxidante dos seus constituintes celulares, incluindo as proteínas necessárias para o reparo de DSB, permitindo-lhes recuperar do estresse e continuar a reprodução (Krisko *et al.*, 2012).

Mais um resultado importante deste estudo, é o significativo aumento na expressão de três proteínas hipotéticas após a radiação gama. Isto pode indicar um papel para as proteínas espécie-específicas na resposta ao estresse, uma vez que estas representam, provavelmente, proteínas sem homólogos em outras espécies. Da mesma forma, em um estudo inicial do proteoma de *D. radiodurans* sob estresse de radiação ionizante proteínas hipotéticas foram identificadas e, posteriormente, mostraram ser cruciais na resposta à radiação nestas espécies bacterianas (Zhang *et al.*, 2005).

Em suma, os dados gerados neste trabalho permite-nos concluir que a síntese *de novo* é de grande importância na recuperação do parasito irradiado. O perfil de expressão protéica de *T. cruzi* após a irradiação sugere a ocorrência de processamento e/ou modificações pós-traducionais em resposta ao estresse. Da mesma forma, os nossos resultados indicam uma maior atividade da mitocôndria

após o estresse, mediante uma expressão aumentada dos genes do maxicírculo, maior produção de ATP e consumo de O_2 . E por fim, uma menor produção de H_2O_2 observada nos parasitos irradiados, indicam a existência de um eficiente mecanismo de defesa contra radicais livres. Este estudo revela quão peculiar é a resposta de *T. cruzi* a radiação ionizante, e gera também novos questionamentos sobre essa grande radioresistência do parasito, uma característica única entre os demais eucariotos.

6 - CONCLUSÕES

As principais conclusões geradas mediante os resultados obtidos neste trabalho foram:

- Utilizando a metodologia 2D-DIGE, foram identificados 543 *spots* diferencialmente expressos após a exposição de *T. cruzi* à radiação gama.
- Dos 543 *spots* diferencialmente expressos, 53 proteínas foram identificadas por MS/MS e agrupadas de acordo com sua função biológica.
- A presença de proteínas com múltiplas formas e massa predita menor que esperada foi observada em mais da metade das proteínas identificadas por MS/MS. Este padrão foi observado nos parasitos após a irradiação, sendo um forte indicativo de processamento de proteínas e/ou eventos de modificação pós-traducional em resposta a radiação gama.
- A síntese *de novo* nos parasitos irradiados mostrou ser essencial para sua recuperação frente ao estresse.
- Algumas tendências puderam ser observadas nas análises de proteômica, incluindo mudanças nos seguintes processos biológicos: regulação positiva do processo de síntese de proteínas, repressão de proteínas de enovelamento (exceto pela indução de duas chaperonas do retículo endoplasmático), repressão da via (fosforilação oxidativa) de geração de ATP, glicólise, e metabolismo de aminoácidos.

- Observamos também a superexpressão de duas triparedoxinas, responsáveis por reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio em resposta ao estresse oxidativo.

- Ensaio bioquímico de avaliação da atividade mitocondrial de *T. cruzi* mostrou que, parasitos irradiados produzem mais ATP e menos H₂O₂ do que parasitos não irradiados, além de consumirem mais O₂.

- A avaliação da expressão gênica de *T. cruzi* irradiado por qRT-PCR mostrou que os genes do maxicírculo foram induzidos após a irradiação, indicando assim uma maior atividade da mitocôndria após o estresse.

*7 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

- Aguiar PHN, Furtado C, Repolês BM, Ribeiro GA, *et al.* 2013. Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *PLoS Negl Trop Dis* 7(6): e2279.
- Anitori RP. 2012. Extremophiles Microbiology and Biotechnology. In: Gwin KR, Battista JR, editors. Ionizing-radiation resistant microorganisms. Caister Academic Press. pp. 25-52.
- Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, *et al.* 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309: 473.
- Atwood JA 3rd, Minning T, Ludolf F, Nuccio A, *et al.* 2006. Glycoproteomics of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. *J Proteome Res* 5:3376–3384.
- Augusto-Pinto L, Bartholomeu DC, Teixeira SM, Pena, SD, Machado, CR. 2001. Molecular cloning and characterization of the DNA mismatch repair gene class 2 from the *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 272: 323-33. Augusto-Pinto L, da Silva CG, Lopes D de O, Machado-Silva A, Machado CR. 2003. *Escherichia coli* as a model system to study DNA repair genes of eukaryotic organisms. *Genet Mol Res* 2(1):77-91.
- Bardereri P, Campetella O, Frasch ACC, Santome JA, *et al.* 1998. The NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochem J* 330: 951-958.
- Bagwell CL, Moloney MG and Yaqoob M. 2010. Oxazolomycins: natural product lead structures for novel antibacterials by click fragment conjugation. *Bioorg Med Chem Lett* 20 (7):2090-2094
- Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, *et al.* 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-22.

- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, *et al.* 2003. The trypanosomiasis. *Lancet* 362(9394): 1469-80.
- Basu B, Apte SK. 2012. Gamma radiation-induced proteome of *Deinococcus radiodurans* primarily targets DNA repair and oxidative stress alleviation. *Molecular & cellular proteomics* 11: 1.
- Benachenhou-Lafha N, Forterre P, Labedan B. 1993. Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaebacteria in the universal tree of life. *J Mol Evol* 36: 335-346
- Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ. 2004. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem* 279: 49883–49888.
- Bennett CB, Lewis LK, Karthikeyan G, Lobachev KS, *et al.* 2001. Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nat Genet* 29, 426-34.
- Bensmail H & Haoudi A. 2003. Postgenomics: Proteomics and Bioinformatics in Cancer Research. *J Biomed Biotechnol* 217-230.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, *et al.* 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309 (5733):416-422.
- Besteiro S, Barret MP, Rivière L, Bringaud F. 2005. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends Parasitol* 21(4): 185-91.
- Brandao A, Urmenyi T, Rondinelli E, Gonzalez A, *et al.* 1997. Identification of transcribed sequences (ESTs) in the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, 863-6.

- Bringaud F, Rivière L, Coustou V. 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasitol* 149(1): 1-9.
- Brown GC. 1992. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* 284 (1): 1-13.
- Cadenas E. 2004. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Asp Med* 25:17-26.
- Caldas RA, Araújo EF, Felix CR, Roitman I. 1980. Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol* 66(2): 213-6.
- Campos PC, Silva VG, Furtado C, Machado-Silva A, *et al.* 2011. *Trypanosoma cruzi* MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. *Molecular and biochemical parasitology* 176(1): 8-16.
- Carranza JC, Kowaltowski AJ, Mendonça MAG, de Oliveira TC, *et al.* 2009. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41(3): 299-308.
- Cassola A, De Gaudenzi JG, Frasch AC. 2007. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol.* 65(3): 655-70.
- Cazzulo, JJ. 1984. Protein and amino acid catabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B* 79(3): 309-20.
- Cazzulo, JJ. 1992. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *Faseb J* 6(13) 3153-61.
- Cazzulo, JJ. 1994. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomembr* 26(2): 157-65.

- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, *et al.* 2002. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Molecular & cellular proteomics* 1: 304-313.
- Clayton CE. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21: 1881-8.
- Conte L, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R, Parodi AJ. 2003. The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of The Cell* 14: 3529-3540.
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, *et al.* 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 443-449.
- Coura JR & Borges-Pereira J. 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115(1-2): 5-13.
- Coura JR & Viñas PA. 2010. Chagas diseases: a new worldwide challenge. *Nature* S6-S7.
- Coustou V, Besteiro S, Biran M, Philippe D, *et al.* 2003. ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem* 278(49): 49625-35.
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53 (1):135-159.
- Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, *et al.* 2010. Small-molecule antioxidant proteome shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS ONE* 5: e12570.

- Daly MJ , Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A. 2004 Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306: 1025-1028.
- De Souza W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8: 269-85.
- Di Noia JM, D'Orso I, Sanchez DO, Frasch AC. 2000. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem* 275: 10218-27.
- Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, *et al.* 2011. Autophagy in protists. *Autophagy* 7(2): 127-158.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, *et al.* 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-15.
- Ezkurdia I, del Pozo A, Frankish A, Rodriguez JM, *et al.* 2012. Comparative proteomics reveals a significant bias toward alternative protein isoforms with conserved structure and function. *Molecular biology and evolution* 29: 2265-2283.
- Ferella M, Nilsson D, Darban H, Rodrigues C, *et al.* 2008. Proteomics in *Trypanosoma cruzi* - Localization of Novel Proteins to Various Organelles. *Proteomics* 8(13): 2735-2749.
- Finzi JK, Chiavegatto CW, Corat KF, Lopez JA, *et al.* 2004. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Molecular and Biochemical Parasitology* 133(1) 37-43.

- Foth BJ, Zhang N, Mok S, Preiser PR, Bozdech Z. 2008. Quantitative protein expression profiling reveals extensive post-transcriptional regulation and post-translational modifications in schizont-stage malaria parasites. *Genome biology* 9: 177.
- Furtado C, Kunrath-Lima M, Rajão MA, Mendes IC, de Moura MB, *et al.* 2012. Functional characterization of 8-oxoguanine DNA glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 7(8): e42484. doi:10.1371/journal.pone.0042484
- Gallego CA, Estévez M, Fárez E, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowska D, 2005. Overexpression of AP endonuclease protects *Leishmania major* cells against methotrexate induced DNA fragmentation and hydrogen peroxide. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol 141(2) 191– 197.
- Garg N & Bhatia V. 2005. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. *Expert Rev Vaccines* 4:867–880.
- Gonçalves RLS, Barreto RFSM, Polycarpo CR, Gadelha FR, *et al.* 2011. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43(6): 651-61.
- Grynberg P, Passos-Silva DG, Mourão MDM, Hirata R, *et al.* 2012. *Trypanosoma cruzi* gene expression in response to gamma radiation. *PloS one* 7: 1-14.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology* 19: 1720-1730.
- Hakem R. 2008. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *THE EMBO JOURNAL* 7: 589–605

- Hoeijmakers JHJ. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411: 366-374
- Holetz FB, Correia A, Ávila AR, Nakamura CV, *et al.* 2007. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356: 1062–1067.
- Hutchinson F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32: 115-154.
- Irigoin F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, *et al.* 2008. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biology and Medicine* 45(6) 733–742.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, *et al.* 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-42.
- Jäger AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D’Orso I, Frasch AC. 2007. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *PNAS* 7: 2035-2042.
- Jiang CZ, Yen CN, Cronin K, Mitchell D, Britt AB. 1997. UV- and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 147: 1401-9.
- Kappagoda CT, Knapp MF, Linden RJ, Pearson MJ, Whitaker EM. 1979. Diuresis from left atrial receptors: effect of plasma on the secretion of the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *The Journal of physiology* 291: 381–391.
- Kollien AH & Schaub GA. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatomine. *Parasitol Today* 16: 381-387.

- Kramer S. 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 181: 61-72.
- Krauth-Siegel RL & Comini MA. 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1780 (11):1236-48.
- Krauth-Siegel RL & Coombs GH. 1999. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitology Today* 15(10):404-409.
- Krisko A & Radman M. 2013. Biology of extreme radiation resistance: The way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: 1-11.
- Krisko A & Radman M. 2010. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14373-14377.
- Lamour N, Rivière L, Coustou V, Coombs GH, *et al.* 2005. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J. Biol. Chem* 280(12): 11902-10.
- Liu Y, Zhou J, Omelchenko MV, Beliaev AS, *et al.* 2003. Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4191-6.
- Lopes DO, Schamber-Reis BL, Regis-da-Silva CG, Rajão MA, *et al.* 2008. Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of *Trypanosoma cruzi* suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. *DNA Repair Amst* 7(11):1882-92.

- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 99(1):1-12.
- Machado CA & Ayala FJ. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 7396-7401.
- Machado CR, Augusto-Pinto L, McCulloch R, Teixeira SM. 2006. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. Mutat Res 612: 40-57.
- Magalhães AD, Charneau S, Paba J, Guércio RAP, *et al.* 2008. *Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. Proteome Science 6:24.
- Marchini FK, de Godoy LMF, Rampazzo RCP, Pavoni DP, *et al.* 2011. Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. PloS one 6(9) e25381.
- Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. Journal of biomedicine & biotechnology 2010:525241.
- Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, *et al.* 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. Mol Cell 11:1291-9.
- Mattimore V & Battista JR. 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. J Bacteriol 178 (3): 633-637.
- Michaeli S. 2011. *Trans-splicing* in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. Future microbiology 6: 459-474.

- Michaeli S, Doniger T, Gupta SK, Wurtzel O, *et al.* 2012. RNA-seq analysis of small RNPs in *Trypanosoma brucei* reveals a rich repertoire of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research* 40(3): 1282-1298.
- Ministério da Saúde. 2010. M.D. Doenças Infecciosas e Parasitárias.
- Morales J, Mogi T, Mineki S, Takashima E, *et al.* 2009. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. *The Journal of biological chemistry* 284(11): 7255-63.
- Murta SMF, Nogueira FB, Dos Santos PF Campos FM, *et al.* 2008. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta Tropica* 107(1) 59–65.
- Nakayasu ES, Gaynor MR, Sobreira TJP, Ross JA, Almeida IC. 2009. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. *Proteomics* 9 (13): 3489-3506.
- Nie L, Wu G, Zhang W. 2006. Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. *Biochemical and biophysical research communications* 339: 603-610.
- Ning K, Fermin D, Nesvizhskii AI. 2012. Comparative analysis of different label-free mass spectrometry based protein abundance estimates and their correlation with RNA-Seq gene expression data. *Journal of Proteome Research* 11: 2261-2271.
- Nogueira FB, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SMF. 2009. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitology Research* 104(4) 835–844.

- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, *et al.* 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3776–3780.
- Paba J, Ricart CA, Fontes W, Santana JM, *et al.* 2004a. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. J Proteome Res; 3(3):517–524.
- Paba J, Santana JM, Teixeira AL, Fontes W, *et al.* 2004b. Proteomics analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Proteomics 4:1052–1059.
- Paes MC, Cosentino-Gomes D, de Souza CF, Nogueira NP, Meyer-Fernandes JR. 2011. The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol Res 2011:174614.
- Panisko EA, Conrads TP, Goshe MB, Veenstra TD. 2002. The postgenomic age: characterization of proteomes. Exp Hematol 30, 97-107.
- Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, *et al.* 2007. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. J. Mass Spectrom 42: 1422-1432.
- Parodi-Talice A, Duran R, Arrambide N, Prieto V, *et al.* 2004. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. International Journal for Parasitology 34: 881.
- Passos-Silva DG, Rajão MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, *et al.* 2010. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. Journal of nucleic acids vol. 2010: 1-14.
- Peloso EDF, Vitor SC, Ribeiro LHG, Piñeyro MD, *et al.* 2011. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. Journal of bioenergetics and biomembranes 43(4): 419-24.

- Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G. 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15: 289-302.
- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martínez A, Radi R. 2013. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 19(7): 723-734.
- Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN, Basombrio MA, Radi R. 2009. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int J Parasitol* 39:1455-64.
- Piñeyro MD, Arcari T, Robello C, Radi R, Trujillo M. 2011. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics* 507(2): 287-95.
- Rajão MA, Passos-Silva DG, DaRocha WD, Franco GR, *et al.* 2009. DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. *Molecular microbiology* 71(1): 185-97.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388-402.
- Regis-da-Silva CG, Freitas JM, Passos-Silva DG, Furtado C, *et al.* 2006. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol Biochem Parasitol* 149: 191-200.
- Riley PA. 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65: 27-33.

