

JOSIANE CARDOSO

**ANÁLISE DO PAPEL BIOLÓGICO DOS PROTEOSSOMOS
DURANTE A METACICLOGÊNESE *IN VITRO* DO
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada à coordenação
do curso de Biologia Celular e Molecular
da Universidade Federal do Paraná,
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marco A. Krieger

Curitiba 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Análise do papel biológico dos proteossomos durante
a metaciclogênese *in vitro* do *Trypanosoma cruzi***

JOSIANE CARDOSO

Tese apresentada a Universidade Federal do Paraná como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Março, 2010

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao meu orientador, Dr. Marco Aurélio Krieger pela confiança, orientação e apoio.

À Prof. Dra. Vanessa Santos Sotomaior, pela generosidade, colaboração e amizade, pois foi quem deu início a esta pesquisa no ICC.

À Mestre Carla Vanessa de Paula Lima, pela amizade, e toda ajuda no decorrer deste projeto.

À Dra. Renata Guerra de Sá, que com seu exemplo, fez despertar em mim o verdadeiro entusiasmo pela ciência e o conhecimento.

Ao Dr. Maurílio José Soares, pela colaboração, paciência e conselhos oferecidos no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, diretor do ICC, pelo apoio e pela oportunidade de desenvolver minha dissertação nesta instituição.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os amigos do Instituto Carlos Chagas que colaboraram direta ou indiretamente com este projeto.

Ao meu esposo e filho pela enorme colaboração, amor, paciência e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Dedico a minha família Marcelo e Heitor.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O TRYPANOSOMA CRUZI E A DOENÇA DE CHAGAS.....	1
1.2 CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	3
1.3 ASPECTOS CELULARES DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	6
1.4 GENOMA E EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.5 A DEGRADAÇÃO PROTEÍCA E O PROTEOSSOMO	11
1.5.1 Proteossomo 20S	12
1.5.2 Proteossomo 26S	14
1.5.3 Degradação pelos proteossomos	15
1.5.4 Complexos reguladores do proteossomo 20S	17
1.5.5 Proteossomos híbridos	21
1.5.6 Proteossomo- <i>like</i> (HsLVU).....	22
1.5.7 Complexidade da via de degradação de proteínas pelos proteossomos	23
1.6 O PROTEOSSOMO DE PROTOZOÁRIOS PARASITAS	24
1.7 LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DOS PROTEOSSOMOS	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 AVALIAR O EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEOSSOMO DURANTE A METACICLOGÊNSE <i>IN VITRO</i>	29
2.2 AVALIAR A DEGRADAÇÃO PROTEOSSOMAL DURANTE A METACICLOGÊNSE <i>IN VITRO</i>	29
2.3 AVALIAR AS PROTEÍNAS PROTEOSSOMAS DURANTE A METACICLOGÊNSE <i>IN VITRO</i>	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 PROCEDÊNCIAS DOS REAGENTES	31
3.2 MEIOS DE CULTURA.....	32
3.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	33
3.4 ORGANISMOS	35
3.5 METACICLOGÊNSE DO TRYPANOSOMA CRUZI.....	35
3.5.1 Preparação dos epimastigotas	36
3.5.2 Estresse nutricional.....	36
3.5.3 Início da diferenciação e obtenção de epimastigotas aderidos 12 e 24 horas.....	36
3.5.4 Obtenção de tripomastigotas metacíclicos	37
3.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>T. CRUZI</i>	37
3.7 ELETROFORESE DE DNA.....	38
3.8 AVALIAÇÕES DO CRESCIMENTO E METACICLOGÊNSE DE <i>T. CRUZI</i> COM O USO DOS INIBIDORES ESPECÍFICOS DE PROTEOSSOMO	38
3.8.1 Inibição do crescimento de <i>T. cruzi</i>	38
3.8.2 Inibição da metaciclogênese	39
3.8.3 Avaliação dos parasitas através de microscopia óptica	39
3.8.4 Avaliação dos parasitas através microscopia eletrônica de transmissão (MET).	40
3.8.5 Avaliação do conteúdo de DNA dos parasitas por citometria de fluxo	41
3.9.1 Preparação de fração enriquecida de proteossomo	42
3.9.2 SDS-PAGE e ensaios de <i>Western Blot</i> para detecção do proteossomo 20S nas frações enriquecidas	42
3.9.3 Atividade enzimática do proteossomo em gel não-desnaturante	43
3.9.4 Medida da atividade proteossomal frente a peptídeos exógenos.....	43

3.9.5	Medida da atividade proteossomal endógena dependente de ubiquitina e ATP – 26S	44
3.9.6	<i>Western blot</i> do ensaio proteolítico endógeno	45
3.9.7	Deteção de ubiquitina livre	45
3.9.10	Validação estatística dos ensaios de proteólise	46
3.10.	ANÁLISE DO PERFIL DE UBIQUITINAÇÃO	46
3.11.	DETECÇÃO DE GRUPAMENTOS CARBONIL	48
3.12	ANÁLISE DOS COMPONENTES DO PROTEOSSOMO	49
3.12.1	Vetores plasmidiais para clonagem e expressão em <i>E. coli</i>	49
3.12.2	Identificação do regulador de proteossomo PA26, ubiquitina e proteossomo- <i>like</i> (HslV e HslU ATPase)	50
3.12.3	Desenho de iniciadores e amplificação	50
3.12.4.	Purificação dos produtos de amplificação	51
3.12.5	Recombinação dos produtos de amplificação	52
3.12.6	Preparo de células cálcio competentes	52
3.12.7	Transformação de pDNORTM221 contendo os insertos por choque térmico em DH5 α	53
3.12.8	Seleção dos clones recombinantes	53
3.12.9.	Preparação de plasmídeo em pequena escala (miniprep)	54
3.12.10	Recombinação com pDESTTM17 e transformação	54
3.12.11	Produção das proteínas recombinantes em BL21	55
3.12.12	Coloração por Coomassie Blue	56
3.12.13	Purificação das proteínas em resina de níquel NiNTA-Agarose	56
3.12.14	Purificação das proteínas por eletroeluição	57
3.12.15	Produção de anticorpos policlonais	57
3.12.16	Análise na expressão relativa das proteínas dos componentes do proteossomo por <i>Western blot</i>	58
3.12.17	Imunolocalização dos componentes do proteossomo	59
4	RESULTADOS	61
4.1	INIBIÇÃO DO PROTEOSSOMO E AVALIAÇÃO CELULAR	61
4.1.1	Tratamento com o inibidor específico de proteossomo lactacistina bloqueia o crescimento de <i>T. cruzi</i>	62
4.1.2	A metaciclologênese é bloqueada com a inibição do proteossomo	63
4.1.3	Lactacistina inibe aproximadamente 95% da metaciclologênese	65
4.1.4	Parasitas tratados com lactacistina aderem-se ao fundo da garrafa, mas não se diferenciam	66
4.1.5	Tratamento com o inibidor específico de proteossomo lactacistina causa alterações morfológicas nos parasitas	69
4.1.6	A inibição do proteossomo altera o ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	73
4.2	AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE MEDIADA PELO PROTEOSSOMO	76
4.2.1	Presença de proteossomos ativos nas frações enriquecidas	76
4.2.2	Determinação de atividades proteossomais durante a metaciclologênese	78
4.2.3	Ubiquitina e ATP não estimulam atividade proteossomal endógena (26S)	80
4.2.4	O perfil de ubiquitinação se mantém constante durante a metaciclologênese	84
4.2.5	O perfil de proteínas oxidadas apresenta grandes variações durante a metaciclologênese	85
4.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DAS PROTEÍNAS DOS COMPONENTES DO PROTEOSSOMO DURANTE A METACICLOGÊNESE	87
4.3.1	Desenhos dos oligoiniciadores (<i>Primers</i>)	87
4.3.2	Expressão e purificação da proteína ubiquitina	89
4.3.3	Expressão e purificação das proteínas PA26, HslV e HslU-ATPase	90
4.3.4	Produção dos anticorpos policlonais	92
4.3.5	Análise da expressão relativa das proteínas PA26, HslV, HslU ATPase, Rpn7, Rpn10, alfa-7 e ubiquitina durante a metaciclologênese <i>in vitro</i> de <i>T. cruzi</i>	93
4.3.6	Ensaio de localização celular	97
5	DISCUSSÃO	107
5.1.	AVALIAÇÃO CELULAR DA METACICLOGÊNESE COM O USO DE INIBIDORES DE PROTEOSSOMO	107

5.2. AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE MEDIADA PELO PROTEOSSOMO	111
5.3. LOCALIZAÇÃO CELULAR DOS PROTEOSSOMOS	116
6 CONCLUSÕES.....	122
6.1. Efeito da inibição do proteossomo de <i>T. cruzi</i>	122
6.2. Degradação proteossomal durante a metaciclogênese de <i>T. cruzi</i>	122
6.3. Expressão relativa das proteínas proteossomais durante a metaciclogênese de <i>T. cruzi</i>	123
7 PERPECTIVAS.....	125
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
9 ANEXO	137

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila
ATP: adenosina tri-fosfato
BSA: albumina bovina sérica (bovine serum albumine)
DEPC: dietil pirocarbonato
Dm: *Didelphis marsupialis*
DMP: dimethyl pimelimidate
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucléico
DNase: desoxirribonuclease
dNTP: desoxiribonucleosídeo trifosfato
dsRNA: RNA dupla-fita
DTT: Ditioneitol
DUB: enzima desubiquitinadora
EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético
E1: enzima ativadora de ubiquitina
E2: enzima conjugadora de ubiquitina
E3: enzima ubiquitina ligase
g: aceleração da gravidade
HslV: *heat shock locus V*
HslU: *heat shock locus U*
IAA: Iodoacetamida
Ig: Imunoglobulina
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactosídeo
kb: 1000 nucleotídeos em RNA ou 1000 pares nucleotídeos em DNA
kDa: quilo Dalton
kDNA: DNA do cinetoplasto
LB: Luria-Bertani
LIT: *liver infusion tryptose*
M: Molar
mRNA: RNA mensageiro
MHC: *major histocompatibility complex*
Ni-NTA: *nickel-nitrilotriacetic acid*

OD: densidade ótica
PA: *proteasome activator*
pb: pares de bases
PBS: tampão fosfato
PCR: reação em cadeia pela polimerase
PI: *proteasome inhibitor*
RNA: ácido ribonucléico
RNase: ribonuclease
SDS-PAGE: do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SDS: sódio dodecil sulfato
SL-RNA: do inglês, *spliced leader RNA*
SSC: *standard saline-citrate*
T.A.: Tampão de amostra para proteínas
TAU: *triatomine artificial urine*
TFA: ácido trifluoroacético
TIGR: *The Institute of Genome Research*
Tris: hidroximetil aminometano
Ub: ubiquitina
UTR: *untranslated region*; região não traduzida

Neste texto, empregamos termos estrangeiros para definir estruturas, processos moleculares, métodos, reagentes, entre outros. Mantivemos nesses casos sua denominação original por não existir um glossário em português para estes termos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo de vida do T. cruzi.....	5
Figura 1.2 Esquema geral da forma epimastigota do T. cruzi mostrando suas principais estruturas celulares	7
Figura 1.3 Esquema do proteossomo 26S.....	18
Figura 3.1 Desenho dos vetores de clonagem e expressão em E. coli.....	49
Figura 4.1 Efeito de lactacistina no crescimento de formas epimastigotas de T. cruzi.	62
Figura 4.2 Efeito de tratamento com diferentes concentrações dos inibidores específicos de proteossomo	64
Figura 4.3 Os inibidores de proteossomo PSI, MG132 e lactacistina bloqueiam a metaciclo gênese.....	65
Figura 4.4 Porcentagem de diferenciação em meio TAU3AAG.	66
Figura 4.5 Análise por microscopia óptica dos epimastigotas.	68
Figura 4.6 Microscopia eletrônica de transmissão de T. cruzi.	70
Figura 4.7 Microscopia eletrônica de transmissão de T. cruzi.	72
Figura 4.8 Análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA em T. cruzi.	74
Figura 4.9 Análise do conteúdo de DNA em T. cruzi.	75
Figura 4.10 Presença de proteossomos em frações enriquecidas.....	77
Figura 4.11 Perfil da atividade proteolítica 20S durante a metaciclo gênese.....	79
Figura 4.12 Adição de ATP e ubiquitina não estimulam a atividade proteossomal durante a metaciclo gênese in vitro de T. cruzi.	82
Figura 4.13 Perfil dos conjugados ubiquitinados durante a metaciclo gênese.....	85
Figura 4.14 Detecção de grupamentos carbonil.	86
Figura 4.15 Seqüência nucleotídica da ubiquitina de T. cruzi.	87
Figura 4.16 Expressão e purificação da proteína recombinante ubiquitina.....	89
Figura 4.17 Expressão e purificação da proteína recombinante PA26.....	91
Figura 4.18 Expressão e purificação das proteínas recombinantes HslU-ATPase e HslV.	91
Figura 4.19 Teste de soro pré-imune.....	92
Figura 4.20 Análise do padrão de expressão das proteínas RPN 7, RPN10 e alfa-7 durante a metaciclo gênese de T. cruzi.	94
Figura 4.21 Análise do padrão de expressão relativa da proteína PA26 durante a metaciclo gênese de T. cruzi.....	95
Figura 4.22 Análise do padrão de expressão relativa da proteína HslV durante a metaciclo gênese de T. cruzi.....	95
Figura 4.23 Análise do padrão de expressão relativa da proteína HslU ATPase durante a metaciclo gênese de T. cruzi.....	96
Figura 4.24 Análise do padrão de expressão relativa da proteína ubiquitina durante a metaciclo gênese de T. cruzi.....	97
Figura 4.25 Imunolocalização da proteína Alfa-7 em epimastigotas.	98

Figura 4.26 Imunolocalização da proteína Alfa-7 em tripomastigotas metacíclicos.....	99
Figura 4.27 Imunolocalização da proteína Rpn10 em epimastigotas.....	100
Figura 4.28 Imunolocalização da proteína Rpn10 em tripomastigotas metacíclicos.....	101
Figura 4.29 Imunolocalização da proteína PA26 em epimastigotas.....	103
Figura 4.30 Imunolocalização da proteína PA26 em tripomastigotas metacíclicos.....	104
Figura 4.31 Imunolocalização da proteína HsLV em epimastigotas.....	105
Figura 4.32 Imunolocalização da proteína HsIV em tripomastigotas metacíclicos.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Proteossomo 20S (CP do inglês “core particle”) e seus reguladores	22
Tabela 2 Seqüências adaptadoras:	51
Tabela 3 Porcentagem de células do Trypanosoma cruzi com DNA fragmentado ou nas fases G1/G2 do ciclo celular:	76
Tabela 4 Atividade proteolítica 20S durante metaciclogênese in vitro de T. cruzi.	80
Tabela 5 Atividade proteossomal endógena independente de ATP e ubiquitina.	83
Tabela 6 Nome, tamanho e primers usados para amplificar as seqüências das proteínas selecionadas para clonagem e produção de anti-soros.....	88

RESUMO

Proteossomos são complexos intracelulares responsáveis pela maior parte da degradação de proteínas em vários organismos. Neste estudo nós utilizamos diferentes abordagens para determinar a função biológica do proteossomo durante a replicação e metaciclogênese *in vitro* do *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente utilizamos inibidores específicos de proteossomo e avaliamos o efeito dos mesmos por microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo. O crescimento de culturas de *T. cruzi* foi inibido pela presença de até 10 μM de lactacistina, com CI_{50} (concentração que inibe o crescimento em 50%) de 4,35 μM , após 24 ou 72 h. A metaciclogênese *in vitro* foi fortemente (95%) inibida pelo tratamento com 5 μM lactacistina sendo a fase de adesão ao substrato não afetada, mas os epimastigotas não se diferenciaram em tripomastigotas metacíclicos. A maioria dos epimastigotas tratados apresentou inchaço da mitocôndria e uma distribuição alterada do DNA nuclear e do cinetoplasto. Além disso, tratamento com lactacistina interrompeu o ciclo celular na fase G2. Nossos resultados sugerem que a inibição da atividade de proteossomos em *T. cruzi* não bloqueia a adesão ao substrato, mas interrompe a divisão celular e afeta fatores desencadeadores de diferenciação. Analisamos também as atividades proteolíticas proteossomais durante a metaciclogênese e obtivemos evidências bioquímicas para a coexistência de degradação proteossomal ubiquitina-dependente e ubiquitina-independente. A degradação protéica não foi estimulada pela adição de ubiquitina e ATP. Não houve picos de degradação mediada pela ubiquitina, sendo observado um perfil semelhante de conjugados ubiquitinados em todas as fases de diferenciação analisadas. No entanto, houve uma variação significativa nos níveis de proteínas oxidadas em diferentes períodos durante o processo de diferenciação. Esses resultados sugerem que o proteossomo 20S pode estar atuando na degradação de proteínas oxidadas, uma vez que estas são os substratos naturais de proteólise ubiquitina-independente. O proteossomo 20S pode ser ativado por diferentes complexos (PA700 e PA26) e a ação coordenada destes permite a coexistência na célula de proteólise dependente e independente de ubiquitina. Além disso, verificamos a existência de outra espécie de proteossomo (HsIVU) envolvido na degradação de proteínas sem a participação de ubiquitina. Estes diferentes complexos estão presentes em todas as formas avaliadas ao longo da metaciclogênese. Todavia, apresentam diferentes localizações intracelulares indicando um aumento da proteólise de substratos específicos nestas localizações intracelulares.

ABSTRACT

Proteasomes are intracellular complexes that play a major role in degradation of most proteins in several organisms. In this study we have used different approaches to determine the biological function of proteasomes during replication and *in vitro* metacyclogenesis of the protozoan *Trypanosoma cruzi*. We have first used specific proteasome inhibitors and then evaluated their effect by light microscopy, transmission electron microscopy and flow cytometry. Culture growth was inhibited by the presence of up to 10 μM lactacystin, with IC_{50} (concentration that inhibits growth in 50%) of 4.35 μM , after 24 or 72 h. Metacyclogenesis *in vitro* was strongly (95%) inhibited by treatment with 5 μM lactacystin: adhesion of parasites to the substrate was not affected, but the epimastigote forms did not differentiate into metacyclic trypomastigotes. Most treated epimastigotes presented mitochondrial swelling and an altered distribution of nuclear and kinetoplast DNA. Furthermore, treatment with lactacystin interrupted the cell cycle at the G2 phase. Our results suggest that inhibition of proteasomal activity in *T. cruzi* does not block adhesion to the substrate, but blocks cell division and affects differentiation triggering factors. We have also analyzed proteasomal proteolytic activities during metacyclogenesis and we have obtained biochemical evidences for the co-existence of both ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent proteasomal degradation. Protein degradation was not stimulated by addition of ubiquitin and ATP. There were no peaks of ubiquitin-mediated degradation, being observed a similar profile of ubiquitinated conjugates during all phases of differentiation. However, there was a significant variation in the levels of oxidated proteins at different periods during the differentiation process. These results suggest that the 20S proteasome may be acting in degradation of oxidated proteins, since these are the natural substrate of ubiquitin-independent proteolysis. The 20S proteasome could be activated by different complexes (PA700 and PA26) and their coordinated action allowed the co-existence in the cell of both ubiquitin-dependent and -independent proteolysis. Furthermore, we have evidenced the existence of other proteasome species (HsIVU) involved in protein degradation with ubiquitin participation. All these different proteasomal complexes were present during the different cellular forms evaluated during the metacyclogenesis. However, they were found at different cell locations indicating an increase in proteolysis of specific substrates at these intracellular localizations.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TRYPANOSOMA CRUZI E A DOENÇA DE CHAGAS

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Este microorganismo é um parasita heteroxênico, que alterna seu ciclo de vida entre um hospedeiro invertebrado (hemípteros hematófagos da família Reduviidae, principalmente *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, conhecidos popularmente como barbeiros) e um hospedeiro vertebrado (diversos mamíferos, dentre eles o homem).

Descrito por Carlos Chagas em 1909, o *T. cruzi* foi identificado como sendo o agente causador de uma nova enfermidade, a qual passou a ser denominada de doença de Chagas. Aspectos da biologia do parasita, além da patologia e epidemiologia da doença foram detalhadamente evidenciados por Carlos Chagas. Além disso, seu trabalho estendeu-se à observação dos vetores, reservatórios silvestres e aspectos clínicos da moléstia. Deste então este organismo tem sido foco de diversos estudos, pois além de ser o agente causador da Doença de Chagas, ele pertence a um dos grupos mais antigos dos eucariotos – os Euglenozoa –, tornando-se um excelente modelo de estudo sobre parasitas e sobre evolução de organismos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 100 anos após a descoberta da doença existem cerca de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi* localizados principalmente em 18 países do continente Americano, com distribuição desde o México na América do Norte a todos os países da América Central e América do Sul (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>). Com o aumento da migração e a alta mobilidade populacional, hoje a Doença de Chagas encontra-se disseminada também fora deste seu contexto epidemiológico clássico, existindo relatos significativos de populações infectadas na América do Norte, Europa, Ásia e Oceania. Cerca de cento e vinte milhões de pessoas estão atualmente expostas ao risco de infecção. Ocorrem 21.000 mortes anualmente em decorrência da doença e 2-3 milhões de

pessoas possuem complicações crônicas. Estima-se que no Brasil haja atualmente 5 milhões de pessoas infectadas. (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>)

Classicamente a transmissão do parasita ao homem é promovida por insetos hematófagos infectados (transmissão vetorial). A transmissão congênita, por via oral ou por transfusão de sangue também podem ocorrer. De um modo geral estes meios de transmissão estão sendo controlados pelo combate ao vetor, controle da qualidade do sangue e procedimentos que diminuam drasticamente o aparecimento de novos casos. A transmissão por via oral ocorre na maioria das vezes através de alimentos contaminados com inseto vetor ou suas fezes, sendo atualmente responsável por um número significativo de casos agudos da doença na Amazônia Brasileira (Coura *et al.*, 2002).

Após a infecção, há um período de incubação que depende da forma de transmissão do *T. cruzi*: aproximadamente uma semana quando a transmissão é vetorial e de 20 dias a 3 meses quando a transmissão é transfusional. A doença de Chagas compreende basicamente duas fases: a fase aguda e a fase crônica. As características de cada fase, assim como a evolução para a cura ou óbito, dependem de diversos fatores ligados ao *T. cruzi* (como cepa, virulência e tamanho do inóculo), ao homem (como idade, sexo e provavelmente raça) e ao ambiente (revisto por Cançado, 2000).

A fase aguda corresponde ao período em que os tripanossomas são facilmente encontrados no sangue. Embora na maioria das vezes assintomática, a fase aguda caracteriza-se clinicamente por febre, sensação de fraqueza, poliadenite, aumento do fígado e baço e lesão na área de inoculação dos protozoários, denominada chagoma de inoculação. A lesão chama particular atenção quando ocorre na região ocular ou em suas imediações e a reação inflamatória é acompanhada de edema bipalpebral, que impede a abertura do olho (sinal de Romana). Na fase crônica da doença destacam-se, por sua gravidade, a cardiopatia chagásica (que ocorre em 27% dos casos), as dilatações de órgãos cavitários (principalmente do aparelho digestivo, como

megaesôfago, megacólon, etc.) em 6% dos infectados e distúrbios neurológicos em 3% dos infectados (revisto por Cançado, 2000).

A tripanossomíase americana apresenta não somente relevância médica, mas impacto econômico e social devido à morte prematura de pacientes em idade produtiva e aos custos para tratamento dos milhões de pacientes chagásicos. O tratamento da doença de Chagas é sintomático, uma vez que não existe terapêutica eficaz nem processos de imunização para proteger os indivíduos susceptíveis. As drogas nifurtimox e benznidazol têm sido usadas no tratamento da Doença de Chagas, porém são eficazes apenas na fase aguda da doença. Além disso, causam sérios efeitos colaterais e existem evidências de parasitos resistentes a ambos compostos. Embora o mecanismo de ação destas substâncias não esteja esclarecido, acredita-se que a primeira atue inibindo a síntese de proteínas e RNA do parasita e a segunda aja sobre a via de detoxificação de radicais livres. As probabilidades de cura diminuem à medida que a doença vai adquirindo a forma crônica (revisto por Cançado, 2000).

1.2 CICLO DE VIDA DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário heteroxênico com um ciclo de vida complexo que envolve pelo menos quatro formas evolutivas e dois hospedeiros, um inseto vetor e o hospedeiro vertebrado mamífero (Figura 1.1). Durante seu ciclo de vida, o parasita sofre alterações morfológicas, ultraestruturais e bioquímicas.

Formas epimastigotas do *T. cruzi* no tubo digestivo do inseto vetor se multiplicam, aderem à superfície do intestino e no reto se transformam em tripomastigotas metacíclicos, que são formas não proliferativas capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. Durante o repasto alimentar do inseto, os tripomastigotas metacíclicos são eliminados junto com as fezes e urina e podem penetrar facilmente através das mucosas, das conjuntivas ou de qualquer descontinuidade da pele. Feridas causadas pelo ato de coçar e o

próprio local da picada são pontos favoráveis para invasão. Para poder se ligar e invadir as células do hospedeiro vertebrado, a forma tripomastigota deve atravessar uma matriz de proteínas extracelulares (como a fibronectina e a laminina) presentes nas paredes de vasos e órgãos, havendo evidências que este processo é mediado por receptores na superfície do parasita, como o Tc85-11 (glicoproteína de 85kDa), o qual se liga à laminina e citoqueratina-18 nas células do mamífero hospedeiro (Ulrich *et al.*, 2002).

No sítio de ligação do parasita ocorre recrutamento e fusão de lisossomos, o que resulta na formação de um vacúolo com propriedades lisossomais, o vacúolo parasitóforo (Rodrigues *et al.*, 1996; Tardieux *et al.*, 1992). No interior deste vacúolo, a elevada acidez e a presença de enzimas pode ativar um complexo enzimático do parasita responsável pelo rompimento da membrana do vacúolo, com o conseqüente escape do parasita para o citoplasma (Ley *et al.*, 1988).

No citoplasma das células do hospedeiro, os tripomastigotas diferenciam-se em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas (forma flagelada, circulante e infectante), as quais são liberadas para o meio extracelular e para o sangue, podendo invadir novas células do hospedeiro ou serem sugadas pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo do parasita (Brener, 1973).

O processo de transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, denominado metacicloênese, desperta grande interesse já que envolve a transformação de uma forma não patogênica em uma patogênica. Este processo, que ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor, pode ser mimetizado *in vitro* utilizando-se meio quimicamente definido que simula as condições da urina do inseto vetor (Contreras *et al.*, 1985). A diferenciação do parasita requer a adesão dos epimastigotas a um substrato (Bonaldo *et al.*, 1988), semelhante ao que ocorre no interior do triatomíneo (Garcia *et al.*, 1995). Os mecanismos envolvidos no processo de adesão ainda não foram completamente esclarecidos, mas foi sugerido que proteínas hidrofóbicas, além de glicoproteínas, sejam importantes neste processo (Alves *et al.*, 2007). Ao longo da metacicloênese *in vitro* é possível obter formas aderidas em

diferentes tempos de diferenciação (epimastigotas aderidas, 12 e 24h), bem como formas já diferenciadas presentes no sobrenadante da cultura (tripomastigotas metacíclicos). O processo de amastigogênese, no qual tripomastigotas metacíclicos se transformam em amastigotas na célula do hospedeiro vertebrado, também pode ser mimetizado *in vitro* (Contreras *et al.*, 2002).

