



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

**ANÁLISE DA RESPOSTA DE TRIPANOSOMATÍDEOS
AO CHOQUE TÉRMICO**

ILDINETE SILVA PEREIRA

**Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília
como requisito parcial à obtenção do
Grau de Mestre em Biologia Molecular.**

BRASÍLIA
1986

Trabalho realizado nos Laboratórios de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com o apoio financeiro das entidades: CNPq, CNPq (PADCT) e CAPES.

Orientador. Prof. Waldenor B. Cruz

Co-Orientador: Prof. Spártaco Astolfi
Filho

A "seu" Moreno, meu pai, com a maior saudade.
A minha mãe e irmãos, com um grande carinho.

Agradecimentos especiais ao Prof. **Spártaco Astolfi Filho**, pela orientação desde os primeiros anos da minha formação acadêmica, pela amizade e inestimável ajuda na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Waldenor por seu importante papel de educador na nossa formação científica, pela orientação e sugestões durante a realização desse trabalho, pela convivência nesses anos e pela amizade.

Ao Professor César pela sugestão deste trabalho, pelo estímulo e pela amizade.

Aos Professores do Instituto de Biofísica da UFRJ: José Francisco pelo estímulo e sugestões e Moacir Rebelo pelo fornecimento da Metionina.

Aos Professores Maia, Maria Helena, Maria Cristina e a Aline do Instituto de Química da USP pela ajuda na realização dos géis bidimensionais.

Aos Professores do Laboratório de Microbiologia da UnB: Isaac Roitman e Hélio Peixoto por gentilmente nos ter fornecido os tripanosomatídeos utilizados neste trabalho

Aos Professores Maristela O. Azevedo, Maria Sueli Soares, Eugen Gander, Carlos Roberto Félix, Celina O. Martim, Kumi-ko Mizuta e Yeda X. Santana.

Aos colegas e amigos Santuza, Leila, Jacyara, Elaine, Marlene, Sérgio, Paulo Eugênio, Toninho, Fred, Ludovico, Sônia Maria, Wolney, Cirano, Maria Cláudia, Bia, Rodolfo, Sonilda, Pedro, Marcos, Fernando, Lucília, Marta, Suzi, Elita, Luiz Artur, Inês, Marcelo e demais colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular, Enzimologia, Biofísica e Bioquímica.

Ao Celso e à Fátima.

Ao Côrtes, Aúrea, Paulo, Antonio, Marízia e Margarete.

Ao Landoaldo, Jô, Fernando, Fausto, Elmar e Ivan.

Ao Geraldo pelos desenhos.

Ao Joaquim pela confecção de alguns materiais.

Ao Gisaldo pelos trabalhos datilográficos.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular, da Universidade de Brasília.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho.

I N D I C E

PÁGINAS

INTRODUÇÃO

I.	Histórico	01
II.	Características Gerais da Resposta ao Choque Térmico	02
III.	Genes e Proteínas de Choque Térmico Aspectos Gerais	06
IV.	Regulação da Resposta ao Choque Térmico	13
V.	Resposta ao Choque Térmico em Trypanosomatídeos	16
VI.	Objetivo do Presente Trabalho	17

MATERIAIS E METODOS

1.	Reagentes	19
2.	Células	19
3.	Manutenção das Células	20
4.	Soluções e Tampões	20
5.	Curva de Crescimento	24
6.	Obtenção das Células	25
7.	Cinética de Incorporação de ³ H-Leucina em Várias Temperaturas	25

8.	Análise dos Polipeptídeos Sintetizados "in vivo", em Condições de Choque Térmico	26
9.	Análise da Velocidade de Indução da Resposta ao Choque Térmico	26
10.	Análise da Velocidade da Volta ao Estado Normal de Síntese Proteica	27
11.	Análise dos Polipeptídeos Através de Eletroforese	27
12.	Preparo do Marcador de Peso Molecular para a 2a. Dimensão	33
13.	Fluorografia	34
14.	Condições de Estocagem das Soluções e Tampões ..	34
RESULTADOS		36
DISCUSSÃO		58
RESUMO		64
SUMMARY		65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		66

ABREVIATURAS

PSG	- SALINA FOSFATO GLICOSADA
AAMIX	- MISTURA DE AMINOACIDOS
DDT	- DITIOTREITOL
PPO	- (2,5 - DIFENILOXAZOLE)
POPOP	- (1,4 - BIS 2(4-METHYL - 5-PHENYLOXAZOLIL) BENZENE)
TAEU	- TAMPÃO DE AMOSTRA PARA ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL
SDS	- DODECIL SULFATO DE SÓDIO
TAEB	- TAMPÃO DE AMOSTRA PARA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL
NP-40	- NONIDET P-40
PAGE	- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRIALAMIDA
TEMED	- N, N, N, N - TETRAMETIL ETILENO DIAMINO
PA	- PERSULFATO DE AMÔNIO
DMSO	- DIMETILSULFÓXIDO
TRIS	- TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO
µC	- MICROCURIE
P/V	- PESO POR VOLUME
V/V	- VOLUME POR VOLUME
cpm	- CONTAGEM POR MINUTO
TCA	- ACIDO TRICLOROACÉTICO
PCT	- PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO
pPCT	- PEQUENA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO
RCT	- RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO
Kd	- QUILODALTON

INTRODUÇÃO

I. HISTÓRICO

A resposta ao choque térmico é universal tendo sido descrita para todos os organismos estudados até agora (Ashburner e Bonner, 1979; Schlesinger et.al.,1982; Bardwell e Craig, 1984).

Ritossa em 1962 descobriu que uma variedade de estresses ambientais, tais como choque térmico, anóxia e drogas tóxicas, induzem um novo padrão de "puff" nos cromossomos politênicos das glândulas salivares de Drosophila buskei, sendo o mesmo observado em D. melanogaster.

Em 1974, Tissieris et. al. observaram que em resposta aos mesmos estresses, descritos por Ritossa (1962), Drosophila melanogaster sintetizava um pequeno número de novas proteínas com simultânea repressão na síntese de algumas outras. Observaram também que a inducibilidade térmica era "locus" específica e que os mesmos loci poderiam estar susceptíveis em todos os estágios do desenvolvimento da mosca.

Resultados semelhantes aos de Tissieris et. al. (1974) foram obtidos por Lewis et.al. (1975) que demonstraram haver uma surpreendente correspondência entre o número de "puffs" induzidos pelo choque térmico e o número de proteínas sintetizadas, haven-

do também uma similaridade entre o tamanho dos "puffs" induzidos e a velocidade e duração de síntese das respectivas proteínas. Foi sugerido também, que a resposta ao choque térmico era homeostática, sendo a rapidez da resposta tanto a nível dos puffs quanto das proteínas, uma forte evidência para tal.

Embora o estudo da resposta ao choque térmico mostrasse ser um sistema adequado ao esclarecimento de questões relacionadas com os mecanismos de controle da expressão genética, sua utilização inicialmente ficou relacionada apenas aos aspectos envolvidos com a melhor caracterização da organização estrutural e funcional dos puffs nos cromossomos politênicos (Tissieris et. al., 1974; Lewis et.al., 1975).

No entanto, a partir de 1978, com a demonstração de que uma ampla diversidade de organismos (desde bactéria até o homem), respondiam a semelhantes situações de estresse, pela indução de genes específicos, cujos produtos eram similares às proteínas de choque térmico descritas em Drosophila, a resposta ao choque térmico despontou como um modelo para o estudo da regulação da expressão genética da célula eucariota (Schlesinger et. al., 1982).

II. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

A indução da resposta ao choque térmico é extremamente rápida e envolve mudanças no padrão de expressão genética da cé-

lula (Ashburner e Bonner, 1979). Sugere-se portanto, a preexistência de fatores mediadores desta indução (Tanguay, 1983; Topol et.al., 1985). Como consequência do estabelecimento desta resposta, observa-se a indução ou o aumento da síntese de proteínas denominadas proteínas de choque térmico e a simultânea repressão ou diminuição da síntese das proteínas celulares normais (Ashburner e Bonner, 1979; Schlesinger et.al., 1982).

Associado a estas mudanças, observa-se o desaparecimento dos polisomas pré-existentes, que são substituídos por uma nova população de polisomas contendo os mensageiros sintetizados devido à elevação da temperatura (Mckenzie et.al., 1975). A tradução "in vitro" dos mensageiros obtidos destes polisomas, revela um padrão de síntese proteica similar ao observado "in vivo" (Mckenzie e Meselson, 1977).

Do mesmo modo, observa-se que para a maioria dos organismos estudados, a síntese das proteínas de choque térmico é devido à transcrição, "de novo", dos genes de choque térmico (Lindquist, 1980 a; Lindquist, 1980 b; Fink e Zeuthen, 1980; Lomomis e Wheeler, 1980; Yammori e Yura, 1980; Finkelstein et.al., 1982; Kimpel e Key, 1985; Wu et.al., 1986).

Ashburner e Bonner (1979), descrevem que durante um choque térmico à temperatura adequada, os RNAs das proteínas celulares normais são relativamente estáveis podendo ficar estocado no citoplasma. Podem também ser traduzidos num sistema acelular

de síntese proteica bem como dirigir a síntese das proteínas normais após o final da condição de estresse.

Outro efeito interessante induzido pelo choque térmico é o rearranjo sofrido por algumas proteínas intracelulares (Biessmann et.al., 1982). Os mesmos autores observam que o citoesqueleto de vimentina desintegra logo após o choque térmico, e a seguir, reintegra-se em torno do núcleo da célula. Dentro desta linha, é discutido a provável relação entre a desagregação dos polisomas e a tradução preferencial das mensagens de choque térmico com a desintegração do citoesqueleto, uma vez que para a tradução das mensagens normais, poderia haver o requerimento de polisoma ligado ao citoesqueleto.

A indução da resposta a um choque térmico não letal é reversível, significando que com o retorno às condições normais, ocorre uma gradual reativação da síntese proteica padrão da célula enquanto que a síntese das proteínas de choque térmico é reprimida. Observa-se também, uma relação entre severidade do choque térmico e o grau de indução da resposta, bem como o tempo requerido para a recuperação da célula, sendo que quanto mais severo o estresse, mais intensa é a indução da resposta e maior é o tempo requerido para a recuperação (Lewis et.al., 1975; Lindquist et.al., 1982; DiDomenico et.al., 1982 a; DiDomenico et.al., 1982 b).

Embora o significado funcional das proteínas de choque térmico não esteja claro, várias evidências confirmam os resultados iniciais, descritos por Lewis et.al. (1975), sugerindo que estejam envolvidas na proteção das células contra os danos do estresse ambiental, assegurando-lhes voltar às condições normais após o estresse (Loomis e Wheeler, 1982 a; Subject e Sciandra, 1982; Lindquist et.al., 1982; Bensaude e Morange, 1984; Kimpel e Key, 1985).

A aquisição de termotolerância, que é a capacidade que a célula adquire de, transitoriamente, resistir a uma temperatura letal após ter sido previamente submetida a um choque térmico numa temperatura não letal, é a mais forte evidência para a função de proteção da resposta ao choque térmico (Schlesinger et. al., 1982).

Dentro deste contexto, tem sido demonstrado para vários organismos, uma correlação entre indução da síntese das proteínas de choque térmico e aquisição de termotolerância (Gerner e Schneider, 1975; Loomis e Wheeler, 1980; Subjeck e Sciandra, 1982; Loomis e Wheeler, 1982 a; Li e Werb, 1982; Landry et.al., 1982; Burdon, 1982; Key et.al., 1982; Li et.al., 1982; Li, 1983; Neidhardt et.al., 1984; Laszlo e Li; 1985; Kimpel e Key, 1985).

Vários agentes, tais como etanol, arsênico, cádmio e hipóxia, conhecidos como indutores da síntese de proteínas de cho-

que térmico (Ashburner e Bonner, 1979, Schlesinger et.al., 1982 a), também induzem termotolerância em células previamente expostas a estes agentes (Li e Werber, 1982; Li et.al., 1982, Li 1983).

Resultados preliminares obtidos por Lindquist et.al. (1982), sugerem que em levedura esporulando, um processo fisiológico natural onde se observa a aquisição de termotolerância, encontram-se RNAs mensageiros que traduzidos num sistema acelular de síntese proteica, dirigem a síntese de proteínas de choque térmico.

Outra forte relação entre indução de proteínas de choque térmico e termotolerância é sugerida pelos achados de Loomis and Wheeler (1982 b), em um mutante de Dictyostelium discoideum deficiente na expressão das pequenas proteínas de choque térmico e na aquisição de termotolerância (Tanguay, 1983).

III. GENES E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO - ASPECTOS GERAIS

A resposta ao choque térmico é universal e seus componentes, genes e proteínas, estão entre os elementos mais conservados na natureza (Schlesinger et.al., 1982; Craig et.al., 1982; Kelley e Schlesinger, 1982; Neidhardt et.al., 1984).

Após o choque térmico, observam-se rápidas mudanças no padrão de síntese proteica da célula: indução da síntese das pro-

teínas de choque térmico (PCT), e repressão da síntese das proteínas normais (Ashburner e Bonner, 1979). Diferentes números de proteínas de choque térmico bem como diferenças em seus pesos moleculares foram descritos para diferentes eucariotos (Ashburner e Bonner, 1979; Neidhardt et.al., 1984).

Em Drosophila melanogaster, o organismo mais extensivamente estudado, tem-se relatado a presença de oito proteínas de choque térmico que, em função de suas principais características e de seus genes, podem ser agrupadas em três classes: a primeira classe é constituída pelo gen da proteína de choque térmico de 83 Kd (PCT 83); a segunda classe pelos genes correlacionados das PCT 70 e PCT 68; a terceira classe pelo conjunto dos genes das pequenas proteínas de choque térmico pPCT 27, pPCT 26, pPCT 23 e pPCT 22 (Craig et.al, 1982).

A PCT 83 é a maior proteína de choque térmico de Drosophila e apresenta reação imunológica cruzada com uma PCT de peso molecular na faixa de 85 - 90 Kd de vários organismos (Ashburner e Bonner, 1979; Schlesinger, et.al., 1982 a).

Esta proteína apresenta localização citoplasmática após o choque térmico e é a proteína mais fortemente induzida a temperaturas intermediárias (Neidhardt et.al., 1984). Lindquist (1980 b), analisando a síntese proteica de D. melanogaster a varias temperaturas, observou que a PCT 83 era fortemente induzida sob uma ampla faixa de temperaturas e que atingia um máximo de

indução a 33°C, embora se observasse sua expressão basal, na temperatura normal de crescimento.

Na recuperação do choque térmico, a PCT 83 é a última a ter sua síntese reprimida, ao contrário do que ocorre com a PCT 70 (Lindquist et.al., 1982).

Outra característica particular da PCT 83, é que seu gene é o único, dos genes de choque térmico, a apresentar íntron (Neidhardt et.al., 1984; Ingolia e Craig, 1982).

Dentre as proteínas de choque térmico descritas, a PCT 70 é a mais abundante, está entre as proteínas mais conservadas que se conhece e apresenta determinantes antigênicos comuns com as PCTs correspondentes de vários eucariotos analisados (Craig et.al., 1982; Kelley e Schlesinger, 1982).

A localização intracelular da PCT 70 parece ser dependente da condição de estresse. Velazquez e Lindquist (1984), demonstraram que em D. melanogaster exposta a choque térmico ou anóxia, a PCT 70 localiza-se no núcleo durante o estresse, migra para o citoplasma na recuperação e rapidamente retorna ao núcleo, após um segundo estresse. Com os estudos de Vincent e Tanquay (1982), observa-se que durante um choque térmico, a PCT 70 de D. melanogaster encontra-se envolvida com estruturas do citoesqueleto tanto no citoplasma quanto no núcleo e que quando o agente de estresse é arsênico, esta proteína é encontrada no ci-

toplasma. Burdon (1982), observa que durante o choque térmico, a PCT 70 de humanos encontra-se distribuída entre as frações nucleares e citoplasmáticas, o mesmo sendo observado para a PCT 70 de galinha (Schlesinger et.al., 1982 a).