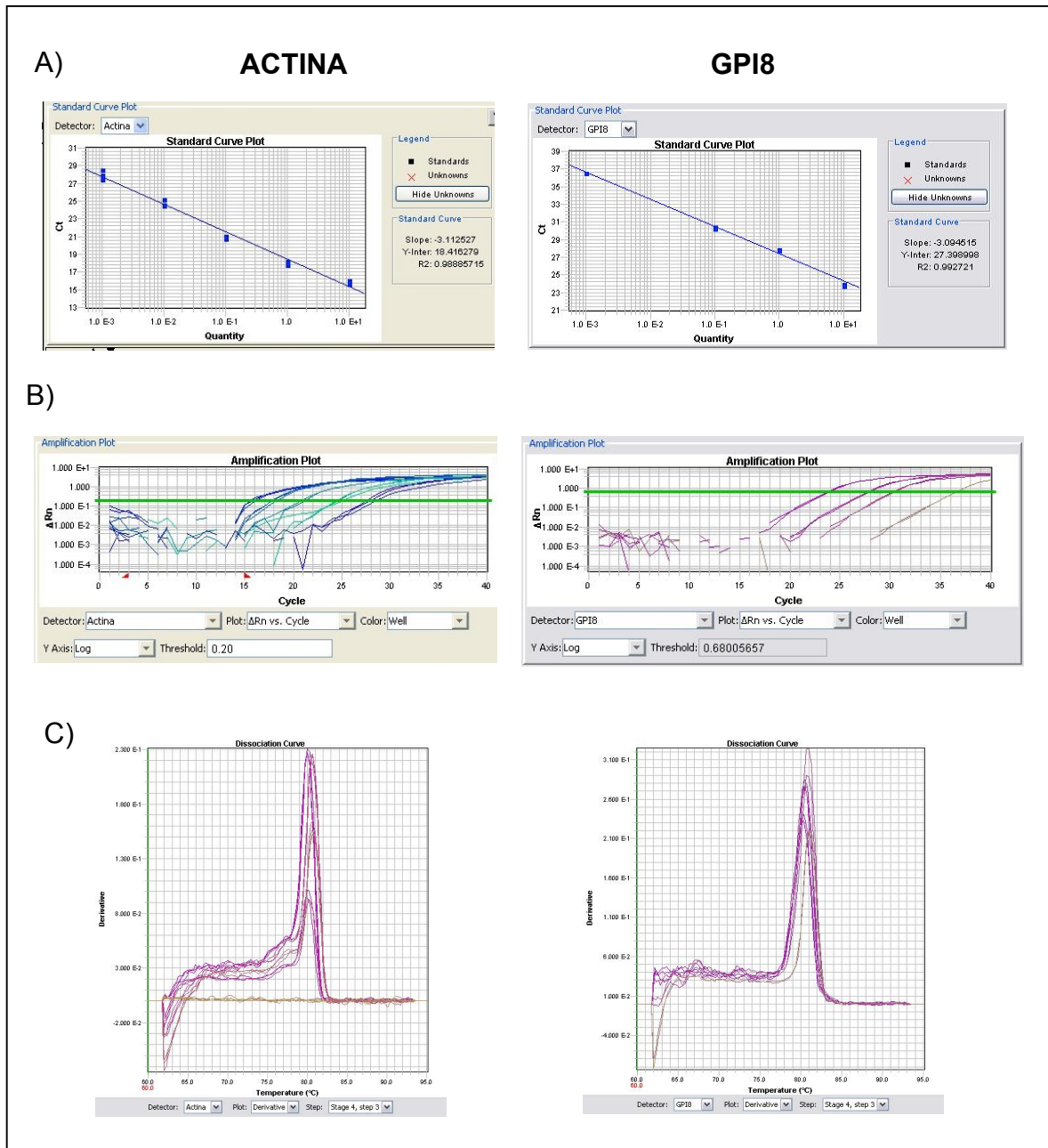
- Riviere L, Moreau P, Allmann S, Hahn M, *et al.* 2009. Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci* 106(31): 12694-9.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. 2009. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci.* 66(6):981-93.
- Robinson CK, Webb K, Kaur A, Jaruga P, *et al.* 2011. A major role for nonenzymatic antioxidant processes in the radioresistance of *Halobacterium salinarum*. *Journal of bacteriology* 193: 1653-1662.
- Sage JM, Gildemeister OS, Knight KL. 2010. Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *The Journal of biological chemistry* 285(25): 18984-90.
- Shrivastav M, DeHaro LP, Nickoloff JA. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 18(1): 134–147.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531:231-51.
- Sodré CL, Chapeaurouge AD, Kalume DE, Mendonça-Lima L, *et al.* 2009. Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Arch Microbiolo* 191: 177-184.
- Souza RA, Henriques C, Alves-Ferreira M, Mendonça-Lima L, Degraive WM. 2007. Investigation of a protein expression profile by high-resolution bidimensional electrophoresis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Analytical Biochemistry* 365: 144-146.

- Stadtman ER. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 62: 797-821.
- Takata M, Sasaki MS, Tachiiri S, Fukushima T, *et al.* 2001. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* 21:2858-66.
- Takeda GK, Campos R, Kieffer J, Moreira AA, *et al.* 1986. Effect of gamma rays on blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Experimental study in mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28: 15-8.
- Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, *et al.* 2004. Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. *Genetics* 168:21-33.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, *et al.* Chagas' disease. 1992. *Clin Microbiol Rev* 5 (4):400-419.
- Teixeira SM & daRocha WD. 2003. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* 2:148-58.
- Tibayrenc M & Ayala FJ. 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 18: 405-410.
- Vanhamme L & Pays E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol.* 59 (2): 223-240.
- Verdun RE, Di Paolo N, Urmenyi TP, Rondinelli E, *et al.* 1998. Gene discovery through expressed sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 66: 5393-8.

- Vickerman K. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 24: 1317-31.
- Vidal AE, Harkiolaki M, Gallego C, Castillo-Acosta VM, *et al.* 2007. Crystal Structure and DNA Repair Activities of the AP Endonuclease from *Leishmania major*. *Journal of Molecular Biology* 373 (4): 827–838.
- Washburn MP, Koller A, Oshiro G, Ulaszek RR, *et al.* 2003. Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3107-3112.
- WHO. 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010). *Wkly Epidemiol Rec* 85 (34):334-336
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, *et al.* 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (7): 1051-1054.

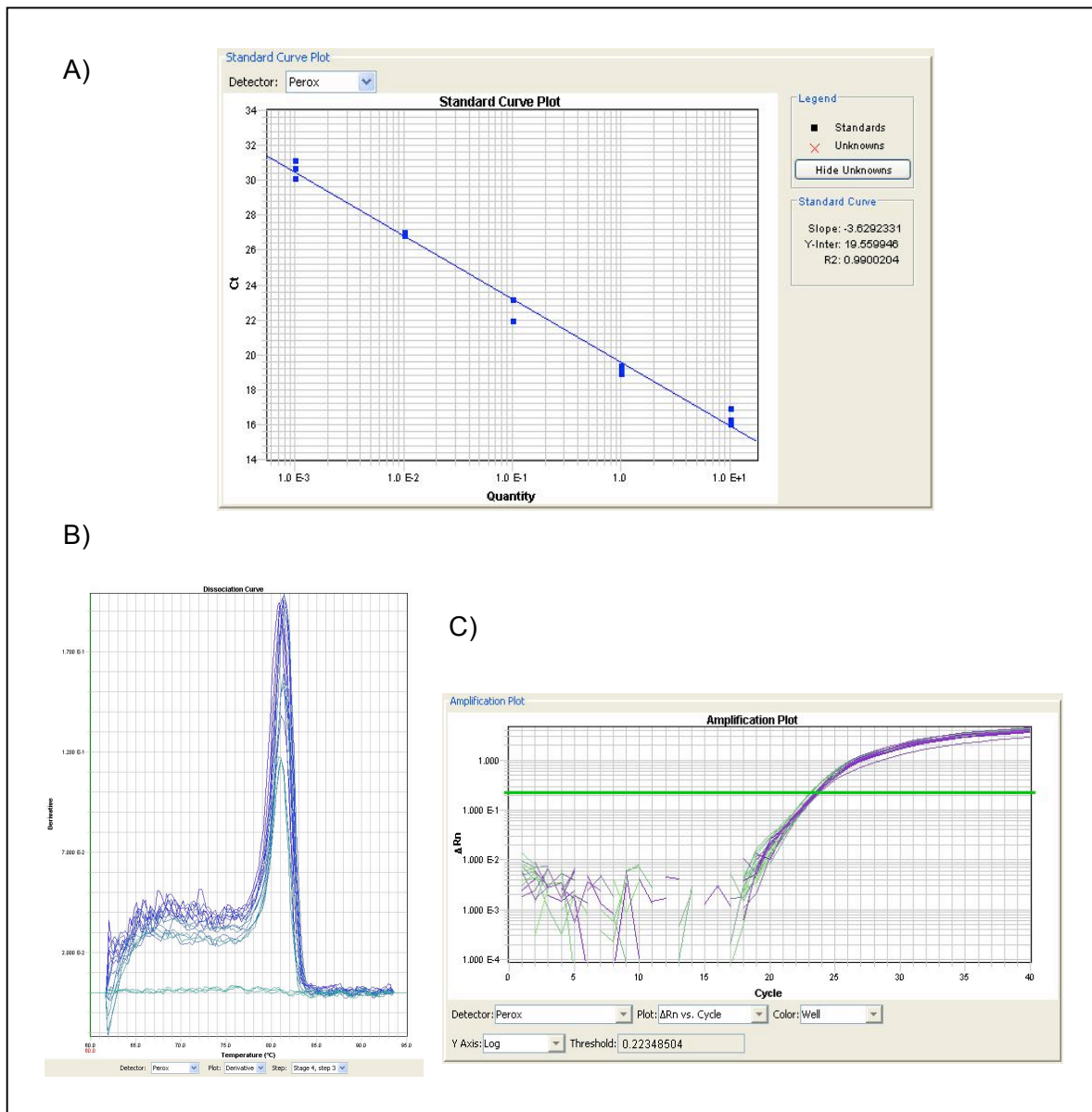
8 – ANEXOS

Anexo I - Cálculo da eficiência dos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR



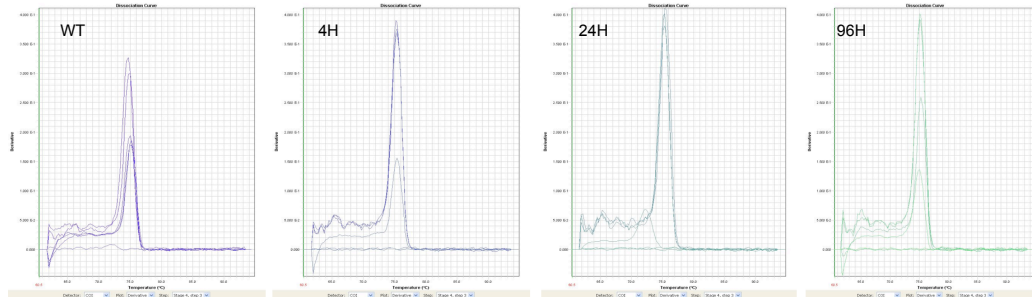
Cálculo da eficiência dos iniciadores dos genes actina e GPI8 (normalizadores da qRT-PCR). A) Curvas padrão para o cálculo de eficiência de amplificação dos iniciadores do gene actina, $R=0,99$; $Slope=-3,112$ e GPI8 $R=0,98$ e $Slope=-3,09$. B) e C) *Amplification plot* e curvas de dissociação de cada

gene (Actina e GPI8) amplificado com diferentes concentrações de cDNA, respectivamente.

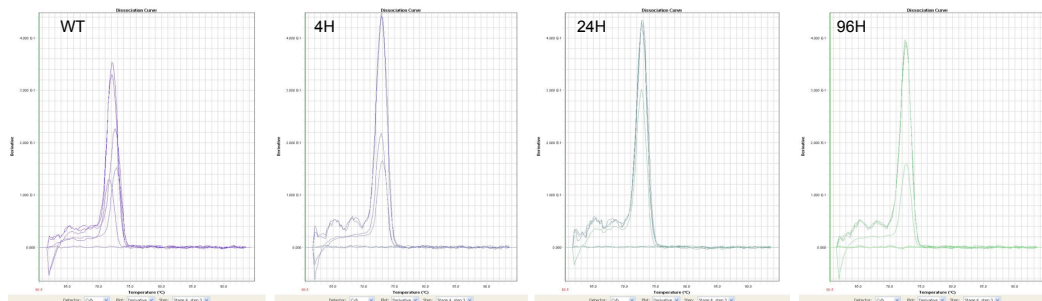


Cálculo da eficiência e padronização das concentrações de cDNA e primer a ser utilizada nas reações de qRT-PCR - gene tryparedoxina peroxidase. A) Curva padrão para o cálculo de eficiência de amplificação dos iniciadores do gene, $R=0,99$ e $Slope=-3,629$. B) Curva de dissociação do gene amplificado com diferentes concentrações de cDNA, amplificou bem em todas as diferentes concentrações. C) Gráfico de amplificação do gene com diferentes concentrações de iniciadores. Desenho representativo das análises realizadas para todos os 24 genes deste trabalho.

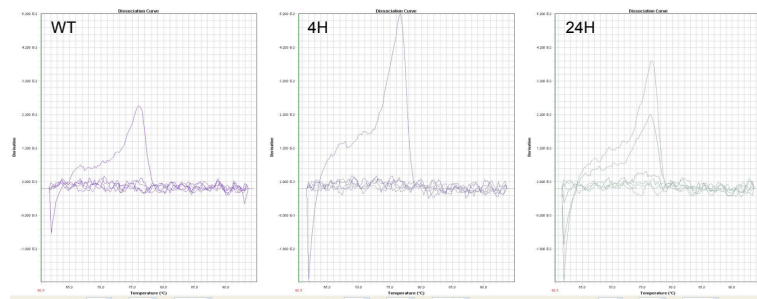
Anexo II - Curvas de dissociação dos iniciadores dos genes usados nos experimentos de qRT-PCR