As diferentes formas evolutivas do parasita apresentam diferenças morfológicas, ultraestruturais, funcionais e bioquímicas (Brener, 1973; Zeledon, 1999; revisto por Tyler & Engman, 2001).

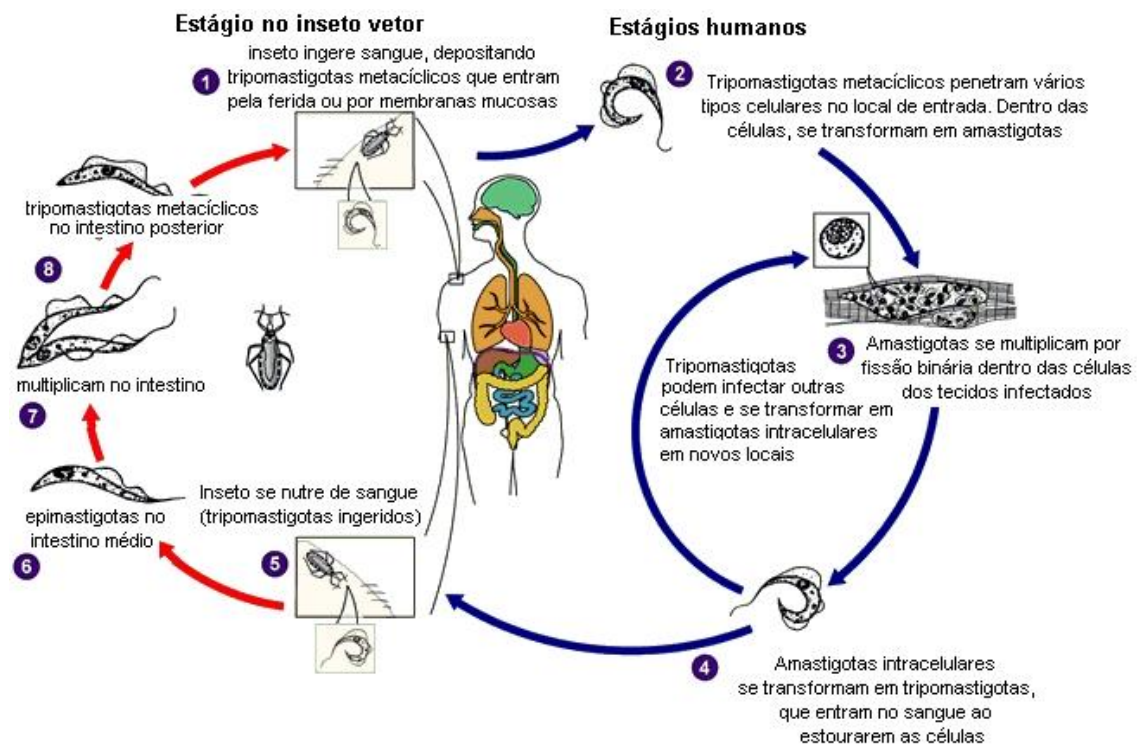


Figura 1.1 Ciclo de vida do *T. cruzi*.

(modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.3 ASPECTOS CELULARES DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Três estruturas celulares do *T. cruzi* são bastante evidentes por microscopia óptica: o núcleo, o cinetoplasto e o flagelo. A análise destas estruturas e da forma celular permite a identificação das formas evolutivas bem definidas: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas.

As formas tripomastigotas possuem a forma alongada (podem apresentar-se com formas finas), com cinetoplasto arredondado localizado na região posterior ao núcleo. O flagelo mede cerca de 20 µm de comprimento, emerge da bolsa flagelar (que se localiza lateralmente na porção posterior do corpo) e adere-se ao longo do corpo do parasita, tornando-se livre na região anterior. O núcleo está localizado na região central da célula, possuindo um formato alongado. Estas formas evolutiva altamente infectante podem ser encontrada na porção posterior do intestino do inseto vetor, em suas fezes e urina (trypomastigota metacíclico), ou no sangue e espaço intercelular dos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneas).

As formas epimastigotas são alongadas, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão localizado anteriormente ao núcleo. O flagelo mede cerca de 20 µm de comprimento e emerge da bolsa flagelar localizada na porção anterior do corpo. O núcleo é esférico. Esta forma é naturalmente encontrada no tubo digestivo do inseto vetor.

As formas amastigotas são arredondadas, com cinetoplasto em forma de barra ou bastão localizado na região anterior ao núcleo. O flagelo que emerge da bolsa flagelar é extremamente curto, medindo cerca de 1 µm de comprimento (Elias *et al.*, 2001). Esta forma é encontrada no interior das células de hospedeiros infectados.

O *T. cruzi* contém estruturas típicas de uma célula eucarionte, além de outras estruturas especializadas e características de cinetoplastídeos (Figura 1.2). Estas serão abordadas neste tópico.

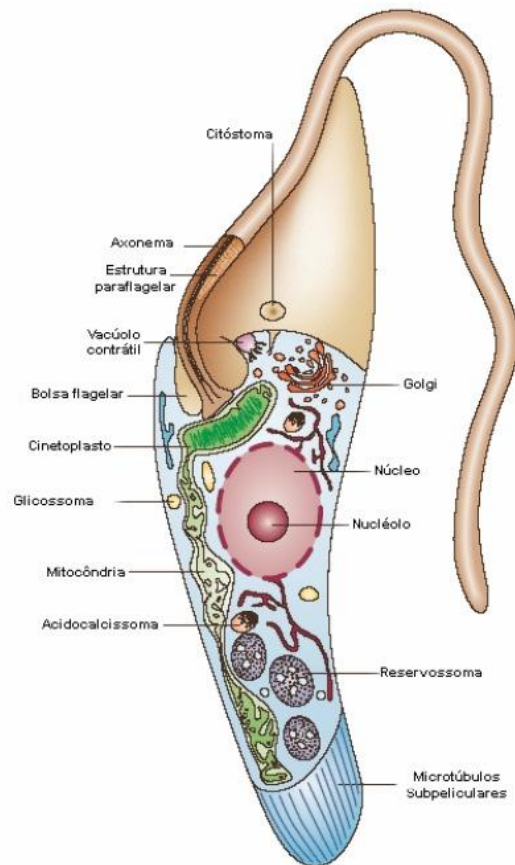


Figura 1.2 Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi* mostrando suas principais estruturas celulares

Fonte: Do campo, 1975.

Do ponto de vista morfológico, a superfície celular do *T. cruzi* pode ser composta por três estruturas: um discreto glicocálice com aproximadamente 7 nm de espessura, uma bicamada lipídica e microtúbulos subpeliculares (De Souza, 1984). A membrana celular dos tripanossomatídeos está associada fortemente a uma camada de microtúbulos subpeliculares, com uma organização extremamente regular (Hemphill *et al.*, 1991; Kohl & Gull, 1998). Os microtúbulos subpeliculares conferem rigidez à célula e resistência ao rompimento mecânico.

Dentre as características peculiares dos cinetoplastídeos está a presença de uma mitocôndria única e diferenciada, que apresenta uma grande quantidade de DNA mitocondrial em uma região especializada, o cinetoplasto. Este DNA se organiza na forma de maxicírculos e minicírculos que se

conectam e ficam localizados logo abaixo do corpúsculo basal, dando origem a esta estrutura intramitocondrial (revisto por De Souza, 2008).

Em cinetoplastídeos ocorre a compartimentalização metabólica de parte da via glicolítica em organelas conhecidas como glicossomos. Sendo um tipo especializado de peroxissomo e distribuídos por todo o citoplasma celular, os glicossomos albergam algumas proteínas envolvidas na glicólise que, em outros organismos, localizam-se no citoplasma (Hannaert *et al.*, 2003). As proteínas presentes no glicossomo têm um ponto isoelétrico alcalino, sendo sintetizadas em ribossomos citoplasmáticos e posteriormente transferidas, com a participação de um peptídeo sinal, para o interior dos glicossomos.

A forma epimastigota do *T. cruzi* é capaz de ingerir macromoléculas do meio por endocitose. Tal atividade é inexistente, ou muito baixa, nas formas amastigotas e tripomastigotas. Este processo ocorre na região da bolsa flagelar, e de forma mais eficiente no citóstoma (Soares & De Souza 1991, Soares *et al.*, 1992).

Todas as macromoléculas ingeridas pela célula, independentemente de sua natureza, se concentram em uma organela chamada de reservossomo. Nela também encontramos proteases sintetizadas pela célula, como é o caso da cruzipaina, uma cisteína proteinase. O pH do interior do reservossomo é de cerca de 6,0, colocando-o como um compartimento pre-lisossomal. Durante o processo de transformação da forma epimastigota em tripomastigota modificações na estrutura do reservossomo são observadas, com o desaparecimento inicial das inclusões lipídicas e posterior desaparecimento da organela, de tal forma que ela não é mais encontrada na forma tripomastigota. Estes dados sugerem que o reservossomo represente uma organela especializada no acúmulo de macromoléculas externas ingeridas, bem como de proteases sintetizadas pelo parasita, que serão posteriormente utilizadas durante o processo de diferenciação celular (revisto por De Souza, 2008).

Por muitos anos foi descrita a presença em *T. cruzi*, bem como em outros tripanossomatídeos, de estruturas citoplasmáticas delimitadas por uma unidade de membrana contendo em seu interior material eletrondenso, chamadas de grânulos de volutina ou corpos densos. O uso combinado de

microscopia eletrônica analítica e estudos bioquímicos possibilitou a identificação nesta organela de vários elementos químicos, sobretudo Ca^{2+} e P, e a presença de um pH ácido. Esta estrutura foi denominada então de acidocalcissomo (Scott *et al.*, 1997). Foi demonstrado que em epimastigotas de *T. cruzi* ocorre associação entre acidocalcissomos e o vacúolo contrátil. Os vacúolos contráteis são formados por um conjunto de túbulos e vesículas localizados próximo à bolsa flagelar que estão envolvidos em processos de osmorregulação celular (revisto por De Souza, 2008).

1.4 GENOMA E EXPRESSÃO GÊNICA EM *Trypanosoma cruzi*

A estrutura e organização cromossômica nos tripanossomatídeos possuem algumas particularidades. O *T. cruzi* apresenta um grande polimorfismo, consequência de uma significativa variação na quantidade de DNA nuclear e no número de cromossomos entre diferentes isolados de parasito. Os cromossomos não se condensam durante a divisão celular, impossibilitando a visualização de cromossomos metafásicos (Vickerman & Tetley, 1977). Somente através de técnicas de eletroforese de campo pulsado e hibridação telomérica (Schwartz & Cantor, 1984) foi possível identificar bandas cromossômicas nestes parasitos. Através destas análises estimou-se que o genoma diplóide de *T. cruzi* cepa Cl Brener tem 87 Mb e é distribuído em 30 a 40 cromossomos, de 0,45 a 4 Mb cada (Cano *et al.*, 1995).

Os tripanossomatídeos possuem também características peculiares quanto à sua organização genômica. Cerca de 20 a 30% (dependendo da cepa) de todo o conteúdo de DNA está condensado no cinetoplasto (revisto por Silveira, 2000), uma estrutura típica da ordem Kinetoplastida. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é organizado em maxicírculos e minicírculos – 40-50 maxicírculos de 22 a 28 kb que correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos e 5.000-10.000 minicírculos de aproximadamente 1,5 kb com seqüências altamente variáveis (revisto por Shapiro & Englund, 1995; Silveira, 2000). Os maxicírculos contêm genes codificadores de RNA ribossomal e de

proteínas mitocondriais. Os minicírculos não contêm genes codificadores de proteínas, todavia geram transcritos conhecidos por RNAs guias que estão envolvidos na edição de RNA (Madison-Antenucci *et al.*, 2002; Schnauffer *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2000).

Os genes de tripanossomatídeos não possuem introns, com exceção de um único gene descrito até hoje – o que codifica para a poli-A polimerase – com um intron de 302 nt em *T. cruzi* e 653 nt em *T. brucei* (Mair *et al.*, 2000).

Os RNAs mensageiros (mRNAs) do *T. cruzi* são transcritos em longas unidades policistrônicas, com vários genes agrupados seqüencialmente, os quais, em geral, não apresentam nenhuma relação funcional entre si (Ullu & Tschudi, 1995; Johnson *et al.*, 1987; Kooter *et al.*, 1987). Adicionalmente, não foram evidenciados promotores para RNA polimerase II nas regiões a montante dos mRNAs que codificam proteínas em tripanossomatídeos. São descritos em *T. cruzi* apenas promotores para RNA polimerase I e o promotor do gene do mini-éxon, que é transcrito por uma RNA polimerase II (Dietrich *et al.*, 1993; Nunes *et al.*, 1997).

Estes RNAs precursores são processados gerando mRNAs maduros que apresentam na sua extremidade 5' a estrutura cap e na extremidade 3' uma seqüência poli-A. Este processamento insere na extremidade 3' dos RNAs a cauda poli A e na extremidade 5' das moléculas de RNA codificadoras de proteínas uma seqüência de RNA conservada de 39 nucleotídeos conhecida como mini-exon ou *spliced leader* RNA (SL-RNA) (Vanhamme & Pays, 1995; Teixeira, 1998) Este Fragmento de RNA que é adicionado a todos os RNAs mensageiros contém o cap em sua estrutura. O fato de proteínas originadas do mesmo transcrito policistrônico apresentarem padrões de expressão diferentes reforçam a importância da regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional neste organismo (revisado por Teixeira & Da Rocha, 2003).

Acredita-se que os genes de *T. cruzi* são continuamente transcritos e a regulação da expressão gênica ocorre após a transcrição do mRNA até a expressão da proteína funcional. Desse modo, a regulação pode estar ocorrendo: (a) na etapa de *trans-splicing* e adição da cauda poli-A; (b) no transporte seletivo de mRNA para o citoplasma ou na estabilidade do mRNA; (c) no acesso do mRNA aos ribossomos pela mobilização polissomal

diferencial dessas moléculas (Ávila *et al.*, 2001; Dallagiovanna *et al.*, 2001; Fragoso *et al.*, 2003); ou (d) na etapa de tradução, através do controle da estabilidade versus degradação das proteínas e modificações pós-traducionais.

A adaptação do *T. cruzi* aos distintos microambientes de seus hospedeiros envolve modificações em sua morfologia, fisiologia e bioquímica, que ocorrem devido à reprogramação da expressão gênica bem como à regulação da degradação protéica.

1.5 A DEGRADAÇÃO PROTEÍCA E O PROTEOSSOMO

A biossíntese das proteínas e seus mecanismos reguladores estão bem elucidados. Entretanto, não são ainda totalmente conhecidos os processos proteolíticos intracelulares, nem os fatores e sinais que controlam as vias de degradação de proteínas e como eles são transmitidos ao interior das células. Sabe-se que a proteólise ocorre em todos os compartimentos celulares, mas o processo citosólico é particularmente importante, uma vez que proteínas individuais são degradadas com velocidades muito diferentes, por mecanismos altamente seletivos e precisamente regulados com a participação de proteases de alto peso molecular (Hargrove & Schmidt, 1989). Certamente falhas na degradação de proteínas reguladoras de meia-vida curta ou a destruição acelerada de outras essenciais poderiam afetar drasticamente as funções celulares.

A degradação de proteínas intracelulares em células eucarióticas é mediada principalmente pelo proteossomo, sendo este um complexo protéico formado por diferentes subunidades responsáveis pelo reconhecimento e degradação de diversas proteínas envolvidas em várias funções essenciais para a viabilidade celular, como por exemplo: no ciclo celular, no reparo do DNA, no controle da transcrição, na modulação de receptores, em vias de transdução de sinal e na apresentação de antígenos (Glickman & Ciechanover, 2002).

A degradação proteossomal, bem como a via proteolítica mediada pelo proteossomo apresentam grande complexidade. Existem diversos subcomplexos regulatórios, assim como espécies diferentes que formam subpopulações distintas de proteossomos. Como intuito de ampliar o entendimento de como atua esse sistema, faremos a seguir uma breve descrição dos componentes do proteossomo:

1.5.1 Proteossomo 20S

Os sítios catalíticos da maquinaria de degradação estão situados no interior do proteossomo 20S. Este é um complexo de proteínas bem organizado com coeficiente de sedimentação de 20S e peso molecular de ~750 kDa. Estudos de microscopia eletrônica mostraram que no proteossomo 20S as subunidades são organizadas em quatro anéis heptaméricos superpostos em forma de um cilindro (11-12 nm de largura por 15-16 nm de comprimento e um estreito poro de 2-3 nm de diâmetro). Os dois anéis externos do cilindro (abertura e reconhecimento dos substratos) são constituídos por subunidades denominadas do tipo α e os dois internos (sítios catalíticos) por subunidades do tipo β . Nos eucariotos o proteossomo 20S é constituído por 14 diferentes tipos de subunidades polipeptídicas, 7 tipos α e 7 tipos β (α_{1-7} e β_{1-7}) com pesos moleculares que variam de 22 a 34 kDa (Tanaka 1995, 1998). Embora 14 represente o número limite de subunidades que podem ser acomodadas no modelo do proteossomo devido à simetria do complexo, em vertebrados o grau de complexidade é bem mais elevado. Além das subunidades constitutivas (do tipo α), eles contêm diversas subunidades tipo- β induzíveis que podem substituir as correspondentes, sem afetar a velocidade de quebra das proteínas, e deste modo alterar a constituição e o tamanho dos peptídeos resultantes (Gaczynska *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram que três subunidades constitutivas do tipo β , denominadas β_1 (ou também chamadas de Y ou delta no homem e no rato e PRE3 em levedura), β_2 (ou Z ou alfa no homem e PUP1 em levedura) e β_5 (ou X ou épsilon no homem e no rato e PRE2 em levedura) são parcialmente

substituídas e incorporadas ao proteossomo 20S por três outras diferentes subunidades LMP2, MECL-1 e LMP7, respectivamente, quando células T de camundongo são estimuladas pela citocina imunomodulatória interferon γ (IFN- γ). As novas subunidades incorporadas ao proteossomo 20S são relativamente mais eficientes na geração de peptídeos antigênicos necessários ao reconhecimento por moléculas da classe I, do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Groettrup *et al.*, 1996). Estes proteossomos com as subunidades β substituídas são chamados de imunoproteossomos e estão envolvidos na apresentação de antígenos ligados ao complexo maior de histocompatibilidade (Ciechanover & Scharz, 1998).

O proteossomo 20S apresenta três atividades proteolíticas distintas: tripsina-símile, quimotripsina-símile e peptidil pós-glutamil hidrolase (caspase-símile), sendo que os sítios ativos são gerados por pares adjacentes das subunidades β_1 , β_2 e β_5 . A atividade catalítica é dependente essencialmente do aminoácido treonina (posição NH₂-terminal) e dos resíduos glutamato-17 e lisina-33 (Groll *et al.*, 1997).

A atividade tripsina-símile está associada à subunidade β_2 , a quimotripsina-símile com a β_5 e a caspase-símile com a subunidade β_1 . As cadeias α , embora cataliticamente inativas, desempenham um papel essencial na estabilização dos anéis das cadeias β e na formação estrutural do complexo 20S (Kopp *et al.*, 1997). As subunidades α possuem funções de ligação com os complexos reguladores, mas as regiões de contactos e os mecanismos de ligação não estão totalmente conhecidos. O que se sabe é que modificações pós-traducionais principalmente fosforilações, regulam a atividade enzimática do 20S, a associação com os complexos reguladores (Bose *et al.*, 1999) e a abertura do anel através de mudanças conformacionais (Iwafune *et al.*, 2002).

Foram descritas também possíveis atividades RNases de duas subunidades α e seu envolvimento na degradação de mRNA (Petit *et al.*, 1997; Gautier-Bert *et al.*, 2003).

Estudos de cristalografia também revelaram que quando o proteossomo 20S está inativo a abertura do cilindro permanece quase fechada, impedindo que substratos protéicos penetrem na câmara interna que contém os sítios

catalíticos ativos. Além disso, as regiões N terminais das subunidades α formam uma barreira física adicional para o acesso das proteínas. Para que os substratos acessem os sítios catalíticos, o proteossomo 20S precisa ser ativado por diferentes complexos regulatórios (De Martino & Slaughter, 1999). Existem quatro complexo ativadores do proteossomo 20S: PA700/19S, PA28 β/α , PA28 γ , e PA200, que são amplamente expressos em células de mamíferos (revisto por Tanaka, 2009).

Distintos proteossomos possuem propriedades catalíticas diferentes e são formados pela ligação destes complexos de regulação em um ou ambos os lados da estrutura em forma de barril do 20S (Bajorek & Glickman, 2004). A ligação dos complexos reguladores, além de ativar o 20S permitindo abertura e a entrada dos substratos, serve como uma estrutura de reconhecimento e seleção de substratos específicos (revisto por Tanaka, 2009). Desse modo, o proteossomo 20S é capaz de reconhecer e degradar proteínas em oligopeptídeos de 3 a 15 resíduos de aminoácidos.

Entretanto, é importante salientar que proteínas danificadas pela oxidação ou mal-dobradas podem ser diretamente degradadas pelo proteossomo 20S. Os mecanismos que controlam o acesso dos substratos, nestes casos, são mal compreendidos.

1.5.2 Proteossomo 26S

O proteossomo 26S é formado por dois complexos: o núcleo catalítico 20S e um complexo regulatório chamado 19S ou PA700 que ativada o proteossomo 20S e possui uma massa molecular de ~700 kDa. O 19S liga-se a uma ou ambas as extremidades do proteossomo 20S latente para formar um proteossomo enzimaticamente ativo (revisto por Tanaka 2009).

1.5.3 Degradação pelos proteossomos

1.5.3.1 Degradação de proteínas pelo proteossomo 26S

O proteossomo 26S (20S + 19S) degrada preferencialmente proteínas previamente marcadas com cadeias de poliubiquitinas (Coux *et al.*, 1996). As proteínas são marcadas em um processo chamado ubiquitinação que envolve a ação conjunta de enzimas denominadas ativadoras de ubiquitina (E1), conjugadoras de ubiquitina (E2) e ligadoras de ubiquitina (E3). A fim de garantir a acurácia na seleção das proteínas que serão marcadas, numerosas enzimas (ex: 2 E1, aproximadamente 30 E2 e mais de 500 E3 em humanos) atuam em uma cascata enzimática. O grupo das E3 é o mais diverso, pois cada enzima reconhece especificamente o (s) substrato.

O substrato ligado à cadeia de poliubiquitina é reconhecido por subunidades da subcomplexo 19S. É proposto que uma ou mais subunidades na base do subcomplexo 19S encontrem um sítio de engate no substrato polipeptídico, o qual é usado como um ponto de partida de deslocamento do substrato através de um possível poro na base do subcomplexo. O deslocamento do substrato através do poro é dirigido por hidrólise de ATP e por desnaturação do substrato. O substrato transita pelo cilindro central 20S onde sofre hidrólises e produz pequenos peptídeos que saem do cilindro por um poro axial que pode ser aberto por um segundo subcomplexo regulador. Também participam deste processo as enzimas desubiquitinadoras (DUB) que removem as cadeias de poliubiquitinas dos substratos (revisto por Pickart & Cohen, 2004).

1.5.3.2 Degradação de proteínas pelo Proteossomo 20S

Foi demonstrado, em células eucarióticas, que o proteossomo 20S reconhece e degrada seletivamente proteínas oxidadas no citosol, núcleo e

retículo endoplasmático, minimizando assim a citotoxicidade destas proteínas (revisto por Davies, 2001).

Gordon *et al.* (1998), avaliaram em levedura a expressão diferencial de certos genes durante a resposta ao estresse oxidativo provocado pela ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Neste trabalho foi demonstrado que várias subunidades do proteossomo 20S tinham sua expressão aumentada. Outros estudos *in vitro* mostraram que o proteossomo 20S reconhece e degrada proteínas oxidadas, mas o proteossomo 26S, mesmo na presença de ATP e um sistema de ubiquitinação reconstituído funcional, não é muito eficaz. Além disso, o estresse oxidativo rapidamente (mas reversivelmente) bloqueia tanto o sistema de ativação, como o de conjugação de ubiquitina e a atividade do proteossomo 26S em células intactas, embora não afete a atividade do proteossomo 20S. A inativação por mutação da enzima E1 (ativadora de ubiquitina) não afeta a degradação de proteínas oxidadas, indicando que estas são degradadas de uma maneira independente de ATP e ubiquitina pelo proteossomo 20S (revisto por Davies, 2001).

Recentemente, foram identificadas cerca de 30 proteínas chamadas IPIs (do inglês “Interacting-Proteasome Proteins”), que são degradadas pelo proteossomo 20S de uma maneira independente de ATP e ubiquitina (Baugh *et al.*, 2009).

Ferrington *et al.* (2001) demonstraram que após a oxidação da metionina da proteína calmodulina a taxa de degradação pelo proteossomo 20S é aumentada. No caso da calmodulina, a degradação é facilitada através da associação de Hsp90 com proteossomo 20S. Em outros casos conhecidos, ativação do proteossoma 20S envolve associação com proteínas reguladoras através das subunidades alfa, que promove o acesso ao núcleo catalítico (revisto por Squier, 2006). Os mecanismos que controlam a abertura do cilindro, nestes casos, são mal compreendidos.

Foi demonstrado *in vitro* que a própria estrutura das proteínas oxidadas ajuda na abertura do cilindro e que mais de 20% das proteínas intracelulares são degradadas diretamente pelo 20S (Baugh *et al.*, 2009), mas não está claro se *in vivo* o proteossomo por si é o responsável pelo reconhecimento dos substratos sem o auxílio de proteínas ativadoras.

1.5.4 Complexos reguladores do proteossomo 20S

1.5.4.1 Partícula regulatória 19S ou PA700

Um dos ativadores melhor caracterizados do 20S é o complexo 19S. O complexo 19S contém ~20 diferentes subunidades que podem ser classificadas em dois grupos: partículas regulatórias ATPases (Rpt) e partículas regulatórias não ATPases (Rpn), ambas com pesos moleculares que variam de 10 a 110 kDa (revisto por Tanaka 2009). Estes dois grupos formam a tampa e base do 19S.

A tampa do complexo 19S é composta por nove subunidades não ATPase: Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11, Rpn12 e Rpn15 (Figura 1.3). Uma importante função da tampa é de-ubiquitinar os substratos capturados através de um processo realizado pela atividade metalopeptidase da Rpn11 com objetivo de reciclar as ubiquitinas (Verma & Deshaies, 2002). A Rpn11 DUB remove a cadeia de poli-ubiquitina, que será clivada em mono-ubiquitina por outras DUBs. A função das outras subunidades da tampa ainda não está clara.