A PCT 70 é codificada por uma família multigênica em D. melanogaster e em S. cerevisiae e é representada por um único gene em E. coli, sendo observado uma grande homologia entre esses genes e entre seu produtos, mesmo nestas espécies evolutivamente distantes (Craig et.al., 1982; Bardwell e Craig, 1984).

Além da homologia estrutural observada entre as PCT 70 e seus genes em vários organismos, os estudos de transformação de células de vertebrado com o gene da PCT 70 de D. melanogaster, sugerem que os sinais de controle transcricional do choque térmico também foram conservados durante a evolução (Corces et.al., 1981; Mirault et.al., 1982; Pelham e Bienz, 1982). Em células de levedura, a expressão do mesmo gene é regulada traducionalmente, sugerindo que os sinais de controle traducional podem ser reconhecidos entre espécies tão divergentes quanto D. melanogaster e S. cerevisiae (Collatz et.al., 1985).

Utilizando um sistema de transformação heterólogo, para a análise das sequências que controlam a transcrição do gene da PCT 70 de Drosophila, foi observado a presença de um elemento de sequência, comum para a maioria dos genes de choque térmico de Drosophila e localizado cerca de onze nucleotídeos anterior ao

"TATA BOX". Este elemento de sequência é definido como sequência consenso de Pelham, e contém o palindroma 5' C-T-n-G-A-n-n-T-T-C-n-A-G 3' (Mirault et.al., 1982; Corces et.al., 1982; Pelham e Bienz, 1982).

Dudler e Travers (1984), estudando o mesmo gene em sistema de transformação homólogo, observaram que para a eficiente utilização do seu promotor, além da sequência consenso de Pelham, havia o requerimento de uma outra sequência localizada entre as posições - 68 e - 97 (tomando como referência o ponto de início da transcrição).

Recentemente, os estudos de Topol et.al. (1985), demonstraram que o promotor do gene da PCT 70 de D. melanogaster apresenta 3 domínios, aos quais se ligam um fator de transcrição específico para os genes de choque térmico, o que é necessário para a atividade transcricional máxima deste gene.

O outro grupo de proteínas de choque térmico descrito em D. melanogaster, é o constituído pelas quatro pequenas proteínas de choque térmico (pPCT). Seus genes encontram-se localizados juntamente com 3 genes regulados apenas pelo desenvolvimento, em um segmento de 11 Kb no locus 67 B (Craig et.al., 1982). Estes quatro genes não são transcritos na mesma direção e não contêm íntrons (Craig et.al., 1982; Southgate et.al., 1983).

Segundo Southgate et.al. (1983) e Vitek et.al. (1984),

esta família de genes deve ter surgido durante a evolução provavelmente como consequência de eventos de duplicação gênica e inversões.

As pPCTs de D. melanogaster são relacionadas umas às outras, com cerca de 50% de homologia, e à proteína do α -Cristalino de vertebrados que também é codificada por uma pequena família multigênica (Craig et.al., 1982; Neidhardt et.al., 1984; Vitek et.al., 1984).

Quanto à localização intracelular, Vincent e Tanguay (1982) demonstraram que tais proteínas migram para o núcleo progressivamente com o aumento da temperatura. No núcleo, as pPCT são encontradas como grandes agregados onde parecem estar envolvidas na proteção do DNA contra os danos do estresse. Essa capacidade de formar agregados provavelmente é caracterizada pela presença de um domínio estrutural comum às pPCTs e a proteína do α -Cristalino (Craig et.al., 1982). Na recuperação do choque térmico, as pPCTs redistribuem-se entre núcleo e citoplasma onde aparecem associados com RNA, de origem desconhecida, formando grandes agregados citoplasmáticos com coeficiente de sedimentação na faixa de 20 a 30 S (Southgate et.al., 1983).

Os genes das pPCTs são os únicos genes de choque térmico a serem induzidos pelo hormônio esteróide da muda, ecdisterona, em Drosophila melanogaster (Vitek e Berger, 1984; Lawson et.al., 1985), sendo também induzidos por outras condições de estresse

descritas para os demais genes de choque térmico.

Estudando as sequências de nucleotídeos responsáveis pela inducibilidade térmica dos genes das pPCTs de Drosophila melanogaster em célula COS de macacos, Ayme et.al. (1985) demonstraram que apenas os genes das pPCT 26 e pPCT 22 eram transcripcionalmente induzidos pelo choque térmico e que a sequência consenso de Pelham poderia ser a responsável por esta indução. Sugeriram também, que a não inducibilidade térmica dos genes das pPCT 27 e pPCT 23, neste sistema, poderia ser explicado pela pontencialidade de formação de Z-DNA dentro da região promotora destes genes ou por um mecanismo de indução térmica diferente, onde uma particular conformação da cromatina bem como o requerimento de fatores específicos poderiam estar envolvidos.

Os resultados de Lawson et.al. (1985) mostram que para a indução do gene da pPCT 23 em células de Drosophila melanogaster, são requeridos mais de 147 pares de bases da região promotora, sugerindo uma organização diferente entre os promotores dos genes da pPCT 23 e da PCT 70.

Os genes das pPCTs de D. melanogaster apresentam um complexo padrão de regulação pelo desenvolvimento, conforme descrito por Lawson et.al. (1985) e Cohen e Meselson (1985). Para explicar a regulação múltipla destes genes, Cohen e Meselson (1985) sugerem o envolvimento de várias sequências controle que, independentes umas das outras, poderiam interagir com proteínas

regulatórias distintas e induzir a transcrição destes genes, em resposta à estímulos específicos.

IV. REGULAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

Para a grande maioria dos organismos estudados, o principal nível de regulação da resposta ao choque térmico (RCT) é o transcricional, embora também haja o envolvimento de outros níveis de controle.

→ Durante o estresse, a resposta ao choque térmico de Drosophila, é controlada por um complexo sistema de regulação, onde a expressão dos genes de choque térmico, independentemente um do outro, pode ser modulada por mecanismos que atuam em três diferentes níveis: transcricional, onde apenas alguns genes específicos são ativados enquanto a síntese e processamento da maioria dos outros transcritos normais é reprimida; pós-transcricional, onde se observa um diferente grau de estabilidade das diferentes mensagens e traducional, onde determinadas classes de mensagens são seletivamente e eficientemente traduzidas (Lindquist, 1980; DiDomenico et.al., 1982 b; Ballinger e Pardue, 1983).

DiDomenico et.al. (1982 a; 1982 b), demonstraram que, pelo menos para a PCT 70 de D. melanogaster, através dos mecanismos de controle transcricional e pós-transcricional, ocorre auto-regulação da RCT e que uma quantidade específica de PCT funcional é requerida como um sinal para a regulação de sua pró-

pria síntese bem como para a liberação da síntese proteica normal. Observaram também que o choque térmico e a sua recuperação são processos mediados por diferentes mecanismos a nível da tradução. Foi observado que em Drosophila, o controle traducional da RCT, envolve uma redução de 15 a 30 vezes nas velocidades de iniciação e alongação das proteínas originadas dos mRNAs normais em comparação com aquelas originadas dos mRNAs de choque térmico (Ballinger e Pardue, 1983).

Em células HeLa, embora também se observe uma tradução preferencial das mensagens de choque térmico, esta parece ser devido ao fato destes mRNAs apresentarem características estruturais que lhes conferem uma intrínseca e alta eficiência traducional durante o estresse (Hickey e Weber, 1982).

Os estudos sobre a regulação da expressão da RCT em plantas, têm revelado que esta é muito semelhante à descrita para Drosophila, sendo detectado envolvimento de mecanismos a nível transcricional, traducional e pós-traducional (Baszczynski e Walden, 1983; Kimpel e Key, 1985).

Segundo Lindquist (1981), os mecanismos de controle traducional da RCT de Saccharomyces cerevisiae é diferente do descrito para Drosophila melanogaster, pois de um modo mais simples, a maioria das mensagens normais de S. cerevisiae é rapidamente degradada, havendo tradução das mensagens que permanecem na célula, as mensagens de choque térmico que apresentam uma

maior estabilidade durante o estresse.

Em E. coli, a indução da resposta ao choque térmico ocorre a nível de transcrição, não havendo evidências de outros níveis de controle (Yamamori e Yura, 1980; Neidhardt et.al., 1984).

Em contraste com o quadro geral da regulação da RCT, Bienz e Gurdon (1982) reportam que em ovócito de Xenopus leavis a regulação da resposta dá-se exclusivamente a nível da tradução.

Outra característica muito interessante desta resposta é que alguns genes de choque térmico bem como genes relacionados a estes (genes cognatos) são regulados pelo desenvolvimento em vários organismos em condições normais (Ingolia e Craig, 1982; Bensaude et.al., 1983; Sing e Yu, 1984; Lowe e Moran, 1984; Bienz, 1984; Vitek e Berger, 1984; Cohen e Meselson, 1985).

Os resultados de Bienz (1984) indicam que os genes de choque térmico em ovócito de Xenopus leavis, não são regulados coordenadamente, havendo um controle pelo desenvolvimento que se sobrepõe à indução transitória pelo calor. Também é sugerido o envolvimento de fatores de transcrição gene-específico que apresentam atividade regulada pelo desenvolvimento, além dos fatores de transcrição ativados pelo choque térmico os quais se ligam aos elementos de sequência dos promotores destes genes, ativan-

do-os (Bienz, 1985).

V. RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Como o Trypanosoma cruzi, agente etiológico da doença de Chagas, apresenta um ciclo biológico complexo onde naturalmente está submetido a variações de temperatura, é de grande interesse estudar os mecanismos envolvidos na expressão gênica em condições de choque térmico, visto que estes poderiam codificar termotolerância e estarem relacionados com o processo de diferenciação celular.

Azevedo et.al. (1983) analisando o processo de síntese proteica em células epimastigotas de Trypanosoma cruzi encontraram que a temperaturas supra-ótimas ocorria uma redução na síntese proteica total, enquanto que pelo menos um polipeptídeo de peso molecular estimado em 77 Kd apresentava sua síntese estimulada.

Carvalho et.al. (1984 a) e Carvalho et.al. (1984 b), estudando as alterações no padrão proteico do T. cruzi sob condições que mimetizam o que ocorre naturalmente no seu ciclo de vida, tais como elevação de temperatura e mudança na composição química do meio de cultivo, encontraram que o aumento da temperatura induz a síntese de quatro polipeptídeos de peso molecular de 103, 92, 76 e 61 Kd com a simultânea diminuição na síntese proteica total da célula. Assim como ocorre para outros orga-

nismos, foi observado que esta indução em T. cruzi também é transitória e que o tempo requerido para a recuperação é proporcional à severidade do estresse. Foi descrito, pelo mesmo grupo, que o soro era capaz de induzir, independente da temperatura, tanto nas formas epimastigota quanto nas tripomastigota, proteínas diferentes das observadas em células mantidas em outros meios. Com o objetivo de definir o nível de regulação da resposta à alta temperatura, demonstraram que mesmo sob severa inibição da síntese de RNA, havia expressão em altos níveis das proteínas induzidas pelo calor, sugerindo que a resposta ao choque térmico fosse, como descrito em ovócito de Xenopus leavis, regulada a nível da tradução (Carvalho et.al., submetido a Exp. Cell. Res.).

→ Experimentos realizados recentemente por Van der Ploeg et.al. (1985) sobre diferenciação celular e expressão de genes de choque térmico em Leishmania major e T. brucei, sugerem que os genes de choque térmico poderiam estar envolvidos no processo de diferenciação celular e que a resposta ao choque térmico poderia desempenhar um papel importante na adaptação do parasita no hospedeiro mamífero.

VI. OBJETIVO DO PRESENTE TRABALHO

Visto que a resposta ao choque térmico constitui um modelo muito atrativo para o estudo da expressão genética de células eucarióticas e como a família Tripanosomatidae é composta de

espécies importantes tanto para a saúde como para a agricultura, este trabalho de tese, visando dar subsídios para uma melhor compreensão da biologia molecular desses microrganismos, propõe-se analisar comparativamente o efeito do estresse térmico na síntese proteica de três tripanosomatídeos - Crithidia brasilensis, Herpetomonas samuelpessoai e Trypanosoma cruzi.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. REAGENTES

Os anfolitos utilizados eram da LKB. A leucina (^3H) foi procedente da New England Nuclear (USA) e a metionina (^{35}S) foi gentilmente cedida pelo Dr. Moacir A. Rebelo (Instituto de Biofísica - UFRJ). Os marcadores de peso molecular foram da SIGMA. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2. CELULAS

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram os tripanosomatídeos:

Trypanosoma cruzi, cepa Y: isolado de xenodiagnose de um caso humano de doença de Chagas (Silva e Nussenzweig, 1953) e gentilmente cedida pelo Professor Hélio P. Azevedo do Laboratório de Microbiologia da UnB.

Herpetomonas samuelpeessoai: isolado do hemíptera Zelus leucogrammus (Roitman et. al., 1976) e gentilmente cedido pelo Professor Isaac Roitman do Laboratório de Microbiologia da UnB.

Crithidia brasiliensis sp.: isolada do hemíptera do gênero Zelus, em Brasília, e caracterizada no Laboratório de Biologia Molecular (Sá et. al, 1980).

3. MANUTENÇÃO DAS CELULAS

As células foram cultivadas em meio LIT (Camargo, 1964) a 28° C e mantidas em fase exponencial através de inóculos sucessivos.

4. SOLUÇÕES E TAMPOES

4.1 MEIO LIT

Confeccionado de acordo com o descrito por Camargo (1964).

4.2 PSG-5X (P/V)

Glicose	- 4,5 %
NaCl	- 3,35%
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	- 3,0%
KCl	- 17,5 mg%

4.3 AA MIX (1X)

A mistura de aminoácidos foi preparada em TRIS.HCl 40 mM, pH=7.2 e 31 mg% de DTT conforme descrito por Hunt and Jacson (1974). Foi omitido o aminoácido que seria usado como precursor radioativo no sistema de síntese proteica.

Valina	- 3,0 mM
Asparagina H ₂ O	- 0,5 mM
Glicina	- 2,0 mM

Glutamina	- 0,5 mM
Tirosina	- 0,5 mM
Serina	- 2,0 mM
A. Aspártico	- 2,0 mM
Fenilalanina	- 1,5 mM
Histidina (HCl. monohidrato)	- 2,0 mM
Isoleucina	- 0,5 mM
A. Glutâmico	- 2,0 mM
Triptofano	- 0,5 mM
Alanina	- 3,0 mM
Arginina hidrocloreto	- 0,5 mM
Cisteina	- 0,5 mM
Treonina	- 1,5 mM
Prolina	- 1,0 mM
Lisina monohidrocloreto	- 2,0 mM
Leucina	- 3,0 mM
Metionina	- 0,5 mM

4.4 SOLUÇÃO CINTILADORA

Tolueno	- 2,0 l
PPO	- 12,5 g
POPOP	- 0,75 g

4.5 TAEU (2X)

TRIS.HCl, pH=6,8	- 200 mM
------------------	----------

2 - Mercaptoetanol	- 20% (v/v)
SDS	- 4% (p/v)
Glicerol	- 20% (v/v)
Azul de Bromofenol	- 0,1% (p/v)

4.6 SOLUÇÃO L

TRIS.HCl, pH=8,8	- 1,5 M
SDS	- 0,4% (p/v)

4.7 SOLUÇÃO M

TRIS.HCl, pH=6,8	- 0,5 M
SDS	- 0,4% (p/v)

4.8 SOLUÇÃO N

Acrilamida	- 29,2% (p/v)
Bis.Acrilamida	- 0,8% (p/v)

4.9 TAMPÃO DE CORRIDA

TRIS.base	- 0,025 M
Glicina	- 0,192 M
SDS	- 1% (p/v)

O pH deste tampão não era ajustado.