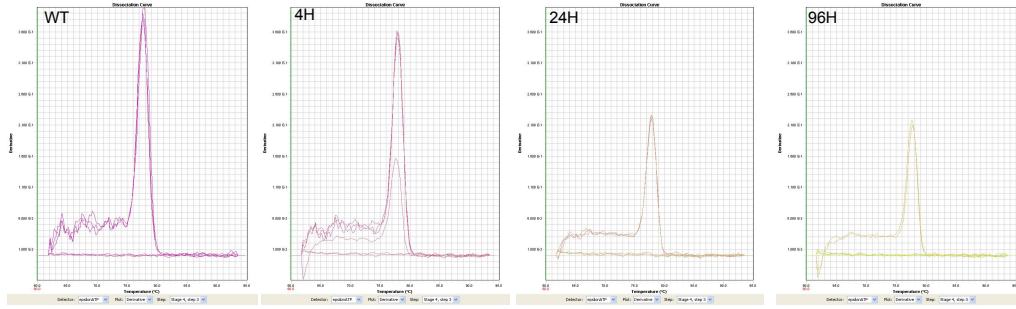
COI



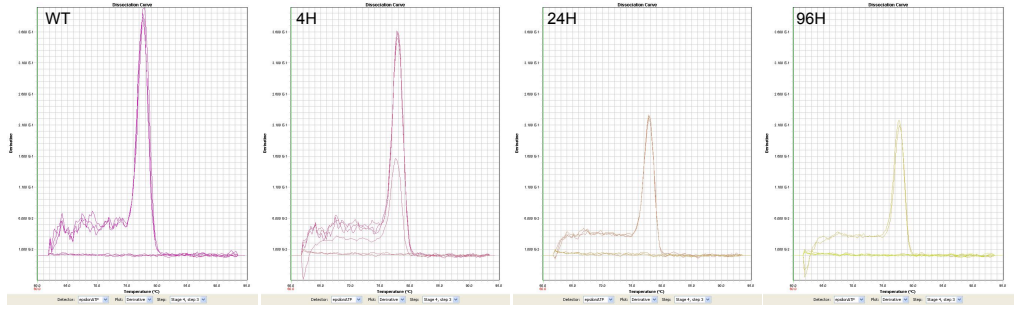
Cyb



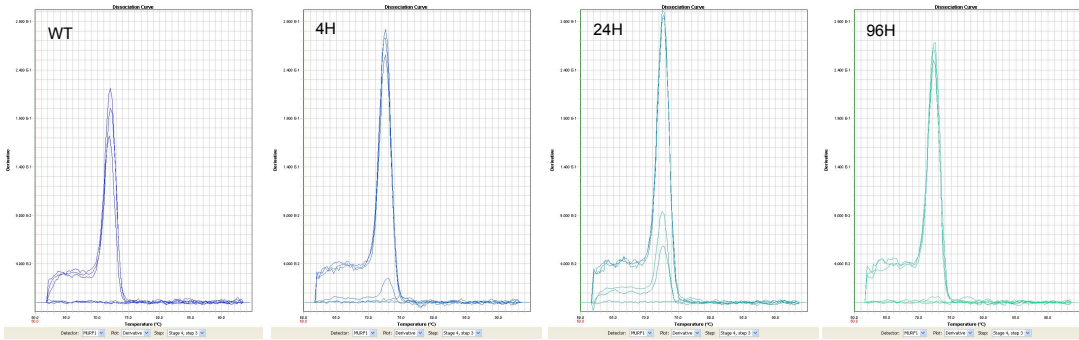
ATPase 6



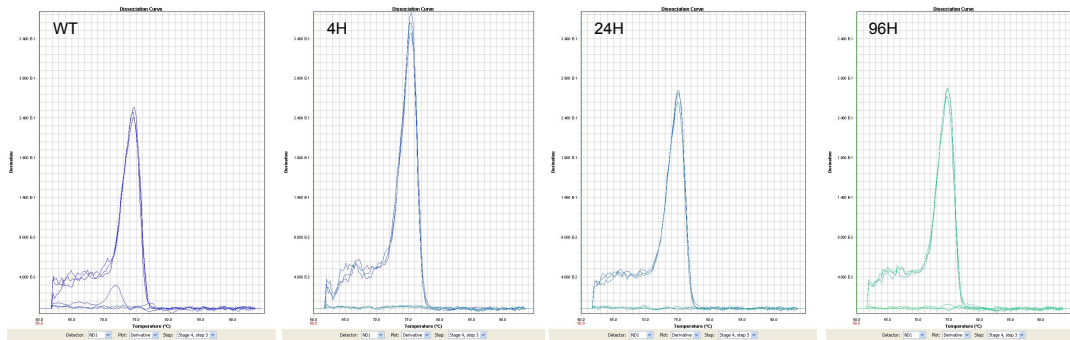
epsilonATP



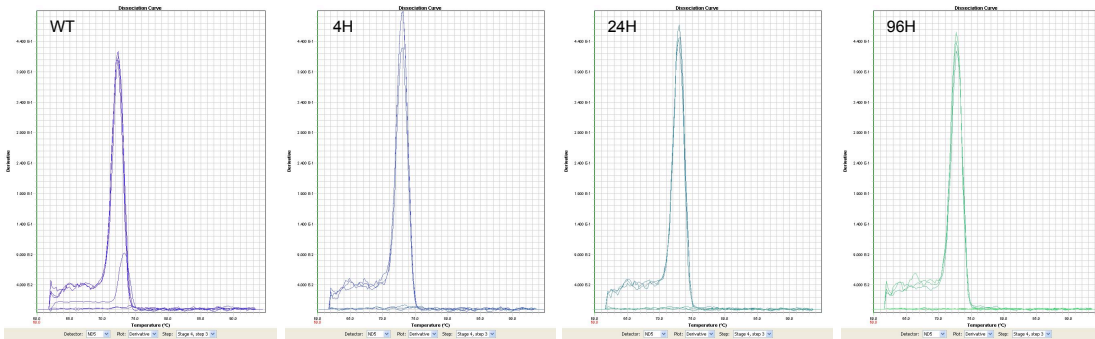
ubcyt



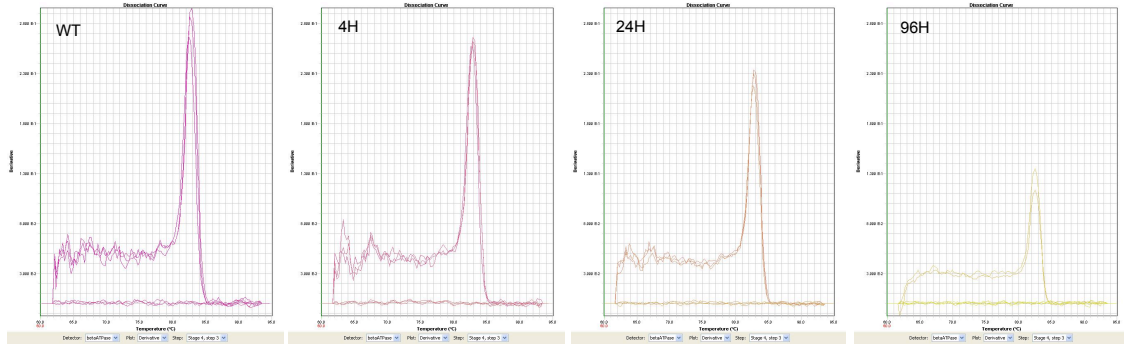
MURF1



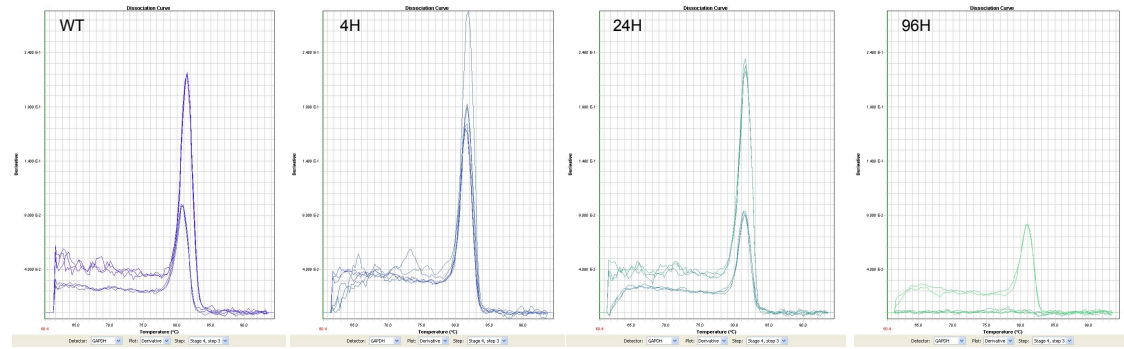
ND1



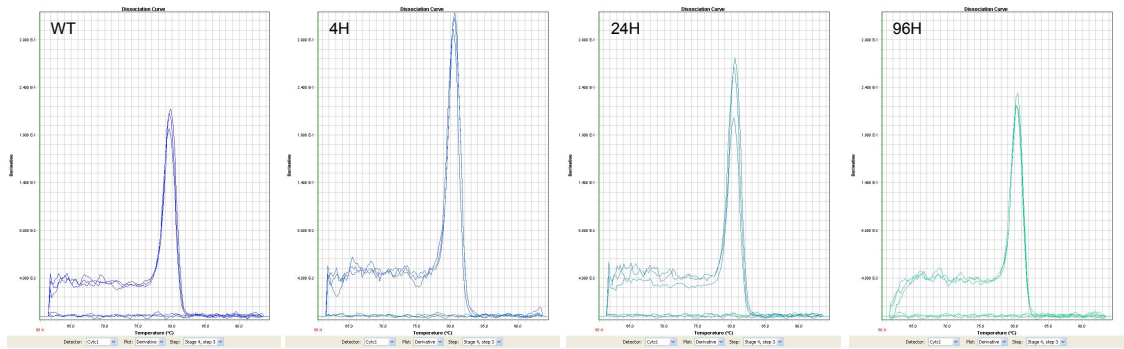
ND5



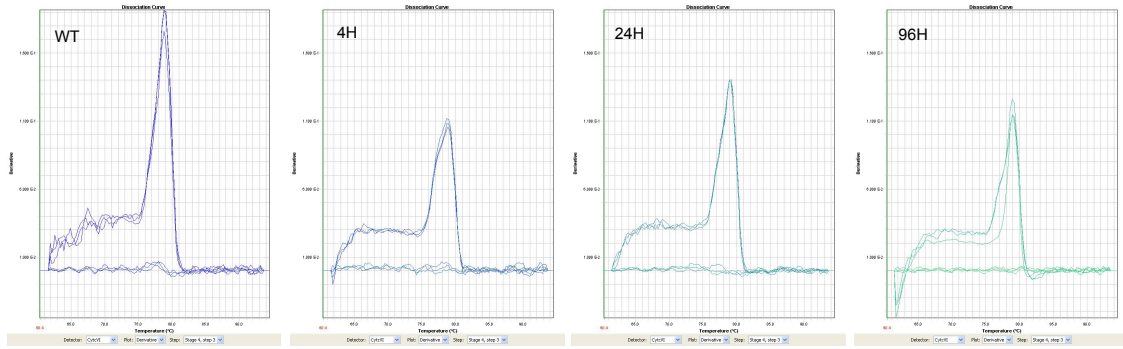
betaATPase



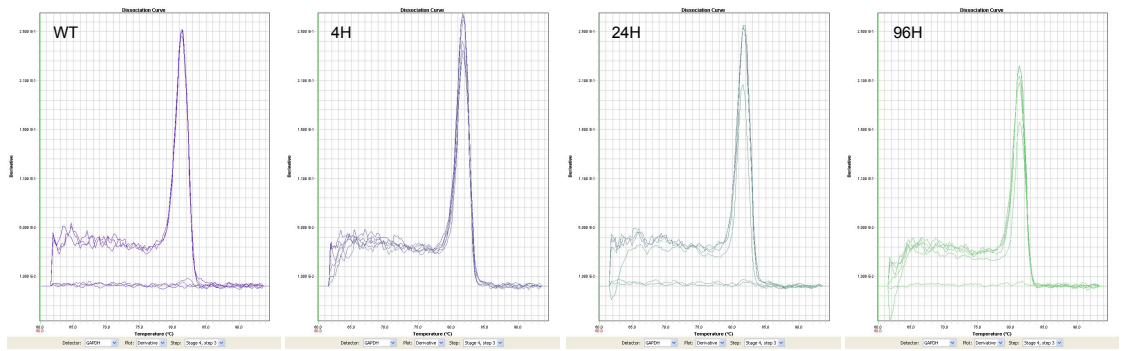
ATPsyntF1



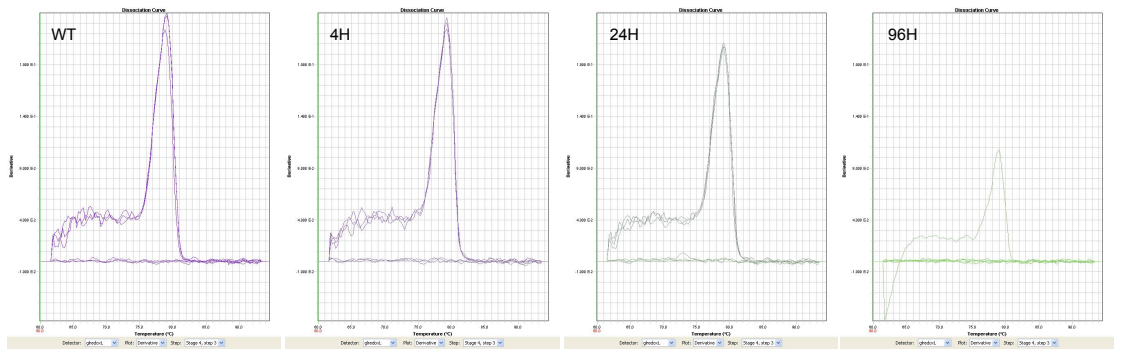
Cytc1



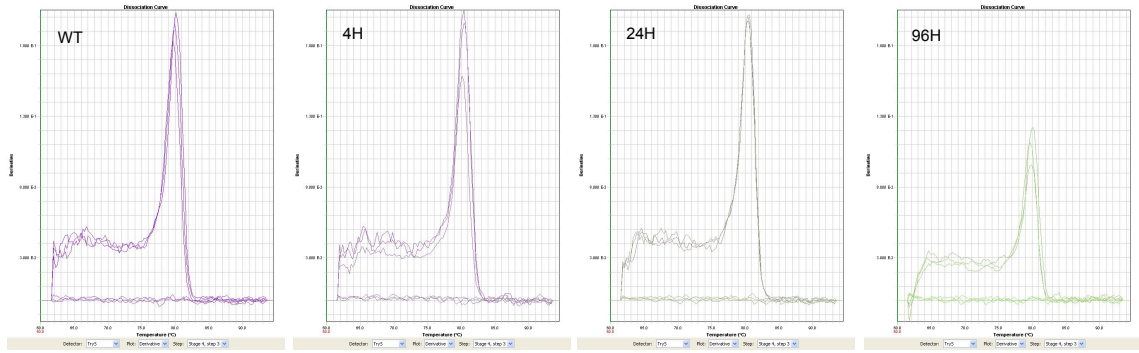
CytcVI



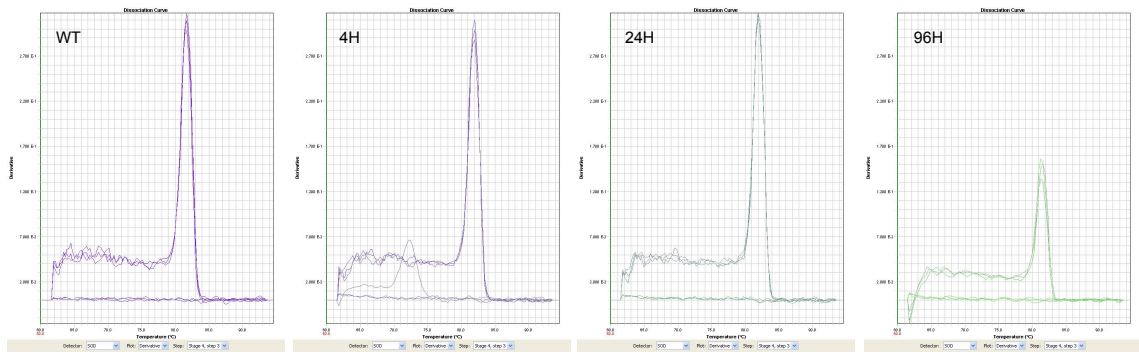
NDuboxi20kD



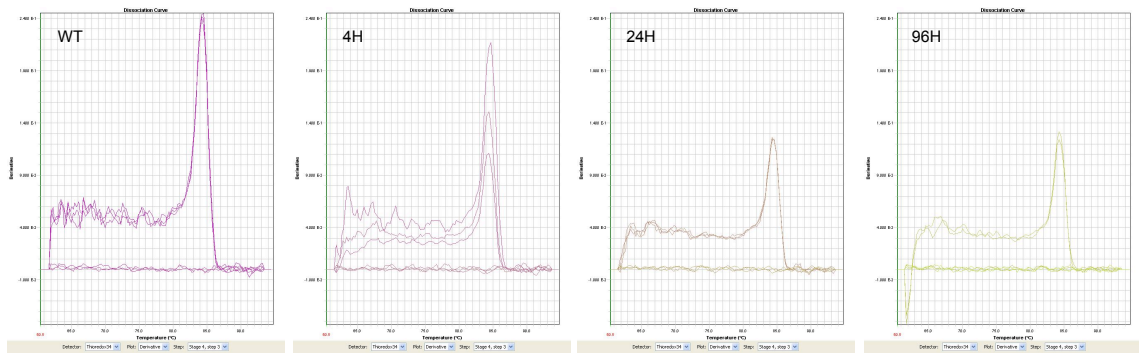
gLredox



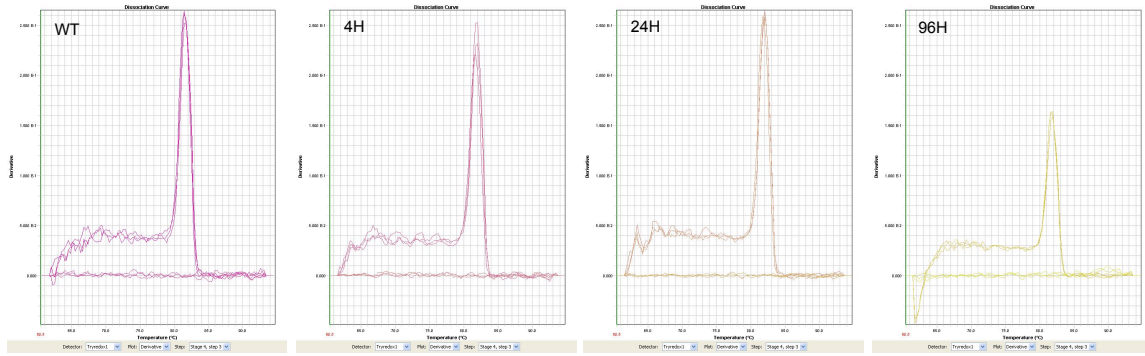
TryS



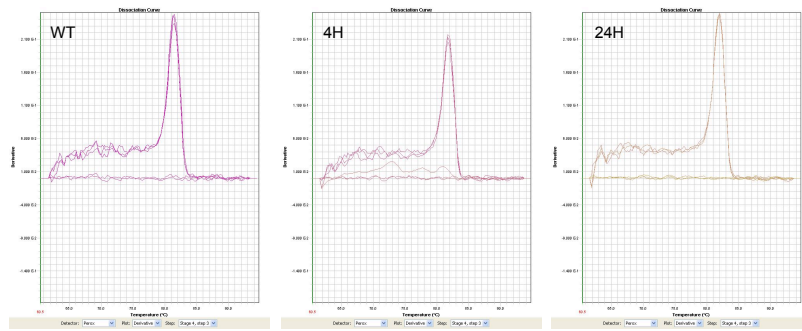
SOD



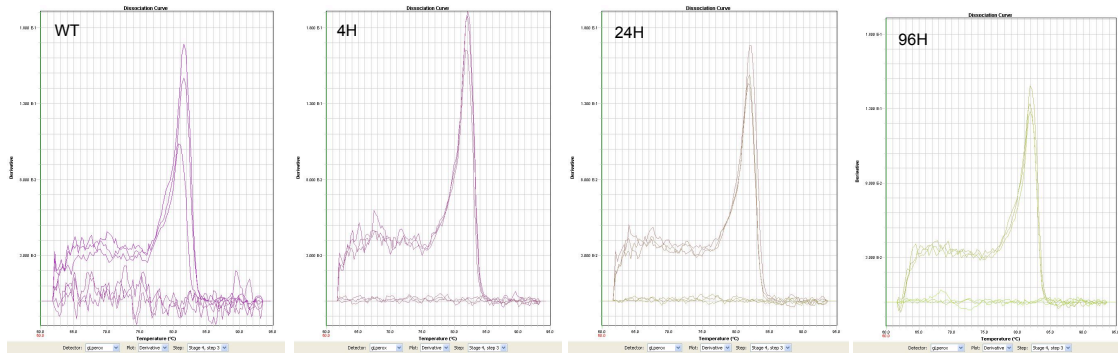
Thioredox34



Thyredox1



Tryparedoxin peroxidase



gLperoxi

Anexo III - Manuscrito referente a este trabalho aceito para publicação na revista internacional indexada “PLOS ONE”

Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Response to Ionizing Radiation Stress

Helaine Grazielle Santos Vieira ¹, Priscila Grynberg ^{1,3}, Mainá Bitar ¹, Simone da Fonseca Pires ², Heron Oliveira Hilário ¹, Andrea Mara Macedo ¹, Carlos Renato Machado ¹, Héliida Monteiro de Andrade ², Glória Regina Franco ^{1*}.

AFILIATIONS

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília, Distrito Federal, Brazil.