A base do 19S é composta por seis subunidades homólogas da família AAA-ATPase (Rpt1-Rpt6) e quatro subunidades não ATPase (Rpn1, Rpn2, Rpn10 e Rpn13) (Figura 1.3). A base tem como funções a captura de proteínas pelo reconhecimento das cadeias de ubiquitina, o desdobramento das proteínas e a abertura do anel de subunidades alfa. As subunidades Rpn10 e 13 funcionam como receptores de ubiquitina, sendo eficientes armadilhas para os substratos poliubiquitinados. A Rpn10 realiza esta função através da ligação com a porção C- terminal dos motivos de interação da ubiquitina (UIM) (Deveraux *et al.*, 1995). Em eucariotos superiores os domínios UBL (ubiquitin-like) e UBA (ubiquitin-associated) podem se ligar diretamente a Rpn10 (Hartmann-Petersen *et al.*, 2004). É interessante observar que as subunidades Rpn2 e Rpn1 também reconhecem motivo UBL da mesma maneira que Rpn10 (Elsasser *et al.*, 2002).

O papel das subunidades ATPase da base do complexo 19S é o de facilitar a abertura do cilindro 20S para a entrada dos substratos no interior do sítio catalítico. No entanto, de que forma elas realizam esta função ainda não está claro (revisto por Tanaka, 2009).

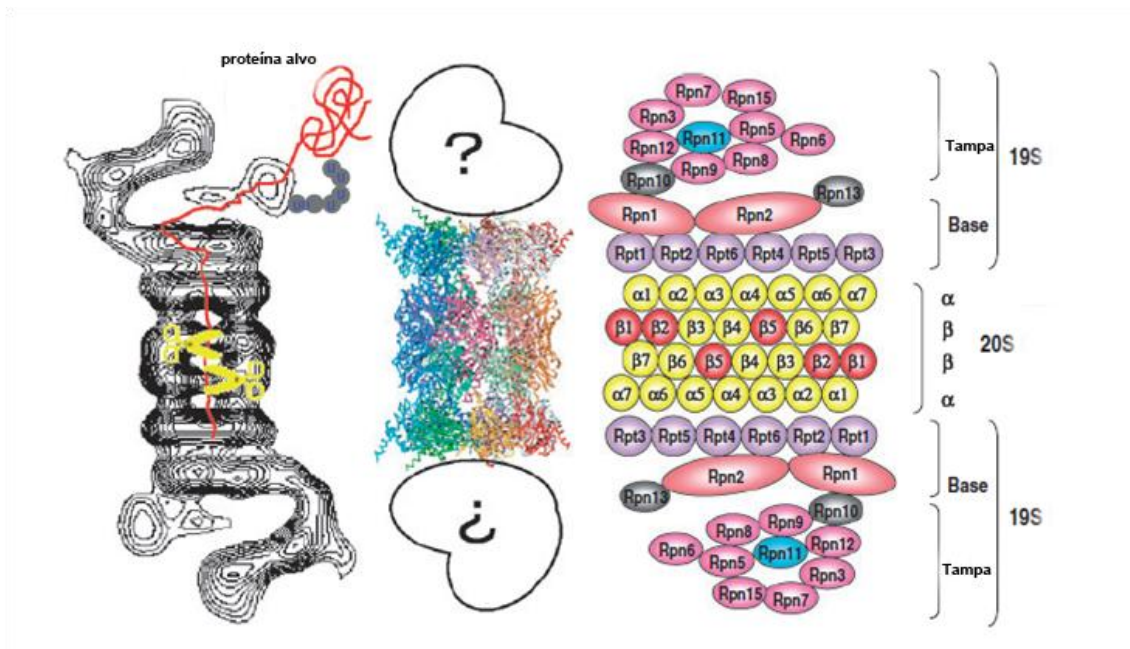


Figura 1.3 Esquema do proteossomo 26S.

À esquerda, imagem baseada em eletronicografia do proteossomo 26S. Figura central, estrutura tridimensional do 20S. A estrutura tridimensional do 19S ainda não foi determinada. À direita, esquema do 20S e do 19S com suas subunidades.

Modificado de Tanaka 2009.

1.5.4.2 Ativador de proteossomo - 28 (PA28)

O PA28 ou regulador 11S (coeficiente de sedimentação 11S) foi identificado como outro ativador de proteossomo 20S. Análises por microscopia eletrônica revelaram que o PA28 apresenta uma forma cônica quando ligado a ambos os lados do 20S (Coux *et al.*, 1996). Fazem parte de sua composição três subunidades relacionadas chamadas α , β e γ , que possuem cerca de 50% de homologia em suas estruturas primárias (Tanahashi *et al.*, 1997).

PA28 α e β unem-se ao 20S de maneira independente de ATP, mas regulada por cálcio e fosforilação, formando um complexo heteroheptamérico com alternância de subunidades α e β . Já o PA28 γ parece formar um complexo homopolimérico.

Os PA28 α e β não desempenham um papel central no início da degradação de proteínas, pois sua ligação ao 20S estimula todas as atividades peptidásicas, mas não afeta a degradação de proteínas grandes que já foram poli-ubiquitinadas. Presume-se que sua ligação estimule a degradação de polipeptídeos de tamanho intermediário que são gerados pela degradação do 26S, desempenhando assim uma função seqüencial e cooperativa com 26S.

Estudos com camundongos nocautes para os genes de PA28 α e β mostraram que ambas as subunidades são induzidas por interferon γ , sugerindo uma função destas partículas no processamento de antígenos pelo proteossomo para serem apresentados juntos com as proteínas de classe I do MHC (Ciechanover & Schwartz, 1998).

O PA28 γ não está envolvido no processamento de antígenos e sua verdadeira função ainda não foi elucidada. Em experimentos com camundongos nocautes para o gene PA28 γ foram observadas anormalidades nos tecidos examinados e retardo no crescimento (Murata *et al.*, 1999). O nocaute de PA28 γ em fibroblastos de cultura *in vitro* provocou uma diminuição na proliferação celular, quando comparada com o tipo selvagem. O nocaute de PA28 γ não afetou a expressão ou localização de PA28 $\alpha\beta$. Estes resultados em conjunto indicam que PA28 γ funciona como um regulador do crescimento em camundongos e mostra que PA28 $\alpha\beta$ não é afetado pela deficiência de PA28 γ (revisto por Tanaka, 2009).

Outros dados interessantes mostram o envolvimento da PA28 γ na proteólise nuclear, na supressão da apoptose (Zhang & Zhang, 2008) e na estimulação da degradação de reguladores do ciclo celular de uma maneira independente de ubiquitina e ATP (Li *et al.*, 2007).

O correspondente do PA28 em tripanossomatídeos é o PA26. A proteína do PA26 foi identificada pela primeira vez em formas procíclicas e sanguíneas de *T. brucei*, com um peso molecular de 26k DA sendo estável na ausência de ATP (Yao & Wang, 1997). O PA26 apresenta cópia única no genoma de *T. brucei* e está presente na célula sob a forma de um anel homoheptamérico, ligando-se ao proteossomo 20S e estimulando todas suas 3 atividades peptidásicas.

Apesar de compartilhar apenas 14% de identidade de seqüência, a estrutura do PA26 assemelha-se ao PA28 humano, e consegue ligar-se a este

estimular suas atividades peptidásicas (Whitby *et al.*; 2000). Entretanto, o PA28 não consegue se ligar nem ativar o proteossomo 20S de *T. brucei* (Yao & Wang, 1997). Portanto, a presença de PA26 em tripanossomatídeos pode sugerir uma origem mais antiga do ativador de proteossomo e um envolvimento e importância muito maior na degradação de proteínas nestes organismos do que inicialmente previsto.

1.5.3.4 Ativador de proteossomo - 200 (PA200)

O ativador PA200 se liga ao proteossomo 20S de uma maneira independente de ATP e *in vitro* estimula a degradação de peptídeos, mas não de proteínas (Khor *et al.*, 2006).

O PA200 é uma proteína de 200 kDa que está localizada primariamente no núcleo, formando discretos acúmulos em células de mamíferos expostas a radiações ionizantes, o que sugere o seu envolvimento no reparo do DNA (Ustrell *et al.*, 2002). O mesmo foi observado em células onde o gene PA200 foi silenciado por RNA de interferência, onde houve uma maior instabilidade gênica após exposição a radiação ionizante (Blickwedehl, 2008). Entretanto, Khor *et al.* (2006), demonstraram que células tronco embrionárias com deficiência em PA200 não apresentaram aumento da sensibilidade às radiações ionizantes, sugerindo que PA200 não é essencial para o reparo da dupla fita de DNA.

O PA200 de leveduras é denominado Blm10 e parece estar envolvido com a montagem e/ou a atividade proteolítica do proteossomo 20S, mas estes estudos também apresentam divergências (Fehlker *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2007).

1.5.4.4 Inibidores de proteossomo - 31 (PI31) e Regulador de proteossomo- 39 (PR39)

O PI31 atua como um inibidor do proteossomo 20S *in vitro*, por competição com o PA700 e PA28, evitando a ativação do proteossomo por estes (McCutchen-Maloney *et al.*, 2000). A ação inibitória é feita por domínios

ricos em prolina presentes na sua estrutura secundária. Entretanto, outros estudos em células embrionárias de camundongo mostraram que ao invés de inibir a função do proteossomo, PI31 atua como um regulador da formação de proteossomos envolvidos no processamento de antígenos da classe MHC I (Zaiss *et al.*, 2002).

O PR39 é um inibidor do proteossomo reversível e não competitivo, que atua mudando a conformação do proteossomo 20S e conseqüentemente sua dinâmica de interação (Anbanandam *et al.*, 2008). O PR39 induz uma única mudança alostérica que permite a inibição da degradação de proteínas selecionadas. O papel do PR39 ainda é desconhecido.

1.5.5 Proteossomos híbridos

Análises de imunoprecipitação e microscopia eletrônica mostraram que PA28 e PA700 ligam-se simultaneamente ao proteossomo 20S formando proteossomos híbridos PA28-20S-PA700 (Tabela 1), sendo surpreendente que ambos os ativadores possam se ligar ao mesmo 20S em posições opostas (Cascio *et al.*, 2002; Kopp *et al.*, 2001). Os proteossomos híbridos contribuem para uma eficiente proteólise, pois as proteínas podem ser primeiramente reconhecidas pelo PA700 e então endereçadas para a degradação no 20S, o qual tem suas atividades peptidásicas fortemente estimuladas pelo PA28 α/β . Também é observado trabalho conjunto de PA700 e PA28 α/β na degradação de peptídeos para apresentação de antígenos, como já descrito anteriormente. Curiosamente, o proteossomo híbrido que mais está presente na célula é o PA200-20S-PA700 (Tabela 1). O motivo dessa formação é desconhecido (Schmidt *et al.*, 2005).

Tabela 1 Proteossomo 20S (CP do inglês “core particle”) e seus reguladores

Reguladores	Outras nomenclaturas
PA700	19S
PA200	Blm10
PA28$\alpha\beta$	11S
PA28γ	
<i>Proteossomos ativos</i>	
PA700- CP – PA700 (19S – 20S – 19S)	30S
PA700 – CP (19S – 20S)	26S
PA200 – CP – PA200	
PA200 – CP	
PA28$\alpha\beta$ – CP - PA28$\alpha\beta$ (11S – CP – 11S)	
PA28$\alpha\beta$ – CP	
<i>Proteossomos Híbridos</i>	
PA28$\alpha\beta$ – CP – PA700	
PA28$\alpha\beta$ – CP – PA28γ	
PA28γ – CP – PA700	
PA200 – CP – PA700	
PA200 – CP - PA28$\alpha\beta$	
PA28$\alpha\beta$ – CP – PA200	
PA28γ – CP – PA200	

Fonte: Modificado de Tanaka, 2009.

1.5.6 Proteossomo-like (HsLVU)

Duas espécies principais de proteossomo podem ser diferenciadas através de sua estrutura: o proteossomo 20S e o proteossomo-like chamado HsLVU, ambos pertencentes à família das treoninas proteases, sendo que HsLV é considerado um precursor ancestral do proteossomo 20S (Bochtler *et al.*, 1999). O complexo do proteossomo precursor de várias espécies de bactérias contém a protease HsLV (proteína de choque térmico codificada pelo

gene localizado no locus v – *heat shock locus V*), ligada a uma HsLUATPase codificada pelo gene no locus U (Bochtler *et al.*, 2000). Este complexo de proteases degrada proteínas em procariotos de maneira análoga ao 26S em eucariotos (De Mot *et al.*, 1999), mas sem a sinalização por ubiquitina, já que esta molécula não existe em bactérias.

As subunidades do complexo HsLV apresentam ~20% de similaridade com as subunidades beta do proteossomo 20S (Bochtler *et al.*, 2000). A determinação estrutural da HsIU revelou que esse complexo existe sob a forma de um hexâmero, composto por subunidades homólogas da família AAA-ATPase (Neuwald *et al.*, 1999). Apesar da informação estrutural pouco se sabe sobre o mecanismo de degradação e ativação desse complexo proteolítico.

Normalmente cada reino biológico possui um tipo específico de proteossomo. Eucariotos e Archaea possuem o proteossomo 20S, enquanto que em bactérias prevalece o HsLVU. No entanto, em protistas como *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium yoelii* foram encontradas as seqüências para ambos os tipos de proteossomos (Gille *et al.*, 2005).

A caracterização bioquímica da HsIV de *Plasmodium sp.* mostrou que esta é capaz de degradar diferentes substratos fluorogênicos específicos para treonina protease, quimotripsina-símile e caspase-símile com K_m de $58,22 \pm 5,5$, $19,18 \pm 2,1$ e $377,97 \pm 25,2$ μ M, respectivamente (Gowthaman *et al.*, 2007) mostrando que a atividade predominante é a quimotripsina-símile.

1.5.7 Complexidade da via de degradação de proteínas pelos proteossomos

A via de degradação de proteínas mediada pelo proteossomo apresenta grande complexidade. Provavelmente uma espécie de proteossomo não está atuando sozinho, e os diferentes reguladores devem estar atuando em conjunto permitindo que coexistam diversas montagens de proteossomos na célula.

O papel essencial da via proteossomo-ubiquitina mediada pelo proteossomo 26S na regulação da homeostase de proteínas em eucariotos é amplamente estudado, sendo bem estabelecido. Por outro lado, o impacto da via de degradação independente de ubiquitina e ATP ainda não está bem elucidado. Nesta via, os substratos protéicos são reconhecidos por diferentes reguladores (PA28/PA26 e PA200) ou diretamente pelo proteossomo 20S sem a sinalização da molécula ubiquitina. Existem muitas evidências que a via independente de ubiquitina não está limitada a raras exceções, mas que atua sobre um amplo número de proteínas (Foster & Hill, 2003; Hoyt & Coffino, 2004; Orłowski Wilk, 2003; Verma & Deshaies, 2000).

Sabe-se que na mesma célula sob determinadas condições, diferentes grupos de proteínas podem ser enviadas para o proteossomo por diferentes mecanismos. Existem inúmeros fatores que avaliam se a proteína será degradada pela via dependente ou independente de ubiquitina. Entretanto, os critérios utilizados para essa avaliação ainda são discutidos. Três observações indiretas são as mais utilizadas: (i) um aumento na fração ubiquitinada desta proteína em condições de degradação acelerada, (ii) a sua estabilização na presença de inibidores de proteossomo (lactacistina, MG132, PSI, epoxomicin etc.) (Gaczynska *et al.*, 2005), (iii) um aumento na fração ubiquitinada do substrato de interesse após inibição do proteossomo.

Finalmente, por razões históricas a via de degradação protéica mediada pelo proteossomo freqüentemente é associada ao sistema proteossomo-ubiquitina. É importante salientar que isto está longe de ser uma verdade, pois certos componentes proteossomais estão envolvidos em diversos processos, como replicação e reparo do DNA, remodelamento da cromatina, bem como na degradação de proteínas de maneira independente de ubiquitina.

1.6 O PROTEOSSOMO DE PROTOZOÁRIOS PARASITAS

O proteossomo exerce um papel essencial na homeostase celular de várias espécies de protozoários parasitos, tais como *Trypanosoma cruzi*

(González *et al.*, 1996), *Trypanosoma brucei* (Hua *et al.*, 1996) e *Toxoplasma gondii* (Shaw *et al.*, 2000).

Algumas modificações que ocorrem durante o ciclo de vida destes parasitas podem estar condicionadas à presença dos proteossomos, uma vez que uma característica marcante é o profundo remodelamento morfológico e molecular que estes protozoários sofrem durante o seu desenvolvimento, tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado. Um bom exemplo da função dos proteossomos foi demonstrado por Sholze *et al.* (1996) e Makioka *et al.* (2002) analisando a necessidade deste complexo enzimático para o encistamento da *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba invadens*.

A função dos proteossomos no desenvolvimento intracelular de parasitas foi investigada em *Toxoplasma gondii* (Shaw *et al.*, 2000). O tratamento dos taquizoítos com inibidor específico de proteossomo – lactacistina - não interferiu na entrada dos parasitas nas células hospedeiras e nem no estabelecimento do vacúolo parasitóforo. Entretanto, o crescimento e a replicação dos parasitas foram inibidos. Resultados similares foram obtidos com outros protozoários parasitas, como o *Plasmodium sp.* O tratamento de esporozoítos de *P. berghei* com lactacistina inibiu o desenvolvimento de formas exoeritrocíticas *in vivo* e *in vitro*, porém não alterou a sua capacidade de invasão. Os estágios eritrocíticos do *P. falciparum* também foram fortemente inibidos *in vitro* pelo tratamento com lactacistina (Gant *et al.*, 1998).

A importância da proteólise intracelular em protozoários do gênero *Leishmania* foi descrita por Robertson *et al.* (1999), que demonstrou a presença dos proteossomos 20 e 26S nesta espécie, e a inibição do crescimento *in vitro* de promastigotas e amastigotas após o tratamento com inibidores específicos de proteossomo.

O papel dos proteossomos no remodelamento de protozoários parasitas também foi descrito em *T. cruzi*, onde foi demonstrado que a lactacistina inibe a transformação de tripomastigotas em amastigotas. Entretanto, estes experimentos indicaram que esse inibidor não interferiu com a infectividade dos tripomastigotas, mas provavelmente tornou-os suscetíveis aos mecanismos microbicidas do hospedeiro (Mutomba *et al.*, 1997; Mutomba & Wang, 1998).

Outra evidência do envolvimento do proteossomo na transformação estágio-específica de tripomastigotas para amastigotas em *T. cruzi* foi demonstrada por De Diego *et al.* (2001) que utilizando inibidores específicos da atividade do proteossomo mostraram que as proteínas do citoesqueleto associadas ao flagelo são alvo de proteólise dependente de ubiquitina e do proteossomo 26S. Estes resultados indicam que a atividade dos proteossomos é necessária para a remodelação da célula e sugerem que estes desempenham um papel importante durante o desenvolvimento do *T. cruzi*.

Apesar do genoma de *T. cruzi* possuir todos os genes das subunidades do 20S, bem como os dos complexos reguladores , PA700, PA26, PA200 e PI31, existem poucos estudos a respeito da dinâmica da proteólise mediada pelo proteossomo neste parasita. O proteossomo é um elemento essencial para a biologia de *T. cruzi*, existindo assim a possibilidade de servir como um futuro alvo terapêutico. Entretanto, a limitada informação sobre a biologia do proteossomo de *T. cruzi* requer estudos mais aprofundados tanto na parte estrutural quanto funcional, visando caracterizar sua importância no parasita.

1.7 LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DOS PROTEOSSOMOS

Proteossomos estão presentes no citoplasma e núcleo de todas as células eucarióticas. Entretanto, sua abundância relativa nestes compartimentos é muito variável. No citoplasma estão associados com centrosomos, citoesqueleto e retículo endoplasmático. No núcleo estão presentes em todo o nucleoplasma, mas ausentes no nucléolo.

Além disso, existem múltiplas formas de proteossomos: 20S livres, 26S (20S com um ou dois complexo reguladores 19S), 20S associado com PA28 e proteossomos híbridos (proteossomo 20S com um complexo regulador 19S e um PA28) (De Martino & Slaughter, 1999; Glickman & Ciechanover, 2002). As várias formas de proteossomos associados com os complexos regulatórios podem coexistir *in vivo*, mas são pouco caracterizadas. Os fatores que regulam a função das diferentes montagens ainda são desconhecidos. Além disso, a proporção relativa dessas diferentes espécies moleculares depende do tipo de

célula, da fase do ciclo celular e das condições metabólicas (Brooks *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 1999; Tanahashi *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos sugerem que proteossomos formam sub-populações com composições diferentes de acordo com a fonte de isolamento ou localização (Briane *et al.*, 1992; Haass & Kloetzel, 1989; Pal *et al.*, 1994).

A localização dos proteossomos em células que sofrem drásticas mudanças durante seu desenvolvimento varia bastante. Por exemplo, proteossomos de espermatozoides de peixes são localizadas ao longo do flagelo e participam da mobilidade do esperma (Inaba *et al.*, 1993). Em contraste, proteossomos de espermatozoides humanos estão associados com a região do acrossoma (Biały *et al.*, 2001; Wójcik *et al.*, 2000). Proteossomos de ovócitos humanos são abundantes e dispersos no citoplasma, enquanto que em ovócitos de rato concentram-se em torno do fuso mitótico (Josefsberg *et al.*, 2000; Ryabova *et al.*, 1994;).

Durante a diferenciação de linhagens específicas de células podem ocorrer diferenças no padrão básico de distribuição dos proteossomos. Por exemplo, em mioblastos os proteossomos co-localizam com a rede de desmina, bem como com a de actina. Porém, quando a fusão miogênica é induzida, movem-se primeiro para o núcleo e mais tarde reaparecem no citoplasma (De Conto *et al.*, 1997).

Recentemente foi demonstrado que *T. brucei* possui o proteossomo-like HsLVU, que localiza-se na mitocôndria do parasita e tem a função de controlar a replicação/segregação do DNA do cinetoplasto (Ziyin *et al.*, 2008).

Estes dados mostram que a distribuição intracelular de proteossomos varia dependendo da espécie celular e do estágio de diferenciação.

Apesar dos proteossomos estarem presentes em toda a célula, há indícios de que eles são mais ativos cataliticamente em alguns locais do que em outros. Determinadas regiões das células são caracterizadas por um aumento de proteólise dependente de proteossomo e são chamadas de “centros de proteólise” (Johnston *et al.*, 1998). Nestes locais ocorre um

acumulo de proteossomos, proteínas ubiquitinadas e componentes necessários para a proteólise (Johnston *et al.*, 1998; Bence *et al.*, 2001).

Apesar dos avanços significativos obtidos na caracterização estrutural dos proteossomos, sua distribuição intracelular permanece mal compreendida. Os dados atuais mostram que o proteossomo está presente de forma ubíqua no citoplasma e núcleo, mas sua função pode ser distinta em diferentes localizações. Isto provavelmente depende da existência de diferentes espécies de proteossomos formados pela associação com diferentes complexos regulatórios.

Embora tenha ocorrido um grande avanço no conhecimento da estrutura e função dos proteossomos em células eucarióticas, pouco ainda se sabe sobre a contribuição desse complexo no metabolismo de *T. cruzi*. Portanto, este trabalho se propõe realizar uma investigação sobre a via de degradação proteossomal durante a metaciclogênese *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*, quanto a alguns aspectos celulares, bioquímicos e moleculares, como intuito de ampliar a compreensão do papel biológico dos proteossomos neste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 AVALIAR O EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DO PROTEOSSOMO DURANTE A METACICLOGÊNSE *IN VITRO*

- Avaliar o crescimento celular e a metaciclogênese de *T.cruzi* após inibição do proteossomo
- Realizar uma avaliação celular da metaciclogênese por microscopia óptica e eletrônica de transmissão após inibição do proteossomo
- Avaliar o ciclo celular após inibição do proteossomo por citometria de fluxo

2.2 AVALIAR A DEGRADAÇÃO PROTEOSSOMAL DURANTE A METACICLOGÊNSE *IN VITRO*

- Avaliar as atividades peptidásicas dos proteossomos 20S e 26S através de ensaios proteolíticos
- Avaliar o perfil de ubiquitinação por ensaios de imunoprecipitação com anticorpo contra ubiquitina de *T. cruzi* e *Western blot*
- Avaliar o perfil de proteínas oxidadas durante a metaciclogênese através da detecção dos grupamentos carboníls por *Western blot*

2.3 AVALIAR AS PROTEÍNAS PROTEOSSOMAS DURANTE A METACICLOGÊNSE *IN VITRO*

- Avaliar a expressão relativa das proteínas: subunidade catalítica alfa7, subunidades HsIV e HsIUATPase, subunidades dos complexos

regulatórios PA700 (Rpn10 e Rpn7) e PA26 durante a metaciclogênese, por ensaios do tipo *Western blot*

- Realizar a localização celular do proteossomo 20S (subunidade cataítica alfa 7), do proteossomo-like HslVU (subunidade HslV), do complexo regulatório 19S (subunidade regulatória 10) e do complexo ativador PA26 em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, por imunofluorescência

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIAS DOS REAGENTES

Amersham-Parmacia Biotech: Anti-histidina; Anti-IgG de camundongo;

CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow; Hybond N+; Taq DNA polimerase

Appligene: IPTG

Biochemika: TFA

Biomol: PSI (Z-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H); MG132 (Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-Leucinal); Lactacistina ; Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-metilcumarina;

Cbz- Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina; Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7- amido-4-metilcumarina

Bio Rad: Acrilamida; Agarose; Azul de bromofenol; Bis-acrilamida; Persulfato de amônia

Cult-lab: Soro fetal bovino

Difco: Bacto-triptona; Extrato de levedura; Infuso de fígado; Triptose

ESM: Acetato de uranila; Tetróxido de ósmio

Invitrogen: EDTA; Fenol; Hoechst 33342; Gateway® *BP Clonase*TM II; Gateway® *LR Clonase*TM; Gateway® pDESTTM17; Gateway® pDONRTM221; AlexaFluor 488; *kit PCR Platinum*[®] Pfx ; Peg/MgCl₂; Padrão de peso molecular MultiMark Multi-Colored Standart

MERCK: Acetato de sódio; Ácido acético; Ácido clorídrico; TCA; Álcool isoamílico; Bicarbonato de Sódio; Carbonato de Sódio; Cloreto de magnésio; Cloreto de potássio; Cloreto de sódio; Clorofórmio; Etanol absoluto; Fosfato diabásico de sódio; glucose; Hidróxido de sódio; SDS; Sulfato de magnésio

Microbiológica:Hemina

Promega: Kit NBT/BCIP

Pierce: *Micro BCA Protein Assay*

Qiagen: *QIA filter plasmid mini kit; QIA filter plasmid mid kit*

Roche Molecular Biochemicals: *High pure PCR product purification kit*

Sigma: Amberlit; Ampicilina; Anticorpo contra as subunidades alfas do proteossomo 20S; ATP; β -mercaptetanol; brometo de etídio; BSA; cacodilato; citrato de sódio; Cloreto de cálcio; DABCO (N-propilgalacto); DMSO; Ferricianeto de potássio; Ficoll; Formaldeído; Glicerol; Glutaraldeído; Hepes; Iodeto de propídio; Nitrato de chumbo; Nonidet P-40 (NP-40); Ponceau S; Resina proteína G sepharose; Saponina; TEMED; Ubiquitina