4.10 TAEB (2X)

Uréia	- 9,5 M
NP-40	- 4% (v/v)
DTT	- 0,01 M
Anfolito 5-8	- 1,6% (v/v)
Anfolito 3,5-10	- 0,4% (v/v)

4.11 SOLUÇÃO OL

Uréia	- 6 M
NP-40	- 4% (v/v)
DTT	- 0,01 M
Anfolito 5-8	- 0,8 (v/v)
Anfolito 3,5-10	- 0,2% (v/v)

4.12 SOLUÇÃO D

Acrilamida	- 28,38%
BIS.acrilamida	- 1,62%

4.13 SOLUÇÃO O (1X)

Glicerol	- 10% (v/v)
DTT	- 1 mM
SDS	- 2,3% (p/v)
TRIS.HCl	- 0,0625 M, pH=6.8

4.14 SOLUÇÃO DE CORRIDA INFERIOR

H₃PO₄ - 0,01 M

4.15 SOLUÇÃO DE CORRIDA SUPERIOR

NaOH - 0,02 M

Deaerado por aproximadamente 30 minutos, na hora do uso.

4.16 SOLUÇÃO CORANTE

Comassie Blue G - 1% (p/v)

Metanol - 30% (v/v)

Ácido Acético - 7% (v/v)

4.17 SOLUÇÃO DESCORANTE

Etanol - 25% (v/v)

Ácido Acético - 8% (v/v)

5. CURVA DE CRESCIMENTO

Para o crescimento das células, foi utilizado um inóculo a partir de pré-inóculo em fase exponencial. O crescimento foi feito em frascos de vidro de 100 ml contendo 20 ml de meio LIT ao qual adicionava-se um inóculo padrão para se ter $5 \cdot 10^6$ células/ml para T. cruzi e 10^6 células/ml para C. brasiliensis e

H. samuelpessoai. As culturas foram mantidas a 28°C e o número de células estimado utilizando-se a câmara de Neubauer. Estas condições de crescimento foram seguidas no decorrer de todo o trabalho.

6. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

As células utilizadas foram obtidas a partir de culturas em fase exponencial. As células (em um volume de 20 ml) foram coletadas por centrifugação (centrífuga IEC MODEL PR-2), a 4°C, a 2300 g por 20 minutos. O sedimento era ressuspendido em, aproximadamente, 20 ml de solução PSG 1X, pH=7.0. A seguir era feita nova centrifugação (mesmas condições) e o sedimento ressuspendido em solução PSG 1X, pH=7.0 para se ter $5 \cdot 10^7$ células/ml, conforme estimado através de contagem em câmara de Neubauer.

7. CINÉTICA DE INCORPORAÇÃO DE ^3H -LEUCINA EM VÁRIAS TEMPERATURAS

O sistema de síntese proteica, "in vivo", continha num volume final de 1,0 ml: 900 μl de PSG 1X, pH=7.0; 32 μl de AAMIX (2X) da qual se omitia leucina; 100 μl da massa de célula ($5 \cdot 10^7$ células). Cada sistema era incubado por 30 minutos nas temperaturas de 28°C, 37°C e 40°C, após o que era adicionado 10 μl de ^3H -Leucina (2 μCi). A incubação prosseguia por 1 hora e de 20 em 20 minutos era retirado alíquotas de 10 μl e colocadas sobre os papéis Whatman 3MM de 1 x 1 cm pré-embebidos em TCA 5%. Após a

secagem, os papéis eram colocados por 15 minutos a 0°C em uma solução de TCA 5% gelada. Logo após, eram lavados por duas vezes durante 5 minutos cada, com TCA a 5% gelado sob agitação, uma vez durante 5 minutos com etanol: éter (1:1) e uma vez por 5 minutos com éter. Os papéis, após a secagem, eram colocados em tubos "vials" contendo 2,0 ml de solução cintiladora e a radioatividade medida em um contador de cintilação (Beckman LS 7000).

8. ANÁLISE DOS POLIPEPTÍDEOS SINTETIZADOS, "IN VIVO", EM CONDIÇÕES DE CHOQUE TÉRMICO

A composição do sistema era semelhante à descrita acima, sendo usado a AA-MIX (2X) da qual se omitia metionina. Após 30 minutos de incubação nas respectivas temperaturas, adicionava-se 1 µl de ³⁵S-metionina (aproximadamente 10 µCi). A incubação prosseguia por mais 40 minutos, e a seguir, o material era imediatamente centrifugado (centrífuga SPIN I da INCIBRÁS) na câmara fria, a 12000 g por 5 minutos. O sobrenadante era aspirado em bomba de vácuo e o sedimento congelado a - 50°C. Os polipeptídeos eram analisados através de eletroforese uni e bidimensional, como descrito a seguir.

9. ANÁLISE DA VELOCIDADE DE INDUÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

A composição do sistema era semelhante à descrita no item 8. Cada sistema foi incubado a 28°C por 30 minutos e a se-

guir transferido para 40°C. Para cada das condições: 40°C/5 minutos, 40°C/15 minutos e 40°C/30 minutos adicionava-se ³⁵S-Me-tionina e a incubação prosseguia por 10 minutos após o que o material era processado para análise dos polipeptídeos, através de eletroforese, conforme descrito no item anterior.

10. ANÁLISE DA VELOCIDADE DA VOLTA AO ESTADO NORMAL DE SÍNTESE PROTEICA

Após o choque térmico, a 40°C por 30 minutos, os sistemas eram incubados a 28°C. E para cada das condições: 28°C/5 minutos, 28°C/15 minutos e 28°C/30 minutos, era adicionado ³⁵S-Me-tionina e a incubação prosseguia por 10 minutos. Em seguida, o material foi processado conforme descrito anteriormente.

11. ANÁLISE DOS POLIPEPTÍDEOS ATRAVÉS DE ELETROFORESE

11.1 UNIDIMENSIONAL

A eletroforese processou-se de acordo com o descrito por Laemmli (1970).

A. PREPARO DAS AMOSTRAS

Cada sedimento, contendo cerca de 5×10^7 células, era ressuspendido em 70 µl de TAEU 1X, fervido em banho-maria por 3 minutos e os polipeptídeos analisados em PAGE-SDS.

B. PREPARAÇÃO DO GEL

Os géis unidimensionais foram de 13,5 x 17,0 x 0,1 cm usando um gradiente linear de 7-15%.

SOLUÇÕES	GEL-SEPARADOR		GEL-CONCENTRADOR
	7%	15%	4,5%
L	2,5 ml	2,5 ml	-
M	-	-	2,0 ml
N	2,3 ml	4,99 ml	1,25 ml
H ₂ O	5,2 ml	1,3 ml	4,75 ml
GLICEROL	-	1,2 ml	-
PA 10%	5,5 μ l	18 μ l	50 μ l
TEMED	5,5 μ l	5,5 μ l	5 μ l

Após a polimerização (1-2 hs), as amostras eram aplicadas e o sistema submetido à análise eletroforética.

C. CONDIÇÕES DA ANÁLISE ELETROFORÉTICA E PROCESSAMENTO DO GEL

As eletroforeses foram conduzidas sob corrente constante, utilizando-se no início 10 mA, até que o azul de bromofenol do tampão de amostra atingisse o gel separador, e a seguir 20 mA. A corrida era mantida até que o azul de bromofenol saísse do gel. Em seguida, o gel foi corado por 1-2 horas, utilizando-se a solução corante, e descorado com sucessivas trocas da solução descorante até que o perfil proteico pudesse ser evidenciado. Logo após, os polipeptídeos radioativos foram identificados por fluorografia conforme descrito a seguir.

11.2 - BIDIMENSIONAL

A eletroforese bidimensional processou-se de acordo com o método descrito por O' Farrel (1975).

A. PREPARO DA AMOSTRA

Cada sedimento, com cerca de 5×10^7 células, foi:

- a) ressuspenso em 1,0 ml de solução de TCA 10% contendo metionina 0,1% (p/v), gelada, agitado em VORTEX e incubado a 0°C por 20 minutos;
- b) centrifugado (SPIN I da INCIBRÁS) a 12000 g por 5 minutos, na câmara fria;
- c) ressuspenso em 1,0 ml de etanol gelado, agitado em VORTEX e incubado a 0°C por 15 minutos;
- d) centrifugado como em b);
- e) ressuspenso em 1,0 ml de clorofórmio: metanol (1:1), agitado em VORTEX e incubado a 0°C por 5 minutos;
- f) centrifugado como em b);
- g) secado em bomba de vácuo e estocado a - 20°C, ou ressuspenso em TAEB (2X), agitado em VORTEX e centrifugado a 12000 g por 2 minutos, a temperatura ambiente. Ao sobrenadante, adicionava-se 5 µl de DTT 1M.

B. PREPARAÇÃO DO GEL

B.1. 1a. Dimensão: Focalização Isoelétrica

Foram utilizados tubos de 3 mm de diâmetro x 11,5 cm de comprimento vedados em uma das extremidades com parafilme. Para

10 ml de mistura de GEL (cerca de 0,5 ml da mistura por tubo),

usava-se:	Uréia	- 5,5 g
	Solução D	- 1,33 ml
	NP.40-10%	- 2,0 ml
	H ₂ O	- 2,0 ml
	Anfolito 5-8	- 0,4 ml
	Anfolito 3,5-10	- 0,1 ml

Após a mistura de todos os componentes, a solução do gel era deaerada por 5 minutos e adicionava-se os catalisadores:

PA.10%	- 20 μ l
TEMED	- 14 μ l

Esta solução era imediatamente transferida, com o auxílio de uma seringa, para os tubos até a altura de 5 mm do topo. O gel era delicadamente coberto com 20 μ l de água bidestilada e esperava-se a polimerização por 1 a 2 horas, após o que o parafilme do fundo dos tubos era substituído por uma membrana de diálise e os tubos adaptados na câmara de eletroforese. A água do topo dos géis era substituída por 20 μ l de TAEB (2X), sobre o qual era adicionado 20 μ l de solução 0L e em seguida, completava-se os tubos com solução de corrida superior. Os reservatórios superior e inferior eram preenchidos com suas respectivas soluções e a seguir os géis eram submetidos a uma pré-corrida de 200 Volts, 300 Volts e 400 Volts por 30 minutos cada. Após a pré-corrida, a solução superior era descartada e a superfície de cada gel seca com papel de filtro para posterior aplicação da

amostra. Era aplicado 50 μ l de cada amostra em cada gel e sobre esta era delicadamente adicionado 20 μ l de solução 0L. Cada tubo era preenchido com NaOH 0,02 M deaerado, bem como o reservatório superior. A cuba de eletroforese, contendo os tubos com os géis da 1a. dimensão, era submetida à corrida.

B.2 - 2a. Dimensão: PAGE-SDS

Os géis da 2a. dimensão foram de 16,5 x 16,5 x 0,1 cm, com uma concentração de 12%. Composição do gel:

SOLUÇÕES	GEL SEPARADOR (12%)	GEL CONCENTRADOR (4,5 %)
L	5,0 ml	-
M	-	2,5 ml
N	6,6 ml	1,5 ml
H2O	8,4 ml	6,0 ml
DEAERAR POR 5 - 10 MINUTOS		
PA 10%	67 μ l	21 μ l
TEMED	10 μ l	7 μ l

A mistura do gel separador era imediatamente transferida para a placa de eletroforese até 2,0 cm abaixo do BISEL. Após a polimerização (1-2 horas) adicionava-se o gel concentrador, onde era feito um poço para adaptação, ao lado do gel da 1a. dimensão,

do marcador de peso molecular. Da solução do gel concentrador era reservado 3,0 ml, aos quais se adicionava 40 μ l de PA 10% e 6 μ l TEMED, sendo esta solução usada para selar o gel da 1a. dimensão e o marcador de peso molecular. O marcador de peso molecular era preparado conforme descrito a seguir. O sistema era submetido à corrida.

C. CONDIÇÕES DA ANÁLISE ELETROFORÉTICA E PROCESSAMENTO DOS GÊIS

C.1 - 1a. Dimensão

O sistema foi submetido a 400 V por 17 horas. Em seguida, os géis foram retirados dos tubos, com auxílio de uma seringa, e transferidos para um tubo de ensaio onde foram equilibrados com aproximadamente 5,0 ml de solução 0 (1X) por 30 minutos, após o que foram estocados a -50°C. Na hora do uso, o gel foi descongelado, incubado em solução 0 (1X), fresca, por 30 minutos. A solução 0 foi descartada, o gel seco com papel de filtro, adaptado sobre o gel da 2a. dimensão e selado ao lado do marcador de peso molecular.

C.2 - 2a. Dimensão

As condições da análise eletroforética, bem como de processamento dos géis era de acordo com o descrito no item C para os géis unidimensionais.

12. PREPARO DO MARCADOR DE PESO MOLECULAR PARA A 2ª.DIMENSÃO

Os marcadores de peso molecular utilizados foram: albumina de soro bovino, ovoalbumina; tripsinogênio, β -Lactoglobina de leite bovino e lisozina.

SOLUÇÃO I: mistura dos marcadores de peso molecular.

4,0 μ g/ μ l de cada em TAEB (2X).

SOLUÇÃO II: 50 μ l da solução I

50 μ l de solução 0 (2X)

A seguir, a solução II foi fervida em banho-maria por 3 minutos e a ela adicionado 20 μ l de DTT 1M.

SOLUÇÃO III: Uréia	- 1,37 g
Solução D	- 0,33 ml
NP.40-10%	- 0,5 ml
Água Bidestilada	- 0,5 ml

Após a mistura destes componentes, foi adicionado 120 μ l da solução II e 20 μ l de DTT 1M. Esta mistura foi deaerada em bomba de vácuo, após o que adicionava-se os catalisadores: 7,5 μ l de PA 10% e 5 μ l de TEMED. Esta solução foi imediatamente introduzida nos tubos da 1ª. dimensão e esperava-se a polimerização, após o que os géis foram retirados dos tubos e cortados em pedaços de 0,5 em 0,5 cm. Cada pedaço foi estocado a - 50°C, imerso em solução 0 (1x).

Na hora do uso, um pedaço era descongelado e corado, pela adição de 100 μ l de azul de bromofenol 0,1% (p/v) durante 10

minutos. O gel era seco com papel de filtro e adaptado no poço do gel concentrador, sendo posteriormente selado ao lado do gel da 1a. dimensão.

13. FLUOROGRAFIA

Os polipeptídeos radioativos eram detectados de acordo com o descrito por Bonner e Laskey (1974), com pequenas modificações. Após a eletroforese, os géis foram corados, descorados e a seguir feito a fluorografia.

Os géis foram imersos em DMSO duas vezes durante 30 minutos cada, sob agitação, imersos por 1 hora sob agitação, primeiro em PPO 20% em DMSO e posteriormente em água. Em seguida, os géis foram secos a vácuo e expostos, a uma película KODAK X-OMAT RP, a - 50°C. A seguir, a película foi revelada e os polipeptídeos radiotivos analisados.

14. CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DAS SOLUÇÕES E TAMPOES

Soluções estocadas à 4°C: L, M, N, D e O.

Soluções estocadas à temperatura ambiente: Meio LIT, solução cintiladora, tampão de corrida, solução corante e solução descorante.