* Corresponding author

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, is extremely resistant to ionizing radiation, enduring up to 1.5 kGy of gamma rays. Ionizing radiation can damage the DNA molecule both directly, resulting in double-strand breaks, and indirectly, as a consequence of reactive oxygen species production. After a dose of 500 Gy of gamma rays, the parasite genome is fragmented, but the chromosomal bands are restored within 48 hours. Under such conditions, cell growth arrests for up to 120 hours and the parasites resume normal growth after this period. To better understand the parasite response to ionizing radiation, we analyzed the proteome of irradiated (4, 24, and 96 hours after irradiation) and non-irradiated *T. cruzi* using two-dimensional differential gel electrophoresis followed by mass spectrometry for protein identification. A total of 582 spots were found to be differentially expressed, from which 215 were identified. These identified protein spots represent different isoforms of only 53 proteins. We observed a tendency for overexpression of proteins with molecular weights below predicted, indicating that these may be processed, yielding shorter polypeptides. The presence of shorter protein isoforms after irradiation suggests the occurrence of post-translational modifications and/or processing in response to gamma radiation stress. Our results also indicate that active translation is essential for the recovery of parasites from ionizing radiation damage. This study therefore reveals the peculiar response of *T. cruzi* to ionizing radiation, raising questions about how this organism can change its protein expression to survive such a harmful stress.

INTRODUCTION

Chagas disease, a neglected tropical disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is considered to be a public health problem [1, 2]. Over 10 million people are infected in Latin America and more than 100 million individuals live at risk of infection by blood transfusion, congenital, or oral transmission [3]. Forty years after its introduction, benznidazole and nifurtimox continue to be the first choice of treatment for Chagas disease. However, chemotherapy based on nitroheterocyclic compounds has a limited efficacy for patients in the chronic phase of infection and these drugs are highly toxic [4, 5]. Little progress has been made toward the treatment of infected individuals and the development of more efficient drugs to treat Chagas disease patients remains urgent. Considering the resistance of some parasites to chemotherapy, the introduction of vaccines against *T. cruzi* could be another option [3, 6].

T. cruzi is capable of resisting high doses of gamma radiation, enduring up to 1.5 kGy. As a direct biological effect, gamma radiation causes double-strand breaks (DSB) in the parasite DNA. However, 48 hours after irradiation, it is possible to see the chromosomal bands already restored. The parasite growth arrests for up to 120 hours, returning to the normal rate after this period [7, 8]. This extraordinary recovery might be due to a very efficient DNA repair system. Homologous recombination is required to repair DNA DSBs and the involvement of the TcRAD51 protein in this process was evaluated by our group elsewhere. The overexpression of TcRAD51 ensures a more effective DSB DNA repair and a greater resistance to DNA damage in *T. cruzi* [9].

Oxidative stress is another effect of ionizing radiation due to the production of hydroxyl radicals (OH[•]), superoxide (O₂^{•-}), and hydrogen peroxide (H₂O₂), directly from radiolysis of water. These products are commonly called reactive oxygen species (ROS) [10]. Once the DNA molecule is intimately associated with water, the production of OH[•] results in damages that include, apart from DSBs, oxidation of nitrogenous bases and sugar [11, 12]. Approximately 75-80% of the biological damage caused by this type of radiation is mediated by OH[•] formation. Such radicals are capable of reacting with most biologically relevant molecules. Each amino acid reacts differently with OH[•] and the precise mechanisms of reaction are poorly understood [13].

Another organism that is extremely resistant to ionizing radiation is the bacterium *Deinococcus radiodurans*, which can withstand radiation doses of up to 15 kGy [14]. *D. radiodurans* presents a very robust DNA repair apparatus; nevertheless, the biological responses to genomic lesions depend on its proteome integrity. Considering that ionizing radiation also induces protein damage through oxidative stress, a protected functional proteome ensures an efficient cell recovery from this type of stress [15]. Using the classical proteomic approach of two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) coupled with mass spectrometry (MS), Basu & Apte observed in a time-course analysis that some classes of proteins have a strong influence on stress responses. These proteins are mainly involved in processes such as DNA damage repair, protein synthesis and folding, and responses to oxidative stress [16].

Proteome *versus* transcriptome analyses have been highly recommended for studies with tripanosomatids, as they have very peculiar molecular features concerning their gene expression control. As a kinetoplastid, *T. cruzi* transcription is polycistronic and gene regulation occurs mainly post-transcriptionally, with mature mRNAs being generated by trans-splicing and polyadenylation [17, 18]. The processing and stabilization of mRNAs are extremely important in trypanosomatid gene regulation [19, 20]. Furthermore, other dynamic control mechanisms, such as post-translational modifications, are fundamental in the regulation of gene expression and need to be better characterized in these organisms [21-23].

A time-course microarray study previously carried out by our group analyzed the *T. cruzi* gene expression in response to gamma radiation [7]. Among the 273 differentially expressed genes, 160 were upregulated and 113 were downregulated. The majority of the genes with assigned functions was downregulated. Translation, protein metabolic processes, and the generation of precursor metabolites and energy pathways were affected. Four mitochondrial genes and Retrotransposon Hot Spot genes were upregulated; likewise, the tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, a gene involved in DNA DSB repair, was also induced [7]. Taking into account the *T. cruzi* gene expression peculiarities, analyses of proteome changes after irradiation in different time points may contribute to the understanding of the parasite response to such stress.

In this work, we performed quantitative proteomic analyses using 2D-DIGE to ascertain the parasite response to ionizing irradiation. A total of 582 protein spots were found to be differentially expressed considering all analyzed time points and 53 different proteins were identified by tandem mass spectrometry (MS/MS). The great majority of the identified proteins was represented by several isoforms, suggesting that post-transcriptional and/or post-translational modifications are occurring as a consequence of gamma radiation exposure. Overexpression of tryparedoxin after irradiation was also observed, indicating that the parasite may be responding to the oxidative stress caused by irradiation. We also compared the time-course microarray and proteomic analyses. Although some of the protein expression patterns confirmed the microarray results, the correlation between mRNA and protein levels of the genes identified in both studies was extremely poor. In addition, treatment of the parasites with translation inhibitors showed that the synthesis of proteins putatively involved in the parasite response to stress is essential for its recovery from such a harmful stress.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Gamma Irradiation

In this work, we used *T. cruzi* epimastigote forms of the CL Brener strain, which were isolated and characterized by Brener & Chiari [24]. Clones have been maintained as frozen stocks at Universidade Federal de Minas Gerais. Parasites were grown at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium pH 7.3, supplemented with 10% fetal bovine serum, streptomycin sulfate (0.2 g/L), and penicillin (200,000 units/L). Cultures in the exponential growth phase (2×10^7 cells/mL) were exposed for 20 minutes to 500 Gy of gamma radiation (1,578 Gy/h) in a cobalt (60 Co) irradiator (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, Belo Horizonte, Brazil). Cells were counted daily after irradiation to generate the growth curve.

Cycloheximide and Puromycin Treatments

Parasites exposed or not exposed to 500 Gy of gamma radiation were treated with cycloheximide (Calbiochem) 50 µg/mL for 15 minutes or with puromycin (Sigma) 25 µg/mL for 1 hour. Both drugs were added to the parasite cultures 4 hours after irradiation. Parasites were washed twice in phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 4 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, and 2.7 mM KCl), the LIT medium was replaced, and the cells were counted.

Protein Extract Preparation and DIGE Labeling

Protein extracts were obtained, simultaneously, in triplicate for each condition: non-irradiated control (NI), 4, 24, and 96 hours after irradiation. Parasites (2×10^9 cells) were washed twice with LIT medium followed by centrifugation at 1,500 g for 5 minutes at 4°C. Each pellet was resuspended in 200 µL of lysis buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 10 mM Tris base) and a protease inhibitor mix (GE Healthcare, USA). Samples were mixed on vortex every 30 minutes during 2 hours of incubation at room temperature and subsequently centrifuged at 14,000 g for 30

minutes. The supernatants were aliquoted and stored at -70°C for further use. For all samples, protein concentration was determined using the 2D Quant kit (GE Healthcare, USA), according to manufacturer's instructions.

Before labeling, samples had their pH adjusted to 8.5 with NaOH 0.05 M (as recommended by the manufacturer's protocol). To reduce biological variation, a pool of protein extracts obtained from triplicates was used. A total of 50 µg of protein from each pool (NI, 4, 24, and 96 hours after irradiation) was labeled with CyDye DIGE Fluor Minimal Labeling Kit (GE Healthcare, USA). The dye swap strategy was used to avoid label bias, where each sample was labeled with 400 pmol of either Cy3 or Cy5. A mixture of all protein extracts (12.5 µg of each pool sample) was labeled with Cy2 as the internal control. Reactions were carried out on ice for 30 minutes in the dark and then stopped by the addition of 10 mM lysine.

Two-dimensional Gel Electrophoresis

First dimension: The isoelectric focusing (IEF) was performed using Immobiline Dry Strips (GE Healthcare, USA) 18 cm in size, with a pH ranging from 4-7. Strips were loaded with 50 µg of protein per CyDye (total of 150 µg) and sample buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% dithiothreitol (DTT), 0.002% bromophenol blue, and 1% IPG buffer (pH 4-7; GE Healthcare, USA). Passive rehydration followed overnight, at room temperature, in a strip holder (GE Healthcare, USA). The IEF protocol used in the Ettan IPGphor3 (GE Healthcare, USA) instrument was as follows: 50 µA per strip, 20°C, steps 1 to 5: 0.2kV for 12 hours, 0.5kV for 2 hours; 1kV for 1.5 hour, 8kV for 2 hours, 8kV gradually raising to 40kV, accumulating approximately 60kV in total. Focused IPG strips were equilibrated for 15 minutes in an equilibration solution (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue and 125 mM DTT) and then alkylated for an additional 15 minutes in an equilibration solution containing 13.5 mM iodoacetamide instead of DTT.

Second dimension: Equilibrated strips were briefly washed in 1x running buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, and 0.2% SDS) and placed on top of 12% acrylamide/bis-acrylamide gels, overlaid with a 0.5% agarose solution. Protein separation was carried out at 10°C, in an Ettan Dalt Six Electrophoresis System (GE Healthcare, USA), 45 mA per gel, until the dye front reached the bottom of the gel. Labeled proteins in each gel were visualized using the Typhoon FLA 9000 scanner (GE Healthcare, USA) at 100 µm image resolution with excitation/emission wavelengths for Cy3 (532/580 nm), Cy5 (633/670 nm), and Cy2 (488/520 nm). Gel images were

uploaded and cropped using Image Loader Software (GE Healthcare, USA), then imported to DeCyder 2D software, version 7.0 (GE Healthcare, USA).

DIGE Data Analysis

For spot detection, the Differential In-gel Analysis (DIA) module of DeCyder 2D software, version 7.0 (GE Healthcare, USA), was used. The DIA co-detection algorithm exploits the identical spot patterns from multiple samples in the same gel. After the removal of some artifacts from the gels, spot quantification was performed automatically by normalizing the spot volumes against the internal control. The following steps were performed in the Biological Variation Analysis module, which uses images processed in DIA and matches spots across gels. One-way ANOVA and Student's t-test were applied to evaluate differential protein expression levels between the groups of study. Spots classified as significantly differentially expressed were manually inspected. Abnormal spots were excluded from the analysis when necessary and gels were re-matched.

Trypsin in-gel Digestion, Mass Spectrometry, and Protein Identification

Differentially expressed protein spots were excised and trypsin in-gel digestion was carried out overnight at 37°C with 20 ng/μL of trypsin (Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin, USA), diluted in 25mM ammonium bicarbonate. After trypsin digestion, peptides were extracted from the gel by washing twice with 30 μL of 50% acetonitrile and 5% formic acid solution and shaking for 15 minutes. Peptides were then concentrated (Eppendorf Concentrator 5301) to 10 μL and desalted using Zip-Tip (C18 resin, P10, Millipore Corporation, USA). Once the peptides were eluted (50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid) from columns, 0.5 μL of each sample was mixed with 0.25 μL of a saturated matrix solution [10 mg/mL α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Aldrich, USA) in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid]. Samples were spotted on the MTP AnchorChip™ 600/384 (Bruker Daltonics) and let to dry at room temperature. Raw data for the identification of proteins were obtained with the MALDI-TOF-TOF AutoFlex III™ (Bruker Daltonics, USA) instrument (Laboratório Multiusário de Biomoléculas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Brazil) in the positive/reflector mode controlled by FlexControl™ software. Instrument calibration was achieved by using peptide calibration standard

II (Bruker Daltonics) as a reference. Trypsin and keratin contamination peaks were excluded from the peak lists used for data base searching. Each spectrum was produced by accumulating data from 200 consecutive laser shots.

MS/MS spectra were searched against the non-redundant protein sequence database from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the MASCOT® software (version 2.1) MS/MS ion search tool (<http://www.matrixscience.com>). The search parameters were as follows: no restrictions on protein molecular weight, two tryptic miss-cleavages allowed, and variable modifications of methionine (oxidation), cysteine (carbamidomethylation), and pyroglutamate formation at N-terminal glutamine of peptides. The mass tolerance for the peptides in the searches was 0.6 Da for MS spectra and 0.4 Da for MS/MS spectra. Peptides were considered to be identified when the scoring value exceeded the identity or extensive homology threshold value calculated by the MASCOT® software ($p < 0.05$).

Manual Curation and Statistical Analysis

Peptide sequences obtained from MASCOT® were aligned to the *T. cruzi* annotated genome using the BLAST tool from TriTrypDB (<http://www.tritrypdb.org>). Protein annotation was reassigned particularly when partial sequences were chosen by MASCOT® and full-length sequences were available at the TriTrypDB. Once a final annotated and curated set of upregulated and downregulated spots was available, it was possible to assess the protein species by their expected and observed weights (retrieved from the TriTrypDB and calculated from the position in the 2D-DIGE, respectively).

Statistical analyses were performed using R in-house scripts with built-in statistical functions. A linear model was applied to test the correlation between molecular weight and fold-change. The Wilcoxon test was used to evaluate the presence of significant differences between 1) the observed molecular weights of upregulated and downregulated protein spots and 2) the observed and expected molecular weights from upregulated and downregulated protein spots.

The final set of proteins was further manually annotated according to biological function and grouped into different functional classes based on literature data describing each protein and its molecular role.

RESULTS AND DISCUSSION

The Effects of Protein Synthesis Inhibition on the Growth of *T. cruzi* Epimastigote Cells Exposed to Gamma Radiation

Normal growth of epimastigote cells was affected by protein synthesis inhibition (using 50 µg/mL cycloheximide or 25 µg/mL puromycin) and by ionizing radiation treatment (500 Gy), as shown in Figure 1. However, irradiation promoted a more drastic growth arrest that persisted for approximately 96 hours; after this period, the parasites resumed normal growth, reaching the stationary phase 216 to 240 hours after irradiation (Figure 1). The treatment of NI cells with cycloheximide (Figure 1A) or puromycin (Figure 1B) retarded the cell growth by at least 24 hours when compared with non-treated cells, but did not lead to parasite death. Conversely, the combination of cycloheximide treatment and gamma radiation was lethal to 40% of the parasites. The remaining parasites resumed growth only 270 hours after irradiation, reaching the stationary phase 408 hours after irradiation (Figure 1A). For puromycin, a similar effect was observed, but treated cells resumed normal growth earlier when compared with cycloheximide-treated parasites (Figure 1B) and, in this case, no parasite death was detected.

These observations indicate that an active translation is important for the recovery of parasites from damage caused by ionizing radiation. Protein synthesis blockage is potentially impairing the translation of newly synthesized or pre-existing mRNAs that code for proteins involved in triggering cell proliferation. These proteins may accumulate within 24 hours after irradiation and act later after irradiation, when parasites have their genome recomposed and are ready to resume growth. Interestingly, our previous work using microarray did not demonstrate upregulation of a variety of mRNAs coding for proteins involved in cell proliferation or cell cycle control, even 96 hours after irradiation, and only a cyclin transcript was found to be affected (1.67-fold change increase) 24 hours after irradiation [7].

Analysis of the Proteome Profile of *T. cruzi* Epimastigote Cells Exposed to Gamma Radiation

Since we have verified that newly synthesized proteins have an impact on parasite recovery from irradiation stress, we decided to analyze time-course *T. cruzi* changes in the proteome induced by irradiation. Protein extracts were obtained from control NI cells and 4, 24, and 96 hours after irradiation. No significant losses in the total protein content and integrity were observed by 1D-gel electrophoresis (Figure S1). Using the 2D-DIGE approach, six gels were produced following the experimental design specified in Table 1. This technique was chosen due to its greater sensitivity, reduced gel-to-gel variation, and its capacity for quantitative measurements of the relative abundance of each protein in a complex sample [25]. Figure 2 illustrates 2D-DIGE gels at all time points. An average of $2,186 \pm 140$ spots was found when compared with the master gel. From those, 582 presented altered expressions after irradiation, considering all time points (one-way ANOVA, $p < 0.01$) and 215 were identified by peptide mass fingerprint, corresponding to 53 different proteins (Table 2). Almost half of these proteins (26) were represented by more than one spot in the 2D gel (ranging from 2-12 spots per protein), indicating the presence of several isoforms for the same protein. These results suggest that post-translational modifications or protein processing are occurring during the response to gamma radiation stress. We have manually annotated the function of all 53 identified proteins via a literature search. Proteins were then manually assigned to 15 different classes according to their biological function (Figure S3).