USB Corporation; DTT; Persulfato de amônio; Tris; Uréia

VETEC: Bicarbonato de amônio

Whatman: Papel 3MM chr; Membrana de nitrocelulose

3.2 MEIOS DE CULTURA

Meio LB: Bacto-triptona 10 g/l; Extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l

Meio LB Agar: Meio LB suplementado com 15 g/l de agar

Meio LIT (*liver infusion tryptose*): Extrato de levedura 15 g/l; Fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; Glucose 2,2 g/l; Hemina 0,02 g/l; Infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaCl 4,4 g/l; Soro fetal bovino 10%; Triptose 5 g/l pH 7,2

Meio TAU (*triatomine artificial urine*): CaCl₂ 2 mM; KCl 17 mM; MgCl₂ 2 mM; NaCl 190 mM; Tampão fosfato, pH 6,0 8 mM

Meio TAU3AAG: TAU suplementado com: ácido L-aspártico 2 mM, ácido L-glutâmico 50 mM, L-prolina 10 mM e glicose 10 mM

3.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES

Azul de Coomassie: Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%

Fenol/Clorofórmio: 25 partes de fenol saturado; 24 partes de clorofórmio; 1 parte de álcool isoamílico

Gel de Poliacrilamida / SDS (SDS-PAGE) 13% a 15%: Acrilamida 13% ou 15%; Tris-HCl pH 8.8 0,4M; SDS 0,1%; Persulfato de Amônio 0,075%; TEMED 0,07%

Gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante: Tris HCl pH8.0 1M; Acrilamida 5%; Persulfato de Amônio 0,075%; TEMED 0,07%

PBS 10x: NaCl 0,137M; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 4,3mM x7H₂O; KH₂PO₄ 1,5mM

Ponceau S: Ácido Acético 1%; Ponceau S 0,5%

Solução de Reynolds (citrato de chumbo): nitrato de chumbo 0,665g; citrato de sódio 0,88g, pH 12

Tampão de acoplamento: NaHCO₃ pH8.0 0,1M; NaCl 10,5M

Tampão de amostra de proteína 4x (T.A.4X): Tris-HCl pH 6.8 0,16M; SDS 4%; β-mercaptoetanol 10%; Glicerol 24%; Azul de bromofenol 0,02%

Tampão de amostra de DNA: Azul de bromofenol 0,25%; ficoll 400 25%; xileno cianol 0,25%, TBE 1X

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X: Tris-base 25mM; Glicina 0,192M; SDS 0,1%

Tampão de eluição C: Tris pH8.0 10mM; NaCl 150mM; NP-40 01%, β-mercaptoetanol 10mM, Acetato de magnésio 1mM; Imidazol 1mM; EGTA 40mM

Tampão de eluição com Imidazol: NaH₂PO₄ 0,1M; NaCl 0,3M; Imidazol 0,1M a 0,3M

Tampão para ensaio de atividade proteolítica: Tris-HCl pH 8,0 50 mM, MgCl₂ 10 mM

Tampão de lavagem com Imidazol: NaH₂PO₄ 0,1M; NaCl 0,3M; Imidazol 0,02M a 0,06M

Tampão de lavagem para afinidade: 0,02M Tris-HCl pH8.0; 0,3M a 1M NaCl; 10% Glicerol; 0,1% NP-40

Tampão de lavagem de imunoafinidade: KCl 100mM; MgCl₂ 5mM; Hepes pH 7.0 10mM; NP-40 1%; PMSF 1mM; E-64 10µM

Tampão de ligação C: Tris pH8.0 10mM; NaCl 150mM; NP-40 0,1%; Acetato de Magnésio 1mM; Imidazol 1mM; CaCl₂ 4mM

Tampão de ligação IgG: Tris pH8.0 10mM; NaCl 150mM; NP-40 0,1%

Tampão de lise de bactérias: Tris-HCl pH8.0 0,02M; Triton X-100 2%; NaCl 0,5M; PMSF 1mM; E-64 10µM

Tampão de lise desnaturante I: Uréia 7M; Thiourea 2M; Tris-base 40mM; PMSF 1mM; E-64 10µM

Tampão de lise desnaturante: Tris-HCl pH8.0 0,02M; MgSO₄ 0,01M; CaCl₂ 1mM; SDS 1%; β-mercaptoetanol 0,01M; PMSF 1mM; E-64 10µM; Iodoacetamida 0,01M

Tampão de lise não desnaturante: Tris-HCl pH8.0 0,02M; NaCl 0,3M; Glicerol 10%; NP-40 0,1%; PMSF 1mM; E-64 10µM

Tampão de revelação de *Western blot*: Tris-HCl pH 9.5 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl₂ 5mM

Tampão para transferência 1X: Tris-base 25mM; Glicina 192mM; Metanol 20%

Tampão TE: Tris-HCl pH 8.0 10 mM; EDTA pH 8.0 1 mM

Tampão 20S: Tris-HCl pH 7,5 25 mM; DTT 1 mM, Glicerol 10%, EDTA 1mM, Leupeptina 1 mM, NEN 10 mM

TBE 1X: Tris-base 89mM; Ácido bórico 89mM; EDTA pH8.0 2mM

3.4 ORGANISMOS

Escherichia coli: Bactérias das linhagens BL21pLysE e DH5α

Trypanosoma cruzi: Foram utilizadas células do clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi*, em cinco diferentes momentos do processo de diferenciação celular: epimastigotas com 3 dias de cultivo em meio LIT (epimastigotas de 3 dias), epimastigotas com 5 dias de cultivo em meio LIT (epimastigotas de 5 dias), epimastigotas submetidas a um estresse nutricional de 2 horas em meio TAU (epimastigotas estressados), epimastigotas aderidas após 12 horas de diferenciação em meio TAU3AAG (aderidos de 12 horas), epimastigotas aderidas após 24 horas de diferenciação em meio TAU3AAG (aderidos de 24 horas) e tripomastigotas metacíclicos (metacíclicos) em meio TAU3AAG. A partir de agora, esses parasitas serão citados como descrito entre parênteses.

Mus musculus: Camundongos fêmeas de linhagem Swiss

3.5 METACICLOGÊNSE DO TRYPANOSOMA CRUZI

O processo de transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos é denominado metaciclogênese. Este processo, que ocorre naturalmente no sistema digestivo do inseto vetor, pode ser mimetizado *in vitro* utilizando-se meio quimicamente definido que simula as condições da urina do inseto vetor (Contreras *et al.*, 1985). Durante a metaciclogênese *in vitro* é possível obter parasitas em diferentes tempos da diferenciação (epimastigotas, epimastigotas aderidos após 12 e 24 horas de

diferenciação, tripomastigotas metacíclicos). A seguir, estão relacionados todos os passos realizados para a obtenção dos parasitas utilizados neste trabalho.

3.5.1 Preparação dos epimastigotas

Culturas de *T. cruzi* foram mantidas a 28°C em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram repicadas a cada 3 dias mediante inóculos de 1×10^6 células/ml. As formas epimastigotas de 3 dias e 5 dias foram obtidas no terceiro dia, na fase logarítmica de crescimento, quando a densidade celular era de ~ 2 a 3×10^7 células/ml e no quinto dia de cultivo, no final da fase logarítmica de crescimento (~ 5 a 6×10^7 células/ml). Tais condições foram estabelecidas segundo a curva de crescimento do parasita em meio LIT a 28°C (Camargo, 1964).

3.5.2 Estresse nutricional

Formas epimastigotas de culturas em final da fase logarítmica de crescimento (densidade celular de $\sim 6 \times 10^7$ células/ml) foram submetidas a um estresse nutricional. Para isso, os parasitas foram centrifugadas a 8000g por 10 minutos a 10°C, ressuspensos em meio TAU, na concentração de 5×10^8 células/ml e mantidos a 28°C por 2 horas.

3.5.3 Início da diferenciação e obtenção de epimastigotas aderidos 12 e 24 horas

Após o período de estresse nutricional descrito acima, as formas estressadas foram transferidas para garrafas de cultura com meio TAU suplementado com glicose e os aminoácidos prolina, glutamato e aspartato de sódio (TAU3AAG), na concentração de 5×10^6 células/ml, e mantidas a 28°C

por 12 e 24 horas. Após 12 horas de diferenciação o sobrenadante foi descartado e 10 ml de TAU3AAG foram adicionados à garrafa, que foi submetida a forte agitação para obtenção dos parasitas aderidos. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção dos parasitas aderidos nas garrafas após 24 horas de diferenciação.

3.5.4 Obtenção de tripomastigotas metacíclicos

Formas epimastigotas de culturas em final de fase logarítmica de crescimento (densidade celular de $\sim 6 \times 10^7$ células/ml) foram centrifugadas a 8000g por 10 minutos a 10°C, ressuspensas em meio TAU na concentração de 5×10^8 células/ml e mantidas a 28°C por 2 horas. Após este período de estresse nutricional, as células foram cultivadas por 72 horas em meio TAU3AAG na concentração de 5×10^6 células/ml, a 28°C. Durante este período os parasitas aderiram às paredes das garrafas de cultivo e diferenciaram-se em formas tripomastigotas metacíclicas, soltando-se então do substrato (descrito em Bonaldo *et al.*, 1988). Os tripomastigotas metacíclicos do sobrenadante da cultura foram purificados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose equilibrada em PSG (De Souza, 1984).

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE T. CRUZI

A extração e purificação das moléculas de DNA foram realizadas segundo Fragoso e Goldenberg (1992). Assim, 1×10^{10} células foram lavadas em tampão NKM e lisadas segundo Chomczynski (1987). Para ter os núcleos celulares parcialmente purificados foram necessários três ciclos de centrifugação a 800g por 10 minutos a 4°C. Esta fração purificada foi incubada em EDTA 5 mM, NaCl 10 mM, proteínase K 100 µg/ml, SDS 0,5% e Tris-HCl pH 7,6 10 mM, por 12 horas a 37°C. O DNA foi extraído com fenol saturado em Trisma base 100 mM e purificado em várias diálises em EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e Tris-HCl pH 7,6 10 mM.

3.7 ELETROFORESE DE DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em géis de agarose horizontal conforme descrito (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram diluídas em tampão de amostra de DNA e aplicadas em gel de agarose com concentração variada. Também um padrão de massa molecular foi aplicado no gel (1 Kb Plus – *Invitrogen*). Os géis de agarose foram preparados em tampão TBE 1X, nas concentrações de 1% e 2% (m/v) e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão, a 80V durante tempo variável. O DNA foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação.

3.8 AVALIAÇÕES DO CRESCIMENTO E METACICLOGÊNSE DE *T. CRUZI* COM O USO DOS INIBIDORES ESPECÍFICOS DE PROTEOSSOMO (LACTACISTINA, PSI E MG132)

3.8.1 Inibição do crescimento de *T. cruzi*

Para esta análise foi realizada uma curva de crescimento e determinado a IC₅₀ do inibidor específico de proteossomo lactacistina (dose de droga que inibe 50% do crescimento dos parasitas). Diferentes concentrações de lactacistina (0, 3, 5 ou 10 µM) foram acrescentadas a 5 ml de meio LIT contendo as culturas de epimastigotas (10⁶ células/ml). O crescimento celular foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento. A concentração inibitória (IC₅₀) foi calculada após 24 e 72 horas de crescimento. Três experimentos biológicos foram realizados em triplicata técnica.

3.8.2 Inibição da metaciclologênese

Os parasitas foram preparados para metaciclologênese como descrito em 3.5. Para os ensaios de inibição, diferentes concentrações dos inibidores específicos de proteossomo lactacistina (1 a 5 μM); MG132 (0,1 a 1 μM) e PSI (0,1 a 1 μM) foram testadas. As drogas PSI [Z-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H] e MG132 (Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-Leucinal) foram dissolvidas em DMSO a uma concentração final de 0,1%, enquanto lactacistina foi dissolvida em água destilada. As diferentes concentrações dos inibidores foram adicionadas aos meios TAU e TAU3AAG. Após 24, 48, 72 e 96h de incubação em TAU3AAG o sobrenadante do meio de cultura foi recuperado e a porcentagem de diferenciação foi determinada por contagem diferencial de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos em câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em garrafas de 25 cm^2 em um volume de 5 ml de TAU3AAG. Três experimentos biológicos foram realizados em triplicata técnica. Em paralelo foram realizadas metaciclologêneses controle sem adição das drogas ou em meio contendo 0.1% de DMSO.

3.8.3 Avaliação dos parasitas através de microscopia óptica

Os parasitas foram avaliados quanto à sua morfologia após o tratamento com inibidor específico de proteossomo por microscopia óptica *in vivo* e também após fixação e coloração.

Inicialmente os parasitas foram preparados para metaciclologênese com 5 μM do inibidor lactacistina adicionados aos meios TAU e TAU3AAG.

Após 24 horas de tratamento com 5 μM de lactacistina os parasitas aderidos ao fundo das garrafas foram fotografados *in vivo* em um microscópio invertido Nikon TE300. Garrafas controle, sem a droga, também foram fotografadas após 24 horas de diferenciação.

Os parasitas aderidos e os presentes no sobrenadante do meio de cultura também foram observados após coloração de Giemsa em microscópio

óptico Nikon E-600. Para isso, os parasitas presentes no sobrenadante do meio de cultura foram transferidos para tubos Falcon de 50 ml e coletados por centrifugação a 7000g por 10 minutos. Para coletar os parasitas aderidos, primeiramente o sobrenadante foi descartado e cerca de 5 mL de meio TAU3AAG foi adicionado aos frascos. Estes foram agitados vigorosamente em Vortex por 2 minutos e os parasitas desaderidos foram transferidos para tubos Falcon de 50 ml. Este procedimento foi repetido 3 vezes e os parasitas desaderidos totais foram coletados por centrifugação a 7000g por 10 minutos. Culturas controle sem lactacistina também foram analisadas.

3.8.4 Avaliação dos parasitas através microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.8.4.1 Metaciclogênese in vitro

Inicialmente foram realizadas metaciclogêneses com 5 μ M de lactacistina e sem a droga, como descrito anteriormente. Cada ponto (24, 48, 72 e 96h) da metaciclogênese foi separado em garrafas individuais. Os parasitas aderidos e presentes no sobrenadante de cada ponto (controle e lactacistina) foram coletados como descrito em 3.8.3. Os parasitas obtidos foram lavados com PBS 1X três vezes e os *pellets* resultantes preparados para MET, como descritos abaixo.

3.8.4.2 Processamento dos pellets para MET

Os *pellets* foram ressuspensos em 800 μ l de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos para fixação. Após fixação foram lavados 2X por 1 minuto com tampão cacodilato, sendo os *pellets* obtidos por centrifugações a 10.000g por 30-60 segundos.

A pós-fixação foi feita por 15 minutos com tetróxido de ósmio 1%/ ferrocianeto de K 0,8%/ 5 mM de CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1M e a suspensão de células foi lavada 2X por 1 minuto no mesmo tampão. Em

seguida, as suspensões de células foram desidratadas em acetona 50%, 70%, 90% e 100% (2X), 3 minutos cada (incluindo o passo de centrifugação). Quando em acetona 70% as suspensões de células foram centrifugadas por 1 minuto a 10.000g, os *pellets* condensados foram removido cuidadosamente do tubo de microcentrifuga com a ajuda de um palito e transferidos para uma placa de Petri com acetona 70%. Em seguida os *pellets* foram transferidos com a ajuda de uma pipeta Pasteur para vidrinhos de inclusão (5 ml) contendo acetona 90%, e finalmente 100%.

Os *pellets* foram infiltrados em uma solução de Epon/acetona (1:1), por 4 horas em Epon puro, e finalmente polimerizados em Epon por 48 horas a 60°C.

Os blocos foram cortados em ultramicrótomo Reichart UM-6. Os cortes foram corados por 30 minutos com acetato de uranila a 2% e por 2 minutos com citrato de chumbo (Reynolds). Em seguida as grades foram montadas e observadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol.

3.8.5 Avaliação do conteúdo de DNA dos parasitas por citometria de fluxo

Foram realizadas metaciclogêneses com 5 μ M de lactacistina e sem a droga, com descrito anteriormente. Os parasitas sob estresse nutricional de 2 horas em meio TAU, e os presentes no sobrenadante da cultura em TAU3AAG após 48 e 72 horas de diferenciação foram utilizados para análise por citometria de fluxo. Também foram analisadas epimastigotas de cultura em meio LIT após 24 horas de crescimento. Utilizaram-se como controles parasitas correspondentes a cada ponto, mantidos em culturas sem adição da droga. Os parasitas foram permeabilizados com 0,1% de saponina por 30 minutos e corados com 30 μ g/ml de iodeto de propídio por 20 minutos, como descrito anteriormente (Menna-Barreto *et al.*; 2007). Em seguida os parasitas foram analisados utilizando citometro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA). Um total de 10.000 eventos foram analisados. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e técnica.

3.9. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES PEPTIDÁSICAS DO PROTEOSSOMO DURANTE A METACICLOGÊNESE

3.9.1 Preparação de fração enriquecida de proteossomo

Inicialmente foram obtidos 10^9 células de epimastigotas de 3 e 5 dias de cultivo, epimastigotas estressados, epimastigotas aderidos após 12 e 24 horas e tripomastigotas metacíclicos como descrito em 3.5. Estes parasitas foram homogeneizadas em 1 ml de tampão 20S. O homogenado foi transferido para um tubo eppendorff e submetido a sonicação por quatro vezes 45 segundos a 60 Watts, com intervalo de 30 segundos em banho de gelo. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000g e o sobrenadante foi coletado e ultracentrifugado por 1 hora a 100.000g. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 6 horas nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de tampão 20S.

A determinação da concentração protéica foi realizada segundo o método do BCA (Smith *et al.*, 1985). Para a construção da curva-padrão foram utilizadas diversas diluições de uma solução de soro-albumina bovina a 100 μ g/mL.

3.9.2 SDS-PAGE e ensaios de *Western Blot* para detecção do proteossomo 20S nas frações enriquecidas

Cerca de 10 μ g das frações enriquecidas (extratos brutos) foram misturadas com tampão de proteína 1X e fracionadas em gel de SDS-PAGE 10%. Foi utilizado como padrão de peso molecular o MultiMark Multi-Colored Standard. A voltagem adotada foi de 120 Volts. Após a corrida, um dos géis foi corado com Comassie Blue. O outro gel foi preparado para a transferência de acordo com o método anteriormente descrito (Towbin *et al.*; 1979). A voltagem aplicada no sistema foi de 25 Volts a uma temperatura de 4°C por 16 horas.

Após o término da transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e descorada com água para visualização das proteínas.

Posteriormente, a membrana foi bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação com PBS 1X, Tween-20 0,1% e 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, a membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo primário anti-subunidades alfa (Sigma) para detectar o proteossomo 20S, diluído a 1:1000 em PBS 1X / Tween-20 0,1% por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo foi removido e a membrana lavada três vezes. Em seguida a membrana foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina na diluição 1:1000. Após este período, a membrana foi lavada por três vezes durante 5 minutos em PBS 1x / Tween-20 0,1%. Finalmente, O sinal foi detectado usando o Kit NBT/BCIP seguindo as normas do fabricante.

3.9.3 Atividade enzimática do proteossomo em gel não-desnaturante

Cerca de 20 µg das frações enriquecidas foram ressuspensas em tampão de amostra (azul de bromofenol, glicerol 5%) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante 5% em tampão de glicina pH 8.0, a 120 Volts a 4°C. Após a eletroforese o gel foi incubado a 37°C por 30 minutos com o substrato fluorogênico Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina na concentração de 1 µM dissolvido em 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DDT, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol e 1% SDS. Em seguida o gel foi observado em luz ultravioleta em transiluminador para verificar a presenças de bandas que indicassem a atividade do proteossomo.

3.9.4 Medida da atividade proteossomal frente a peptídeos exógenos

Nos ensaios da atividade proteolítica exógena do proteossomo 20S foram utilizados diferentes substratos fluorogênicos como: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-metilcumarina, Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina e Suc-

Leu-Leu-Val-Tyr-7- amido-4-metilcumarina para a determinação das atividades semelhantes a caspase (caspase-símile), tripsina (tripsina-símile) e quimotripsina (quimotripsina-símile), respectivamente, do proteossoma.

Foram utilizados 100 µg das frações enriquecidas e 13 µM dos substratos fluorogênicos. O tampão utilizado foi Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e MgCl₂ 10mM, na presença ou ausência do inibidor MG132. O ensaio foi realizado em um volume final de 240 µl com incubação de 30 minutos a 37°C cuja interrupção foi feita pela adição de 2 ml de etanol. A seguir a reação foi incubada em gelo por no mínimo 1 hora, e o material posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 1.500g. As leituras fluorimétricas foram realizadas em fluorímetro *RF-5301PC Shimadzu* nos comprimentos de onda 380 nm (excitação) e 440 nm (emissão) e os resultados foram expressos em unidades de fluorescência por µg de proteína.

3.9.5 Medida da atividade proteossomal endógena dependente de ubiquitina e ATP – 26S

As determinações da atividade proteolítica sobre substrato endógeno foram realizadas conforme FAGAN *et al.* (1987), à temperatura de 37°C, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, de modo que a quantidade de proteína no meio de incubação fosse sempre de 200 µg. As incubações foram feitas entre 0 e 90 minutos na presença e/ou ausência de ATP (5 mM) e ubiquitina (1 mg/mL), e interrompidas com ácido tricloroacético (TCA) para uma concentração final de 7-7,5%. As amostras foram resfriadas durante 1 hora e posteriormente centrifugadas durante 15 minutos a 2500g. Um ml do sobrenadante obtido como descrito acima foi utilizado para determinação fluorimétrica de tirosina livre. Este aminoácido é normalmente escolhido para avaliação da proteólise por não ser catabolizado e nem sintetizado “de novo”. Além disso, é facilmente dosado por um método fluorimétrico simples, de grande sensibilidade e reprodutibilidade (Waalkes & Udenfriend, 1957). A medida deste aminoácido entre os tempos zero e 90 minutos corresponde à

proteólise total, proveniente de todas as proteínas existentes no extrato, que ocorreu no referido período.

Para a determinação da atividade proteolítica endógena na presença de inibidores dos complexos proteolíticos 20 e 26S (proteossomo 20 e 26S), foi utilizado o aldeído peptídeo Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-Leucinal (MG132), em uma concentração final de 50 μ M, obtida a partir de uma solução estoque a 11 mM em DMSO 0,1%. Nos ensaios para verificar o efeito do inibidor, as amostras foram inicialmente incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e as atividades proteolíticas determinadas, como descritas anteriormente.

3.9.6 Western blot do ensaio proteolítico endógeno

Para a análise de *Western blot*, 20 μ g de amostra utilizada no ensaio proteolítico endógeno (incubada por 90 minutos na presença ou ausência de ATP, ubiquitina ou MG132) foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 13%). A transferência das proteínas para membrana e realização do imunoblot foi realizada como descrito em 3.9.2. O anticorpo primário utilizado foi anti-ubiquitina de *T. cruzi* produzido em camundongo (diluição de 1:100 em PBS 1X / Tween 0,1%). Formas epimastigotas sob estresse nutricional foram utilizadas para este ensaio.

3.9.7 Detecção de ubiquitina livre

Para investigação da presença de ubiquitina livre nos extratos brutos utilizados no ensaio da proteólise endógena, 30 μ g das frações enriquecidas foram submetidas à eletroforese e incubadas com soro anti-ubiquitina de *T. cruzi* com descrito em 3.9.2.

3.9.10 Validação estatística dos ensaios de proteólise

O teste ANOVA multifatorial seguido pelo teste Fisher foi usado para análise estatística dos ensaios de atividade proteolítica. A menor diferença significativa (teste LSD) foi utilizada para fazer comparações entre os valores médios. As médias aceitas como significativamente apresentaram intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

3.10. ANÁLISE DO PERFIL DE UBIQUITINAÇÃO

Para analisar o perfil de conjugados ubiquitinados durante a metaciclologênese foi inicialmente realizada uma metaciclologênese, como descrito em 3.5, para obtenção dos parasitas nos diferentes tempos. Em seguida os extratos foram preparados de modo a se obter um enriquecimento das proteínas marcadas com ubiquitinas nativas.

Primeiramente os parasitas epimastigotas de 3 e 5 dias, epimastigotas estressados, epimastigotas aderidos após 12 e 24 horas e tripomastigotas metacíclicos foram incubados com 5 μ M do inibidor de proteossomo PSI por 5 horas para o acúmulo de proteínas ubiquitinadas. Em seguida, as células foram coletadas e lisadas com tampão de lise desnaturante (0,02 M Tris-HCl pH 8,0; 0,01 M $MgSO_4$; 1 mM $CaCl_2$, 1% SDS, 0,01 M β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF; 10 mM E-64, 0,01 M iodoacetamida e DNase I), para que todas as interações entre proteínas fossem rompidas, precipitando apenas as proteínas modificadas covalentemente pela ubiquitina. Assim, proteínas nucleares e de membrana também podem ser obtidas, considerando-se que proteínas nucleares (Daniel *et al.*, 2004; Hoege *et al.*, 2002) e de membrana (revisto por Mukhopadhyay & Riezman, 2007) são também ubiquitinadas.

Para tanto, aproximadamente 1×10^8 células foram lavadas com PBS 1X e ressuspensas em 200 μ l de tampão de lise desnaturante. Em seguida foram acrescentados 15 unidades/ml de DNase 1 para fragmentação de DNA e as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos, no gelo por 5 minutos e então centrifugadas por 10 minutos a 14.000g, sendo então coletados os

sobrenadantes. Aos extratos desnaturados foram acrescentados 2 µl (1% do volume total) de tampão de lise não desnaturante. Como o excesso de NP-40 quebra o SDS do extrato, é possível a incubação deste com o anticorpo sem danos à sua funcionalidade. Os extratos foram dosados com auxílio do kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce) seguindo recomendações do fabricante.

O enriquecimento de proteínas marcadas por ubiquitinas dos extratos protéicos complexos foi obtido a partir de ensaios de imunoafinidade. Para isso, 20 µl de soro de camundongo contendo anti-ubiquitina e diluído a 100 µl em PBS 1X / 1 mg/mL de BSA foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente com 100 µl de esferas de proteína G sefarose, sob agitação. Após incubação, a resina foi centrifugada a 600g por 1 minuto, o soro restante foi retirado e realizada uma reação de *crosslinking* para ligar o anticorpo à proteína G covalentemente, evitando assim a liberação de anticorpos na amostra eluída da imunoafinidade. O *crosslinking* foi possível com o auxílio do reagente dimethyl pimelimidate (DMP): a resina foi lavada por 5 minutos com PBS 1X acrescido de 1 mg/ml de BSA, depois somente com PBS 1X e então incubada por 30 minutos com 0,02 M de DMP diluído em 0,2 M de trietanolamina pH 8,0, repetindo este processo 3 vezes. A reação foi parada com 0,05 M de etanolamina pH 8,0 e a resina foi lavada 3 vezes com PBS 1X.