As demais soluções foram estocadas a - 20°C, sendo as soluções AA MIX (1X), TAEB (2X) e Solução OL distribuídas em alíquotas.

RESULTADOS

Com o objetivo de padronizar as condições do cultivo das células, para a execução dos experimentos em todo o decorrer do trabalho, construímos as curvas de crescimento dos tripanosomatídeos em estudo. Definiu-se que a coleta das culturas se daria na fase exponencial do crescimento conforme mostrado por uma seta nas figuras 1A, 1B e 1C.

As figuras 2A, 2B e 2C, mostram a cinética de incorporação de ^3H -Leucina em proteínas totais de C. brasiliensis, H. samuelpeessoai e T. cruzi, respectivamente. Observa-se que de um modo geral, ocorre inibição da síntese proteica total com o aumento da temperatura. Comparando-se os níveis desta inibição para os três tripanosomatídeos, nota-se que H. samuelpeessoai parece ser mais resistente a altas temperaturas, com respeito à síntese proteica, visto que à 28°C, 37°C e 40°C (esta última não apresentada por ser coincidente com a de 28°C e 37°C) a incorporação de aminoácidos em proteínas ocorre com aproximadamente a mesma eficiência.

Após o estabelecimento das condições de crescimento dos tripanosomatídeos e do estudo da influência da temperatura na síntese de proteínas "in vivo", os polipeptídeos sintetizados em condições de choque térmico foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS.

Conforme apresentado na figura 3, têm-se que em C. bra-

siliensis sob condição de choque térmico ocorre o aumento e/ou a indução da síntese de pelo menos seis polipeptídeos. Para H. samuelpessoai, de acordo com a figura 4, têm-se que com a elevação da temperatura ocorre a indução e/ou aumento da síntese de pelo menos quatro polipeptídeos. Do perfil eletroforético da figura 5, para o T. cruzi, observa-se o mais simples padrão de polipeptídeos de choque térmico, ocorrendo o aumento e/ou a indução da síntese de pelo menos três polipeptídeos em resposta ao aumento da temperatura. Os PCTs detectados para C. brasiliensis, H. samuelpessoai e T. cruzi, estão indicados por setas nas figuras 3, 4 e 5 respectivamente.

De acordo com as figuras 3, 4 e 5, observa-se que a maioria dos polipeptídeos sintetizados à 28°C tem sua síntese inibida e/ou diminuída com o aumento da temperatura. Nota-se também que o padrão de marcação de alguns PCTs varia com a temperatura, sendo notado que alguns PCTs apresentam intensidades de síntese diferente à 37°C e 40°C.

Após a caracterização geral dos efeitos do choque térmico sobre a síntese proteica dos tripanosomatídeos em estudo, partiu-se para a estimativa de seus pesos moleculares. O perfil eletroforético do gel utilizado para tal é apresentado na figura 6. O peso molecular dos PCTs detectados através de eletroforese em gel unidimensional são mostrados na tabela 1. Os marcadores de peso molecular utilizados foram os seguintes: β -Galactosidase de E. coli (116 Kd), Fosforilase b de músculo de coelho (97,4

Kd), Albumina de soro bovino (66 kd), Ovoalbumina (45 Kd) e Anidrase Carbônica (29 Kd).

A seguir, com o objetivo de melhor caracterizar os PCTs, estes foram analisados através de eletroforese bidimensional em gel. A observação da figura 7, que representa o perfil dos polipeptídeos de C. brasiliensis, mostra o mais complexo padrão de PCTs comparado com o dos outros dois tripasomatídeos, figuras 8 e 9. Com o maior poder de resolução deste sistema de eletroforese, observa-se que cerca de onze polipeptídeos de choque térmico são detectados. Nota-se entretanto, a existência de polipeptídeos de mesmo peso molecular e diferentes pontos isoelétricos (pIs), conforme esquematizado na tabela 2. É observado também que o polipeptídeo mais abundantemente sintetizado à 28°C, que contém 55 Kd (possivelmente Tubulina-T), apresenta sua síntese fortemente inibida à 40°C.

Para H. samuelpeessoai (figura 8), observa-se cerca de cinco polipeptídeos de choque térmico nas temperaturas de 37°C e 40°C. Pode ser notado uma grande similaridade, a nível de peso molecular e ponto isoelétrico, entre os PCTs de H. samuelpeessoai e o grupo de PCTs de alto peso molecular de C. brasiliensis conforme está representado na tabela 2 com a mesma numeração para os polipeptídeos correspondentes nos três organismos estudados.

O T. cruzi dentre os três tripanosomatídeos estudados, é o que apresenta o padrão de PCTs mais simples, conforme pode ser

visto na figura 9. Embora se observe uma grande inibição na síntese proteica total a 40°C, a síntese do polipeptídeo de 55 Kd (possivelmente Tubulina-T) ao contrário do evidenciado para C. brasiliensis está razoavelmente preservada nesta temperatura. A figura 9 mostra que cerca de seis PCTs são detectados para T. cruzi a 37 C, dos quais apenas quatro são comuns em ambas as temperaturas, conforme descrito na tabela 2.

A seguir, para o cálculo do peso molecular dos PCTs detectados pelos géis bidimensionais, adotou-se o seguinte procedimento: para os PCTs com pesos moleculares acima de 60 Kd, utilizou-se os pesos moleculares estimados pelo gel unidimensional da figura 6, como marcadores internos nos géis bidimensionais; e para os PCTs com pesos moleculares abaixo de 60 Kd, foi utilizado os marcadores mostrados nos próprios géis bidimensionais.

A partir destes cálculos, construiu-se a tabela 2 que sumariza os PCTs observados para os tripanosomatídeos em estudo. Nesta tabela, os polipeptídeos que mostram semelhanças quanto ao peso molecular e ponto isoelétrico, estão agrupados com a mesma numeração, sendo que esta, é igualmente representada na tabela 1 e nas figuras 6, 7, 8 e 9.

Com o objetivo final de analisar a velocidade de indução da resposta ao choque térmico e a velocidade de recuperação após o estresse em C. brasiliensis, fêz-se uma cinética para acompanhar os processos de indução e recuperação.

A figura 10 mostra que, conforme descrito para a maioria dos organismos estudados, a indução da resposta ao choque térmico é muito rápida, sendo que com 5 minutos de exposição de C. brasiliensis a uma temperatura de 40°C já se observa sua indução.

De acordo com o que se pode observar na figura 11, o processo de recuperação do choque térmico a 40°C é mais gradual que o da indução, sendo requerido mais que 30 minutos a 28°C para a total repressão da síntese das proteínas de choque térmico. Também foi observado (resultados não apresentados) que o processo de recuperação é mais rápido após um choque térmico a 37°C que a 40°C.

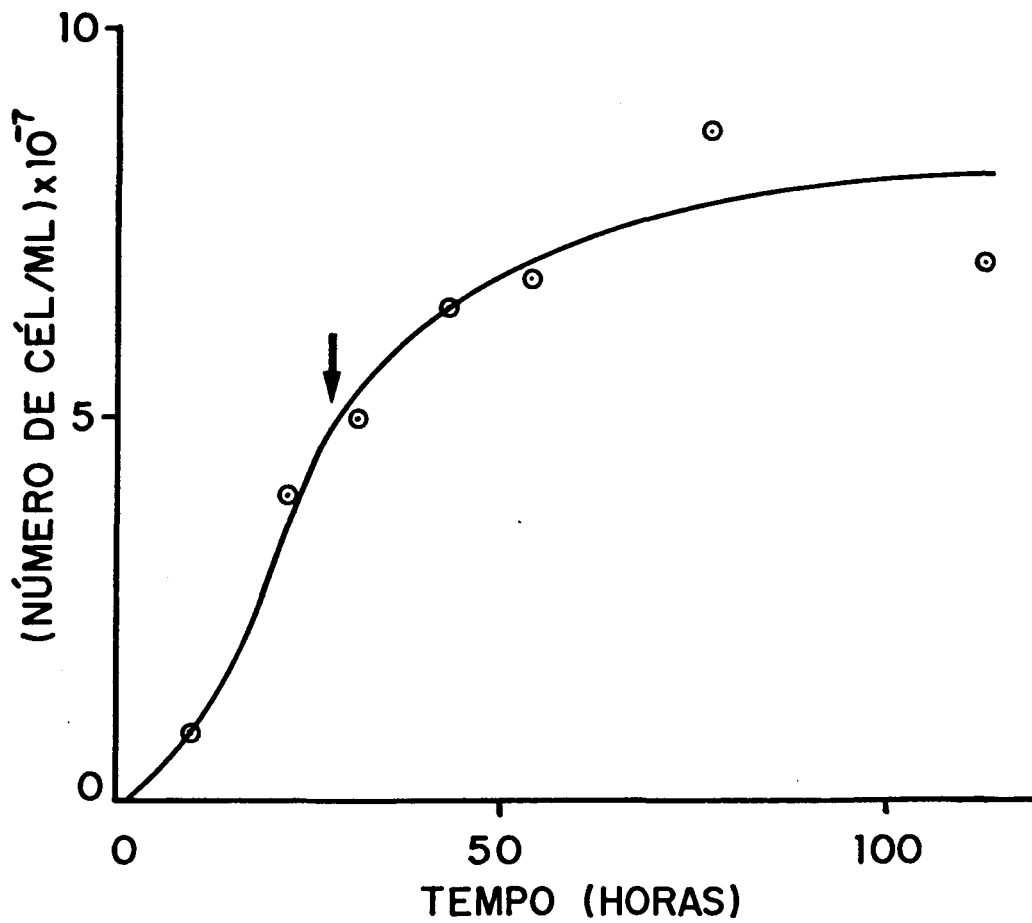


FIGURA 1A: Curva de crescimento de Crithidia brasiliensis em meio LIT a 28°C. Cada ponto representa a média de 3 contagens efetuadas em câmara de Neubauer. A seta indica o ponto do crescimento onde as culturas eram coletadas para o preparo das células.

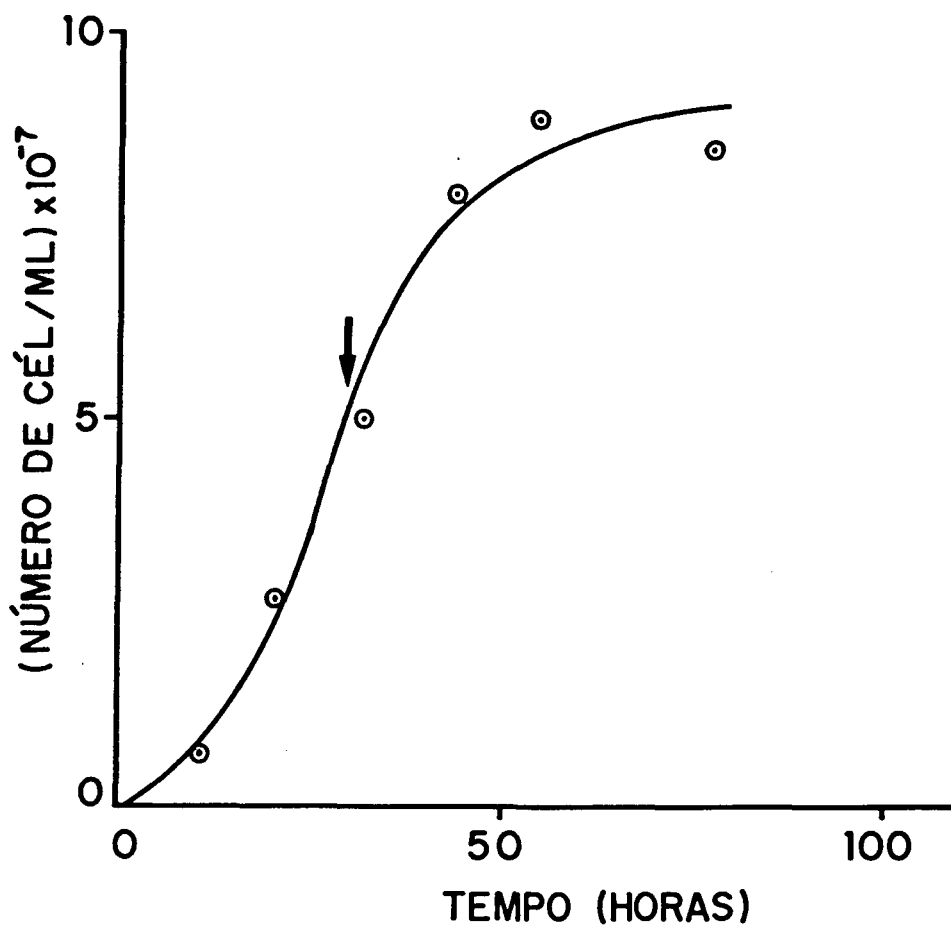


FIGURA 1B: Curva de crescimento de Herpetomonas samuelpessoai em meio LIT a 28°C. As condições eram idênticas às descritas na legenda da figura 1A.

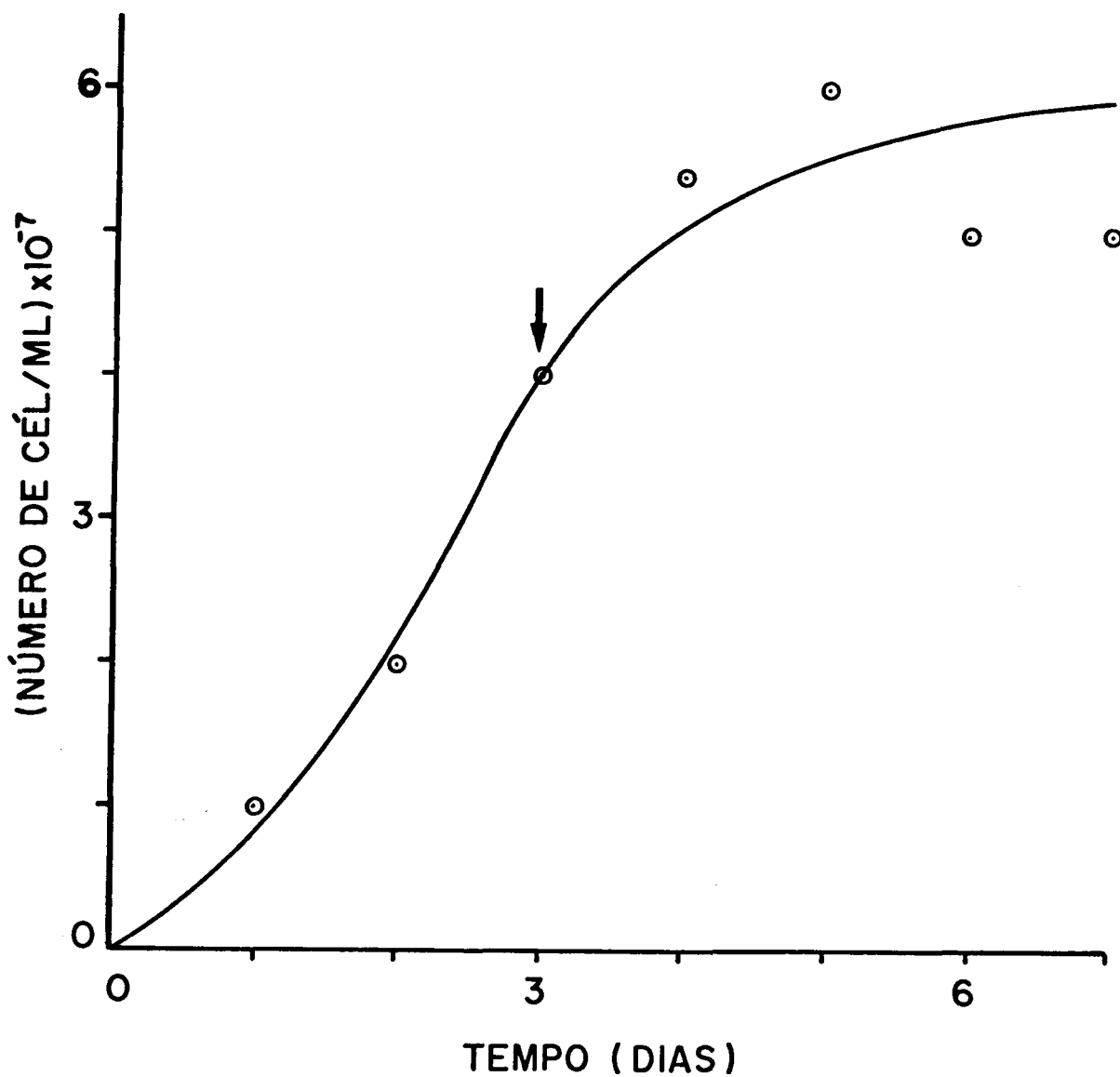


FIGURA 1C: Curva de crescimento do Trypanosoma cruzi, cepa Y, em meio LIT a 28°C. As condições eram idênticas às descritas na legenda da figura 1A.