Additionally, the Student's t-test ($p < 0.01$) was applied to verify which proteins were differentially expressed in each time point when compared with the NI sample. The overall and time-specific number of downregulated protein spots was higher than the number of upregulated ones (Figure 3A). These findings are different from those described previously in our microarray study. Twenty-four hours post-irradiation, the number of downregulated genes decreases drastically, reaching only 6 down-expressed transcripts 96 hours after irradiation, while the number of upregulated genes increases [7]. A linear regression analysis between mRNA and protein levels from genes concomitantly identified in both studies was carried out for each time point. The correlation was extremely poor at all time points, starting with multiple $R^2 = 0.064$ at 4 hours and reaching $R^2 = 0.27$ and 0.24 at 24 and 96 hours post-irradiation, respectively (data not shown). Although a very low correlation was obtained, the result is in agreement with other studies performed in both prokaryotes and eukaryotes using classical methodologies such as microarray, Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) and RNA-Seq for transcriptomic expression data, and 2-DE, Multi-dimensional protein identification technology, and MS for

proteomics data [26-31]. This analysis reinforces the idea that transcriptomic and proteomic approaches are complementary, not confirmatory [29].

Moreover, changes in the *T. cruzi* proteome are more evident 24 hours after exposure to gamma radiation (Figure 3). This scenario suggests that epimastigote cells present an immediate but subtle response to gamma radiation characterized by 12 induced and 21 repressed protein spots 4 hours after irradiation (Figure 3A). Between 4 and 24 hours after irradiation, a more intense response to stress was observed and most of the induced and repressed protein spots were still significantly altered until 96 hours (428 spots; Figure 3B). This finding indicates a sustained alteration in the abundance of specific *T. cruzi* proteins 24 hours after gamma radiation exposure. When analyzing the *T. cruzi* proteome 24 hours after irradiation, we found that, from the 59 exclusive spots, approximately 66% were repressed and 34% were induced. However, the majority of the 23 exclusive spots found 96 hours after irradiation were induced (approximately 61%).

Exposure to Gamma Rays Increases the Levels of Shorter and/or Processed Proteins in Epimastigote Cells

When analyzing the set of upregulated proteins (especially 24 and 96 hours after irradiation), we observed a tendency for the overexpression of shorter molecules to the detriment of longer ones. The upregulated protein spots (red-colored dots) are mainly at the lower part of the gel (lower molecular weight), while the downregulated protein spots (green-colored dots) are more sparsely distributed across the gel (Figure 4A). In addition, low molecular weight protein spots tended to have larger fold changes when compared with those with molecular weights close to the expected value (Figure 4B). The Wilcoxon test was applied and confirmed that the median values of the molecular weight of downregulated and upregulated protein spots were different for each time point ($p < 1e-09$; median values of 55.45/19.39, 45.64/19.38, and 46.51/19.42 for 4, 24, and 96 hours, respectively; Figure 5A).

When we considered the expected molecular weight of the full-length isoform (predicted size obtained from the TriTrypDB website) of both upregulated and downregulated proteins, we noticed a decrease in protein size in the former case and an increase in the latter case, thus showing the emergence of lower molecular weight protein isoforms after irradiation (Figure 5B). We then decided to confirm if the observed molecular weight of these proteins in the 2D gels was in agreement with their expected molecular weight. In the case of upregulated proteins, the

observed molecular weight was significantly lower than expected (Figure 5B), indicating that these proteins might be processed, yielding shorter polypeptides. It is important to note that this result does not seem to be a consequence of protein degradation, since clear spots can be observed in the 2D gel, indicating the presence of a large amount of identical polypeptides in this region of the gel. This would not be the case if proteins were degraded, considering that in this situation peptides of variable size would be generated and no clear spot would be observed in the gel. These results may indicate the emergence of new protein isoforms, as the result of protein processing, alternative splicing of mRNAs, and/or alternative translational start/stop sites after irradiation. Alternative splicing of transcripts has the potential to expand the repertoire of proteins. Recent studies have estimated that all multi-exonic human genes are able to produce at least two alternatively spliced mRNA transcripts by alternative splicing, generating different proteins isoforms with altered structures and biological functions [32]. In trypanosomatids, mature mRNAs are generated after two processing events: trans-splicing to add the spliced leader (SL) sequence to the 5' end of transcripts and subsequent polyadenylation [17]. A genome-wide analysis comparing the SL addition site along the developmental cycle of the parasite suggests that alternative trans-splicing plays an important role in differential gene expression [33]. The occurrence of alternative trans-splicing could be an explanation for the presence of so many different isoforms in *T. cruzi* after radiation response.

A similar event has already been described in *D. radiodurans*, since different isoforms of the single-strand binding (SSB) protein were produced after ionizing radiation stress induction. SSB proteins are vital for cell survival due to their involvement in processes such as DNA replication, recombination, and repair. The SSB protein spots in the gel followed a dynamic pattern of appearance, indicating a progressive processing of the C-terminal acidic tail, perhaps upon its interaction with ssDNA. The observed isoelectric point (pI) and molecular weight of deinococcal SSB isoforms were in agreement with the *in silico*-predicted pI and molecular weight of the SSB proteins shortened from the C-terminal end [16].

Intriguingly, in most of the observed processed proteins, the identified peptide sequences were the same or nearly the same in all sequenced protein spots and, therefore, it was impossible to define the actual outcome of the protein processing. As a particular case of study, the protein annotated as prostaglandin F₂ alpha synthase, which is similar to NADH-flavin oxidoreductase, is processed to a total of six different forms (Figure S2). While the expected molecular weight for the annotated sequence is of 42 kDa, only two isoforms are nearly this size (~40 kDa) and were, in fact, the most downregulated isoforms. A third isoform has a predicted molecular mass of 68 kDa, greatly exceeding the expected protein size. As all of the MS/MS-identified peptides were mapped to the C-terminal portion of the isoforms, there is no information to characterize the N-terminal of this enlarged protein naturally present in the NI parasites and

downregulated after exposure to gamma radiation. A smaller (29 kDa) protein is expressed in approximately equal levels before and after radiation exposure, while an even smaller (22 kDa) protein species is exclusively present in irradiated cells. This is an interesting example, representative of multiple cases, in which we have observed the emergence of shorter isoforms of a same protein after epimastigote irradiation. The list of processed proteins expressing shorter isoforms after irradiation includes alpha and beta-tubulin, D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, elongation factor 2, glycerate kinase, pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, tyrosine aminotransferase, and several heat shock proteins (HSPs), such as HSP60, DnaK, HSP70s, and glucose-regulated protein 78. Apart from the previously discussed SSB proteins in *D. radiodurans*, very few references in the scientific literature mention the presence of shorter protein fragments after radiation exposure in any organism.

Interestingly, Parodi-Talice and collaborators [34] observed a similar pattern in *T. cruzi* for the proteins glutamate dehydrogenase (GluDH), HSP70, and alpha and beta-tubulins, where lower molecular weight isoforms were differentially expressed during metacyclogenesis when compared with isoforms with the predicted molecular weight. The transformation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes is a complex process of differentiation, requiring a controlled production of various proteins [34]. Similarly, a quantitative time-course proteome analysis for the schizont-stage of *Plasmodium falciparum* (34 to 46 hours after invasion) demonstrated that actin-I, enolase, HSPs, and eukaryotic initiation factor 4A and 5A presented more than one isoform. The isoforms also showed different expression patterns at the different time points analyzed. *P. falciparum* is characterized by a complex life cycle, undergoing extensive morphological and metabolic changes, which reflects its capacity to survive in different host environments [35]. According to the authors, post-translational modifications may be a very important strategy for the parasites to control gene expression during differentiation [34, 35].

Differentially Expressed Proteins after Gamma Radiation Exposure

Regarding the differentially expressed proteins, many of the listed proteins in Table 2 and Figure S3 are related to the protein synthesis process that seems to be upregulated, except for some protein spots of the elongation factor 2 that show a reduction in their levels. This may be a response to compensate for the processing of proteins that occurs after irradiation. This response may also enhance the synthesis of specific proteins that will possibly play a role in the stress response. The results obtained from the analyses of translation inhibition and proteomic profile after irradiation place *de novo* protein synthesis as an important cellular response to gamma

radiation. The same pattern is observed in *D. radiodurans*, where proteins related to translation/folding displayed either enhanced or *de novo* expression in the first hour of post-irradiation recovery. Proteins involved with DNA repair and oxidative stress alleviation were also induced in *D. radiodurans* under ionizing radiation stress [16].

Proteins involved in protein folding processes, such as chaperones, are mostly downregulated post-irradiation (Figure S3). This represents an unexpected result, since these proteins are classically involved with stress response by stabilizing newly synthesized protein molecules. Nevertheless, this result is in agreement with transcriptomic data observed in microarray experiments [7]. It is worth noting that, although HSPs are mostly downregulated, processed forms of these molecules are upregulated and may even be functional. Interestingly, the two chaperones localized in the endoplasmic reticulum (calreticulin and protein disulfide isomerase) are upregulated after gamma radiation exposure, which may indicate an important role of this compartment in the ionizing radiation stress response, suggesting the existence of an unfolded protein response-like in this condition [36].

Another unexpected result is the downregulation of proteins involved in the ATP metabolism (namely the beta subunit of ATP synthase and the subunit IV of cytochrome c oxidase), although another member of this class is upregulated (cytochrome c oxidase subunit V). The outcome of this result is not clear and a more in-depth study of the cell energy metabolism would be important.

Perhaps the most remarkable observation in the post-irradiation proteome investigated here is the putative decline in the activity of the glycolytic and amino acid metabolism pathways. Several important enzymes of glycolysis were downregulated after gamma radiation exposure. Accordingly, the only enzyme (pyruvate phosphate dikinase) from gluconeogenesis listed here was upregulated. Most enzymes involved in the amino acid metabolism were also downregulated, but shorter isoforms of the GluDH were upregulated after irradiation. They consist of three isoforms with experimental molecular weights (15 kDa) lower than the predicted values (45 kDa), suggesting once again the occurrence of post-transcriptional modifications/processing of important metabolic enzymes during the stress response. GluDH catalyzes the NAD- and/or NADP-dependent reversible deamination of L-glutamate to form alpha-ketoglutarate and is essential for the metabolism of amino nitrogen in organisms ranging from bacteria to mammals [37]. *T. cruzi* has a metabolism that is largely based on the consumption of amino acids, mainly, proline, aspartate, and glutamate, which constitute the main carbon and energy sources of the epimastigote forms. In *T. cruzi*, GluDH has NADP-specific activity [38], indicating that it may serve as a pentose-phosphate shunt-independent source of NADPH in these parasites. Taken together, these results suggest that the parasite experiences an overall reduction on its energy

metabolism as a consequence of its growth arrest after irradiation.

We have identified four proteins classified as redox sensors in this study. While two of these are downregulated (both oxidoreductases), the other two are upregulated and these are both tryparedoxins, which efficiently reduce hydrogen peroxide [39]. Throughout its life cycle, *T. cruzi* is exposed to various stresses in different environments: the invertebrate (triatomine bugs) and the vertebrate hosts. One of the most deleterious consequences of oxidative stress may be the formation of DNA lesions. Guanine is the most susceptible base to oxidation, due to its low redox potential, and the 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) is the most common lesion. When 8-oxoG is inserted during DNA replication, it can generate double-strand breaks, which makes this lesion severely deleterious. Recently Aguiar *et al.*, 2013 [40], demonstrated that parasites overexpressing MutT are more resistant to the oxidative stress caused by hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment. The MutT enzyme product, 8-oxod-GMP, can generate an oxidative stress signal, enabling the cells to overcome this stress. MutT hydrolyses 8-oxo-dGTP in the nucleotide pool, returning it to the monophosphate form so that it cannot be incorporated into DNA by polymerases. Parasites overexpressing heterologous MutT also increase the levels of cytosolic and mitochondrial peroxidases (TcCpx and TcMPx) after H₂O₂ treatment. Taking this into account and also that parasites subject to gamma radiation experience oxidative stress and increase the levels of some antioxidant enzymes not immediately after irradiation, but later after irradiation, we could suggest that *T. cruzi* does not respond directly to ROS production as a consequence of irradiation, but to 8-oxo-dGMP that is generated subsequently. The nucleotide 8-oxo-dGMP, or another secondary metabolite generated from this process, could be acting as a second messenger to the cell and indicating the presence of oxidative stress.

Recently, Krisko & Radman proposed a new paradigm when a cell is subject to ionizing radiation: the proteome rather than the genome is the primary target in radiation-induced cell death. This paradigm has been supported by several experimental evaluations showing that *D. radiodurans* has a way of protecting its proteins from oxidative damage [41]. Indeed, a strong correlation between intracellular Mn/Fe concentration ratios and bacterial resistance to radiation has been shown, in which the most resistant bacteria tolerates 300 times more Mn²⁺ and three times less Fe²⁺ than the most radiation-sensitive bacteria [15]. Manganese ions prevent the formation of iron-dependent ROS through the Fenton reaction, acting as chemical antioxidant protectors. Furthermore, measurements of protein carbonyl groups in *D. radiodurans* revealed that Mn²⁺ accumulation prevented protein oxidation; these results were also observed in other radioresistant bacteria [42-45].

Furthermore, the level of oxidative protein damage caused during irradiation controls the survival of many organisms (*Bdelloid rotifers*, a class of freshwater invertebrates, *Caenorhabditis*

elegans, the bacteria *D. radiodurans*, and *Halobacterium salinarum*), which are extremely resistant to ionizing radiation [45-48]. The principal factor responsible for this extraordinary radioresistance is their great antioxidant protection of their cellular constituents, including those required for DSB repair, allowing them to recover from stress and continue reproduction [47].

An important finding of this study is the significant upregulation of three hypothetical proteins after gamma radiation. This may indicate a role for species-specific proteins in the response to stress after ionizing radiation exposure, since these most likely represent proteins with no homologues in other species. Similarly, in an initial *D. radiodurans* proteome study, hypothetical proteins were identified and further proved to be crucial for the response to radiation in this bacterial species [48]

Sghaier and collaborators have recently published a study on the amino acid composition of proteins from radiation-resistant bacteria [49]. The authors report that such proteins bear more small amino acids and fewer aromatic rings. We have also assessed the amino acid composition of *T. cruzi* proteins in a slightly different perspective. Amino acid counts were performed for upregulated *T. cruzi* proteins after gamma radiation exposure (we have considered as upregulated the proteins that were more abundant than in NI cells at least in one time point) and for the orthologues in *T. brucei* of *T. cruzi* upregulated proteins. In both cases, amino acid counts were normalized by the count performed in the set of all annotated proteins of the respective *Trypanosoma sp.* The hypothesis was that proteins with important roles after irradiation in *T. cruzi* would have an amino acid composition different than what is observed in the set of all *T. cruzi* proteins and in the respective orthologues in *T. brucei* (which is not radio-resistant).

When we compared *T. cruzi* proteins that were upregulated after radiation exposure with the entire set of annotated proteins from this parasite, we observed that the former have in general fewer polar, hydrophobic, and small amino acids (although some amino acids in these classes are more frequent). In addition, upregulated proteins have fewer aromatic amino acids (except for tyrosine, which is more frequent) and less sulfur-containing cysteine residues.

CONCLUSIONS

Using 2D-DIGE and MS, we have identified 582 protein spots differentially expressed after gamma radiation exposure. The presence of multiple isoforms was observed for more than half of the identified proteins, most of which are shorter than the annotated protein size in the *T. cruzi* genome. Additionally, there was a strong correlation for lower molecular weight peptide spots to be overexpressed. This result could be explained by *de novo* protein synthesis of different isoforms, protein processing, and/or modification events subsequent to radiation exposure. This observation indicates that post-translational control of gene expression have an important role in the parasite response to gamma radiation stress. The inhibition of protein synthesis in face of gamma radiation was shown to have a significant effect decreasing parasite growth and survival rates, highlighting the importance of active translation for parasite recovery after exposure to ionizing radiation.

We have annotated all 53 proteins identified by MS according to their biological roles. Several proteins were represented by multiple spots, and most of them had molecular weights lower than predicted. As a consequence of this observation, we cannot precisely state which biological processes are upregulated *versus* downregulated, since the different protein isoforms may not function in the same way as the full-length protein. Nevertheless, some tendencies could be observed in this study, including changes in the following biological processes: upregulation of the protein synthesis process, downregulation of protein folding (except for the upregulation of two endoplasmic reticulum chaperones), downregulation of the ATP generation pathway, glycolysis, and amino acid metabolism, and the upregulation of two trypanothione synthetases (which reduce hydrogen peroxide in response to oxidative stress).

Finally, taking into account the translation inhibition results obtained herein, together with the observed proteomic profile after irradiation, we can conclude that *de novo* protein synthesis is an essential cellular response to gamma radiation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Neuza Antunes Rodrigues for technical assistance and Dr. Adriano Pimenta for making available the use of the mass spectrometry facility at Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG. The authors also acknowledge the Laboratory of Gamma Irradiation, CDTN and Dr. Márcio Tadeu Pereira for kindly providing the access to the Co irradiator.

REFERENCES

1. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB. (2012) Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. Cellular Microbiology 14: 634-643.
2. Machado FS, Jelicks LA, Kirchoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, De Carvalho ACC, Guan FX, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. (2012) Chagas heart disease: report on recent developments. Cardiology In Review 20: 53-65.
3. Barbosa RPA, Galvao B, Dos Santos LI, Sales PA, Marques PE, Pereira RVS, Cara DC, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Machado AV. (2013) Vaccination using recombinants influenza and adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 are highly effective on protection against *Trypanosoma cruzi* infection. Plos One 8: e61795.
4. Diniz LF, Urbina JA, De Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TAF, Caldas IS, Talvani A, Ribeiro I, Bahia MT. (2013) Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. PLoS neglected tropical diseases 7: e2367.