Aproximadamente 100 µg de extrato protéico foram incubados com 100 µl de resina de anti-Ub durante a noite (16 horas) a 4°C/ A resina foi então lavada com 5 ml de tampão de lavagem de imunoafinidade e as proteínas foram eluídas 2 vezes com 150 µl de glicina 0,2 M pH 2,5 por 5 minutos, neutralizando o pH logo em seguida.

Como controle negativo, o mesmo ensaio foi realizado com soro pré-imune. As amostras de cada etapa de purificação foram concentradas com TCA 10% (ácido tricloroacético) por 1 hora no gelo, lavadas 2 vezes com acetona 100%, sempre centrifugando a 10000g por 30 minutos a 4°C e ressuspensas em 15 µl de 100 mM bicarbonato de amônio, e dosadas por kit *Micro BCA Protein Assay*, seguindo recomendações do fabricante. Em seguida as amostras foram diluídas em tampão de amostra 4X e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 13%. As proteínas foram transferidas a membranas de nitrocelulose e analisadas por *Western blot* como descrito em 3.9.2, utilizando-se soro anti-ubiquitina.

3.11. DETECÇÃO DE GRUPAMENTOS CARBONIL

Para a detecção de grupos carbonil formados em proteínas oxidadas, alíquotas da cultura com 5×10^8 parasitos foram removidas durante a metaciclogênese em cada uma das seis fases e coletadas por centrifugação a 7.000g a 4°C por 5 min. Os aglomerados de células foram lavados com PBS 1x por 3 vezes e ressuspensos em 100 µl de tampão de lise contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,3 M NaCl, 1mM PMSF, 10 µM E64, 10% glicerol, 0,1% NP-40. As suspensões celulares foram submetidas a oito ciclos de agitação vigorosa em Vortex por 30 segundos, com intervalos de resfriamento em gelo por 1 min. Em seguida, as células foram centrifugadas a 10.000g a 4°C por 20 min. Os sobrenadantes foram utilizados como amostras para detecção de grupamentos carbonils como descrito por Levine *et al.* (1994). As amostras foram dosadas com o kit *Micro BCA Protein Assay*. Cerca de 20 µg de proteínas dos diferentes tempos da metaciclogênese foram tratados com 2,4-dinitrofenilidrazina por 25 minutos e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e analisadas por ensaios de *Western blot* utilizando como anticorpo primário o anticorpo comercial de coelho anti-dinitrofenil e como anticorpo secundário anti-anticorpo IgG conjugado a fosfatase alcalina. As proteínas contendo grupamento carbonil foram visualizadas com auxílio do Kit NBT/BCIP.

A normalização dos resultados foi feita através da quantificação da intensidade das bandas imunoreativas e das presentes na membrana coradas com Ponceau S, com o auxílio do programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EUA) (http://www.scioncorp.com/frames/fr_download_now.htm). Após a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e coloração com Ponceau, uma banda consistente de proteína presente em todas as faixas foi usado para controle. Para normalizar os resultados de *Western blot*, os valores de densidade das bandas foram divididos pelos valores de densidade da banda de proteína corada com Ponceau S.

3.12 ANÁLISE DOS COMPONENTES DO PROTEOSSOMO

A fim de realizar uma investigação molecular dos componentes do proteossomo as proteínas recombinantes de ubiquitina e dos complexos PA26 e HslVU, bem como os anticorpos correspondentes, foram obtidas. Os anticorpos das subunidades do PA700 (Rpn7 e 10) e da subunidade do proteossomo 20S (Alfa7) e ubiquitina foram produzidos por nossa equipe e cedidos gentilmente para a análise dos perfis de expressão relativa durante a metaciclôgenese. Ensaio de imunolocalização também foram realizados.

3.12.1 Vetores plasmidiais para clonagem e expressão em *E. coli*

A clonagem dos genes e expressão das proteínas foi realizada de acordo com a tecnologia *Gateway*[®] (INVITROGEN), a qual utiliza métodos baseados em recombinação sítio-específico existentes em bacteriófagos lambda (Landy, 1989). Foram utilizados um vetor de entrada, pDONRTM221, e um vetor de destino pDESTTM17 (Figura 3.1).

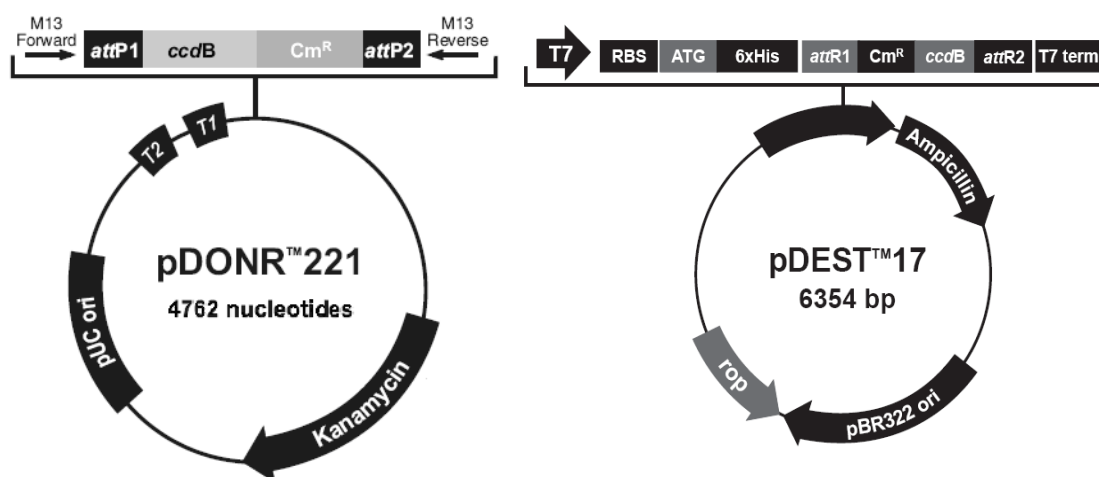


Figura 3.1 Desenho dos vetores de clonagem e expressão em *E. coli*.

A) pDONRTM221 - em destaque o sítio de inserção do gene com os adaptadores attP1 e attP2 que permitem a recombinação com os adaptadores attB1 e attB2 do gene. B) pDESTTM17 - destacando as principais características do vetor, como o promotor T7, a seqüência codificadora de 6 histidinas, sítios

attR de recombinação com os sítios attL dos clones de entrada, gene de seleção ccdB. Fonte: Catálogo Gateway® Technology Invitrogen (2006)

3.12.2 Identificação do regulador de proteossomo PA26, ubiquitina e proteossomo-like (HsIV e HsIU ATPase)

As seqüências dos genes que codificam as proteínas de *T. cruzi* citadas acima foram obtidas através de buscas no banco de dados do genoma do *T. cruzi* (TIGR – The Institute for Genomic Research, www.tigr.org). A análise das seqüências nucleotídicas dos genes foi feita utilizando-se o pacote de programas Lasergene (DNASTAR Inc.) e o algoritmo BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool” (Altschul *et al.*, 1997), do “National Center of Biotechnology Information” – NCBI vinculado ao “National Institute of Health” – NIH no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

3.12.3 Desenho de iniciadores e amplificação

Foram desenhados iniciadores diretos e reversos para amplificação dos genes descritos acima de *T. cruzi*, com o auxílio do programa *Primer Select* (*Laser Gene, DNA Star*). À extremidade de cada iniciador foram acrescentadas as seqüências correspondentes aos sítios attB (Tabela 2) para inserção das seqüências na plataforma *Gateway*® de clonagem.

Os genes foram amplificados a partir do DNA genômico de *T. cruzi* com o auxílio do *kit PCR Platinum*® *Pfx* (INVITROGEN), o qual utiliza uma DNA polimerase proveniente de *Thermococcus sp.* de linhagem KDO (Takagi *et al.*, 1997; Nishioka *et al.*, 2001) chamada *Platinum*® *Pfx DNA Polymerase*. Esta é uma enzima de alta fidelidade que minimiza os erros de polimerização, possibilitando melhores resultados. A mistura para a reação continha, em um volume final de 20 µl, os iniciadores direto e reverso 10 pmol, os quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP) 0,3 mM, MgSO₄ 1 mM, DNA genômico de *T.*

cruzi Dm28c 5 ng e *Platinum*[®] *Pfx* DNA polimerase 1 U, em tampão *Pfx* 1X. As mesmas concentrações de reação foram utilizadas para todos os genes. As reações foram submetidas a 35 ciclos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase): desnaturação – 94°C por 15 segundos, hibridação dos iniciadores 55°C por 30 segundos e polimerização 68°C por 1 minuto. Antes do primeiro ciclo as reações foram mantidas a 94°C por 3 minutos.

INICIADORES	SEQUENCIA
<u>attB1_Direto</u>	5' <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATG</u> ... 3'
<u>attB2_Reverso</u>	5' <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCC</u> TTA ... 3'

Tabela 2 Seqüências adaptadoras:

attb1, que é inserida na extremidade do iniciador direto, e a attb2 que é inserida na extremidade do iniciador reverso. Os 3 pontos são referentes à seqüência inicial (direto) e terminal (reverso) do gene desejado. O códon de parada (destacado em vermelho) foi acrescentado ao final da seqüência codificadora da proteína desejada.

3.12.4. Purificação dos produtos de amplificação

A purificação foi realizada tanto para eliminar possíveis seqüências amplificadas inespecificamente (e que não são de interesse para este trabalho), quanto para remover os iniciadores contendo sítios de recombinação attB os quais são fortes competidores pelo sítio attP do vetor, dificultando a clonagem dos insertos. A purificação foi realizada em PEG/MgCl₂ conforme as indicações do fabricante.

3.12.5 Recombinação dos produtos de amplificação

Os fragmentos de DNA amplificados dos genes ubiquitina, PA26, HslV e HslUATPse foram inseridos na Plataforma *Gateway*® através da recombinação entre os sítios attB do gene amplificado e attP do vetor pDONR™221 com o auxílio da enzima *BP Clonase*™II, originando um sítio attL. Para tanto, 9 ng do produto de PCR previamente purificado foram incubados com 150 ng do vetor pDONR™221 e com a enzima *BP Clonase* por 7 horas a 25°C, diluído em tampão TE pH 8,0. A reação foi parada com a adição de Proteinase K.

3.12.6 Preparo de células cálcio competentes

Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5.0 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado para cada cepa. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas sob agitação constante. Um volume de 1,0 ml (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 ml de meio LB e o mesmo foi incubado a 37°C sob agitação constante até o início da fase de crescimento exponencial (densidade ótica₆₀₀ de 0.4 a 0.6, aproximadamente 3 horas).

Após o crescimento, as células foram resfriadas no gelo por 15 minutos. A partir desse ponto todas as etapas foram feitas a 4°C. A cultura foi centrifugada a 4000g por 5 minutos a 4°C e as células foram ressuspensas em 50 ml (metade do volume da cultura original) de 100 mM CaCl₂ / 10 mM Hepes pH 7,0 gelado e estéril. As culturas foram mantidas no gelo durante 30 minutos e então submetidas à uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2,0 ml (1/50 do volume da cultura original) de 100 mM CaCl₂ / 10 mM Hepes pH 7,0 acrescido de glicerol 10%. As células foram aliquotadas e estocadas a -70°C.

3.12.7 Transformação de pDNORTM221 contendo os insertos por choque térmico em DH5α

Aproximadamente 100 µl de células cálcio competentes das bactérias *E. coli* da linhagem DH5α foram incubadas com 2 µl de plasmídeos pDNORTM221 recombinantes por 30 minutos em gelo e então foi realizado choque térmico por 3 minutos a 42°C e 3 minutos no gelo. Após a realização da transformação, as células foram incubadas em meio LB por 1 hora a 37°C sob agitação de 220 rpm, e em seguida plaqueadas em meio LB agar também com antibiótico para seleção.

3.12.8 Seleção dos clones recombinantes

3.12.8.1 Técnica da Palitagem (Toothpick)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de micro-centrifuga e para a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 10 µl do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 10 min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, usando o plasmídeo nativo como controle. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado sob luz ultravioleta.

3.12.8.2 Técnica de PCR de colônia

As colônias selecionadas foram transferidas para tubos de PCR contendo os reagentes da PCR e primers que hibridizam com regiões que flanqueiam o fragmento de DNA clonado, em um volume final de 20 µl. As amostras foram incubadas a 94°C por 10 minutos e submetidas a 30 ciclos de PCR com as seguintes etapas: 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de extensão a 72°C por 10 min. Os

produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1%. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min, lavado com água e analisado em luz ultravioleta.

3.12.9. Preparação de plasmídeo em pequena escala (miniprep)

Os clones recombinantes foram cultivados em 2 ml de meio LB, contendo o antibiótico apropriado, durante 18 h. Uma alíquota de 1,5 ml da cultura foi então centrifugada a 12.000g por 1 min a temperatura ambiente e os plasmídeos recombinantes purificados com o sistema de minipreparação de plasmídeo (Miniprep Qiagen Kit) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12.10 Recombinação com pDESTTM17 e transformação

Os plasmídeos preparados do pDONRTM221 foram utilizados para reação de recombinação com o vetor pDESTTM17, que permite a produção de proteínas fusionadas com seis histidinas na porção amino terminal para que a proteína seja reconhecida pelo anticorpo anti-histidina. A reação de recombinação foi catalisada pela LR ClonaseTMII. O vetor pDESTTM17 recombinado, ou seja, contendo o gene de interesse foi inserido em *E. coli* (DH5α) foi analisado pelo *Toothpick* e PCR de colônia para verificação da correta transformação dos insertos. Após confirmação, novamente os plasmídeos (pDESTTM17) foram purificados com o *kit Plasmid Miniprep Purification* (Qiagen) preparados, transformados em *E. coli* da linhagem BL21 e plaqueados em meio LB com ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 25µg/ml.

3.12.11 Produção das proteínas recombinantes em BL21

Para expressão das proteínas, 10 ml do pré-inóculo foi preparado a partir das células BL21 com plasmídeo (pDESTTM17 + seqüência específica), e mantidos por uma noite (~16 horas) a 37°C sob agitação. As culturas foram diluídas 10 vezes acrescentando 100 ml de meio LB com ampicilina (100 mg/l) e cloranfenicol (25 mg/l) e cultivadas novamente a 37°C sob agitação (220 rpm) por cerca de 2 horas, até que a densidade óptica (D.O.) medida através de espectrofotômetro a 600 nm atingisse 0.8 (fase estacionária de crescimento).

Retirou-se uma alíquota do meio (amostra não induzida) e em seguida acrescentou-se 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-tio-galactopiranosídeo) para a indução. Novamente a cultura foi mantida sob agitação por duas horas a 37°C. Posteriormente a cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 50 ml de PBS 1X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄) por duas vezes. Em seguida o PBS foi descartado e foi adicionado 5 ml de tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; PMSF 1 mM em PBS 1X). A sonicação foi realizada no Ultrasonic Homogenizer 4710, na potência oito por 15 segundos repetidos quatro vezes. Depois de retirada de uma amostra para verificar proteínas totais, a solução foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos a 4°C, coletando-se uma amostra do sobrenadante para análise das proteínas solúveis. O precipitado foi ressuspenso em tampão de ligação (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol e 8 M uréia) e novamente sonicado como anteriormente. Após sonicação foi coletada uma amostra das proteínas insolúveis.

Em todas as amostras coletadas foi acrescentado tampão de proteína 1X para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%. O gel foi corado com Coomassie Blue para visualização das bandas de proteínas.

3.12.12 Coloração por Coomassie Blue

A verificação do resultado obtido após eletroforese das amostras em gel de poliacrilamida foi realizada através da coloração do gel por Coomassie Blue. Após incubação por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente, o gel foi descorado com solução de descoloração para SDS-PAGE para visualização das bandas.

3.12.13 Purificação das proteínas em resina de níquel NiNTA-Agarose

Para a purificação da proteína recombinante, utilizou-se colunas contendo resina de níquel NiNTA-Agarose (*QIAGEN*). Aproximadamente 2 mg de proteína recombinante foram incubados durante a noite a 4°C com 500 µl de resina NiNTA-Ag previamente equilibrada com tampão de lise de bactérias. Após incubação a resina foi lavada 5 vezes com 5 ml de tampão de lavagem com imidazol e a eluição foi feita também em 5 etapas com 1 ml cada de tampão de eluição com imidazol. As outras proteínas solubilizadas com uréia passaram pelo mesmo processo de purificação, porém aos tampões utilizados na lavagem e eluição da proteína recombinante foram acrescentados 8 M de uréia, para evitar a precipitação das proteínas.

As amostras de cada etapa de purificação foram separadas em géis de acrilamida SDS-PAGE e para visualização dos resultados, os quais foram corados com Coomassie Blue e descorados com solução de descoloração.

As proteínas solúveis foram filtradas por centrifugação em filtro Amicon® Centricon® 50 (*AMICON*) que retém proteínas com massa molecular acima de 50 kDa. A filtração foi feita a 4°C com tempo variado, até que a amostra passasse completamente pelo filtro.

As frações protéicas que não tiveram boa purificação com a resina de níquel passaram por uma segunda etapa de purificação utilizando uma metodologia diferente descrita a seguir.

3.12.14 Purificação das proteínas por eletroeluição

Em de gel poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) foi aplicado toda a amostra de proteína obtida na expressão. O gel foi submetido a uma corrente constante de 15 a 20 mA e assim permaneceu por uma noite (~16 horas). Após o término da corrida o gel foi imerso em KCl 100 mM gelado para visualização das bandas.

A seguir as bandas foram cortadas, ou seja, retiradas do gel para realização da eletroeluição. As tiras cortadas dos géis foram colocadas em membranas de diálise pré-hidratadas, juntamente com 1 ml de tampão de eletroforese de proteínas 1X. As mesmas foram imersas em tampão de eletroforese 1X em uma cuba horizontal, de modo que os géis se localizassem mais próximos do pólo negativo, com uma corrente constante de 80V por 2 horas. Após esse período foi invertido o pólo por 30 segundos, para que as proteínas soltassem da membrana e voltassem para a solução. Após este tempo foi coletado 1 ml da solução no interior da membrana de diálise. Esse procedimento de coleta foi repetido por mais três vezes. O material coletado foi analisado por gel de poliacrilamida 15% e confirmado por *Western blot* (Towbin *et al.*; 1979) com anti-histidina. A dosagem das proteínas recombinantes purificadas foi feita com o auxílio do kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce) seguindo recomendações do fabricante.

3.12.15 Produção de anticorpos policlonais

Anticorpos policlonais foram obtidos através da imunização de camundongos fêmeas de linhagem *Swiss* com aproximadamente 45 dias de idade no início das inoculações.

Para se obter anticorpos específicos, sem contaminantes foi realizado um teste pré-imune, que consiste na verificação da qualidade do soro através de ensaios de imunoblot. Extratos de proteínas totais de *T. cruzi* foram fixados em membrana de nitrocelulose, como descrito anteriormente, e incubados com

soros pré-ímenes de diferentes camundongos. A revelação foi realizada através de reação com fosfatase alcalina (como descrito anteriormente).

Após a seleção dos camundongos por teste do pré-íme, os mesmos foram imunizados por via intraperitoneal com repetidas inoculações (4 inoculações, uma a cada 15 dias) de 20 µg da proteína recombinante purificada diluída em Adjuvante de Freund completo (*Sigma*) no primeiro dia e Alu-Gel-S (*Serva*) nas demais inoculações.

Uma semana após a 4^a inoculação, uma gota de sangue dos camundongos foi coletada através de excisão da extremidade da cauda. Os soros coletados foram testados por *imuno blot* e uma vez que a titulação do soro estivesse suficientemente alta, o sangue do animal foi coletado através de punção cardíaca, em no máximo 10 dias após a última inoculação. O material foi mantido em temperatura ambiente por no mínimo 1 hora para a coagulação do sangue e então centrifugado por 30 minutos a 2000g. O sobrenadante (anti-soro) foi coletado e armazenado a -20°C.

3.12.16 Análise na expressão relativa das proteínas dos componentes do proteossomo por *Western blot*.

Inicialmente foi realizada a metaciclogênese como descrito em 3.5 para obtenção dos parasitas nos diferentes tempos. Para preparar os extratos, os parasitas foram coletados por centrifugação (4.000g, 15 min a 10°C) e lavados duas vezes em PBS pH 7,5. Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em PBS em uma densidade de 1×10^6 células/µl e lisados em tampão de amostra para proteína e fervidos por 5 min. As proteínas foram dosadas com o auxílio do kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce) seguindo recomendações do fabricante.

A expressão relativa das proteínas dos complexos reguladores de proteossomo (PA26, PA700, Rpn7 e Rpn10), da subunidade catalítica do proteossomo 20S (alfa7), das subunidades do proteossomo-*like* (HsLV e HsLU ATPase) e da ubiquitina foi analisada por ensaios do tipo *Western blot*.

3.12.17 Imunolocalização dos componentes do proteossomo

Os componentes do proteossomo foram imunolocalizados em parasitas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Primeiramente foi realizada a metaciclogênese como descrito em 3.5 para obtenção das parasitas. O experimento de imunolocalização foi realizado de acordo com as seguintes etapas:

3.12.17.1 Preparação dos parasitas

Os parasitas foram contados e 10^8 células foram centrifugadas a 7000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 3 vezes com PBS 1X. Em seguida os parasitas foram ressuspensos em 1 ml de paraformaldeído 4% e deixados a temperatura ambiente por 20 min.

3.12.17.2. Preparação das lamínulas

As lamínulas foram preparadas com a adição de ~100 μ L de Poly-L-lisina e deixadas por 20 minutos a 37°C. Em seguida os parasitas (~50 μ l) foram adicionados as lamínulas e incubados de 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente em câmara úmida. Após a incubação o excesso de parasitas foi retirado com pipeta e a lamínula foi lavada suavemente com PBS 1X. Para permeabilização das membranas dos parasitas foi adicionado 50 μ L Triton X-100 0,075% por 2 minutos. Seguiu-se lavagem por 3x por imersão com PBS 1X e incubação em BSA 1% / PBS 1x por 2 horas a temperatura ambiente.

3.12.17.3. Marcação com fluorescência

O excesso de BSA 1% / PBS 1x foi retirado com pipeta e ~ 100 μ L dos anticorpos primários diluídos a 1:100 em BSA 1% / PBS 1x foram adicionados às lamínulas, seguindo-se incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após lavagem em PBS 1x por 3 vezes, cerca de 50 μ l de anticorpo secundário AlexaFluor 488 foi adicionado às lamínulas, com incubação por 1 hora a 37°C no escuro. As lamínulas foram novamente lavadas e os parasitas foram tratados com 50 μ l de DAPI por 5 minutos para marcação do DNA (núcleo e cinetoplasto). Após abundante lavagem com PBS 1X as lamínulas foram montadas sobre lâminas com uma gota de DABCO 2,5% (N-propil galacto

2,5%) e seladas. As amostras foram observadas em um microscópio Nikon E600 equipado com epifluorescência.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese permitiram demonstrar e melhor caracterizar a função biológica de diferentes tipos de proteossomos em *Trypanosoma cruzi*. Os dados obtidos foram organizados de acordo com as diferentes abordagens utilizadas e serão descritos a seguir.

4.1 INIBIÇÃO DO PROTEOSSOMO E AVALIAÇÃO CELULAR

Diferentes estratégias foram utilizadas com o propósito de avaliar o efeito da inibição da atividade dos proteossomos durante o crescimento e metaciclogênese do *T. cruzi*. Após avaliação da ação de diferentes inibidores específicos de proteossomo sobre o crescimento e a metaciclogênese de *T. cruzi* e determinada a concentração inibitória, seguimos a investigação dos efeitos da inibição do proteossomo sobre os parasitas por microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e citometria de fluxo.

Foram selecionados três inibidores específicos de proteossomo para avaliação: PSI, MG132 e lactacistina. As drogas PSI e MG132 são peptídeos aldeídicos que inibem fortemente as atividades semelhantes à quimotripsina e caspase, podendo inibir outras proteases como calpaínas e catepsinas. A lactacistina é um produto natural muito diferente estruturalmente dos peptídeos aldeídicos, sendo mais específica. Neste caso, a inibição dos proteossomos é feita através da ligação covalente aos grupos hidroxilas dos sítios treoninas das subunidades β , provocando a inibição das atividades semelhantes a tripsina e quimotripsina, podendo também inibir catepsina A (Revisto por Do Lee & Goldeberg, 1998).

4.1.1 Tratamento com o inibidor específico de proteossomo lactacistina bloqueia o crescimento de *T. cruzi*

A adição de diferentes concentrações de lactacistina (0, 3, 5 ou 10 μM) às culturas de *T. cruzi* em meio LIT resultou em uma inibição dose-dependente do crescimento das culturas (Figura 4.1A). A cultura controle, sem adição da droga, aumentou de 10^6 células/ml para cerca de 6×10^7 células/ml, durante 96 h de cultivo. Por outro lado, em culturas tratadas com 10 μM lactacistina não houve crescimento celular (Figura 4.1A). A dose que inibiu 50% do crescimento (IC_{50}) em um período de incubação de 24 ou 72 h foi de cerca de 4,35 μM (Figura 4.1B).

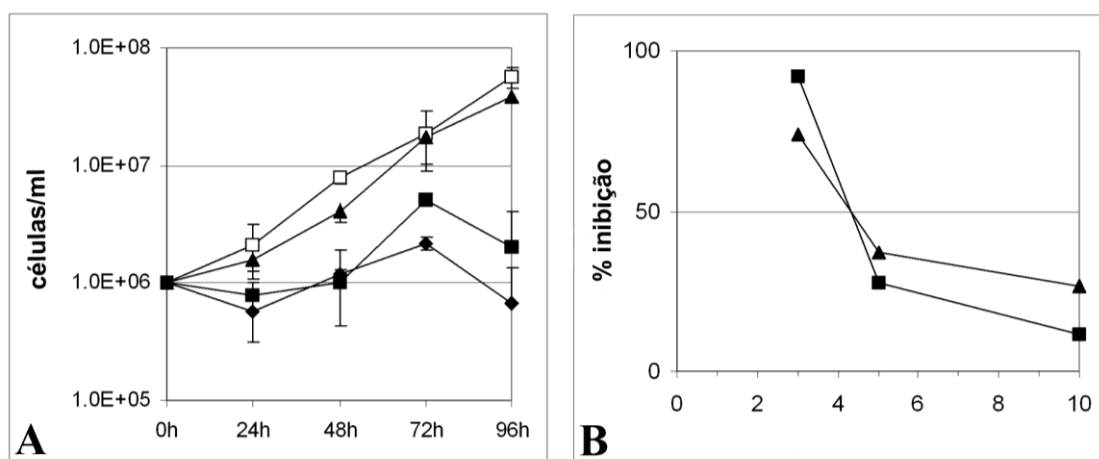


Figura 4.1 Efeito de lactacistina no crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

(A) As células foram tratadas com 0 (controle, □), 3 (▲), 5 (■) ou 10 (◆) μM de lactacistina. O eixo Y (células/ml) está em escala logarítmica. (B) Valores da IC_{50} após 24 h (▲) e 72 h (■) de tratamento com lactacistina. O eixo X representa a concentração de lactacistina em μM . Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

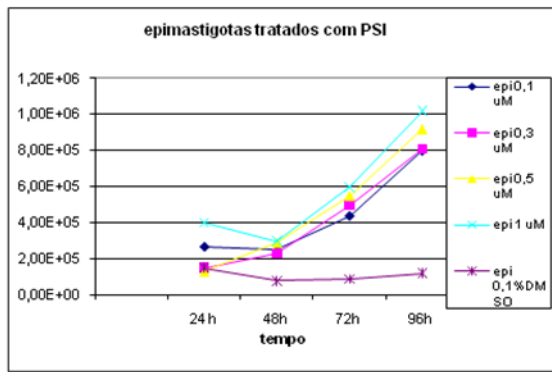
4.1.2 A metaciclologênese é bloqueada com a inibição do proteossomo

A fim de obter a concentração que inibe a metaciclologênese, diferentes concentrações dos inibidores específicos de proteossomo PSI (Figura 4.2A e B), MG132 (Figura 4.2C e D) e lactacistina (Figura 4.2F e G) foram adicionadas separadamente em meio de estresse TAU e meio de diferenciação TAU3AAG, em metaciclologêneses individuais. Foram realizadas contagens diferenciais das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas presentes no sobrenadante do meio de cultura TA3AAG durante 96 horas. Após determinada a concentração que inibiu efetivamente a metaciclologênese foi feito um novo experimento para confirmação dos resultados (Figura 4.3A e B).