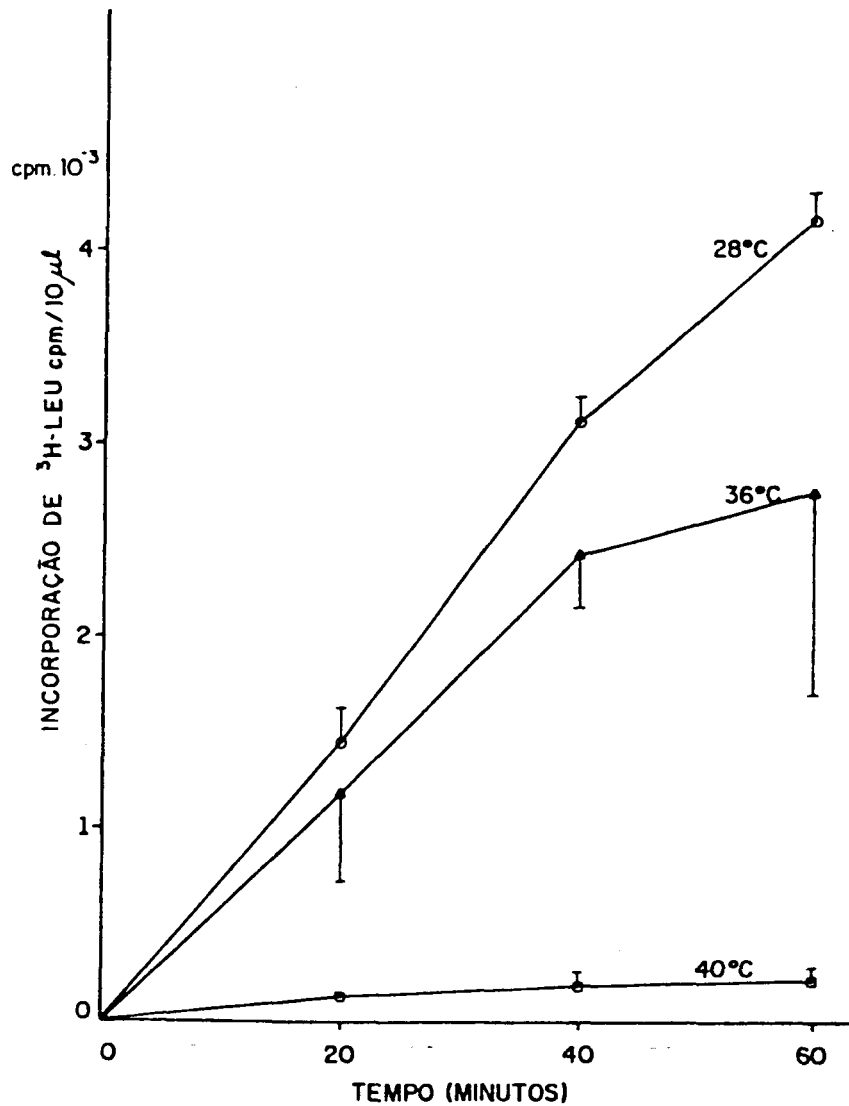


FIGURA 2A: Cinética de incorporação de ^3H -Leucina em várias temperaturas para *C. brasiliensis*. As células foram incubadas por 30 minutos em cada temperatura, após o que adicionava-se ^3H -Leucina e a incubação prosseguia. Alíquotas eram retiradas e a radioatividade precipitável em TCA era medida num contador de cintilação, como descrito. Cada ponto representa a média de 3 repetições.

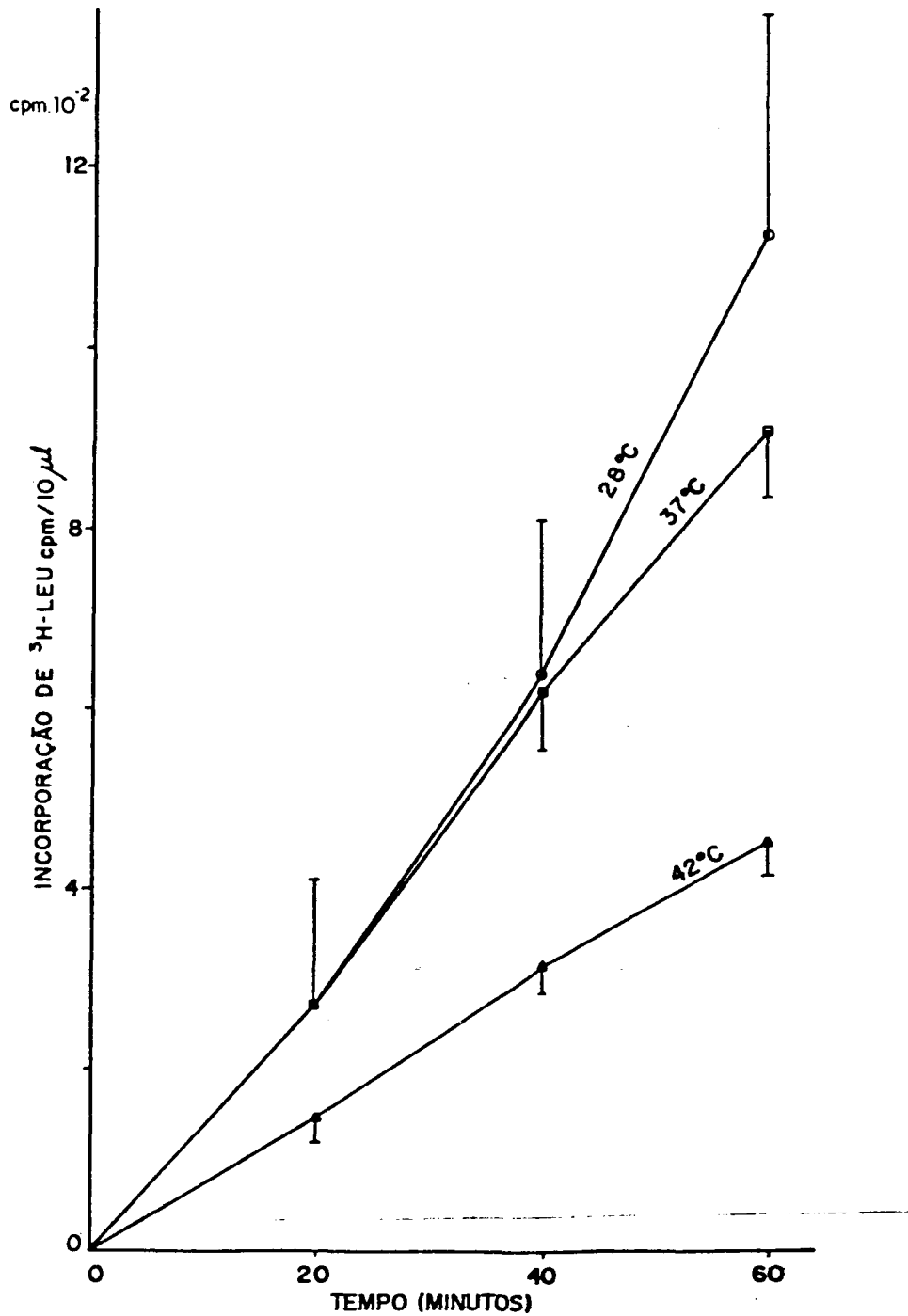


FIGURA 2B: Cinética de incorporação de ^3H -Leucina em várias temperaturas para *H. samuelpessoai*. As condições eram idênticas às descritas na figura 2A.

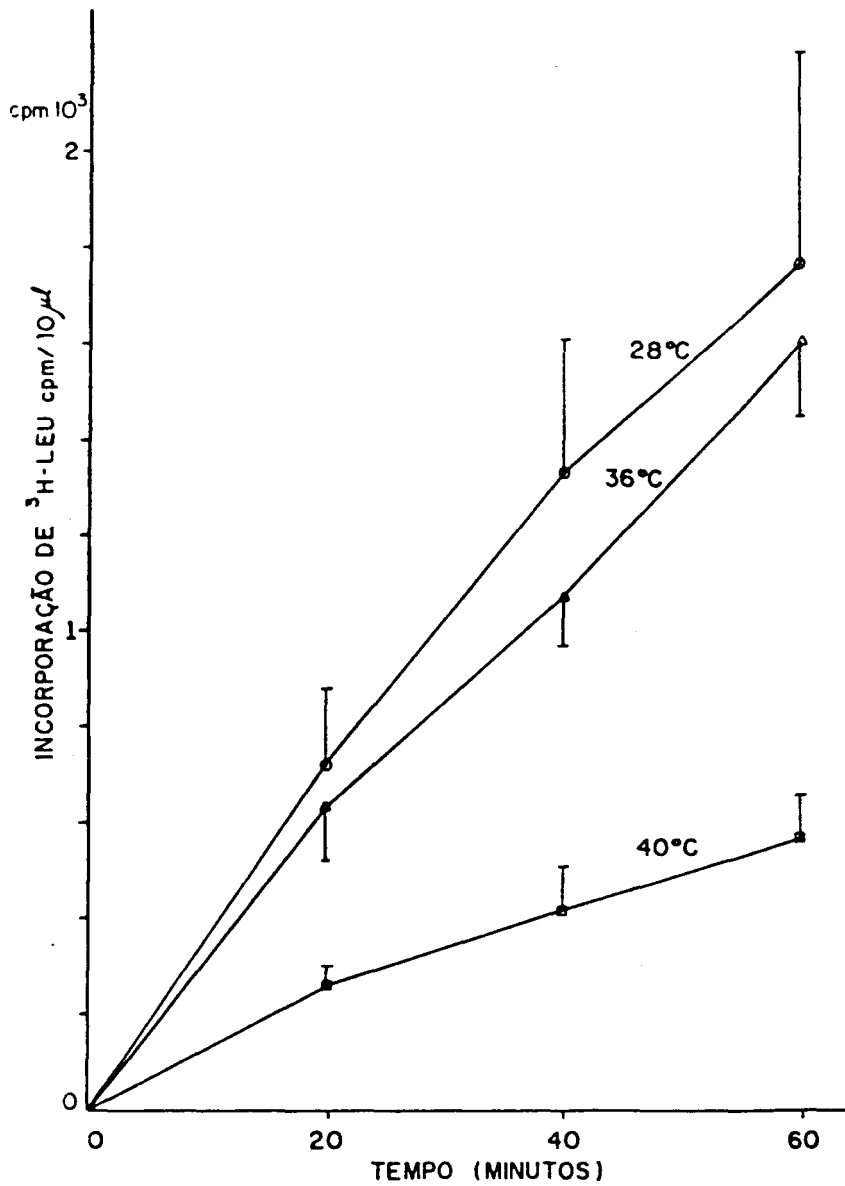
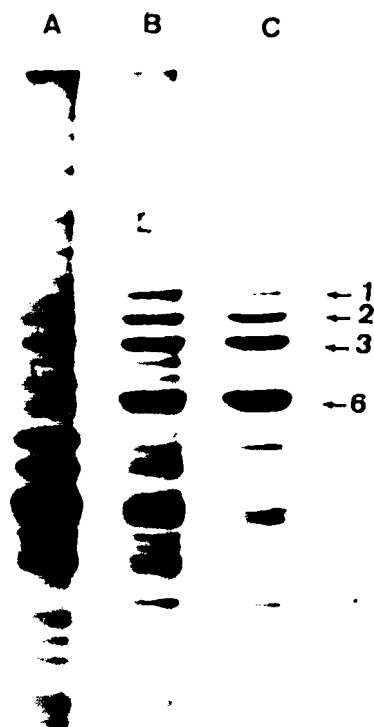


FIGURA 2C: Cinética de incorporação de ³H-Leucina em várias temperaturas para *T. cruzi*. As condições eram idênticas às descritas na figura 2A.



URA 3: Análise dos polipeptídeos de C. brasiliensis sintéticos "in vivo", através de PAGE-SDS. Após incubação das células 30 minutos nas respectivas temperaturas, adicionava-se ^{35}S -ionina e a incubação prosseguia por 40 minutos. As amostras m processadas conforme descrito em Materiais e Métodos e icava-se o equivalente a $8 \cdot 10^6$ células/ $12 \mu\text{l}$ /"slot" para cada stra.

b, c: 28°C, 37°C e 40°C, respectivamente.