5. Clayton J. (2010) Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature* 465: S12-S15.

6. Buckner FS, Navabi N. (2010) Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Current opinion in infectious diseases* 23: 609-616.

7. Grynberg P, Passos-Silva DG, Mourão MM, Hirata JR, Macedo AM, Machado CR, Bartholomeu DC, Franco GR. (2012) *Trypanosoma cruzi* gene expression in response to gamma radiation. *PLoS One* 7: e29596.

8. Regis-Da-Silva CG, Freitas JM, Passos-Silva DG, Furtado C, Augusto-Pinto L, Pereira MT, DaRocha WD, Franco GR, Macedo AM, Hoffmann JS, Cazaux C, Pena SDJ, Teixeira SM, R, Machado CR. (2006) Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 149: 191-200.

9. Passos-Silva DG, Rajão MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR, Furtado C. (2010) Overview of DNA repair in *Trypanosoma cruzi*, *trypanosoma brucei* and *leishmania major*. *Journal of Nucleic Acids* 2010: 1-14.

10. Stadtman ER. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 62: 797-821.

11. Hutchinson F. (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32: 115-154.

12. Riley PA. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65: 27-33.

13. Anitori RP. (2012) Extremophiles Microbiology and Biotechnology. In: Gwin KR, Battista JR, editors. Ionizing-radiation resistant microorganisms. Caister Academic Press. pp. 25-52.
14. Appukuttan D, Rao AS, Apte SK. (2006) Engineering of *Deinococcus radiodurans* R1 for bioprecipitation of uranium from dilute nuclear waste. Applied and Environmental Microbiology 72: 7873-7878.
15. Daly MJ *et al.* (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. PLoS Biol 5: e92
16. Basu B, Apte SK. (2012) Gamma radiationinduced proteome of *Deinococcus radiodurans* primarily targets DNA repair and oxidative stress alleviation. Molecular & cellular proteomics 11: 1.
17. Jäger AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D'Orso I and Frasch AC. (2007) mRNA maturation by two-step trans-splicing/ polyadenylation processing in trypanosomes. PNAS 7: 2035-2042.
18. Matthews KR *et al.* (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. Genes Dev 8: 491-501.
19. Di Noia JM *et al.* (2000) AU-rich elements in the 3-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. J Biol Chem 275: 10218-10227.
20. D'Orso I and Frasch AC. (2001) Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. J Biol Chem 276: 15783-15793.

21. Martínez-calvillo S, Vizuet-de-rueda JC, Florencio-martínez LE, Manning-cela RG, Figueroa-angulo EE. (2010) Gene expression in Trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1-15.
22. Marchini FK, de Godoy LMF, Rampazzo RCP, Pavoni DP, Probst CM, Gnad F, Mann M, Krieger MA. (2011) Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *Plos One* 6: e25381.
23. Zinoviev A, Shapira M. (2012) Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in Trypanosomatids. *Comparative and Functional Genomics* 2012: 1-10.
24. Brener Z, Chiari E. (1963) Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 5: 220–224.
25. Marouga R, David S, Hawkins E. (2005) The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382: 669-678.
26. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology* 19: 1720-1730.
27. Chen G, Gharib TG, Huang CC *et al.* (2002) Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Molecular & cellular proteomics* 1: 304-313.
28. Washburn MP, Koller A, Oshiro G *et al.* (2003) Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3107-3112.

29. Nie L, Wu G, Zhang W. (2006) Correlation between mRNA and protein abundance in *Desulfovibrio vulgaris*: a multiple regression to identify sources of variations. *Biochemical and biophysical research communications* 339: 603-610.
30. Ning K, Fermin D, Nesvizhskii AI. (2012) Comparative analysis of different label-free mass spectrometry based protein abundance estimates and their correlation with RNA-Seq gene expression data. *Journal of proteome research* 11: 2261-2271.
31. Butter F, Bucerius F, Michel M, Cicova Z, Mann M, Janzen CJ. (2013) Comparative proteomics of two life cycle stages of stable isotope-labeled *Trypanosoma brucei* reveals novel components of the parasite's host adaptation machinery. *Molecular & Cellular Proteomics* 12: 172-179.
32. Ezkurdia I, del Pozo A, Frankish A, Rodriguez JM, Harrow J, Ashman K, Tress ML. (2012) Comparative proteomics reveals a significant bias toward alternative protein isoforms with conserved structure and function. *Molecular biology and evolution* 29: 2265-2283.
33. Michaeli S. (2011) Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future microbiology* 6: 459-474.
34. Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, Dallagiovanna B, Cayota A, Krieger M, Goldenberg S, Robello C. (2007) Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Journal of Mass Spectrometry* 42: 1422-1432.
35. Foth BJ, Zhang N, Mok S, Preiser PR, Bozdech Z. (2008) Quantitative protein expression profiling reveals extensive post-transcriptional regulation and post-translational modifications in schizont-stage malaria parasites. *Genome biology* 9: 177.

36. Conte L, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R, Parodi AJ. (2003) The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of The Cell* 14: 3529-3540.
37. Benachenhou-Lafha N, Forterre P, Labedan B. (1993) Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life. *J Mol Evol* 36: 335-346.
38. Barderi P, Campetella O, Frasch ACC, Santome JA, Hellman U, Pettersson U, Cazzulo JJ. (1998) The NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression. *Biochem J* 330: 951-958.
39. Krauth-Siegel RL, Comini MA. (2008) Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780: 1236-1248.
40. Aguiar PHN, Furtado C, Repolês BM, Ribeiro GA, Mendes IC, et al. (2013) Oxidative Stress and DNA Lesions: The Role of 8-Oxoguanine Lesions in *Trypanosoma cruzi* Cell Viability. *PLoS Negl Trop Dis* 7(6): e2279.
41. Krisko A and Radman M. (2013) Biology of extreme radiation resistance: The way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: 1-11.
42. Daly MJ *et al.* (2004) Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306: 1025-1028.
43. Krisko A and Radman M. (2010) Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14373-14377.

44. Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, Fukumoto R, Lee DY, Wehr NB, Viteri GA, Berlett BS, Levine R.L. (2010) Small-molecule antioxidant proteome shields in *Deinococcus radiodurans*. PLoS ONE 5: e12570.
45. Robinson CK, Webb K, Kaur A, Jaruga P, Dizdaroglu M, Baliga NS, Diruggiero J. (2011) A major role for nonenzymatic antioxidant processes in the radioresistance of *Halobacterium salinarum*. Journal of bacteriology 193: 1653-1662.
46. Daly MJ. (2012) Death by protein damage in irradiated cells. DNA repair 11: 12-21.
47. Krisko A, Leroy M, Radman M, Meselson M. (2012) Extreme antioxidant protection against ionizing radiation in *Bdelloid rotifers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109: 2354-2357.
48. Zhang C, Wei J, Zheng Z, Ying N, Sheng D, Hua Y. (2005) Proteomic analysis of *Deinococcus radiodurans* recovering from gamma-irradiation. Proteomics 5: 138-143.
49. Sghaier H, Thorvaldsen S, Saied NM. (2013) There are more small amino acids and fewer aromatic rings in proteins of ionizing radiation-resistant bacteria. Annals of Microbiology 1-9.

FIGURES

Figure 1. The effect of irradiation and translation inhibition on *T. cruzi* epimastigotes growth. Irradiated (500 Gy) or NI parasites were treated with cycloheximide 50 µg/mL (A) or puromycin 25 µg/mL (B), both added 4 hours after irradiation. Each point represents the mean ± standard deviation of three different experiments.

Figure 2. 2D-DIGE analysis of total protein extracts of irradiated and NI epimastigote cells. Gel images 1-6 (see the experimental design in Table 1) showing – in triplicate – parasite proteins from each time point, labeled either with Cy3 (green) or Cy5 (red). Proteins were separated in the first dimension along a pH gradient (pH 4-7, 18 cm Immobiline DryStrip (GE Healthcare, USA), and in the second dimension in a 12% polyacrylamide gel. The molecular weight marker (MW) is indicated in kDa.

Figure 3. Protein spots differentially expressed at all time points. A) Number of downregulated and upregulated protein spots per time point. B) Venn diagram showing the overlaps of 32 protein spots differentially regulated among the three time points and of the 428 protein spots between 24 and 96 hours.

Figure 4. Distribution of upregulated and downregulated protein spots versus molecular weight, pI, and fold change. In the scatter plots, upregulated protein spots are shown in red and downregulated protein spots are shown in green. The correlation between molecular weight and pI or fold-change ratio is shown in (A) and (B), respectively. Spots with no significant difference in expression are colored gray. The blue line indicates the negative correlation between molecular weight and fold change.

Figure 5. Boxplots of peptide molecular weights. A) Distribution of the observed molecular weight in downregulated (green) or upregulated (red) protein spots at each time point analyzed. B) comparison between the distribution of the expected (E) and observed (O) molecular weights among downregulated or upregulated protein spots 24 and 96 hours after irradiation. A single asterisk corresponds to $p < 0.05$ and a double asterisk corresponds to $p < 0.001$.

TABLES

Table 1. Experimental design

Gel	NI	4 h	24 h	96 h	Pool
1	Cy3	Cy5			Cy2
2		Cy3	Cy5		Cy2
3			Cy3	Cy5	Cy2
4	Cy5			Cy3	Cy2
5	Cy3		Cy5		Cy2
6		Cy3		Cy5	Cy2

Each two-dimensional gel was loaded with 50 µg of total protein extract per sample, labeled either with Cy3 or Cy5. The internal control (a pool containing 50 µg of all time point proteins: NI, 4, 24, and 96 hours after irradiation) was labeled with Cy2.

Table 2. Protein data for the 53 proteins identified in this study

Description	Ref. Spot	TriTrypDB Id (TcCLB.)	pI (exp/theo)	Mw (exp/theo)	Fold-change			Anova	Mascot MS/MS ion search		
					4hs	24hs	96hs		Peptides matched	Sequence Coverage	Mascot Score
14-3-3 protein; putative	153	506775.80 or 511167.90 and	5.00/4.78	24.3/29.1	-1.35	1.08	-1.16	1.30E-03	2	12%	73
	151	511589.130 or 508851.180	4.78/4.71	26.6/29.9	1.63	2.03	2.25	1.40E-06	1	4%	36
40S ribosomal protein S12, putative	195	508551.20	4.82/4.78	10.9/15.9	1.45	3.52	2.92	3.30E-04	2	24%	110
Actin, putative	66	510571.39 or 510127.79 or 510571.30	5.75/5.46	45.9/41.2	-1.64	-14.92	-12.65	2.30E-07	2	10%	98
	69		6.07/4.7	44.7/49.8	-1.01	-12.65	-10.53	5.70E-06	5	16%	250
Alpha tubulin; putative	100		5.06/4.7	55.2/49.8	-2.11	-47.2	-45.08	3.30E-08	5	15%	275
	136	411235.9	5.38/4.7	30.7/49.8	1.54	-2.02	-1.68	2.40E-07	2	5%	121
	138		5.47/4.7	30.4/49.8	1.09	-2.34	-2.21	2.30E-05	3	9%	114
	140		5.38/4.7	30.0/49.8	1.4	-1.07	1.28	8.90E-05	3	9%	114
Aminopeptidase, putative, metallo-peptidase, Clan	35	508799.240	6.22/6.44	58.9/55.9	-1.55	-1.53	-1.73	1.20E-03	1	2%	59

MF, Family M17, putative											
ATPase beta subunit	26	509233.180	5.15/5.07	58.6/55.7	-2.42	-21.04	-18.44	2.00E-05	10	33%	62
Beta tubulin; putative	107	506563.40	5.58/4.43	45.0/49.7	-1.36	-4.9	-5.17	3.00E-06	3	7%	156
	129		5.15/4.43	33.9/49.7	-1.01	-4.35	-3.99	4.40E-06	5	13%	242
	130		5.03/4.43	34.0/49.7	-1.31	-10.73	-9.26	1.30E-06	6	17%	438
	171		4.71/4.43	28.6/49.7	1.8	1.69	2.07	4.30E-07	7	22%	73
	173		4.65/4.43	25.5/49.7	2.53	6.33	5.29	2.40E-07	4	11%	237
	176		4.47/4.43	25.0/49.7	1.7	3.58	3.52	7.30E-06	3	9%	216
	184		4.25/4.43	21.2/49.7	1.56	5.97	5.14	1.00E-06	2	6%	116
	185		4.25/4.43	21.2/49.7	1.67	4.39	4.22	9.60E-05	2	6%	133
Calreticulin, putative	81	510685.10	6.37/4.49	42.2/46.2	-1.07	1	1.52	4.50E-04	2	6%	89
Chaperonin containing t-complex protein, putative	12	511725.250	5.02/4.80	69.7/59.2	-1.95	-12.81	-16.4	1.10E-05	3	9%	113
Chaperonin HSP60; mitochondrial precursor; groEL protein; heat shock protein 60 (HSP60)	18	507641.290	5.55/5.14	66.0/59.2	-4.07	-9.24	-10.18	5.10E-07	6	18%	310
	17		5.44/5.14	66.2/59.2	-4.9	-19.19	-19.86	3.70E-07	9	24%	470
	89		4.83/5.14	51.8/59.2	-1.28	-7.85	-7.58	9.00E-06	3	8%	147
	106		5.5/5.14	43.1/59.2	1.23	-5.57	-4.86	6.00E-06	7	15%	177
	20		5.65/5.14	65.8/59.2	-3.99	-8.83	-9.9	3.60E-06	7	18%	354
	23		5.22/5.14	62.3/59.2	-2.03	-8.02	-9.51	1.90E-06	7	18%	191

	24		5.13/5.14	62.2/59.2	-1.72	-11.52	-13.96	2.80E-06	11	32%	81
	25		5.21/5.14	61.5/59.2	-2.16	-9.12	-9.25	4.60E-06	6	16%	205
	28		5.29/5.14	62.0/59.2	-1.78	-16.99	-15.1	9.40E-07	5	14%	195
	88		4.68/5.14	51.2/59.2	-1.06	-3.44	-2.79	2.70E-05	3	8%	109
	131		5.02/5.14	32.2/59.2	-1.76	-9.8	-7.3	1.00E-06	1	2%	75
	162		5.66/5.14	20.3/59.2	1.97	1.81	1.97	1.10E-05	2	5%	62
Chaperonin; Tcomplex-protein 1; theta subunit; putative	16	506247.50	5.42/5.12	68.9/58.3	-2.42	-4.81	-5.44	1.80E-06	3	7%	138
Cystathionine beta- synthase,cysteine synthase,serine sulfhydrylase (CBS)	78	508177.120 or	6.83/7.14	45.0/47.0	-1.1	-2.96	-2.21	4.70E-06	4	13%	153
	80	506905.50 or 508175.360	6.37/7.14	45.3/47.0	-1.98	-10.23	-12.17	5.10E-07	2	7%	88
Cytochrome c oxidase subunit IV; putative	124	506529.360 or 510889.50	5.51/5.96	36.0/38.9	-1.01	-1.92	-1.58	1.60E-05	2	7	105
Cytochrome c oxidase subunit V, putative	200	510565.30 or 508503.20	5.5/6.4	14.8/22.2	1.99	6.2	5.12	4.40E-06	2	14%	69
D-isomer specific2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	119	510099.120	6.72/6.41	35.2/38.5	-1.46	-6.4	-5.31	1.80E-05	2	7%	45
	197		5.26/6.41	11.2/38.5	1.13	-4.38	-3.75	2.80E-07	3	11%	171
dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	0	509717.20 and	5.75/6.39	62.2/49.6	-1.32	-7.65	-5.03	5.10E-07	1	3%	61
	33	510105.170	5.91/6.68	62.1/49.6	-1.49	-7.45	-6.79	1.30E-07	4	14%	167
dihydrolipoyl dehydrogenase; putative (GCVL-2)	73	507089.270 or 511025.110	5.42/7.4	68.9/54.9	-2.42	-4.81	-5.44	6.80E-06	3	7%	98
dipeptidyl-peptidase	29	508601.141 or	5.40/5.60	62.4/74.4	-2.19	-5.73	-4.96	1.50E-06	2	3%	58
	30	509205.120	5.48/5.63	62.3/74.4	-1.9	-7.12	-8.88	5.10E-07	3	6%	139