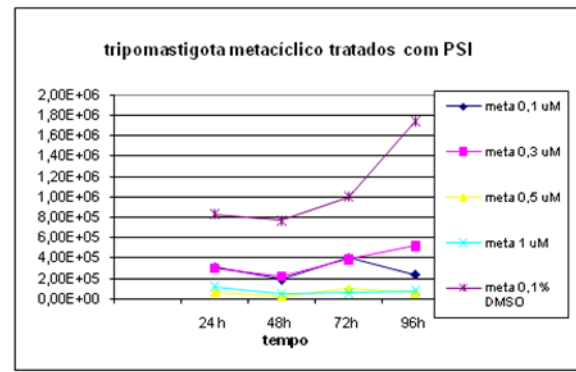
O número de epimastigotas diminuiu ao longo do tempo nas culturas controle de PSI e MG132 (contendo 0,1% de DMSO, Figura 4.2A e C - ✕) ou de lactacistina (sem DMSO, Figura 4.2E - ◆), enquanto que o número de formas tripomastigotas metacíclicas aumentou gradativamente no sobrenadante (Figuras 4.2B e D - ✕, e Figura 4.2F - ◆). Estes resultados eram esperados em uma metaciclologênese normal, pois os epimastigotas aderem-se à parede da garrafa (e assim diminuem em número no sobrenadante) e gradualmente se soltam para o sobrenadante na forma de tripomastigotas metacíclicas.

O contrário foi observado em culturas tratadas com os inibidores de proteossomo, onde houve aumento no número de epimastigotas nas diferentes concentrações dos inibidores usadas (Figura 4.2A,C,E), com diminuição do número das formas tripomastigotas metacíclicas (Figura 4.2B,D e F) ao longo de 96 horas. As concentrações que efetivamente bloquearam a metaciclologênese foram 0,5 μ M de PSI (Figura 4.3A e B - ◆), 0,1 μ M de MG132 (Figura 4.3 A e B - ■) e 5 μ M de lactacistina (Figura 4.3A e B - ●).

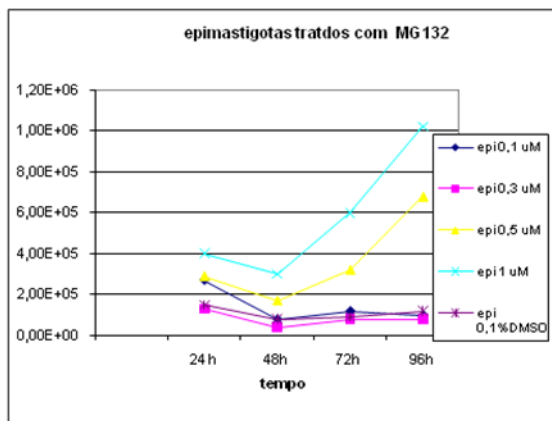
Todos os inibidores testados impediram a metaciclologênese. No entanto, dentre as drogas avaliadas o inibidor lactacistina se mostrou mais eficiente, além de ser mais específico (Coux *et al.*, 1996). Deste modo, este foi selecionado para dar seqüência à avaliação dos efeitos morfológicos conseqüentes da inibição da atividade dos proteossomos nos parasitas durante a metaciclologênese.



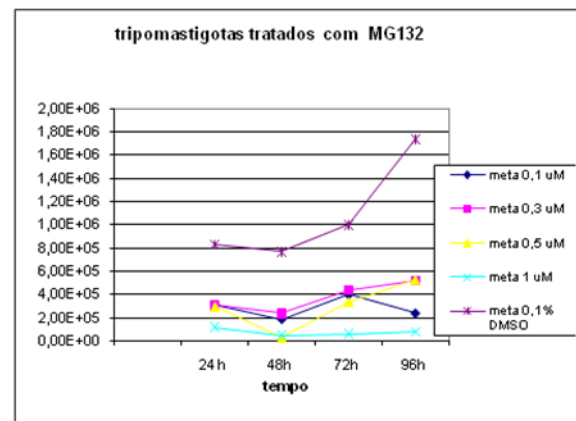
A



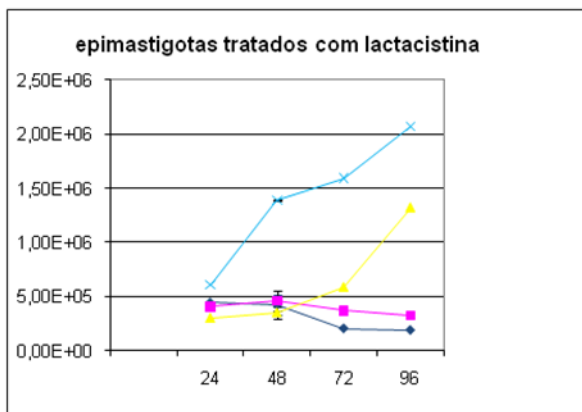
B



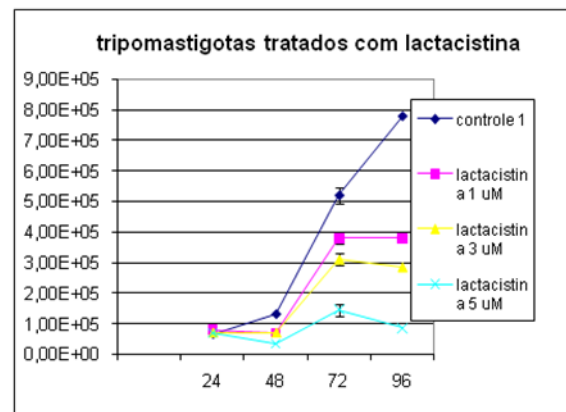
C



D



E



F

Figura 4.2 Efeito de tratamento com diferentes concentrações dos inibidores específicos de proteossomo

O eixo Y (células/ml) está em escala logarítmica. (A e B) Efeito de PSI sobre as formas epimastigotas (A) e tripomastigotas metacíclicos (B) de *T. cruzi* tratadas com 0.1 (◆), 0.3 (■), 0.5(▲) ou 1 (×) μM de PSI. Como controle foi usado meio contendo 0.1% DMSO (⋈). (C e D) Efeito de MG132 sobre as formas epimastigotas (C) e tripomastigotas metacíclicos (D) de *T. cruzi* tratadas com

0.1 (◆), 0.3 (■), 0.5(▲) e 1 (×) μM de MG132. Como controle foi usado meio contendo 0.1% DMSO (⋈). (E e F). Efeito de lactacistina sobre as formas epimastigotas (E) e tripomastigotas metacíclicas (F) de *T. cruzi* tratadas com 0 (◆), 1 (■), 3(▲) e 5 (×) μM de lactacistina.

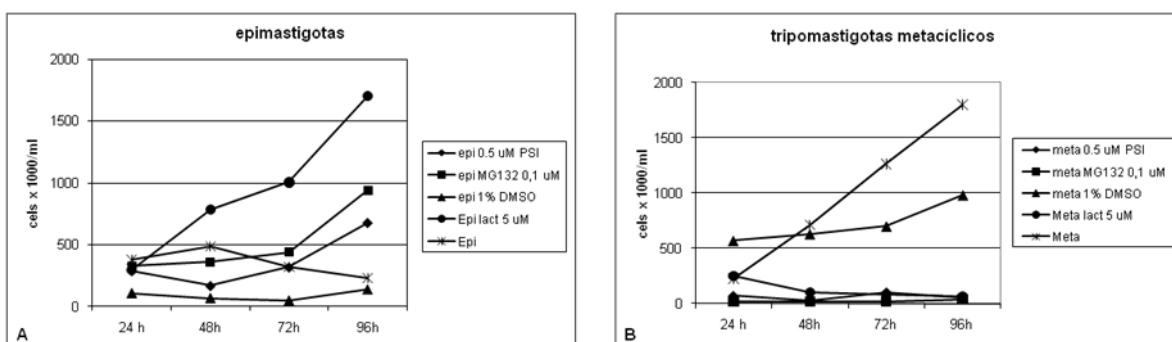


Figura 4.3 Os inibidores de proteossomo PSI, MG132 e lactacistina bloqueiam a metaciclogênese.

(A e B) Experimento realizado com as concentrações dos inibidores PSI (0,5 μM , ◆), MG132 (0,1 μM , ■) e lactacistina (5 μM , ●) que efetivamente bloqueiam a metaciclogênese. Controles sem a droga (⋈) ou contendo DMSO 0,1% (▲). Os gráficos mostram a aumento no número de epimastigotas em culturas tratadas (A), com o conseqüente diminuição no número de formas tripomastigotas metacíclicas no sobrenadante das culturas (B).

4.1.3 Lactacistina inibe aproximadamente 95% da metaciclogênese

A porcentagem da diferenciação durante a metaciclogênese foi estimada através de contagens diferenciais dos parasitas no sobrenadante (meio TAU3AAG) em meio contendo 5 μM de lactacistina, em diferentes intervalos de tempo. Nas culturas sem lactacistina o número de tripomastigotas metacíclicos aumentou gradualmente ao longo de 96 h, enquanto que nas culturas tratadas houve uma inibição da diferenciação celular em cerca de 95% (Figura 4.4). Nas culturas tratadas com lactacistina a maioria dos parasitas do sobrenadante permaneceu sob a forma epimastigota.

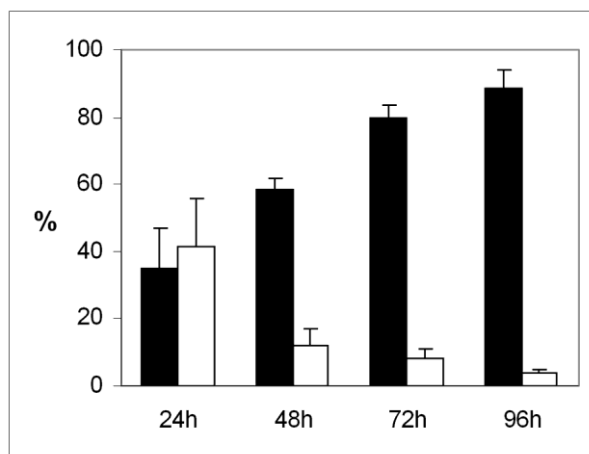


Figura 4.4 Porcentagem de diferenciação em meio TAU3AAG.

A figura mostra o percentual de tripomastigotas metacíclicos no sobrenadante de culturas controle (barras pretas) e de culturas tratadas com 5 µM lactacistina (barras brancas), em diferentes intervalos de tempo. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos diferentes.

4.1.4 Parasitas tratados com lactacistina aderem-se ao fundo da garrafa, mas não se diferenciam

Durante a diferenciação *in vitro* de *T. cruzi* em meio TAU3AAG as formas epimastigotas aderem-se ao substrato (fundo e paredes da garrafa de cultura) e em seguida transformam-se em tripomastigotas metacíclicos. Esta adesão parece ser necessária, mas não suficiente, para o processo de metaciclogênese (Bonaldo *et al.*, 1988).

Utilizamos microscopia óptica para examinar *in vivo* os parasitas aderidos ao fundo dos frascos de culturas após 24 h de diferenciação, em meio contendo 5 µM lactacistina ou sem droga (controle). Observamos que a maioria dos epimastigotas das culturas controle e tratadas estavam aderidos após 24 horas. Os epimastigotas das culturas controle mantiveram sua forma característica (Figura 4.5A), enquanto que as células tratadas com lactacistina apresentaram uma forma arredondada e curta (Figura 4.5B). Investigamos também os parasitas aderidos e presentes no sobrenadante das culturas após 24 h através de coloração de Giemsa e observação por microscopia óptica. Os

epimastigotas aderidos em meio contendo lactacistina (Figura 4.5D) apresentaram-se mais curtos do que os epimastigotas do controle (Figura 4.5C).

A maioria das células no sobrenadante do meio sem droga exibiu uma morfologia característica de tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.5E), enquanto que no sobrenadante do meio com lactacistina as formas encontradas foram predominantemente epimastigotas (Figura 4.5F). O processo de adesão não foi interrompido pelo tratamento com lactacistina, pois um número semelhante de parasitas aderidos foi observado nos frascos de culturas tratadas e não tratadas. Isto indica que a inibição do proteossomo não bloqueou a adesão, mas afetou fatores que desencadeiam o processo de diferenciação do *T. cruzi*.

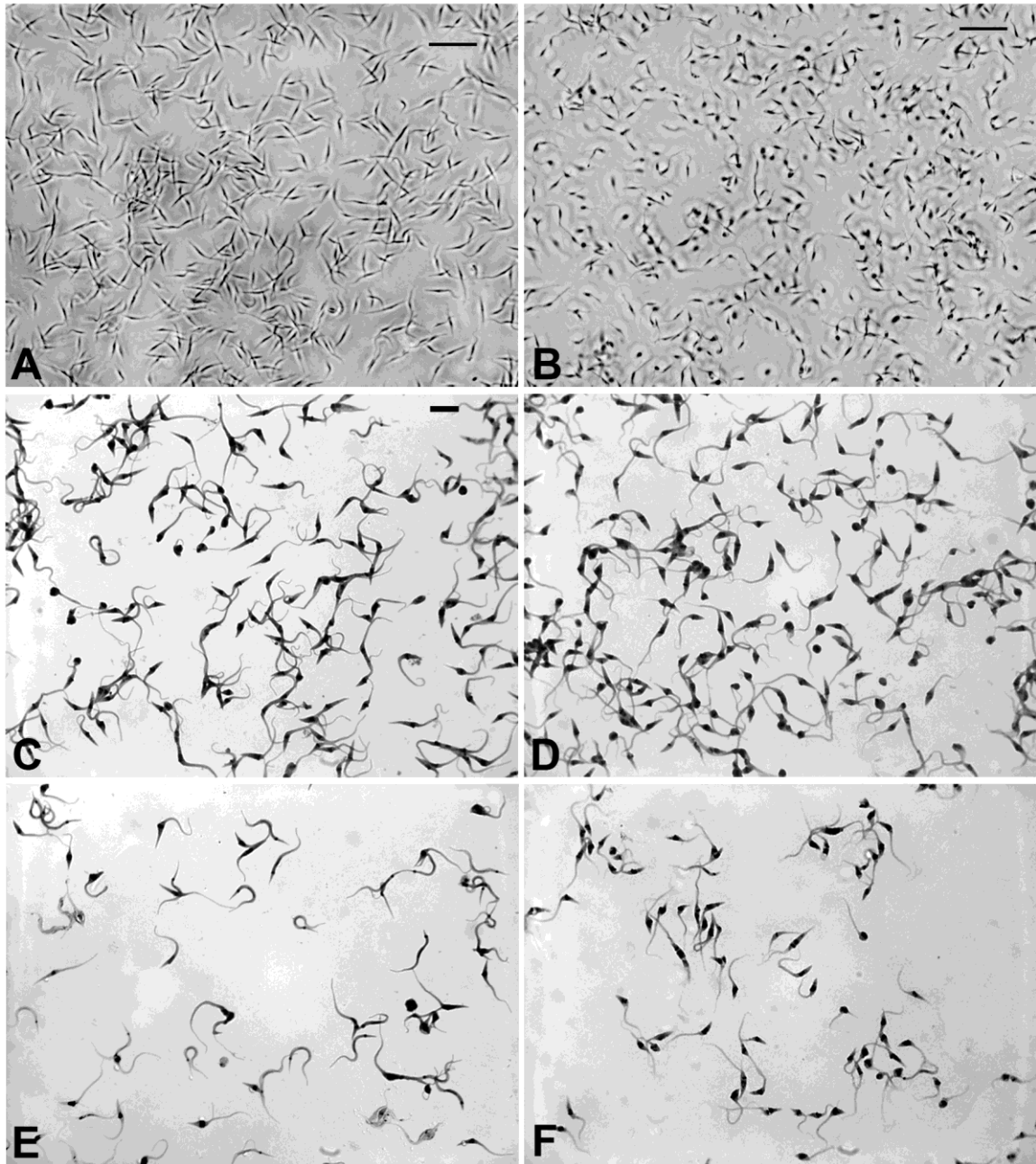


Figura 4.5 Análise por microscopia óptica dos epimastigotas.

(A e B) Análise por microscopia óptica dos epimastigotas vivos em meio TAU3AAG, aderidos após 24 horas de tratamento: (A) controle sem droga, (B) meio contendo 5 μM de lactacistina. Barra = 20 μm . (C, D, E e F) Análise por microscopia óptica dos parasitas corados com coloração de Giemsa, após 24 horas de tratamento. (C) epimastigotas aderidos, controle sem a droga. (D) epimastigotas aderidos em meio contendo 5 μM de lactacistina. (E) tripomastigotas metacíclicos presentes no sobrenadante de meio sem

lactacistina. (F) epimastigotas presentes em meio contendo 5 μM de lactacistina. Barra= 20 μm .

4.1.5 Tratamento com o inibidor específico de proteossomo lactacistina causa alterações morfológicas nos parasitas

Avaliamos o processo de transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos usando microscopia eletrônica de transmissão (MET) em culturas tratadas e não tratadas com lactacistina. Parasitas provenientes de meio LIT e incubados por 2 horas em meio TAU (condição de estresse) mantiveram a forma típica de epimastigotas (Figura 4.6A). O mesmo foi observado em culturas de meio TAU contendo 5 μM de lactacistina (Figura 4.6B). Parasitas tratados apresentaram baixa granulosidade nos reservossomos, mas não foi detectada outra alteração morfológica nas células.

As formas epimastigotas começam a soltar do fundo da garrafa de cultura após 24 horas de incubação em meio TAU3AAG sem lactacistina, ficando livres no sobrenadante sob a forma de tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.6C). Entretanto, epimastigotas de culturas tratadas com lactacistina não se diferenciaram e se soltaram para o sobrenadante ainda sob a forma de epimastigotas (Figura 4.6D) mantendo sua morfologia normal, mas com baixa granulosidade nos reservossomos.

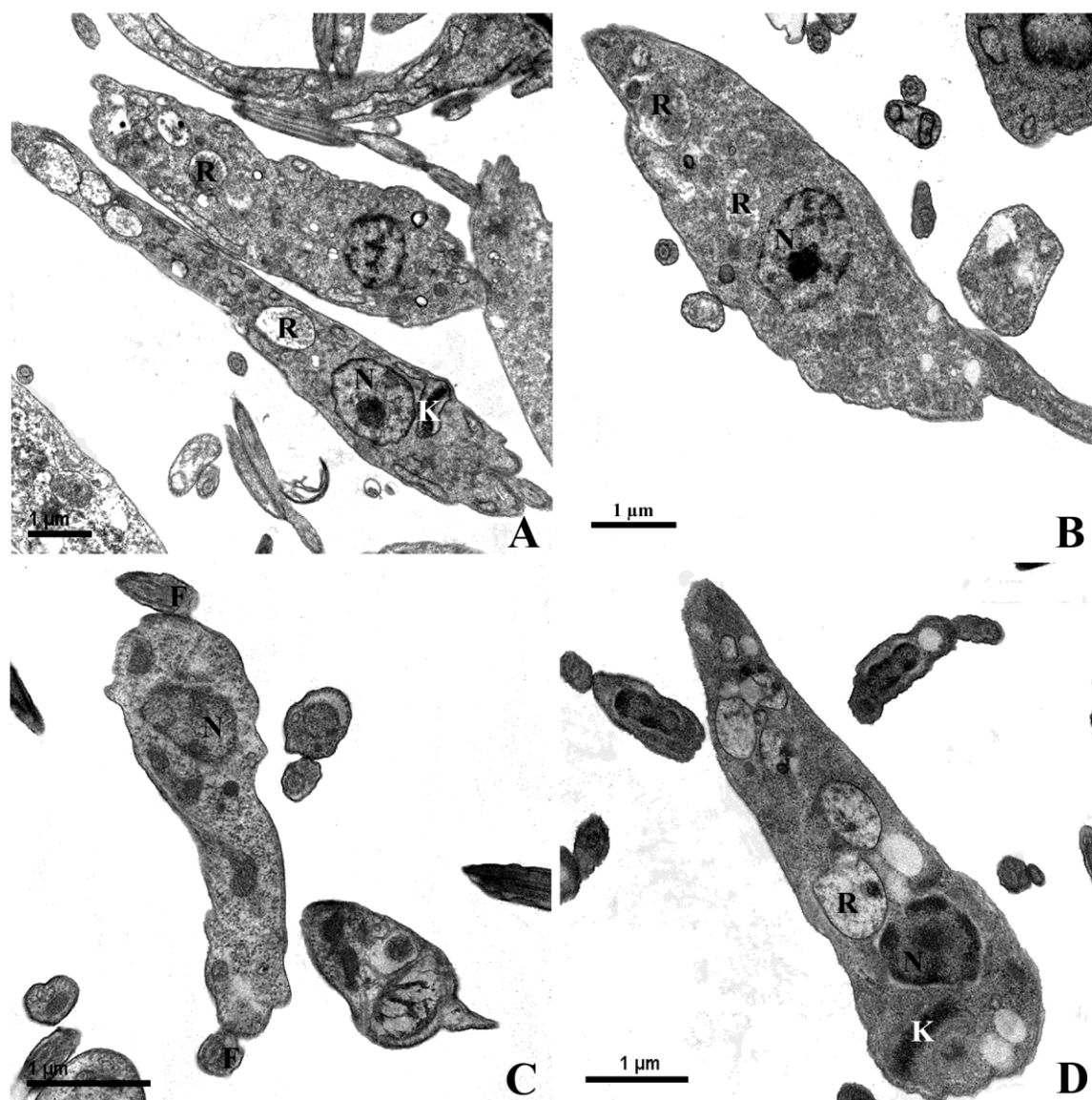


Figura 4.6 Microscopia eletrônica de transmissão de *T. cruzi*.

A. Epimastigotas controle após 2h de incubação em meio TAU (condição de estresse); B. Epimastigota após 2h de incubação em meio TAU contendo 5 µM lactacistina; C. Parasitas presentes no sobrenadante de culturas controle após 24 horas de incubação em meio TAU3AAG (meio de diferenciação). Há um predomínio de formas tripomastigotas metacíclicas; D. Epimastigota após 24 h de incubação em meio TAU3AAG contendo 5 µM de lactacistina (meio de diferenciação). Notar a baixa granulosidade dos reservossomos. F, flagelo; K, cinetoplasto; N, núcleo; R, reservossomo.

Após 72 horas de incubação em meio contendo lactacistina as formas epimastigotas aderidos apresentaram uma forma arredondada com inchaço da

mitocôndria, com aspectos de células apoptóticas (Figura 4.7B). O DNA nuclear e do cinetoplasto apresentou-se condensado e com grânulos densos (Figura 4.7B). Em contrapartida, em epimastigotas aderidos da cultura controle não foram detectadas alterações morfológicas, nem perda de granulosidade nos reservossomos (Figura 4.7A).

Após 72 horas de cultivo a maioria das células não tratadas presentes no sobrenadante de culturas controle estava sob a forma de tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.7C). Entretanto, em culturas tratadas as células exibiram a forma típica de epimastigotas, com cinetoplasto em forma de bastão (Figura 4.7D). Não foram detectados reservossomos em culturas tratadas após 72 horas, enquanto que a maioria das células apresentou inchaço do núcleo e da mitocôndria, com aspectos de células apoptóticas (Figura 4.7D).

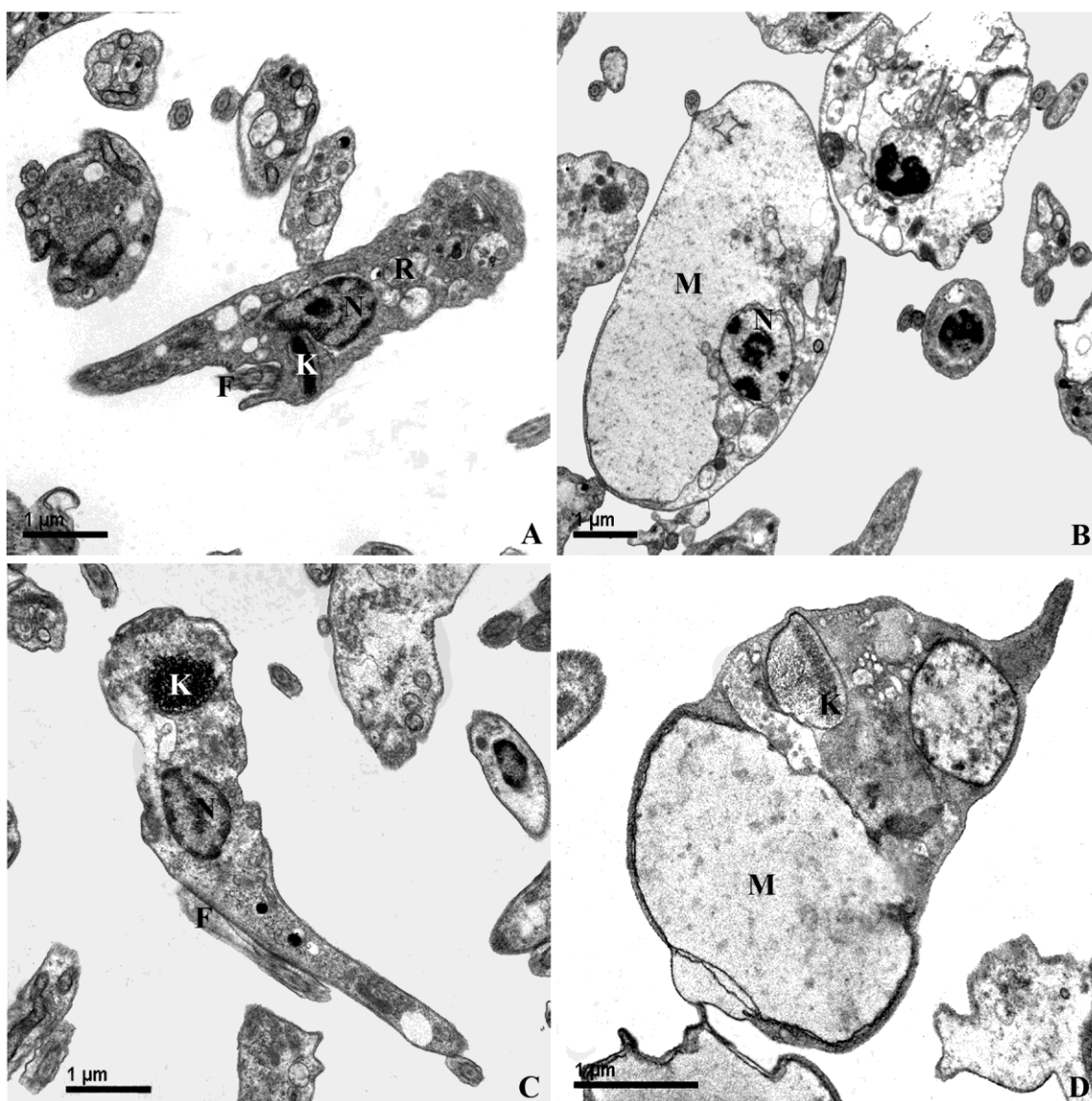


Figura 4.7 Microscopia eletrônica de transmissão de *T. cruzi*.