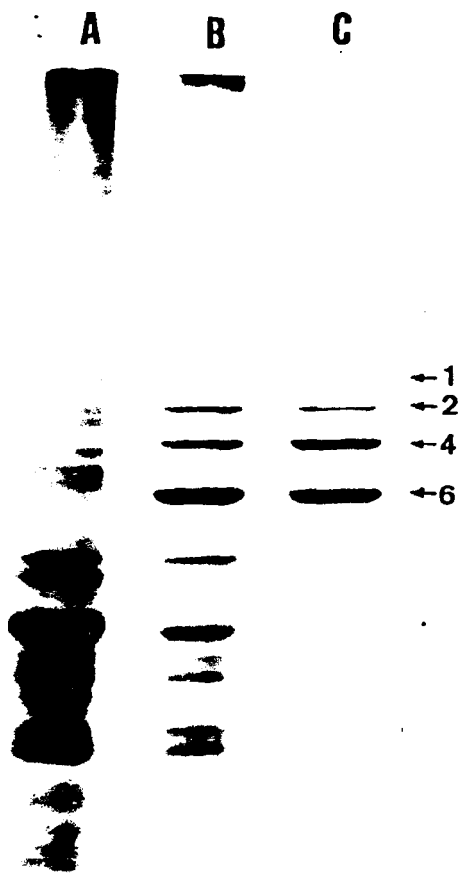
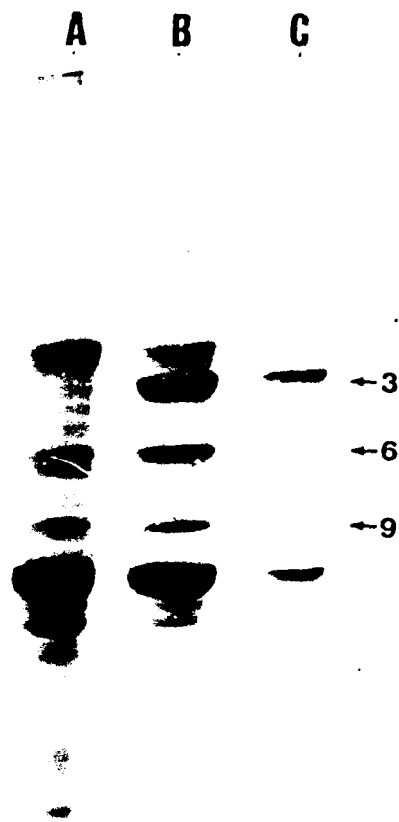
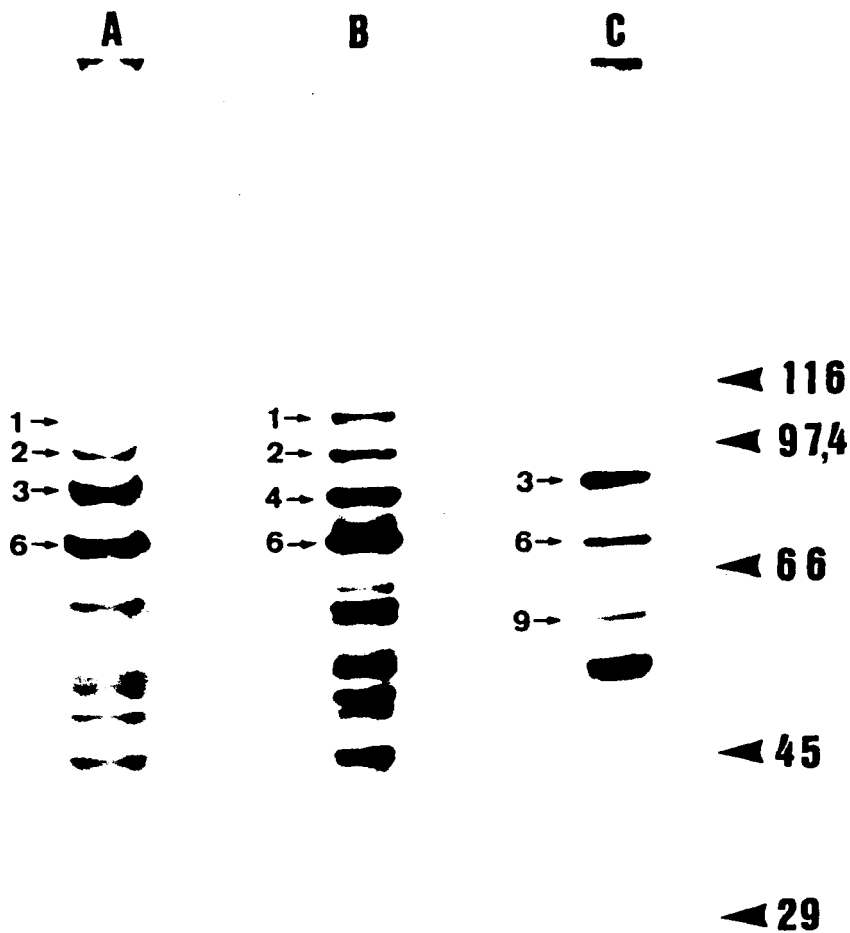


Fig. 4: Análise dos polipeptídeos de H. samuelpessoai sintéticos "in vivo", através de PAGE-SDS. As condições eram idênticas descritas na legenda da figura 3. a, b, c: 28°C, 40°C e 42°C, respectivamente.



RA 5: Análise dos polipeptídeos de T. cruzi, sintetizados "vivo", através de PAGE-SDS. As condições eram idênticas às ritas na legenda da figura 3.

, c: 28°C, 37°C e 40°C, respectivamente.



A 6: Análise do conjunto dos polipeptídeos de choque têrmi-
para determinação dos seus pesos moleculares. As condições
idênticas às descritas na legenda da figura 3, tendo sido
cada 10^5 cpm/15 μ l/"slot" para cada amostra.

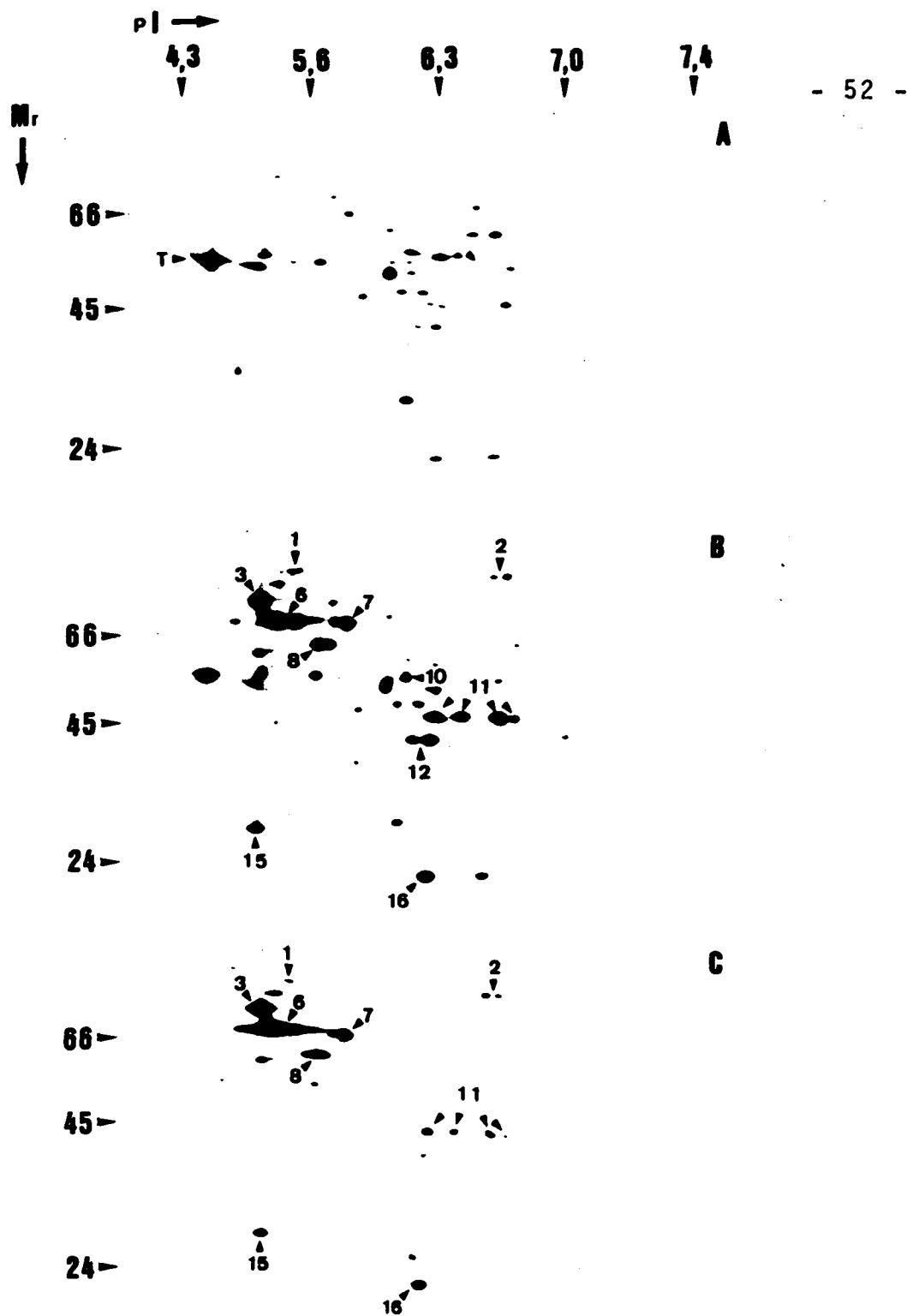
C: C. brasiliensis, H. samuelpessoai e T. cruzi, respectiva-
e.

arcadores de peso molecular.

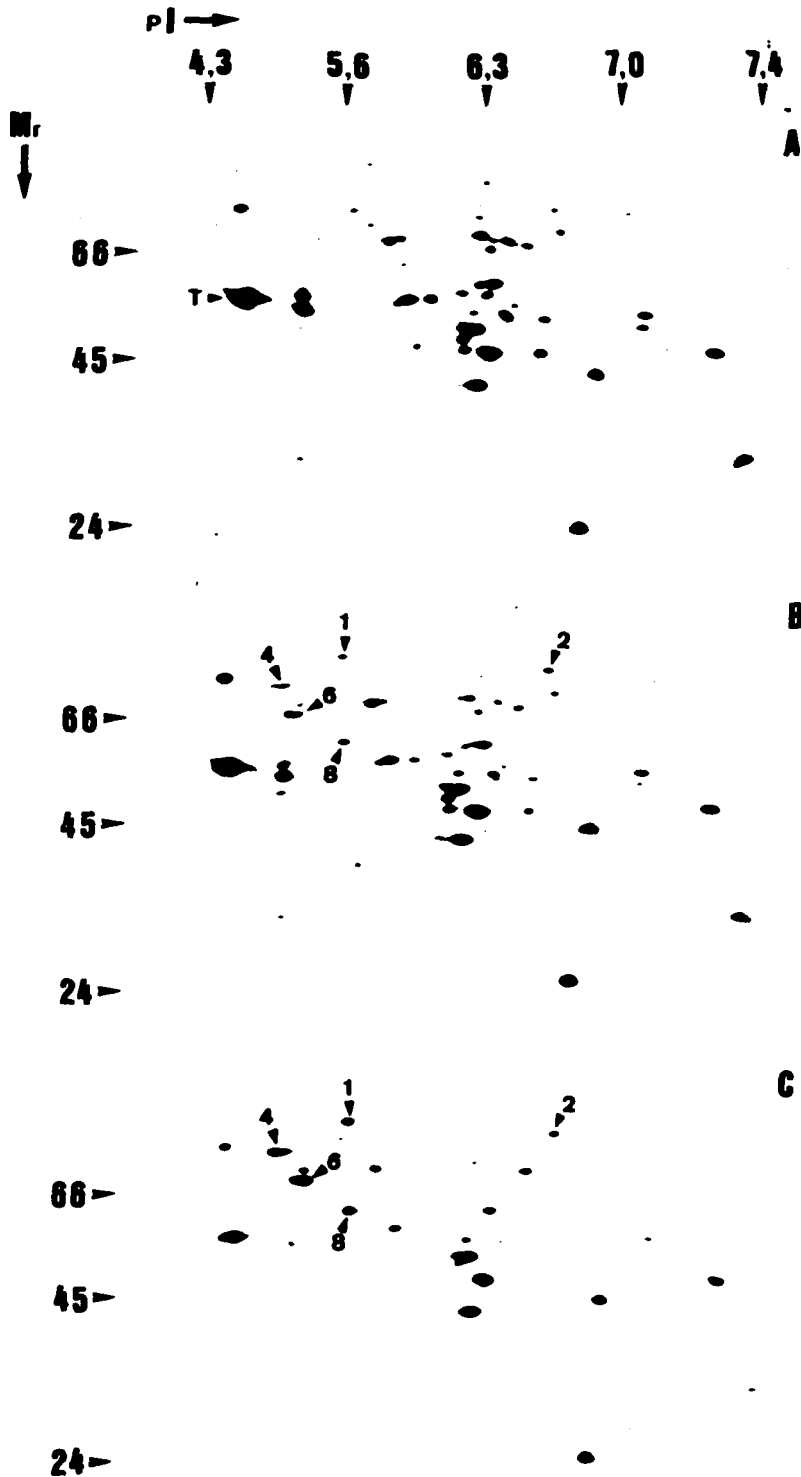
	A	B	C
1(+)	103	103	-
2	94	94	-
3	89	-	89
4	-	85	-
6	76	76	76
9	-	-	63

+ A numeração corresponde à indicação feita na figura 6 e na tabela 2, a seguir.

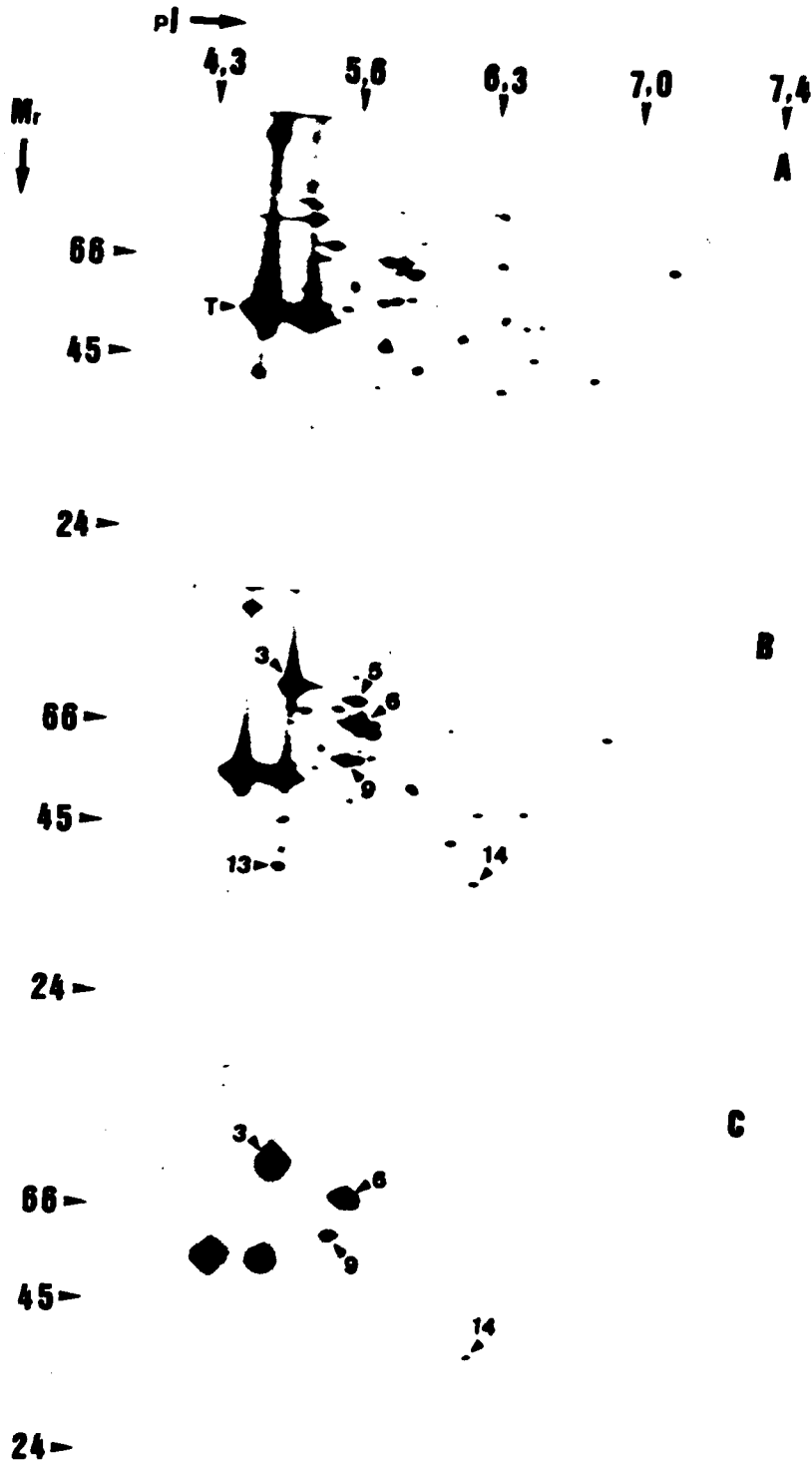
TABELA 1: Peso molecular estimado, para os polipeptídeos de choque térmico de C. brasiliensis, H. samuelpeessoai e T. cruzi (A, B e C, respectivamente), conforme resultados obtidos à partir da figura 6. A unidade utilizada é Kd.



A 7: Análise do perfil proteico de C. brasiliensis através de eletroforese bidimensional, em gel. As condições de incubação foram como descrito na figura 3, sendo aplicado o equivalente a 10^7 células/50 μ l para cada amostra. O tempo de exposição do filme de RX ao gel foi ajustado para obtenção de perfis eletroforéticos correspondentes aos de géis onde se padronizou cpm. O polipeptídeo de 55 Kd (possivelmente Tubulina) foi observado em A, B, C: 28°C, 37°C e 40°C, respectivamente.