Heat-shock protein 70kDa, putative	1	509543.50 and 511257.10	5.14/4.55	76.1/70	-2.15	-9.69	-10.51	9.60E-07	2	11%	70
	90		4.90/4.55	51.8/70	-1.16	-4.64	-5.4	8.20E-06	2	11%	79
	91		4.98/4.60	52.6/70	-1.12	-4.52	-3.7	6.90E-06			
	155		506135.9	5.63	23.4/70	1.7	2.79	2.2	1.30E-03	2	10%
Drug resistance protein	123	444777.10	5.54/4.05	37.2/50.3	-1.18	1.68	2.34	1.50E-04	1	5%	26
Elongation factor 2, putative	36	510963.90	6.36/5.86	55.8/94.2	-1.82	-6.16	-5.58	1.70E-06	2	7%	142
	50		5.99/5.86	54.6/94.2	-1.93	-11.21	-11.53	9.80E-08	4	6%	146
	65		5.78/5.86	50.2/94.2	-1.4	-12.96	-9.24	9.70E-06	6	8%	325
	125		5.34/5.86	36.0/94.2	-1.2	-7.53	-7.72	3.30E-08	5	9%	293
	112		5.96/5.86	38.0/94.2	1.11	-2.38	-1.3	9.60E-03	4	6%	151
	137		5.38/5.86	30.7/94.2	1.83	1.32	1.98	6.90E-06	2	2%	92
Enolase	72	504105.140	6.69/7.46	52.5/50.6	-2.63	-5.28	-6.37	2.00E-06	3	7%	73
Eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6); putative	168	506679.70	5.04/6.09	20.7/33.2	1.55	1.31	1.27	8.90E-04	2	9%	127
Glucose-regulated protein 78, putative	2	506585.40	5.19/4.82	76.9/71.3	-2.45	-23.64	-16.54	3.00E-06	4	10%	253
	13		4.98/4.82	67.1/71.3	1.21	-2.77	-2.68	5.10E-05	2	4%	88
	95		4.72/4.82	45.7/71.3	-1.08	-4.09	-3.33	2.10E-05	2	3%	74
	96		4.58/4.82	45.4/71.3	1.52	1.68	1.52	9.60E-04	1	3%	93
Glutamamyl caboxypeptidase; putative	70	507689.40 or	6.18/6.51	47.6/43.4	-1.22	-2.15	-2.41	4.40E-05	2	6%	92
	76	507657.20 or	6.53/6.51	47.0/43.4	-1.28	-2.09	-2.19	1.40E-05	2	6%	99
	77	507657.10	6.59/6.51	45.5/43.4	-1.23	-2.99	-2.31	4.00E-06	3	9%	129
Glutamate dehydrogenase	212	508111.30	6.72/8.05	15.9/45.0	1.62	1.64	2	1.70E-04	2	7%	77
	213		6.79/8.05	16.0/45/0	1.88	2.39	2.64	1.40E-06	2	7%	110

	214		6.78/8.05	15.1/45.0	1.86	3.66	4.03	1.80E-07	4	13%	173
Glycerate kinase; putative	159	508741.170	6.49/8.21	20.7/56.1	1.37	-1.87	-2.19	3.90E-05	1	3%	37
	209		6.18/8.21	11.8/56.1	1.63	2.6	2.6	1.00E-03	1	2%	43
	8		5.65/5.71	72.4/71.0	-1.39	-4.87	-3.73	2.70E-07	2	4%	81
	9		5.77/5.71	72.7/71.0	-1.42	-5.3	-4	2.80E-07	6	14%	293
Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	10	507029.30	5.9/5.71	73.1/71.0	-1.32	-3.83	-3.08	2.30E-06	3	7%	85
	11		5.87/5.71	69.7/71.0	-1.05	-1.87	-1.94	3.80E-04	4	10%	152
	19		5.6/5.71	67.4/71.0	1.18	-1.4	-1.53	3.20E-05	5	12%	285
	21		5.73/5.71	67.7/71.0	1.26	-1.42	-1.58	4.90E-06	4	10%	109
Heat shock 70 kDa protein, putative	155	506135.9	5.63/6.56	23.4/30.1	1.7	2.79	2.2	1.30E-03	2	10%	88
	7		5.55/5.85	72.7/70.9	-1.34	-4.53	-3.34	3.30E-06	4	15%	191
	156		5.86/5.85	23.1/70.9	1.87	2.21	1.66	6.90E-06	4	19%	181
	164		5.32/5.85	22.1/70.9	1.65	1.87	1.5	2.30E-05	4	14%	214
Heat shock protein 70 (hsp70), putative	92		5.00/5.85	47.8/70.9	-1.11	-5.67	-5.23	2.50E-06	2	4%	65
	101	511211.160	5.13/5.85	44.1/70.9	1.3	-3.49	-3.28	1.10E-07	2	4%	67
	105		5.50/5.85	44.9/70.9	-1.49	-4.58	-3.7	5.00E-06	2	4%	78
	160		6.72/5.85	23.0/70.9	1.08	-2.66	-2.99	8.60E-07	5	11%	332
	175		4.56/5.85	24.1/70.9	1.23	1.34	1.38	1.90E-03	1	2%	66
177	4.65/5.85		20.8/70.9	2.01	5.22	4.11	1.60E-06	1	2%	72	
Heat shock protein 85; putative	93	509643.130 or	4.89/4.79	47.6/80.7	-1.44	-5.4	-4.32	2.10E-05	2	3%	87
	98	507713.30 or	4.95/4.79	43.0/80.7	1.02	-3.01	-3.37	4.30E-07	2	3%	145
	104	509105.140	5.30/4.79	41.5/80.7	-1.63	-16.15	-18.55	6.60E-07	3	5%	143

	126		5.40/4.79	33.5/80.7	1.2	-3.77	-3.74	1.30E-06	2	3%	89
	134		5.29/4.79	29.9/80.7	1.39	2.58	2.18	1.90E-04	4	6%	258
	148		4.95/4.79	28.8/80.7	1.76	2.78	2.47	1.00E-06	1	1%	100
	149		4.86/4.79	28.9/80.7	1.67	3.55	3.23	2.00E-06	1	1%	62
	202		5.72/4.99	15.1/28.6	2.75	7.08	7.83	3.30E-08	4	22%	174
Hypothetical protein, conserved	203	505989.110	5.67/4.99	14.3/28.6	1.87	3.96	3.33	9.70E-05	9	41%	92
	204		5.86/4.99	14.2/28.6	1.48	2.12	2.78	5.40E-06	6	31%	326
Hypothetical protein	154	508817.20 or 503801.70	5.38/8.58	23.5/66.7	1.78	4.80	4.29	1.20E-06	1	1%	17
Hypothetical protein, conserved	182	506605.120 or 511239.110	4.46/4.50	18.4/22.2	-1.25	3.47	3.51	4.70E-04	2	11	62
Nucleoside phosphorylase, putative	121	508989.9 and	6.90/6.42	34.2/37.0	-1.18	-5.59	-4.38	8.60E-07	2	10%	146
	118	509569.100	6.38/6.42	35.6/37.0	-1.12	-3.17	-2.56	3.40E-07	1	4%	23
Oligopeptidase B, putative	47	503995.50	5.86/6.1	55.2/80.8	-1.71	-5.94	-7.55	2.80E-07	2	3%	68
	63		5.86/6.1	52.0/80.9	-1.12	-2.26	-2.47	2.20E-05	2	3%	69
Paraflagellar rod protein 3	60	509617.20	6.09/5.96	56.1/68.6	1.21	-3.51	-4.33	2.00E-06	1	2%	24
Peptidase M20/M25 /M40	39	510257.80	5.57/5.19	55.4/51.2	-1.74	-5.55	-7.07	2.30E-05	2	6%	66
	40		5.5/5.19	54.4/51.2	-1.64	-5.35	-9.41	6.60E-07	1	3%	31
Peroxioredoxin; tryparedoxin peroxidase	189	509499.14	5.16/7.92	18.1/25.5	1.11	1.42	1.73	2.10E-05	3	15%	174
Phosphoglycerate kinase, putative or 3-phosphoglycerate kinase, glycosomal (PGKA)	74	511419.40 or 505999.90 or 511419.50 or	6.53/6.51	47.0/43.5	-2.99	-5.56	-5.35	7.00E-06	1	3%	78

505999.100

	144		5.38/6.43	28.9/42.2	1.49	-1.65	-1.39	1.60E-06	4	13%	217
	145		6.49/6.43	27.2/42.2	-1.12	-2.32	-1.67	1.90E-06	4	13	217
Prostaglandin F2 alpha synthase (TcPGFS)	161	508461.80	5.52/6.43	22.1/42.2	1.74	1.88	1.99	6.34E-8	9	36%	110
	111		5.91/6.43	40.0/42.2	-1.31	-11.76	-7.75	5.00E-07	5	17%	284
	113		6.10/6.43	40.0/42.2	-1.11	-10.19	-6.05	5.10E-07	8	38%	116
	14		5.11/6.43	68.1/42.2	-1.19	-6.45	-7.01	4.30E-05	4	14%	169
Protein disulfide isomerase	180	506247.10 or 507611.370	4.42/4.6	20.9/53.5	1.46	3.7	3.6	6.90E-06	2	9%	44
Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit; putative	132	510091.80	5.03/5.02	30.9/37.8	1.08	-2.21	-1.88	3.50E-05	5	20%	191
	133		4.62/5.02	40.7/37.8	1.02	-4.58	-3.83	1.10E-05	5	20%	191
Pyruvate kinase 2; putative	68	507993.390 or 511281.60	5.97/7.44	46.6/54.6	-1.3	-4.94	-4.8	5.00E-06	1	2%	29
Pyruvate phosphate dikinase	194	510101.140	5.00/8.27	13.5/100.8	1.83	10.51	7.42	2.20E-07	2	3%	94
Receptor for activated C kinase 1, putative	122	511211.120 or 511211.130	5.93/6.04	35.4/35.0	-1.22	-6.66	-6.06	9.60E-03	2	7%	74
S-adenosylhomocysteine hydrolase	193	511229.50 or 511589.200	5.25/6.64	12.9/48.4	1.41	-1.23	-1.1	9.90E-05	2	7%	80
Seryl-tRNA synthetase	140		5.45/4.7	28.8/49.8	1.4	-1.07	1.28	8.90E-05			
Thiol-dependent reductase 1; putative; thiol transferase; putative; glutathione s- transferase; putative	158	509105.70	6.21/5.83	21.5/50.7	-1.32	-2.17	-2.64	1.20E-04	1	3%	32
	62		6.00/5.83	51.9/50.7	-1.18	-2.07	-1.56	1.20E-04	2	6%	86

Trans-sialidase	186	509927.10	4.18/6.67	21.0/54.7	1.67	4.7	4.71	1.70E-07	1	9	114
Tryparedoxin peroxidase	211	487507.10 or	6.66/6.75	17.0/22.4	-1.52	-3.96	-1.82	9.40E-07	3	22%	105
	215	509445.10 or	6.75/6.75	11.8/22.4	1.44	-1.3	1.25	4.90E-05	3	19%	109
	210	505983.9 or 507259.10	6.24/6.75	11.5/22/4	2.17	3.18	3.42	1.80E-03	1	5	33
Tyrosine aminotransferase	64	510187.20 and	5.83/7.2	50.6/46.1	-1.22	-1.77	-1.51	1.10E-03	1	2	58
	79	510187.50 or	6.25/6.14	44.9/46.1	-2.36	-31.03	-28.73	3.30E-08	3	22%	106
	115	510187.40 or	6.21/6.14	38.9/46.1	-1.05	-7.27	-7.38	2.70E-07	3	11%	110
	116	510187.30	6.18/6.14	37.0/46.1	1.09	-5.43	-4.73	2.40E-07	2	14%	128
Vacuolar ATP synthase subunit B	37	506025.50 or 511209.10	5.71/5.29	59.1/55.5	-1.69	-3.54	-4.01	6.90E-06	6	21%	207

SUPPORTING INFORMATION

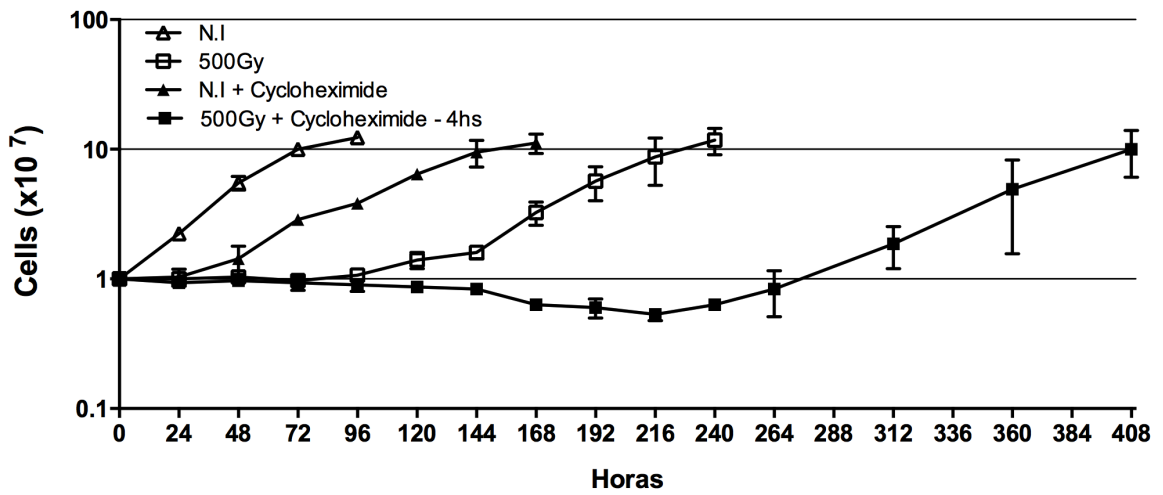
Figure S1. Electrophoretic analysis of total protein extracts of irradiated and NI epimastigote cells. Total protein extracts were obtained for each time point NI, 4, 24, and 96 hours after irradiation. Samples were subjected to 12% SDS-PAGE and stained with coomassie blue.

Figure S2. Differentially expressed isoforms of prostaglandin F2 alpha synthase. The upregulated protein spot (161) shows a lower molecular weight when compared with the downregulated proteins spots (14, 111, 113, 114, and 144).

Figure S3. Time point expression of protein spots. Each graph is representative of one protein, including all related spots. The x-axis is subdivided to show each time point (4, 24, and 96 hours after irradiation) and the y-axis displays the fold-change of each protein species in a given time point. Different spots for the same protein are represented in different colors.