Após incubação em meio TAU3AAG após 72 horas: A. Epimastigotas aderidos de culturas controle. B. Epimastigotas aderidos de culturas tratadas com 5 μM lactacistina: os parasitas apresentam a forma arredondada, com inchaço da mitocôndria. C. Tripomastigotas metacíclicos do sobrenadante de culturas controle. D. Epimastigotas do sobrenadante de cultura com 5 μM de lactacistina: os parasitas apresentam inchaço da mitocôndria. F, flagelo; K, cinetoplasto; M, mitocôndria; N, núcleo; R, reservossomo

4.1.6 A inibição do proteossomo altera o ciclo celular de *T. cruzi*

Análise do conteúdo de DNA dos parasitas mantidos em meio contendo lactacistina durante a metaciclologênese foi feita por citometria de fluxo. Foram analisados epimastigotas mantidos em meio LIT por 24 horas ou submetidos a estresse nutricional por 2 h em meio TAU. Além disso, foram analisados parasitas no sobrenadante do meio TAU3AAG, com ou sem 5 μM de lactacistina, após 48 e 72 horas de diferenciação.

Os resultados (Tabela 3, Figuras 4.8 e 4.9) demonstraram que cerca de 70% dos epimastigotas em meio LIT sem a droga (controle) estavam na fase G1 apresentando DNA típico, enquanto 17,1% estavam em G2 apresentando DNA duplicado. No entanto, em culturas em meio LIT tratadas com 5 μM de lactacistina cerca de 30,8% dos epimastigotas estavam em G1, 43,2% estavam em G2 e 27,9% das células tinham seu DNA fragmentado. Quando epimastigotas do meio LIT foram submetidas ao estresse nutricional em meio TAU a maioria das células parou de se dividir, resultando em uma proporção de células em G1 de 59,1% e cerca de 33,9% em G2 com DNA duplicado (Tabela 3, Figura 4.9 C).

Análise dos parasitas presentes no sobrenadante de culturas de TAU3AAG sem a droga revelou que cerca de 80% das células eram tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.4). A proporção de células em G1 foi de 87,5% após 48h e de 64,7% após 72h (Tabela 3, Figura 4.9 D e F – barras pretas), sendo que poucas células permaneceram em G2 após 48h (7,2%) ou 72h (22,3%). Essas células passaram da fase de replicação para um estado de diferenciação. O aumento da proporção de células em G1 reflete o fato de que a maioria dos parasitas já está em um estágio diferenciado. No entanto, apenas 15% das células incubadas por 48 h em meio de diferenciação contendo lactacistina eram tripomastigotas metacíclicos, demonstrando uma inibição substancial da metaciclologênese (figura 4.4). Observou-se também uma menor proporção de células em G1 após 48 ou 72 h em culturas tratadas, do que em culturas sem tratamento (Tabela 3, Figura 4.9 E e G – barras pretas). Inversamente, a proporção de células em G2 foi maior em culturas tratadas do

que na ausência de tratamento após 48 ou 72 h (Tabela 3, Figura 4.9 E, G - barras listradas).

O acúmulo de células em G2 (Figura 4.9) indicou que lactacistina afetou o disparo da diferenciação celular de *T. cruzi*. Parasitas aderem ao fundo do frasco de cultura, mas não realizam a mudança de replicação para a diferenciação. Na verdade, os parasitas param o processo de replicação, mas não iniciam o processo de diferenciação, sendo liberados para o sobrenadante ainda na forma de epimastigotas.

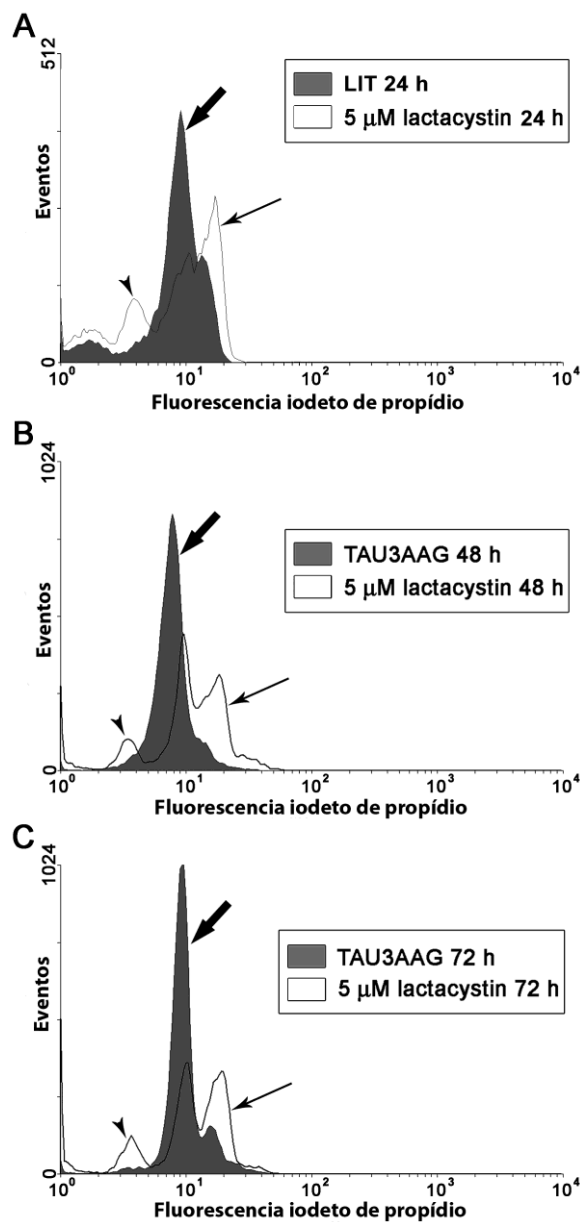


Figura 4.8 Análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA em *T. cruzi*.

Os gráficos mostram sub-populações de células com DNA fragmentado (cabeças de setas), com conteúdo de DNA típico (setas grossas) ou com DNA duplicado (setas finas). (A) Populações de parasitas controle (gráfico escuro) e tratados com 5 μ M de lactacistina (gráfico transparente) após 24 h em meio LIT. (B e C) Populações de parasitas cultivados por 48 h (B) ou 72 h (C) em TAU3AAG contendo 5 μ M de lactacistina (gráfico transparente) ou em meio controle (gráfico escuro). O número de parasitas com DNA duplicado aumentou com o tratamento com lactacistina para todos os experimentos (setas finas). Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e biológica. Este gráfico mostra um experimento representativo.

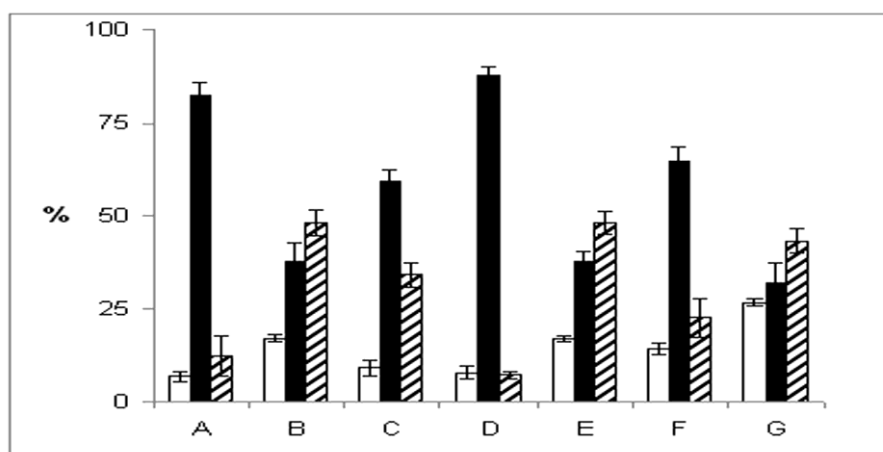


Figura 4.9 Análise do conteúdo de DNA em *T. cruzi*.

Os gráficos representam a porcentagem de células em função do conteúdo de DNA. Barra branca: DNA fragmentado; barra preta: DNA típico; barra listrada: DNA duplicado. (A) População de células controle após 24 h em meio LIT; (B) Células cultivadas por 24 h em meio LIT contendo 5 μ M de lactacistina; (C) Células submetidas a estresse nutricional por 2 h em meio TAU; (D) Células controle após 48 h em meio de diferenciação TAU3AAG; (E) Células após 48 horas de diferenciação em meio TAU3AAG contendo 5 μ M de lactacistina; (F) Células controle após 72 h em meio de diferenciação em meio TAU3AAG; (G) Células após 72 horas de diferenciação em meio TAU3AAG contendo 5 μ M de lactacistina.

Tabela 3 Porcentagem de células do Trypanosoma cruzi com DNA fragmentado ou nas fases G1/G2 do ciclo celular:

com ou sem incubação com 5 μ M de lactacistina. Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Meio e tempo de cultivo	DNA fragmentado	G1	G2
Meio LIT sem lactacistina - cultivo de 24h	12.3 \pm 2.6	70.1 \pm 1.4	17.1 \pm 3.9
Meio LIT com lactacistina - cultivo de 24h	27.9 \pm 4.7	30.8 \pm 4.3	43.2 \pm 3.7
Meio TAU cultivo de 2 h	9.2 \pm 2.2	59.1 \pm 3.2	33.9 \pm 3.4
Meio TAU3AAG sem lactacistina cultivo de 48 h	7.8 \pm 1.8	87.5 \pm 2.2	7.2 \pm 1.1
MeioTAU3AAG com lactacistina cultivo de 48 h	16.9 \pm 0.8	37.4 \pm 2.9	48.0 \pm 3.1
Meio TAU3AAG sem lactacistina cultivo de 72 h	14.2 \pm 1.5	64.7 \pm 3.8	22.3 \pm 5.3
MeioTAU3AAG com lactacistina cultivo de 72 h	26.3 \pm 1.1	31.9 \pm 5.4	43.1 \pm 3.3

Estes resultados foram publicados em revista científica (anexo).

4.2 AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE MEDIADA PELO PROTEOSSOMO

Com o objetivo de avaliar a proteólise mediada por proteossomo durante a metaciclogênese, analisamos as atividades peptidásicas por quantificação fluorimétrica da hidrólise de diferentes substratos exógenos, ou através da medida de tirosina endógena livre liberada pela proteólise.

4.2.1 Presença de proteossomos ativos nas frações enriquecidas

Para os ensaios proteolíticos, primeiramente foi obtida uma fração celular citoplasmática enriquecida com proteossomos dos parasitas (ao qual denominamos de extratos brutos) nos diferentes tempos analisados. Após a

obtenção dos extratos brutos os mesmos foram dosados. Foi então confirmada a presença dos proteossomos 20S em todos os tempos analisados durante a metaciclogênese por *Western blot*, utilizando anticorpo comercial contra as subunidades alfa (Figura 4.10A). Também foi realizado um ensaio enzimático preliminar em gel não-desnaturante para verificar se os proteossomos estavam ativos. Nossos resultados demonstraram que os proteossomos apresentaram-se ativos, pois degradaram o substrato fluorogênico Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Figura 4.10B).

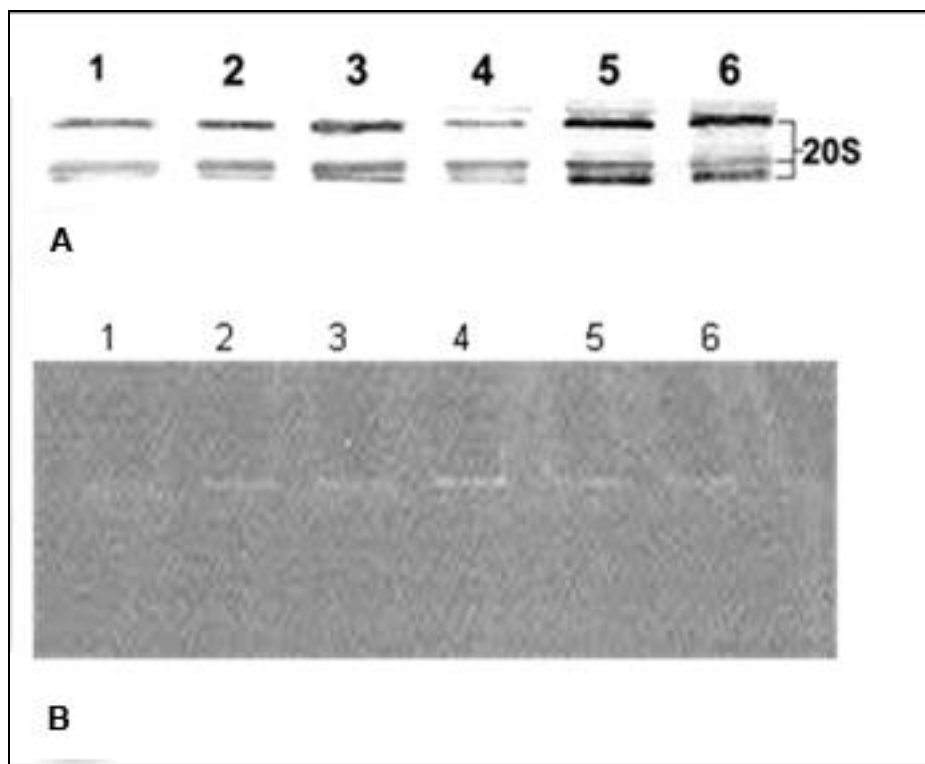


Figura 4.10 Presença de proteossomos em frações enriquecidas.

Cerca de 10 μ g de frações enriquecidas de: (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional por 2 horas em meio TAU, (4) epimastigotas aderidos após 12h e (5) 24h em meio de diferenciação TAU3AAG e (6) tripomastigotas metacíclicos foram utilizados para análise na reação contra anticorpo antissubunidade alfa (em gel de poliacrilamida (A), e para ensaio enzimático em gel não desnaturante (B).

4.2.2 Determinação de atividades proteossomais durante a metaciclogênese

A atividade do proteossomo 20S durante a metaciclogênese foi determinada por quantificação de fluorescência emitida pela hidrólise de diferentes substratos fluorogênicos específicos. Os resultados mostraram que as atividades tripsina e quimotripsina-símile em epimastigotas de 3 e 5 dias em meio LIT, em epimastigotas sob estresse nutricional e em epimastigotas aderidos após 12h e 24h de diferenciação são cerca de duas vezes superiores às atividades peptidásicas em tripomastigotas metacíclicos

A determinação da fluorescência na presença do inibidor de proteossomos MG132 foi utilizada como controle de reação, pois este composto inibiu cerca de 95% das atividades quimiotripsina-símile e caspase-símile e cerca de 30% da atividade tripsina-símile (dados não mostrados).

Análise estatística revelou uma alta atividade de tripsina e quimotripsina-símile em todas as formas evolutivas durante o metaciclogênese, enquanto que a atividade caspase-símile foi baixa (Figura 4.11A e C). Foi possível classificar os parasitas em dois grupos bem definidos: um com alta atividade peptidásica que compreende epimastigotas de 3 e 5 dias, epimastigotas sob estresse nutricional e epimastigotas aderidos de 12h e 24h. Outro grupo contém parasitas com baixa atividade peptidásica, compreendendo tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.11B). A atividade proteolítica foi maior em epimastigotas do que em tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.11B e C).

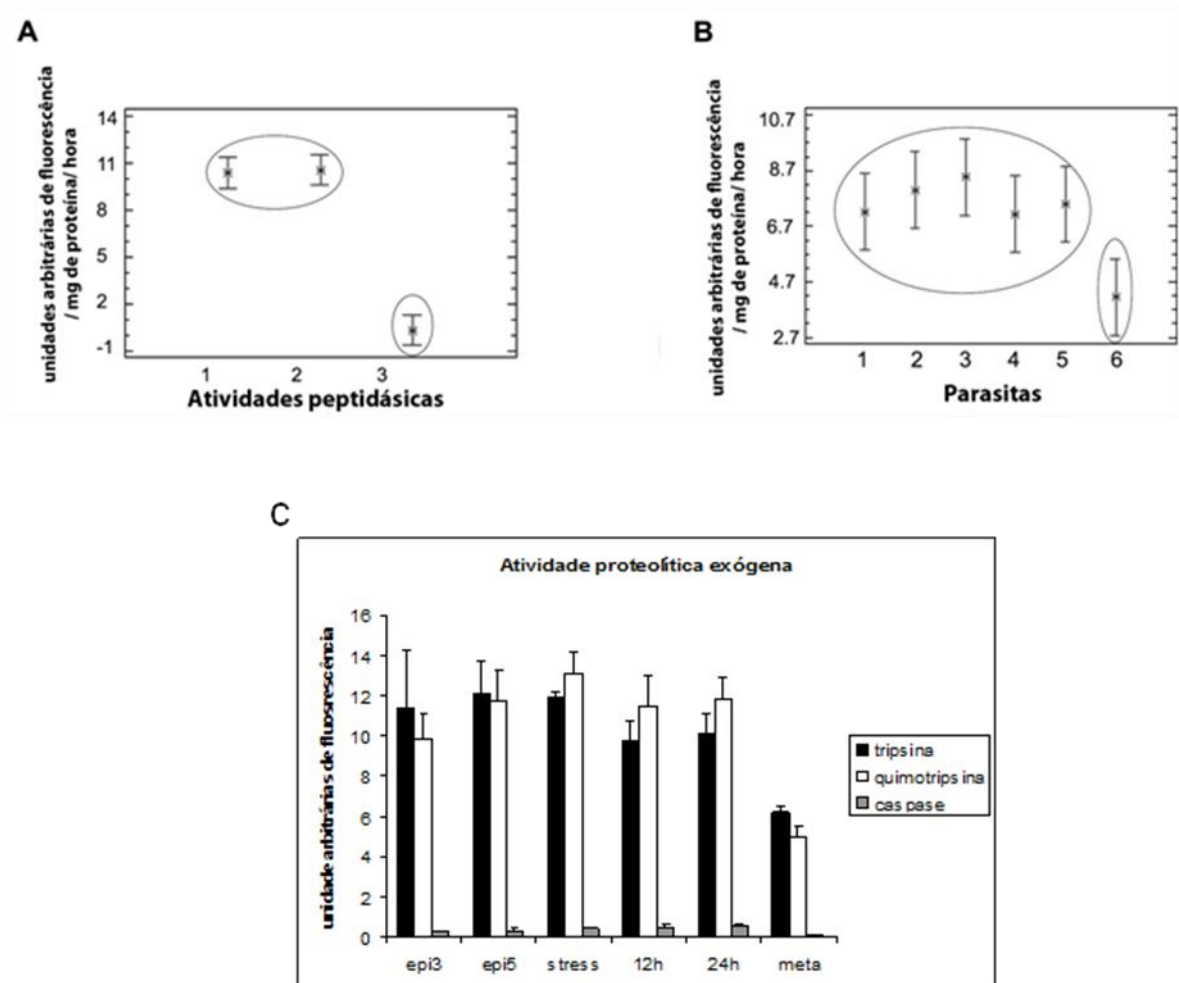


Figura 4.11 Perfil da atividade proteolítica 20S durante a metaciclologênese.

(A) As Atividades peptidásicas foram determinadas pela quantificação fluorimétrica da hidrólise de diferentes substratos fluorogênicos específicos. (1) Z-Gly-Gly-Arg-AMC - quimotripsina-símile; (2) Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC - tripsina-símile; (3) N-CBZ-Leu-Leu-Glu- β -NA - caspase-símile. Os dados representam a média de cada atividade em todos os grupos de parasitas analisados em três experimentos independentes. (B) A atividade proteolítica 20S foi analisada em (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas em estresse nutricional, (4) epimastigotas aderidos após 12h, (5) epimastigotas aderidos após 24h e (6) tripomastigotas metacíclicos. Os dados representam a média de todas as três atividades peptidásicas em cada grupo de parasitas em três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA multifatorial, seguido por teste de Fisher. O valor P foi

inferior a 0,05 para a comparação das atividades peptidase e parasitas. As barras representam 95% de confiança para o teste de Fisher. (C) Gráfico em barras representando as atividades peptidásicas 20S nos diferentes parasitas: (1) epimastigotas de três dias, (2) epimastigotas cinco dias, (3) epimastigotas em estresse nutricional, (4) epimastigotas aderidos após 12h, (5) epimastigotas aderidos após 24h e (6) tripomastigotas metacíclicos.

Tabela 4 Atividade proteolítica 20S durante metaciclogênese in vitro de T. cruzi.

As atividades peptidásicas foram analisadas utilizando-se 100 µg de proteínas obtidas de cada uma das seis fases da diferenciação celular. As atividades quimotripsina-símile, tripsina-símile, e caspase-símile foram determinadas por quantificação fluorimétrica dos substratos Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC e N-CBZ-Leu-Leu -Glu-β-NA respectivamente, com excitação de 440nm e emissão em 380 nm. Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência (AFU). Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes

Unidades arbitrárias de fluorescência / mg de proteína / hora						
Parasitas/ Substratos fluorogênicos	Epimastigotas de 3 dias	Epimastigotas de 5 dias	Epimastigotas sob estresse nutricional	Epimastigotas aderidos após 12h	Epimastigotas aderidos após 24h	Tripomastigotas metacíclicos
Z-Gly-Gly-Arg-AMC	11,3 ± 2,86	12,0 ± 1,6	11,9 ± 0,235	9,75 ± 1,02	10,1 ± 1,05	6,2 ± 0,315
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	9,85 ± 1,19	11,7 ± 1,51	13,1 ± 1,024	11,4 ± 1,515	11,8 ± 1,125	4,92 ± 0,525
N-Cbz-Leu-Leu-Glu-β-NA	0,26 ± 0,01	0,2 ± 0,17	0,42 ± 0,051	0,43 ± 0,168	0,54 ± 0,098	0,07 ± 0,042

4.2.3 Ubiquitina e ATP não estimulam atividade proteossomal endógena (26S)

O objetivo desse experimento foi o de observar se a via de degradação mediada pelo proteossomo seria estimulada por ubiquitina e ATP. Os resultados demonstraram que com a ativação da proteólise dependente do

proteossomo por temperatura elevada (37°C) houve um aumento da atividade do extrato bruto de cerca de 1,5 vezes. No entanto, não foi observado nenhum aumento significativo na atividade proteolítica endógena com a adição de ATP e ubiquitina nos seis grupos de parasitas (Tabela 5 e Figura 4.12E). Como controle da reação utilizamos o inibidor específico de proteossomo MG-132, que provoca uma forte inibição da proteólise (Tabela 5 e Figura 4.12E). Análise estatística desses dados demonstrou que não houve diferença significativa entre a atividade proteolítica endógena ativada com temperatura (37°C) e atividade proteolítica após a adição de ubiquitina e ATP. No entanto, houve um aumento em relação à proteólise basal (Figura 4.12A).

No teste de medida da tirosina livre gerada por clivagem proteolítica de proteínas endógenas (proteólise endógena) foi possível classificar os parasitas em quatro grupos distintos: um constituído por epimastigotas de três e cinco dias em meio LIT e por epimastigotas sob estresse nutricional, e outros três grupos isolados, formados por epimastigotas aderidos após 12h, epimastigotas aderidos após 24 h e tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.12B).

A fim de investigar a possível relação da não-ativação da via ubiquitina-proteossomo com uma saturação de conjugados ubiquitinados, realizamos ensaios de *Western blot* com as amostras de ensaio proteossomal endógeno de epimastigotas sob estresse nutricional (extrato bruto após incubação a 37°C por 90 min, extrato bruto após incubação a 37°C por 90 min + ATP + ubiquitina e extrato bruto após incubação a 37°C por 90 min + ubiquitina + ATP + MG132). Os resultados mostraram que a adição de ubiquitina e ATP não estimulou a proteólise, pois quando ubiquitina foi adicionada à reação, poucas bandas com peso molecular acima de ~40kDa apareceram e a ubiquitina adicionada permaneceu livre e ficou acumulada (Figura 4.12C - linha 2). Já a adição do inibidor de proteossomo MG132 causou um aumento de conjugados ubiquitinados (bandas acima de 40kDa), porém a ubiquitina adicionada permaneceu acumulada (Figura 4.12C - linha 3).

Extratos de epimastigotas de três e cinco dias em meio LIT, de epimastigotas sob estresse nutricional, de epimastigotas aderidos após 12h e

24h, e de tripomastigotas metacíclicos apresentaram um perfil semelhante de conjugados ubiquitinados, além de ausência de ubiquitina livre (Figura 4.12D).