A 8: Análise do perfil proteico de H. samuelpessoai através eletroforese bidimensional, em gel. Demais condições como ito na legenda da figura 7.



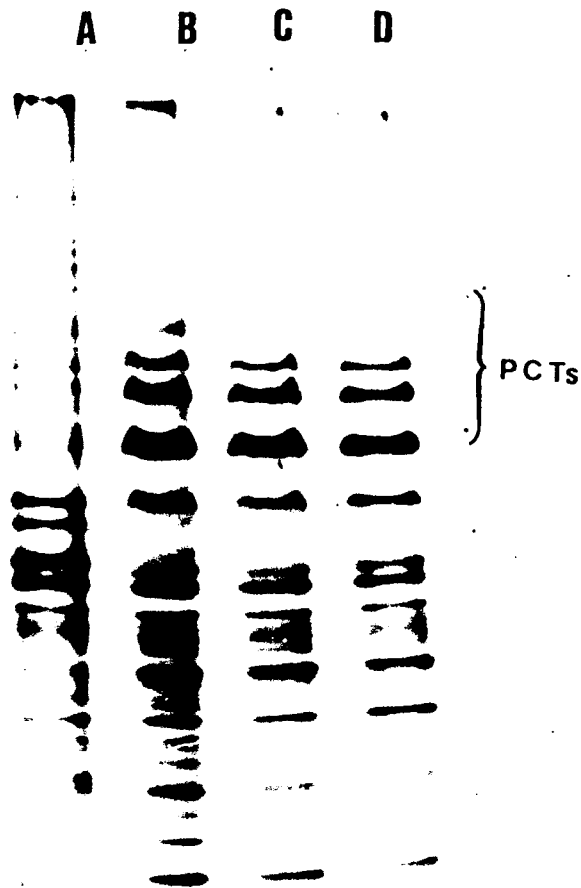
GURA 9: Análise do perfil proteico do T. cruzi através de eletroforese bidimensional, em gel. Demais condições, como descrito na legenda da figura 7.

Número	<u>C. brasiliensis</u>	<u>H. samuelpessoai</u>	<u>T. cruzi</u>
1	103 (a, b)+	103	-
2	94 (a, b)	94	-
3	89	-	89
4	-	85	-
5	-	-	83*
6	76 (a, b)	76 (a,b)	76
7	73 (a, b)	-	-
8	65 (a, b)	65	-
9	-	-	63
10	55*	-	-
11	46 (a,b,c,d)	-	-
12	42 * (a, b)	-	-
13	-	-	41*
14	-	-	39
15	28	-	-
16	23	-	-

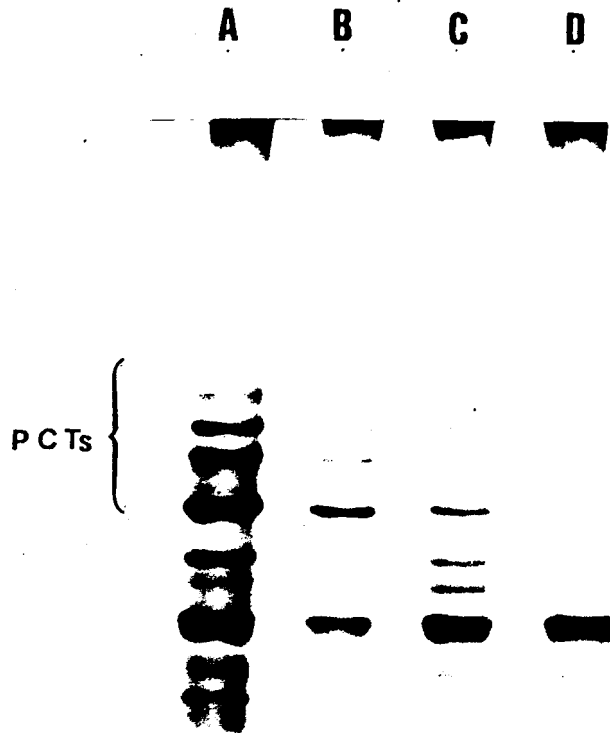
+ As letras entre parênteses indicam a existência de mais de um polipeptídeo com mesmo peso molecular e diferentes pontos isoelétricos (pIs).

* Refere-se à indução e/ou aumentada síntese do polipeptídeo apenas a 37°C, não sendo detectado a 40°C.

TABELA 2: Quadro geral dos pesos moleculares dos polipeptídeos de choque térmico de C. brasiliensis, H. samuelpessoai e T. cruzi. O peso molecular está apresentado em Kd.



URA 10: Análise da velocidade de indução da resposta ao choque térmico de C. brasiliensis. As células foram incubadas a C/30 min. e logo após, submetidas às seguintes condições: a - C/30 min.; b - 40°C/30 min.; c - 40°C/15 min.; d - 40°C/5 .. A seguir, adicionava-se ³⁵S-Metionina e incubação prosseguia por 10 minutos. O material era processado conforme descrito na legenda da figura 3, sendo aplicado cerca de $3 \cdot 10^4$ cpm/15 "slot" para cada amostra.



RA 11: Análise da velocidade do processo de recuperação do ue térmico de C. brasiliensis. Após incubação a 40°C/30 , as células foram submetidas às seguintes condições: a - /5 min.; b - 28°C/15 min.; c - 28°C/30 min.; d - controle: /30 min. (sem exposição a 40°C). A seguir, as condições eram ticas às descritas na legenda da figura 10.

DISCUSSÃO

Visto que a resposta ao choque térmico tem-se mostrado um modelo muito atrativo para o estudo da expressão genética da célula eucariótica e dada a grande importância de se estudar a família tripanosomatidae, tanto pelo fato de conter espécies importantes do ponto de vista médico como também por alguns tripanosomatídeos possuírem um ciclo de vida complexo apresentando interessantes etapas de diferenciação celular, surgiu o interesse de analisar comparativamente a RCT em três representantes desta família.

Como a indução da resposta ao choque térmico está diretamente relacionada com mudanças no padrão de síntese proteica da célula, e como na fase exponencial do crescimento a síntese proteica ocorre em grande intensidade, as condições de cultivo dos tripanosomatídeos foram padronizadas de forma que a coleta das células fosse feita nesta fase.

Analisando a influência da temperatura sobre a síntese proteica, observa-se que de um modo geral ocorre uma inibição na síntese de proteínas com o aumento da temperatura conforme é demonstrado através das cinéticas de incorporação de precursor radioativo em proteínas.

Entretanto, para os tripanosomatídeos analisados (figuras 2A, 2B e 2C) pode ser observado que o aumento de temperatura de 28°C para 37°C praticamente não altera a eficiência de incor-

poração de leucina em proteínas, o que está de acordo com os perfis eletroforéticos dos géis unidimensionais apresentados nas figuras 3, 4 e 5.

Observa-se que a 37°C, além de sintetizar as PCTs, os tripanosomatídeos em questão sintetizam também grande quantidade das proteínas de 28°C. Tal resultado está de acordo com o fato desses tripanosomatídeos serem capazes de se dividir a essa temperatura. Dos três microrganismos estudados, o H. samuelpeessoai apresenta alta taxa de síntese proteica também a 40°C, o que indica ser esse tripanosomatídeo o mais termofílico dos três.

Segundo Ashburner e Bonner (1979), o estabelecimento da resposta ao choque térmico envolve aumento ou indução da síntese das PCTs com simultânea diminuição e/ou inibição da síntese da maioria das proteínas celulares sintetizadas na temperatura normal de crescimento. O mesmo pode ser observado para os três tripanosomatídeos estudados.

A tabela 3, mostra polipeptídeos de choque térmico de diversos organismos. Como os polipeptídeos tiveram seus pesos moleculares calculados através de PAGE-SDS e neste método variações na estimativa de até alguns milhares de Daltons podem ocorrer, cuidados devem ser tomados na sua comparação.

Um fato que chama a atenção nos tripanosomatídeos é a

ORGANISMO ANALISADO	PCTs DETECTADOS (Kd)
<u>Crithidia brasiliensis</u> (este trabalho)	103, 94, 89, 76, 73, 65, 55, 46, 42, 28 e 23
<u>Herpetomonas samuelpessoai</u> (este trabalho)	103, 94, 85, 76 e 65
<u>Trypanosoma cruzi</u> (Y) (este trabalho)	89, 83, 76, 63, 41 e 39
<u>Trypanosoma cruzi</u> (Cl) (Carvalho et.al., 1986)	103, 92, 76 e 61
<u>Tetrahymena pyriformis</u> (Finck e Zeuthen, 1980)	96, 92, 79-73, 52 e 27
<u>Dictyostelium discoideum</u> (Loomis e Wheeler, 1980)	82, 70, 60, 43 e 30
<u>Achlya</u> sp (fungo) (Silver et.al., 1982)	96, 85, 74, 70, 43 e 28-23
<u>Drosophila melanogaster</u> (Ashburner e Bonner, 1979)	83, 70, 68, 36, 27, 26, 23 e 22
<u>Plantas</u> (Kimpel e Key, 1985)	110-90, 90-80, 75-68, 27, 24, 21 e 18-15
<u>Humanos</u> (célula HeLa) (Welch et.al., 1982)	110, 100, 90, 80, 73 e 72

TABELA 3: Polipeptídeos de choque térmico de vários organismos.

presença de um polipeptídeo de 103 Kd (nº 1 na tabela 2) que embora não tenha sido detectado até o momento na cepa Y, foi descrito por Carvalho et.al. (1986). Polipeptídeos maiores que 100 Kd também foram descritos em humanos e plantas.

Recentemente Van der Ploeg et.al. (1985) demonstraram a existência, em Trypanosoma brucei e Leishmania major de sequência de DNA com homologia aos genes das proteínas PCT 83 e PCT 70 de Drosophila melanogaster. Polipeptídeos de números 3 e 4 (tabela 2) poderiam representar os PCTs dos tripanosomatídeos correspondentes ao PCT 83 da mosca da fruta enquanto os de números 6 e 7 poderiam corresponder ao PCT 70. Experimentos adicionais de análise de determinantes antigênicos ou de clonagem molecular dos genes respectivos e seus sequenciamentos serão necessários para estabelecer essas relações definitivamente.

As pequenas proteínas de choque térmico (pPCT) que têm suas expressões também reguladas pelo desenvolvimento em D. melanogaster não tem a sua distribuição tão universal como por exemplo a PCT 70 (vide tabela 3). Nos tripanosomatídeos estudados, os pPCTs foram detectados somente em C. brasiliensis (polipeptídeos nº 15 e 16 - tabela 2). Experimentos adicionais como os sugeridos no parágrafo anterior necessitam ser realizados para se verificar ou não, a existência de homologia entre os polipeptídeos de C. brasiliensis e os da mosca da fruta.

Analisando comparativamente as PCTs dos tripanosomatí-

deos (figuras 7, 8, 9 e tabela 2), observa-se que o padrão dos PCTs de H. samuelpeessoai é muito semelhante ao padrão das PCTs de maior peso molecular de C. brasiliensis, havendo semelhança inclusive a nível de pI (vide PCTs de números 1, 2, 3, 4, 6 e 8 das figuras 7 e 8). O T. cruzi dos três tripanosomatídeos é o que apresenta o padrão de PCTs mais simples onde os PCTs de números 3, 6 e 9 apresentam semelhanças a nível de peso molecular e pI como os PCTs de números 3-4, 6 e 8 respectivamente, de C. brasiliensis e H. samuelpeessoai. Embora a RCT apresente parâmetros que são altamente conservados em espécies mesmo extremamente divergentes na evolução, pode-se observar um quadro geral de maiores semelhanças no padrão de PCTs dos tripanosomatídeos C. brasiliensis e H. samuelpeessoai que evolutivamente estão mais relacionados.

O PCT 76 que pode ser detectado nos três tripanosomatídeos é o mais abundantemente sintetizado após o choque térmico em C. brasiliensis e H. samuelpeessoai enquanto em T. cruzi o mais abundantemente sintetizado é o PCT 89.

Os resultados apresentados neste trabalho com respeito a velocidade de indução da RCT e da recuperação do estado normal para C. brasiliensis, estão em concordância com o descrito por Lewis et.al. (1975) para D. melanogaster, que sugerem um caráter homeostático para a RCT sendo a rapidez da sua indução bem como o processo gradual da recuperação boas evidências desta natureza.

Os tripanosomatídeos heteroxênicos, que durante o seu ciclo de vida infectam hospedeiros homeotérmicos, são submetidos durante a infecção a um estresse térmico. Por isso seria de valor adaptativo a esses microrganismos, que durante a diferenciação celular para a forma infectante também, ocorresse a expressão de alguns genes capazes de lhes conferir proteção contra os danos do estresse térmico.

Observando-se o trabalho de Contreras et.al. (1985), onde analisa-se, através de eletroforese bidimensional em gel, polipeptídeos da forma tripomastigotas de T. cruzi produzidas "in vitro" por estresse nutricional, pode-se detectar polipeptídeos (86 Kd, pI~5,0 - 5,4) e (64 Kd, pI~5,6) que poderiam corresponder aos PCTs (89 Kd, pI~5,2) e (63 Kd, pI~5,6) de T. cruzi, epimastigota. Caso essa correspondência sugerida venha a ser demonstrada verdadeira, poder-se-ia dizer que a metaciclogênese de T. cruzi seria acompanhada também da expressão de genes de choque térmico o que poderia garantir uma maior adaptação do microrganismo no hospedeiro homeotérmico.

Dando continuidade ao trabalho apresentado pretende-se:

- estudar o efeito de outros estresses em tripanosomatídeos;
- verificar se o estresse nutricional que induz a diferenciação celular (epi - tripo) em T. cruzi também induz a síntese de alguns dos PCTs; e
- isolar os principais genes de PCTs com o objetivo de estudar as suas regulações.

RESUMO

As respostas ao estresse térmico de três tripanosomatídeos Criethidia brasiliensis, Herpetomonas samuelpessoai e Trypanosoma cruzi, foram analisadas.

Observou-se que com o aumento da temperatura há uma diminuição da síntese proteica total, porém, a síntese de alguns polipeptídeos é aumentada ou induzida nos tripanosomatídeos estudados.

Foi possível identificar que o padrão de polipeptídeos de choque térmico de C. brasiliensis nas condições experimentais utilizadas é mais complexo que os dos outros tripanosomatídeos estudados, embora o padrão de polipeptídeos de choque térmico de alto peso molecular (maior do que 60 Kd) de C. brasiliensis seja muito similar ao de H. samuelpessoai.

Observou-se também nos três tripanosomatídeos, polipeptídeos de choque térmico de 90-80 Kd e de 76 Kd que poderiam corresponder aos polipeptídeos de choque térmico de 83 Kd e 70 Kd descritos em Drosophila melanogaster e que também foram observados em diversos outros tipos de organismos.

SUMMARY

The heat shock responses of the three Trypanosomatids Crithidia brasiliensis, Herpetomonas samuelpessoai and Trypanosoma cruzi were analysed.

It was observed that with increasing temperature a decrease in total protein synthesis occurs, although the synthesis of some polypeptides increases in all the trypanosomatids studied.

It was possible to establish that the pattern of heat shock polypeptides of C. brasiliensis in experimental conditions is more complex than that of the other two trypanosomatids studied, although the pattern of heat shock polypeptides of high molecular weight (more than 60 Kd) of C. brasiliensis is very similar to H. samuelpessoai.