Effect of irradiation on *T. cruzi* Growth

A



B

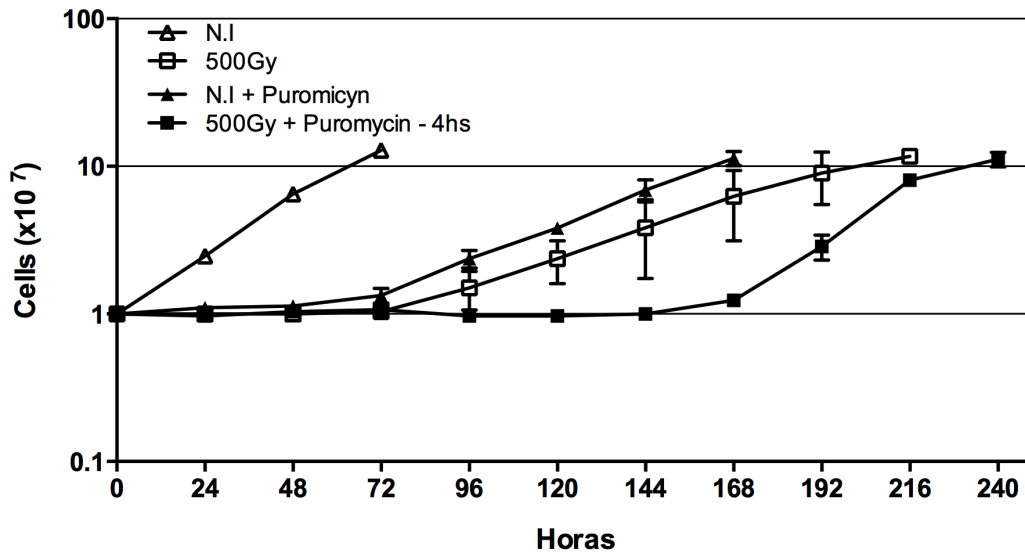


Figure 2. 2D-DIGE gels

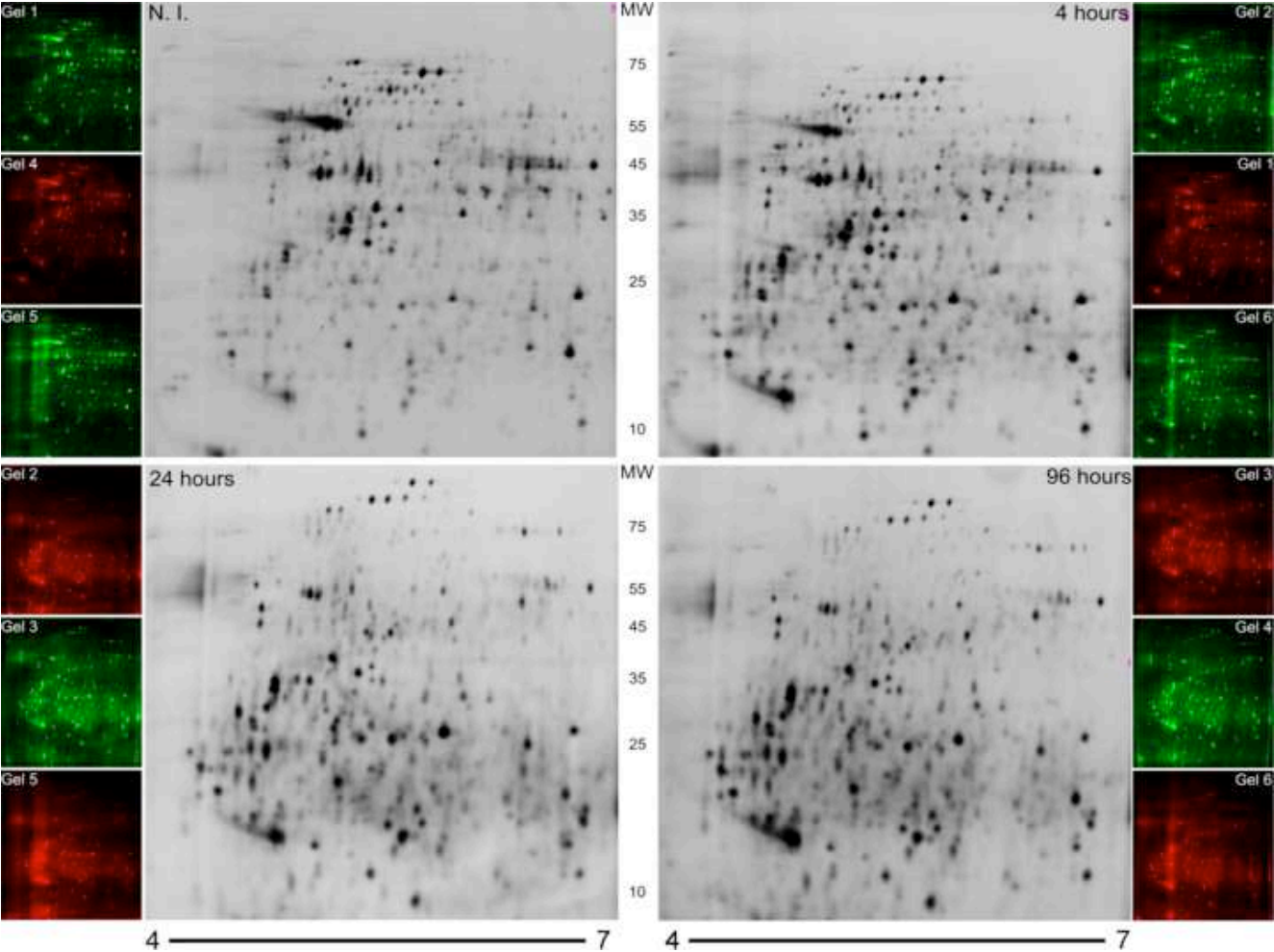


Figure 3. Protein spots differentially expressed

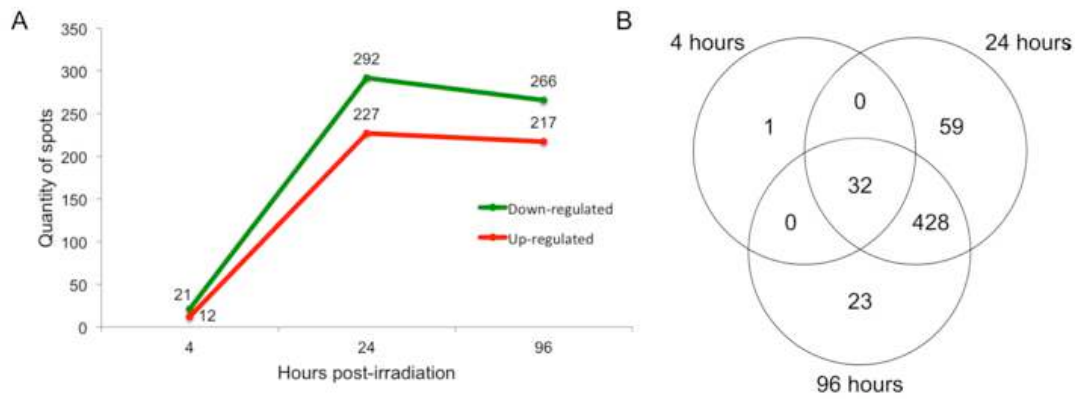


Figure 4. Up and down-regulated protein spots versus MW and pI

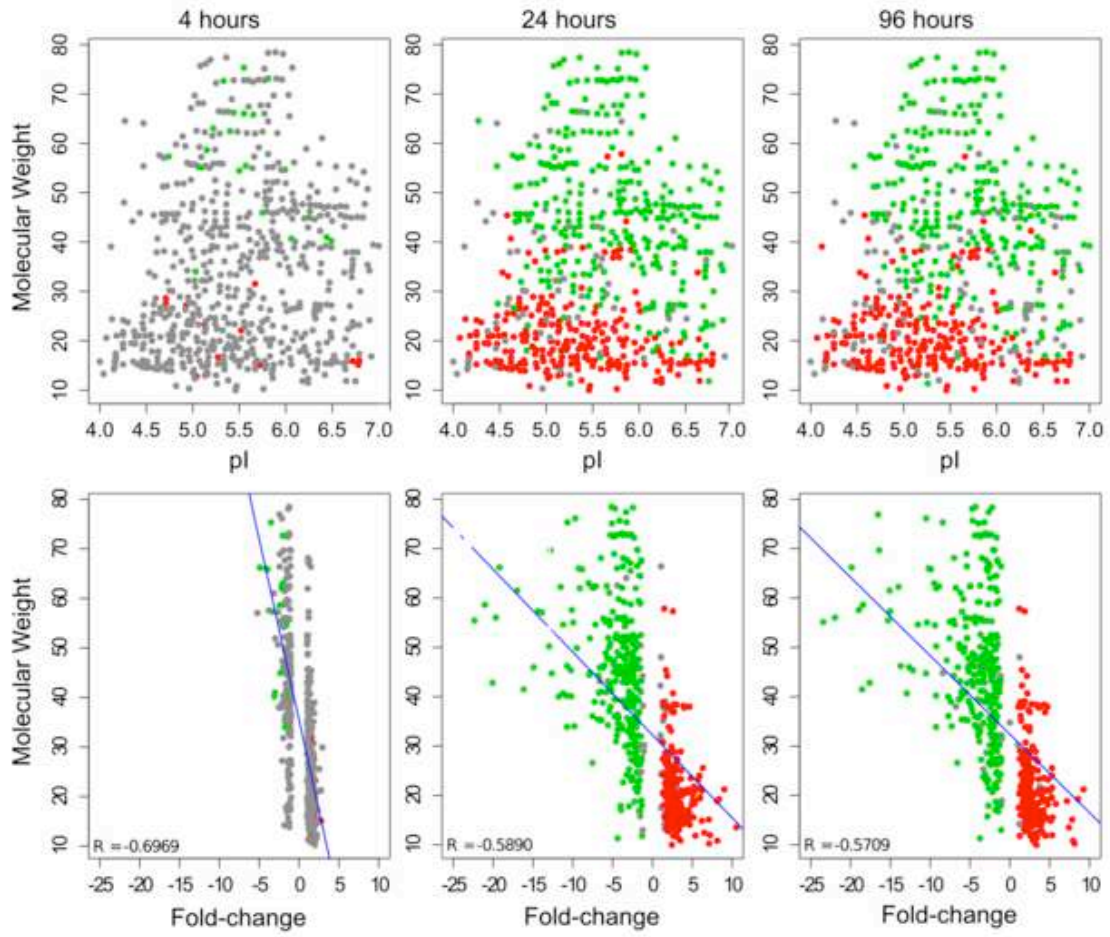


Figure 5. Boxplots of peptide molecular weights

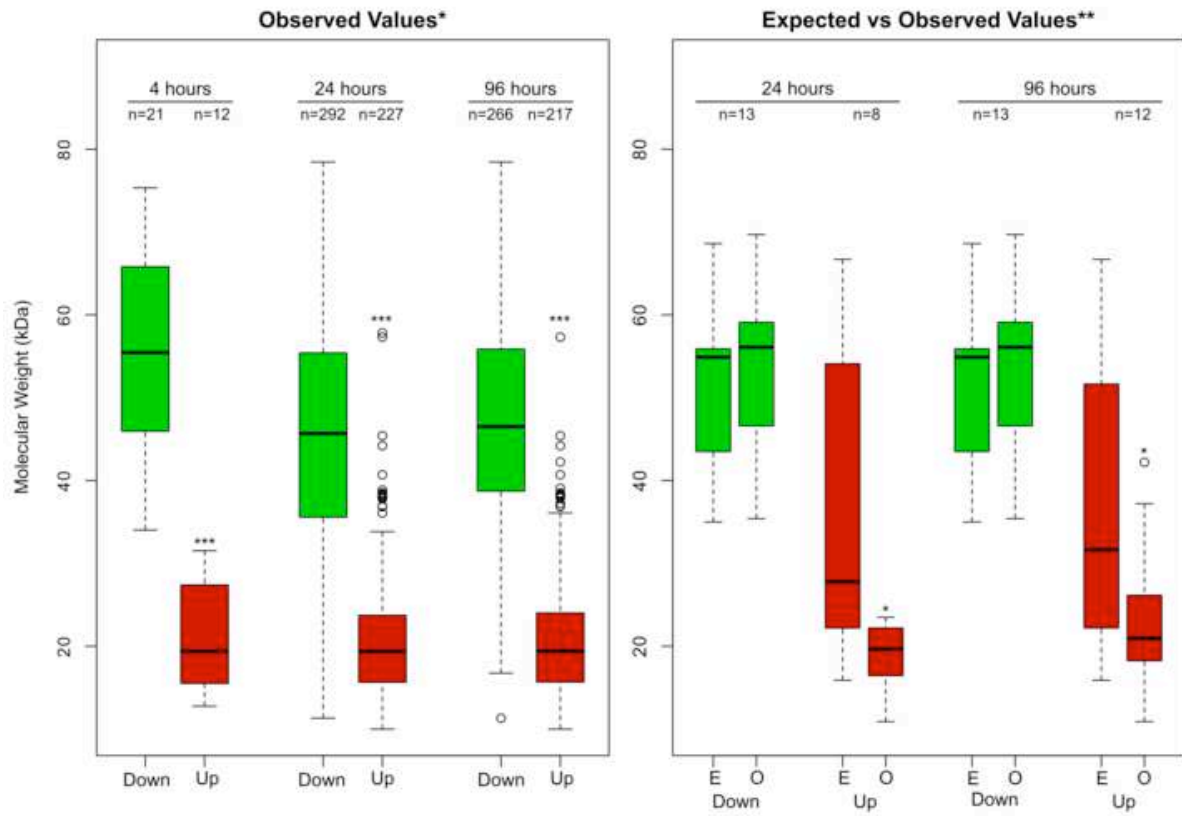


Fig S1. 1D-gel electrophoresis

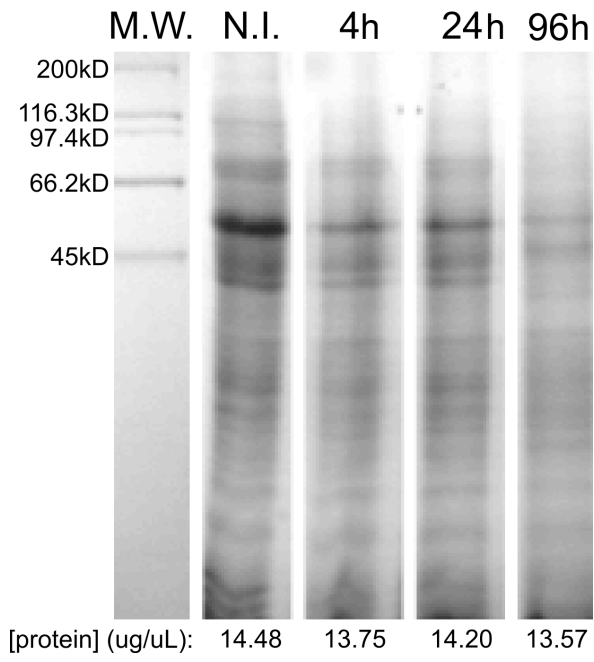


Fig S2. Isoforms of prostaglandin F2 alpha synthase

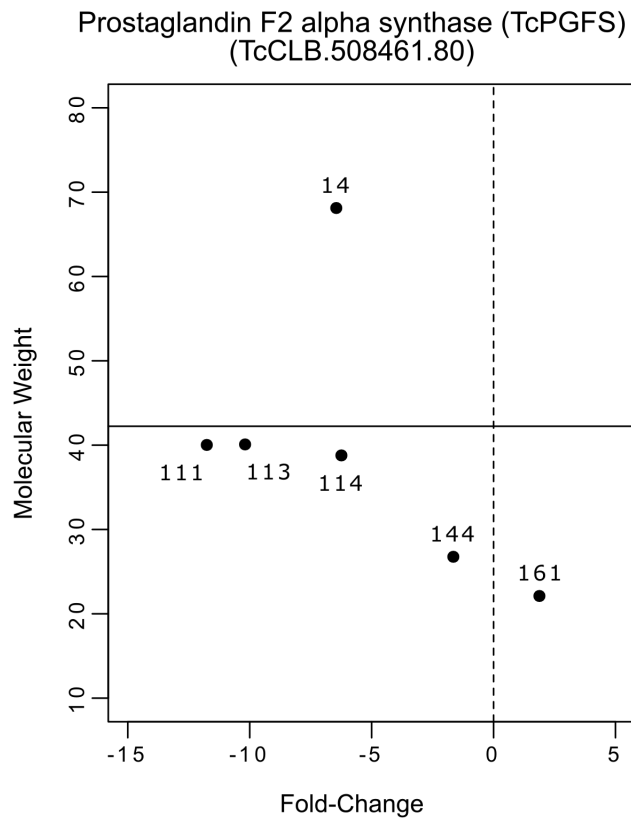
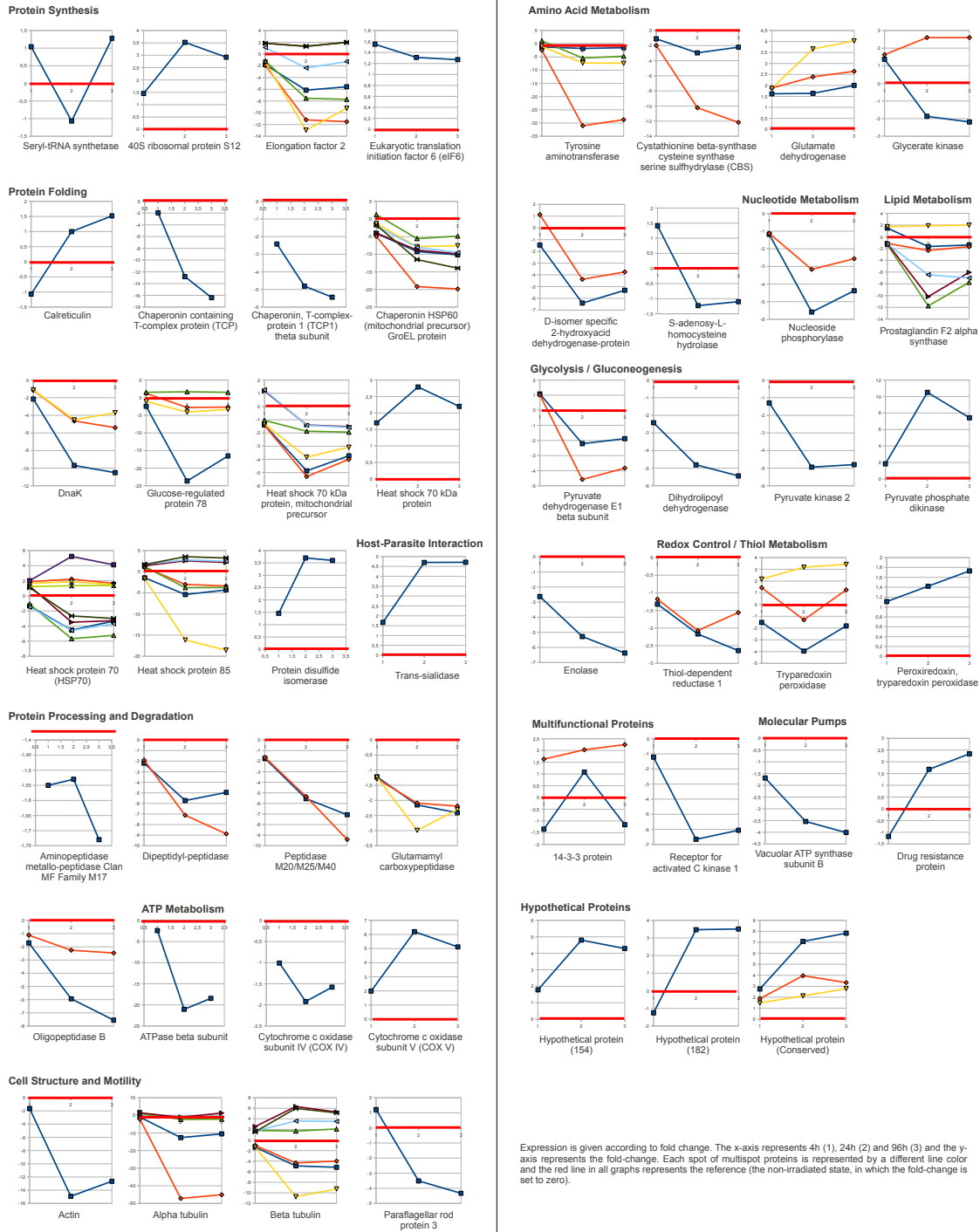


Fig S3. Time point protein expression

TIME-POINT EXPRESSION OF PROTEIN SPOTS



Expression is given according to fold change. The x-axis represents 4h (1), 24h (2) and 96h (3) and the y-axis represents the fold-change. Each spot of multipot proteins is represented by a different line color and the red line in all graphs represents the reference (the non-irradiated state, in which the fold-change is set to zero).