For all the three trypanosomatids, heat shock polypeptides of 80-90 Kd and 76 Kd were detected. These polypeptides may correspond to the 83 Kd and 70 Kd heat shock polypeptides described for Drosophila melanogaster and other different organisms.

BIBLIOGRAFIA

Ashburner, M. and Bonner, J.J. (1979). The Induction of Gene Activity in Drosophila by Heat Shock. Cell. 17: 241-254.

Azevedo, M.O., Sã, C.M., Pereira, I.S. e Astolfi Filho, S. (1983). Análise do Processo de Síntese Proteica em Célula Epimastigota de Trypanosoma Cruzi submetidas a "Heat Shock". Programa e Resumos das Comunicações (BQ 04). X Reunião Anual - Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú MG, 8-10 de novembro.

Ayme, A., Southgate, R. and Tissieris, A. (1985). Nuclotide Sequences Responsible for the Thermal Inducibility of the Drosophila Small Heat Shock Proteins Genes in Monkey COS Cells. J. Mol. Biol. 182: 469-475.

Ballinger, D. G. and Pardue, M.L. (1983). The Control of Protein Synthesis During Heat Shock in Drosophila Cells Involves Altered Polypeptide Elongation Rates. Cell. 33: 103-114.

Bardwell, J.C.A. and Craig, E.A. (1984). Major Heat Shock Gene of Drosophila and Escherichia coli inducible dna K Gene are Homologous. PNAS. 81: 848-852.

Baszczynski, C.L. and Walden, D.B. (1983). Regulation of Gene Expression in Corn (Zea Mays L.) by Heat Shock. II. in Vitro Analysis of RNAs from Heat-Shocked Seedlings. Can. J. Biochem. Cell Biol. 61 (6): 395-403.

Bensaude, O., Babinet, C., Morange, M. and Jacob, F. (1983). Heat Shock Proteins, First Major Products of Zygotic Gene Activity in Mouse Embryo. *Nature (London)* 305: 331-333.

Bensaude, O. and Morange, M. (1984). A quoi Servent Les Proteines de Choc Thermique. *La Recherche* 15 (161): 1589-1590.

Bienz, M. and Gurdon, J.B. (1982). The Heat Shock Response in Xenopus Oocytes is Controlled at the Translational Level. *Cell*. 29: 811-819.

Bienz, M. (1984). Developmental Control of the Heat Shock Response in Xenopus. *PNAS*. 81: 3138-3142.

Bienz, M. (1985). Transient and Developmental Activation of Heat-Shock Genes. *Tibs*, April, 157-161.

Biessman, H. Falkner, F.G., Saumweber, H. and Walter, M.F. (1982). Disruption of the Vimentin Cytoskeleton May Play a Role In Heat Shock Response. *Heat Shock From Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 275-281.

Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974). A Film Detection Method for Tritium-Labelled Proteins and Nucleic Acids in Polyacrylamide Gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88.

Burdon, R.H. (1982). The Human Heat Shock Proteins: Their Induction and Possible Intracellular Functions. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 283-288.

Camargo, E.P. (1964). Growth and Differentiation in Trypanosoma cruzi. I. Origin of Metacyclic Trypanosomas in Liquid Media. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 6: 93-100.

Carvalho, E.F., Carvalho, J.F., Rondinelli, E., Neto; R.S.M., Silva, R. e Castro, F.T. (1984a). Efeito da Temperatura no Controle da Expressão Gênica em T. cruzi. Programa e Resumos das Comunicações (BQ. 36, pp 80). XI Reunião Anual - Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú - MG, 20 a 22 de novembro.

Carvalho, J.F., Carvalho, E.F., Rondinelli E., Neto, R.S.M., Silva, R. e Castro, F.T. (1984b). Alterações do Padrão Proteico de T. cruzi em Condições que Mimetizam Etapas do Ciclo Biológico do Organismo. Programa e Resumos das Comunicações (BQ. 37, pp 81). XI Reunião Anual - Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú - MG, 20 a 22 novembro.

Carvalho, J.F., Carvalho, E.F., Rondinelli, E., Silva, R. and Castro, F.T. (1986). Macromolecular Changes in Trypanosoma cruzi Induced by Supra-Optimal Temperature and Serum. (Submetido a Exp. Cell. Res.).

Cohen, R.S. and Meselson, M. (1985). Separate Regulatory Elements For the Heat-Inducible and Ovarian Expression of the Drosophila hsp 26 gene. Cell. 43: 737-746.

Collatz, E., Plesset, J. Foy, J.J. and McLaughlin, C.S. (1985). Expression of the Drosophila 70000 Dalton Heat Shock Protein is Translationally Controlled in Yeast. Yeast. 1: 49-56.

Contreras, V.T., Morel, C.M. and Goldenberg, S. (1985). Stage Specific Gene Expression Precedes Morphological Changes During Trypanosoma cruzi Metacyclogenesis. Mol. and Biochem. Parasitol. 14: 83-96.

Corces, V., Pellicer, A., Axel, R. and Meselson, M. (1981). Integration, Transcription and Control of a Drosophila Heat Shock Gene in Mouse Cells. PNAS. 78(11): 7038-7042.

Corces, V., Pellicer, A., Axel, R., Mei, S.Y. and Meselson, M. (1982). Aproximate Localization of Sequences Controlling Transcription of a Drosophila Heat Shock Gene. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 27-34.

Craig, E., Ingolia, T., Slater, M., Manseau, L. and Bardwell, J. (1982). Drosophila, Yeast and E. coli Gene Related the Drosophila Heat Shock Genes. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 11-18.

DiDomenico, B.J., Bugaisky, G.E. and Lindquist, S. (1982a). Heat Shock and Recovery are Mediated by Different Translational Mechanisms. PNAS. 79: 6181-6185.

DiDomenico, B.J., Bugaisky, G.E. and Lindquist, S. (1982 b). The Heat Shock Response is Self-Regulated at Both the Transcriptional and Postranscriptional Levels. Cell. 31: 593-603.

Dudler, R. and Travers, A.A. (1984). Upstream Elements Necessary for Optimal Function of the hsp 70 Promoter in Transformed Flies. Cell. 38: 391-398.

Fink, K. and Zeuthen, E. (1980). Heat Shock Proteins in Tetrahymena Studied Under Growth Conditions. Exp. Cell. Res. 128: 23-30.

Finkelstein, D.B., Strausberg, S. and McAlister, L. (1982). Alterations of Transcription During Heat Shock of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 257: 8405-8411.

Gerner, E.W. and Schneider, M.J. (1975). Induced Thermal Resistance in HeLa Cells. Nature. 256: 500-502.

Hickey, E. and Weber, L. A. (1982). Preferential Translation of Heat Shock mRNAs in HeLa Cells. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 199-206.

Hunt, T. and Jackson, R.J. (1974). Modern Trends in Human Leukaemia (Neth, R., Gallo, R.C., Spiegelman, S., Stohlman, F., EDS). pp. 300-307. J.F. Leuhmanns Verlag, Munich.

Ingolia, T.D. and Craig, E.A. (1982). Drosophila Gene Related to the Major Heat Shock Induced Gene is Transcribed at Normal Temperature and Not Induced by Heat Shock. PNAS. 79: 525-529.

Kelley, P.M. and Schlesinger, M.J. (1982). Antibodies to Two Major Chicken Heat Shock Proteins Cross-react with Similar Proteins in Widely Divergent Species. Mol. Cell. Biol. 2: 267-274.

Key, J.L., Lin. C. Y., Ceglaz, E. and Schoffl, F. (1982). The Heat Shock Response in Plants: Physiological Considerations. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor, Lab., pp. 329-336.

Kimpel, J.A. and Key, J.L. (1985). Heat Shock in Plants. Tibs, september, 353-357.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680.

Landry, J., Bernier, D., Chrétien, P., Nicole, L.M., Tanguay, R.M. and Marceau, N. (1982). Synthesis and Degradation of Heat Shock Proteins During Development and Decay of Thermotolerance. *Cancer Research*. 42: 2457-2461.

Laszlo, A. and Li, G. C. (1985). Heat-Resistance Variants of Chinese Fibroblasts Altered in Expression of Heat Shock Protein. *PNAS*. 82: 8029-8033.

Lawson, R., Mestril, R., Luo, Y. and Voellmy, R. (1985). Ecdysterone Selectivity Stimulates the Expression of a 23000 - Da Heat Shock Protein - B - Galactosidase Hybrid Gene in Cultured Drosophila Cells. *Dev. Biol.* 110: 321-330.

Lewis, M., Helmsing, P.J. and Ashburner, M. (1975). Parallel Changes in Puffing Activity and Patterns of Proteins Synthesis in Salivary Glands of Drosophila. *PNAS*. 72: 3604-3608.

Li, G.C., Shrieve, D.C. and Werb, Z. (1982). Correlations Between Synthesis of Heat Shock Proteins and Development of Tolerance to Heat and to Adriamycin in Chinese Hamster Fibroblasts: Heat Shock and Others Inducers. *Heat Shock From Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 395-404.

Li, G.C. and Werber, Z. (1982). Correlation Between Synthesis of Heat Shock Proteins and Development of Thermotolerance in Chinese Hamster Fibroblasts. *PNAS*. 79: 3218-3222.

Li, G.C. (1983). Induction of Thermotolerance and Enhanced Heat Shock Protein Synthesis in Chinese Hamster Fibroblasts by Sodium Arsenite and By Ethanol. *J. Cell. Physiol* 115: 116-122.

Lindquist, S. (1980a). Translational Efficiency of Heat-Induced Messages in Drosophila melanogaster Cells. *J. Mol. Biol.* 137: 151-158.

Lindquist, S. (1980b). Varying Patterns of Protein Synthesis in Drosophila During Heat Shock: Implications For Regulation. *Dev. Biol.* 77: 463-479.

Lindquist, S. (1981). Regulation of Protein Synthesis During Heat Shock. *Nature.* 293: 311-314.

Lindquist, S., DiDomenico, B., Bugaisky, G. Kurtz, S. Petko, L. and Sonoda, S. (1982). Regulation of Heat Shock Response in Drosophila and Yeast. *Heat Shock from Bacteria to Man.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. pp. 167-175.

Loomis, W.F. and Wheeler, S. (1980). Heat Shock Response of Dictyostelium. *Dev. Biol.* 79: 399-408.

Loomis, W.F. and Wheeler, S. (1982a). The Physiological Role of Heat Shock Proteins in Dictyostelium. *Heat Shock From Bacteria to Man.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold, Spring Harbor Lab., pp. 353-359.

Loomis, W.F. and Wheeler, S.A. (1982b). Chromatin-Associated Heat Shock Proteins of Dictyostelium. Dev. Biol. 90: 412-418.

Lowe, D.G. and Moran, L.A. (1984). Proteins Related to the Mouse L-Cell Major Heat Shock Protein are Synthesized in the Absence of Heat Shock Gene Expression. PNAS. 81: 2317-2321.

McKenzie, S.L., Henikoff, S.M. and Meselson, M. (1975). Localization of RNA From Heat-Induced Polysomes at Puff Sites in Drosophila melanogaster PNAS. 72: 1117-1121.

McKenzie, S.L. and Meselson, M. (1977). Translation in Vitro of Drosophila Heat Shock Messages. J. Mol. Biol. 117: 279-283.

Mirault, M.E., Delwart, E. and Southgate, R. (1982). A DNA Sequence Upstream of Drosophila hsp 70 Gene is Essential For Their Heat Induction in Monkey Cells. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 35-42.

Neidhardt, F.C. Van Bogelen, R.A. and Vaughn, V. (1984). The Genetics and Regulation of Heat Shock Proteins. Ann. Rev. Genet. 18: 295-329.

O'Farrell, P.H. (1975). High Resolution Two Dimensional Electrophoresis of Protein. J. Biol. Chem 250 (10): 4007-4021.

Pelham, H. and Bienz, M. (1982). DNA Sequences Required for Transcriptional Regulation of Drosophila hsp 70 Heat Shock Gene in Monkey Cells and Xenopus Oocytes. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 43-48.

Ritossa, F. (1962). A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in Drosophila. Experimentia. 18: 571-573.

Roitman, I., Brener, Z., Roitman, C. and Kitajima, E.W. (1976). Demonstration that Leptomonas pessoai Galvão, Oliveira, Carvalho and Veiga, 1970, is a Herpetomonas. J. Protozool. 23 (2): 291-293.

Sã, M.F.G., Sã, C.M., Veronese, M.A., Astolfi Filho, S. and Gander, E.S. (1980). Morphologic and Biochemical Characterization of Crithidea brasiliensis sp. J. Protozool. 27 (3): 253-257.

Schlesinger, M.J., Ashburner, M., Tissieris, A. (1982). Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. 440 pp.

Schlesinger, M.J., Kelley, P.M., Aliperti, G. and Malfer, C. (1982a). Properties of Three Major Chicken Heat Shock Proteins and Their Antibodies. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 243-250.

Silva, H.P. and Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma Cepa de Trypanosoma cruzi Altamente Virulenta para Camundongo Branco. *Fol. Clin. et Biol.* 20: 191.

Silver, J.C., Andrews, D.R. and Pekkala, D. (1982). Effect of Heat Shock on Synthesis and Phosphorylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins in the Fungus Achlya. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61: 447-455.

Singh, M.K. and Yu, J. (1984). Accumulation of a Heat Shock-Like Protein During Differentiation of Human Erythroid Cell Line K 562. *Nature (London)*. 309: 631-633.

Shouthgate, R., Ayme, a. and Voellmy, R. (1983). Nucleotide Sequence Analysis of the Drosophila Small Heat Shock Gene Cluster at Locus 67B. *J. Mol. Biol.* 165: 35-57.

Subjeck, J.R. and Sciandra J.J. (1982). Co-expression of Thermotolerancia and Heat Shock Proteins in Mammalian Cells. *Heat Shock From Bacteria to Man*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., pp. 405-411.

Tanguay, R.M. (1983). Genetic Regulation During Heat Shock and Function of the Heat Shock Proteins: A Review. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61: 387-394.

Tissieris, A. Mitchell, H.K. and Tracy, U.M. (1974). Protein Synthesis in Salivary Glands of Drosophila melanogaster: Relation to Chromosome Puffs. J. Mol. Biol. 84: 389-398.

Topol, J. Ruden, D.M. and Parker, C.S. (1985). Sequences Required for in Vitro Transcriptional Activation of a Drosophila hsp 70 Gene. Cell. 42: 527-537.

Van Der Ploeg, L.H.T., Gianini, S.N. and Cantor, C.R. (1985). Heat Shock Genes: Regulatory Role for Differentiation in Parasitic Protozoa. Science. 286: 1443-1446.

Velazquez, J.M. and Lindquist, S. (1984). hsp 70. Nuclear Concentration During Environmental Stress and Cytoplasmic Storage During Recovery. Cell. 36: 655-662.

Vincent, M. and Tanguay, R.H. (1982). Different Intracellular Distributions of Heat Shock and Arsenite-Induced Proteins in Drosophila Kc Cells. J. Mol. Biol. 162: 365-378.

Vitek, M.P. and Berger, E.M. (1984). Steroid and High-Temperature Induction of the Small Protein Genes in Drosophila. J. Mol. Biol. 178: 173-189.

Welch, W.J. Garrels, J.I. and Feramisco, J.R. (1982). The Mammalian Stress Proteins. Heat Shock From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor, Lab. pp. 357-366.

Wu, B.J., Kington, R.E. and Morimoto, R.I. (1986). Human HSP70 Promoter Contains at Least Two Distinct Regulatory Domains. PNAS. 83: 629-633.

Yamamori, T. and Yura, T. (1980). Temperature-Induced Synthesis of Specific Proteins in Escherichia coli: Evidence for Transcriptional Control. J. Bacteriol. 142: 843-851.