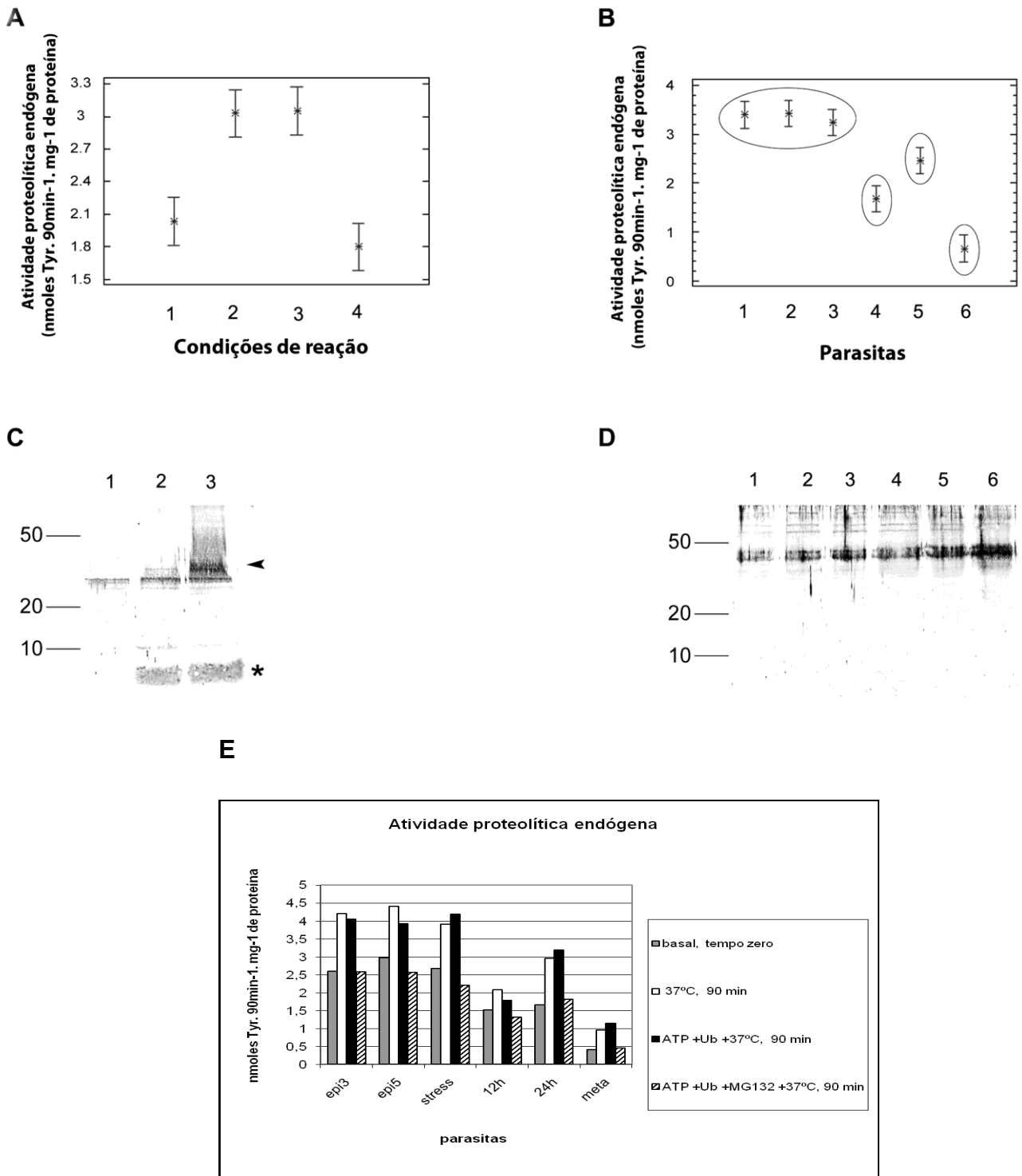


Figura 4.12 Adição de ATP e ubiquitina não estimulam a atividade proteossomal durante a metaciclogênese in vitro de *T. cruzi*.

A atividade proteolítica foi determinada por medida de tirosina gerada por clivagem proteolítica de proteínas endógenas: **(A)** Em condições diferentes de reação: (1) extrato bruto (proteólise basal), (2) extrato bruto após incubação a 37°C por 90 min, (3) extrato bruto após incubação a 37°C por 90 min + ATP + ubiquitina ou (4) extrato bruto após incubação a 37°C por 90 min + ubiquitina + ATP + MG132. Os dados representam a média de tirosina gerada em todos os grupos de parasitas em três experimentos independentes. **(B)** Em diferentes estágios do parasita: (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional, (4) epimastigotas aderidos após 12h, (5) epimastigotas aderidos após 24 horas de diferenciação, e (6) tripomastigotas metacíclicos. Os dados representam a média de tirosina gerada em três experimentos independentes. Os dados foram analisados por ANOVA multifatorial seguido de teste Fisher. O valor P foi inferior a 0,05 para a comparação das atividades peptidase e parasitas. Barras representam 95% de intervalo de confiança para o teste de Fisher. **(C)** *Imunoblots* contra ubiquitina foram realizados para analisar os efeitos da adição de ATP e ubiquitina na atividade proteossomal. Cerca de 20 µg de proteínas de epimastigotas sob estresse nutricional incubadas por 90 min a 37°C na: (1) ausência de ATP + ubiquitina, (2) presença de ATP + ubiquitina, (3) presença de ubiquitina + ATP + MG132 foram incubados com anti-soro anti-ubiquitina de *T. cruzi* e analisados. (◀) Conjugados ubiquitinados. (*)ubiquitina livre. **(D)** Cerca de 30 µg do extrato bruto de proteínas de (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional, (4) epimastigotas aderidos após 12h, (5) epimastigotas aderidos após 24h , e (6) tripomastigotas metacíclicos foram analisados por *imunoblot* com anti-ubiquitina de *T. cruzi*. **(E)**. Gráfico em barras representativo do ensaio proteolítico endógeno.

Tabela 5 Atividade proteossomal endógena independente de ATP e ubiquitina.

100 µg do extrato bruto de parasitas obtidos durante a metaciclogênese foram incubados em condições diferentes de reação: incubação a 37°C por 90 min, incubação a 37°C por 90 min + ATP + ubiquitina ou incubação a 37°C por 90

min + ubiquitina + ATP + MG132. Os dados representam a média de tirosina gerada em todos os grupos de parasitas em três experimentos independentes

Atividade proteolítica endógena (nmoles Tyr. 90min ⁻¹ . mg ⁻¹ de proteína)						
Condições da reação (extrato bruto)	Epimasigotas de 3 dias	Epimastigotas de 5 dias	Epimastigotas sob estresse nutricional	Epimastigotas aderidos após 12 horas	Epimastigotas aderidos após 24 horas	Tripomastigotas metacíclicos
Proteólise basal	2,6 ± 0,56	2,97 ± 0,59	2,70 ± 0,51	1,47 ± 0,28	1,65 ± 0,11	0,88 ± 0,31
37°C por 90 minutos	4,2 ± 0,50	4,39 ± 0,23	3,91 ± 0,13	2,07 ± 0,05	2,95 ± 0,25	1,38 ± 0,68
37°C por 90 minutos + ATP + ubiquitina	4,05 ± 0,45	3,93 ± 0,52	3,75 ± 0,26	1,91 ± 0,19	3,19 ± 0,36	1,16 ± 0,15
37°C por 90 minutos + ATP + ubiquitina + MG132	2,58 ± 0,09	2,56 ± 0,51	2,19 ± 0,06	1,32 ± 0,45	1,82 ± 0,16	0,76 ± 0,44

4.2.4 O perfil de ubiquitinação se mantém constante durante a metaciclogênese

Ensaio de imunoprecipitação foram realizados com o propósito de investigar o perfil de ubiquitinação durante a metaciclogênese, utilizando anti-soro contra ubiquitina de *T. cruzi*. 100 µg de proteínas de cada uma das seis fases de diferenciação celular foram utilizados para análise. Foram recuperados 7.4, 7.6, 7.4, 8, 8 e 7.2 µg, respectivamente, indicando que cerca de 7% de proteínas dos extratos totais de *T. cruzi* são ubiquitinadas. A fração correspondente ao lavado (Figura 4.13, linha 8) não apresentou nenhuma reação com anti-ubiquitina, o que aumenta a confiabilidade desses resultados. O soro pré-imune utilizado como controle (Figura 4.13, linha 1) também não reconheceu os conjugados ubiquitinados.

Os resultados mostraram um perfil semelhante durante a metaciclogênese, não havendo nenhuma evidência de ativação da via ubiquitina-proteossomo em qualquer fase específica da metaciclogênese, pois o perfil de conjugados ubiquitinados permaneceu constante (Figura 4.13). Estes dados sugerem que

os mecanismos envolvidos na marcação e degradação de proteínas ubiquitinadas atuam de forma constitutiva durante a diferenciação do *T. cruzi*.

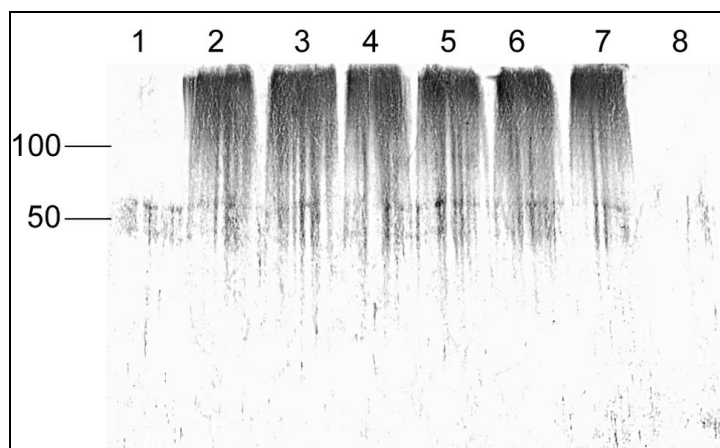


Figura 4.13 Perfil dos conjugados ubiquitinados durante a metaciclôgênese.

100 µg de proteínas de cada uma das seis fases de diferenciação celular foram utilizados para ensaios de imunoprecipitação. As amostras imunoprecipitadas de epimastigotas de 3 dias (linha 2), epimastigotas de 5 dias (linha 3), epimastigotas sob estresse nutricional (linha 4), epimastigotas aderidos após 12 h (linha 5), epimastigotas aderidos após 24 h (linha 6), tripomastigotas metacíclicos (linha 7) e lavado (linha 8) foram analisadas por *Western blot* com anti-soro contra ubiquitina e o imunoprecipitado controle foi analisado com soro pré-imune (linha 1). O padrão de peso molecular de proteínas é mostrado à esquerda. O experimento foi repetido três vezes, obtendo-se sempre os mesmos resultados.

4.2.5 O perfil de proteínas oxidadas apresenta grandes variações durante a metaciclôgênese

A presença de proteínas oxidadas durante o metaciclôgênese foi avaliada através da detecção de grupamentos carbonil nas proteínas, pois este é um método eficiente para indicar oxidação de proteínas.

Os resultados mostraram grande variação nos níveis relativos de grupamentos carbonil entre as diferentes formas do parasita. O conteúdo de proteína oxidada aumentou principalmente em epimastigotas de 5 dias e epimastigotas aderidos após 24 h (Figura 4.14 - linhas 2 e 5), diminuindo em epimastigotas de três dias, epimastigotas em estresse nutricional, epimastigotas aderidos após 12h (Figura 4.14 - linhas 1, 3 e 4), e principalmente em tripomastigotas metacíclicos (Figura 4.14 - linha 6). Os dados foram normalizados por densitometria, com descrito em Materiais e Métodos.

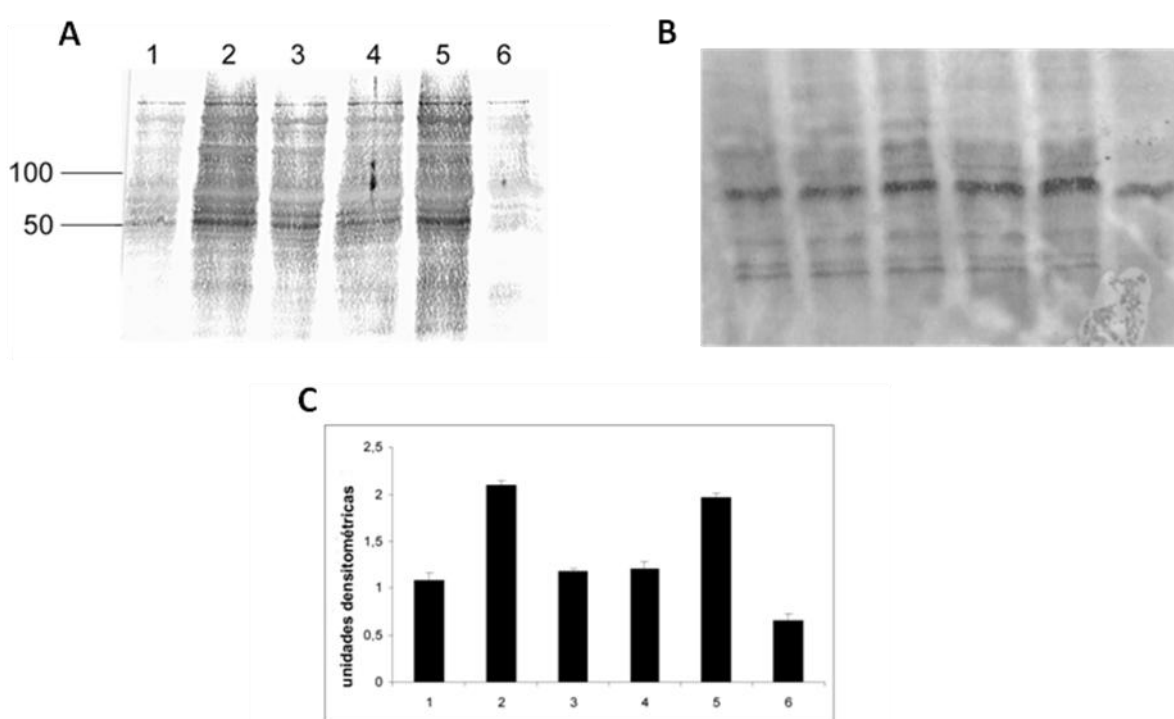


Figura 4.14 Detecção de grupamentos carbonil.

(A) Os grupamentos carbonil de proteínas de *T. cruzi* foram marcados com 2,4-dinitrofenilidrazina e as amostras resultantes (20 μ g de proteínas) foram submetidas à análise por *Western blot* usando um anticorpo contra dinitrofenil nos extratos de: (1) epimastigotas de 3 dias; (2) epimastigotas de 5 dias; (3) epimastigotas sob estresse nutricional; (4) epimastigotas aderidos após 12h; (5) epimastigotas aderidos após 24h e (6) tripomastigotas metacíclicos. O padrão de peso molecular de proteínas é mostrado à esquerda. A normalização foi realizada como descrito em Materiais e Métodos, utilizando a membrana com as proteínas corados com Ponceau S **(B)** O experimento foi repetido três

vezes, obtendo-se basicamente os mesmos resultados. **(C)** Os resultados da normalização são expressos em unidades densitométricas e representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão.

4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DAS PROTEÍNAS DOS COMPONENTES DO PROTEOSSOMO DURANTE A METACICLOGÊNESE

A análise molecular da via proteolítica mediada pelo proteossomo durante a metaciclogênese foi possível devido à produção de anticorpos policlonais contra a ubiquitina, contra a subunidade catalítica alfa-7 do proteossomo 20S, contra as subunidades HsIV e HsIUATPase, contra PA26 e contra as subunidades dos complexos regulatórios PA700 (Rpn10 e Rpn7) do *T. cruzi*.

4.3.1 Desenhos dos oligoiniciadores (*Primers*)

Os oligoiniciadores foram desenhados com base na seqüência nucleotídica dos genes que codificam os componentes dos proteossomos e do gene de uma ubiquitina de *T. cruzi* (Figura 4.15). Com o auxílio do programa *Primer select* foi possível excluir os dímeros e grampos que poderiam ser formados durante a PCR.

```
ATGCAGATCTTTGTGAAGACACTGACGGGCAAGACGATCGCGCTCGA
GGTGGAAATCCAGCGACACCATTGAGAACGTGAAGGCGAAGATCCAGG
ACAAGGAAGGCATTCCACCGGACCAGCAGCGCCTGATCTTCGCTGGC
AAGCAGCTGGAGGACGGCCGCACGCTTGCAGACTACAACATCCAGAA
GGAGTCCACGCTGCACCTTGTGCTGCGCCTGCGCGGCGGCTAA
```

Figura 4.15 Seqüência nucleotídica da ubiquitina de *T. cruzi*.

Seqüência com 231 pares de base, usada como base para o desenho dos iniciadores para amplificação da ubiquitina.

Aos iniciadores foram acrescentadas seqüências adaptadoras chamadas attB1 e attB2. As características dos iniciadores desenhados estão apresentadas na Tabela 6

Tabela 6 Nome, tamanho e primers usados para amplificar as seqüências das proteínas selecionadas para clonagem e produção de anti-soros.

<i>Nome</i>	<i>ID</i>	<i>Massa</i>	<i>Primer</i>
Ubiquitina	(Tc00.104705 3506655.20,1 9-246 nucleotides)	8 KDa	ubF :5'ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatgcagatcttgt gaagacactg 3' ubR :5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtccgccgcgcag gcgcag 3'
PA26	Tc00.1047053 511465.10	26kDa	PA26F :5'ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatgccccaa aacgcctcgt 3' PA26R :5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcttaactcacat acgacctccccgga 3'
PA200	Tc00.1047053 511277.130	200kDa	PA200F :5'ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatgcgtggt gtttgatgggatta 3' PA200R :5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctacatgttgt gagtagtcccca 3'
HsLV	Tc00.1047053 506275.20	23 KDa	HsIVF :5'ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatgttctcgtg atcgctcg 3' HsIVR :5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcttattcgtttcttc tcttctga 3'
HsLU ATPase	Tc00.1047053 506739.50	52 KDa	HsIUATPaseF :5'ggggacaagttgtacaaaaagcaggctcatg cgctgctgcgactgtct 3' HsIUATPaseR :5'ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctaa agaatgaacttctaataatccacct 3'
Rpn10	Tc00.1047053 509611.160	46 KDa	Rpn10 F :5'gggggatccttctgtgcctggactccacggagttag- 3' Rpn10 R : 5'-ggggtcgactatTTTTgtcctcggttcttctcac-3
Rpn 7	Tc00.1047053 508707.90	37 KDa	Rpn7 F :5'—gggggatccatgccaccgcaaacgaaaggaacg — 3' Rpn7 R :5" ggggtcgactcacatctctgccagacgggacaac — 3'
Alfa 7	Tc00.1047053 507775.50	26 KDa	α 7 F :5' aacggatcctgaccagtcaacggacatcttctc 3' α 7 R :5' caagtcgactgttgacacccatgccacct 3'

4.3.2 Expressão e purificação da proteína ubiquitina

O gene da ubiquitina (Ub) foi expresso em vetor de expressão pDESTMT17, a partir da clonagem em vetor de entrada pDNORTM221. Foram obtidas proteínas Ub recombinantes solúveis e em corpúsculos de inclusão, solubilizados por uréia (desnaturadas) (Figura 4.16 A). A Ub possui tamanho correspondente a 8,5 kDa, porém a seqüência de 6 histidinas da etiqueta pode aumentar a massa molecular da proteína recombinante em até 4 kDa. As proteínas recombinantes possuíam uma etiqueta de histidinas, permitindo assim sua purificação por coluna de afinidade ao níquel.

Algumas proteínas de *E. coli* possuem grandes quantidades de histidina em sua composição, ficando então retidas na resina e eluídas juntamente com a proteína recombinante de interesse. Para eliminar tais contaminantes, optou-se por fazer um segundo passo de purificação: eletro-eluição por gel preparativo para as proteínas desnaturadas, ou filtração por Centricon (AMICON) para as proteínas solúveis.

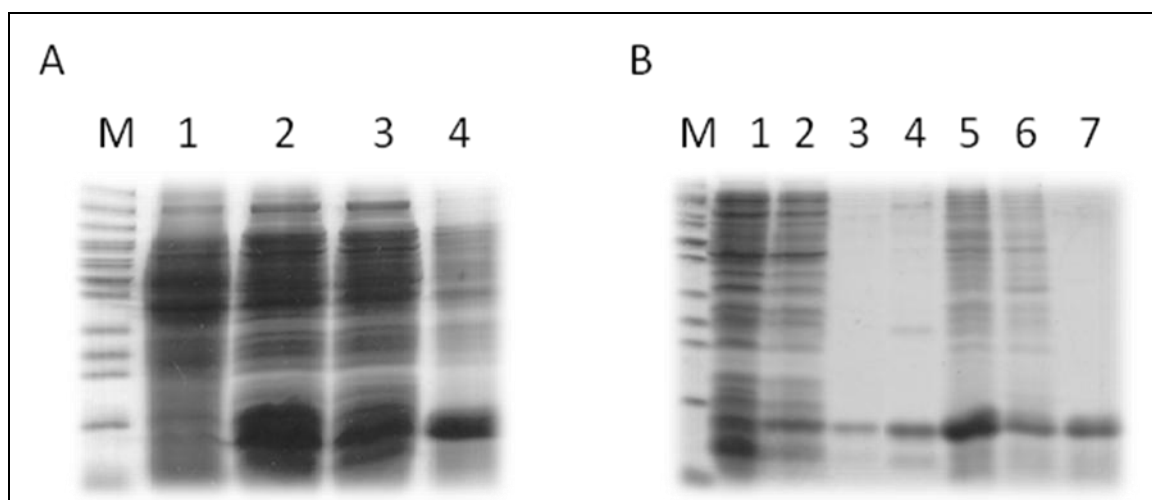


Figura 4.16 Expressão e purificação da proteína recombinante ubiquitina. SDS-PAGE 20%. **(A)** Expressão em: (1) extrato da cultura não-induzida, (2) fração total da proteína induzida com IPTG, (3) fração solúvel e (4) fração insolúvel. **(B)** Purificação: (1) fração total das proteínas, (2) fração solúvel sem purificação, (3) fração solúvel purificada com centricon, após purificação com NiNTA; (4) fração solúvel purificada com NiNTA, (5) fração insolúvel sem purificação, (6) fração insolúvel purificada com NiNTA, (7) fração insolúvel

purificada com NiNTA . M - padrão de massa molecular Bench Mark (Invitrogen).

4.3.3 Expressão e purificação das proteínas PA26, HsIV e HsIU-ATPase.

Os genes das proteínas PA26, HsIV e HsIU-ATPase foram amplificados, purificados e inseridos no vetor de entrada pDONRTM221 e recombinados com o vetor de expressão pDESTTM17. A expressão das proteínas foi realizada em uma célula cálcio-competente de *E. coli*, linhagem BL21(DE3)pLysE. Após a indução com IPTG 1 mM, as proteínas foram expressas nos tamanhos correspondentes PA26-26 kDa (Figura 4.17 A), HsIV-23 kDa e HsIU ATPase-52 kDa (Figura 4.18A –linhas 4 e 8) na fração insolúvel. As proteínas foram então purificadas diretamente por eletro-eluição (Figuras 4.17B e 4.18B). As proteínas foram concentradas e dosadas antes de se iniciar as inoculações em camundongos para obtenção dos anticorpos.

As proteínas alfa-7, Rpn7 e Rpn10 e seus anticorpos foram produzidos pela equipe de nosso laboratório e cedidas gentilmente para a realização dos ensaios de *Western blot* e imunolocalização. Não obtivemos resultados satisfatórios para a proteína do PA200, e os experimentos com esta não tiveram continuidade.

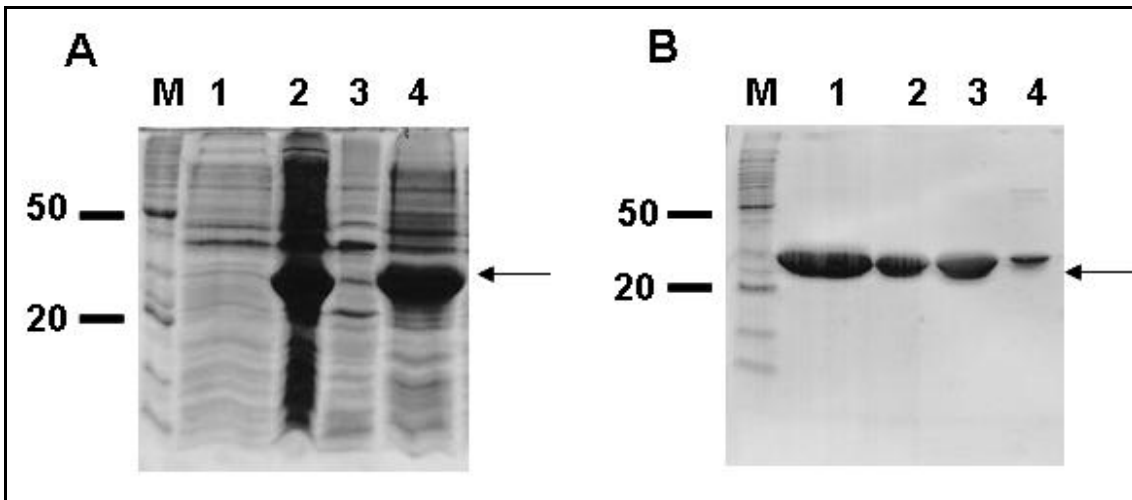


Figura 4.17 Expressão e purificação da proteína recombinante PA26.

SDS-PAGE 13% contendo: (1A) extrato da cultura não-induzida, (2A) fração total da proteína induzida com IPTG, (3A) fração solúvel, (4A) fração insolúvel e os eluídos da proteína purificada por eletro-eluição (1 a 4 B). M - padrão de massa molecular Bench Mark (Invitrogen)

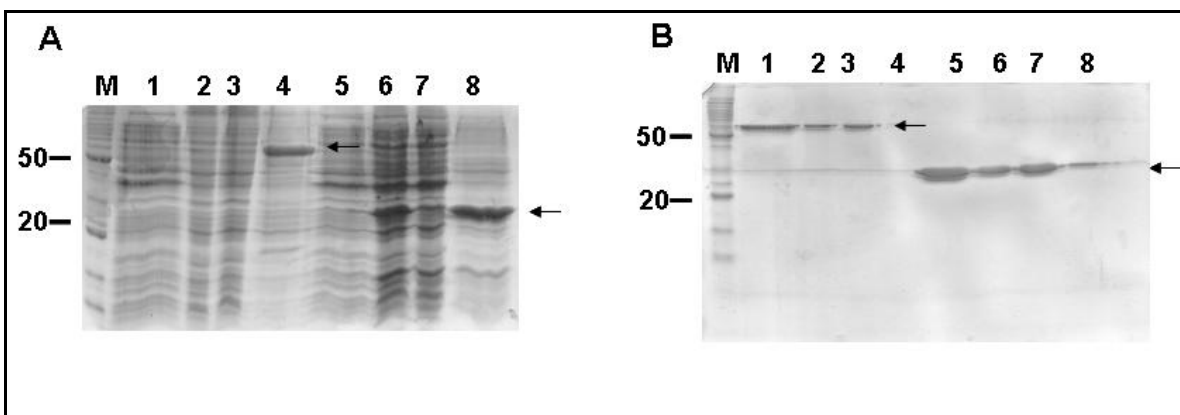


Figura 4.18 Expressão e purificação das proteínas recombinantes HsIU-ATPase e HsIV.

SDS-PAGE 13% contendo: (1A e 5A) extrato da cultura não-induzida, (2A e 6A) fração total da proteína induzida com IPTG, (3A e 7A) fração solúvel, (4A e 8A) fração insolúvel e os eluídos da proteína purificada por eletroeluição (1 a 4B, e 5 a 8B). M - padrão de massa molecular Bench Mark (Invitrogen).

4.3.4 Produção dos anticorpos policlonais

Antes do início das imunizações foram coletados os soros dos camundongos, a fim de verificar se os mesmos estavam reagindo ou não com o extrato protéico de *T. cruzi*. Para tanto, foi realizado um ensaio de *Imunoblot* onde o extrato de proteínas de *T. cruzi* foi separado em gel de SDS-PAGE e fixado em membrana de nitrocelulose. As membranas com os extratos foram então incubadas com os soros pré-ímmes por 1 hora à temperatura ambiente. O resultado confirmou a qualidade dos animais (Figura 4.19), sem reconhecimento de proteínas inespecíficas que poderiam comprometer experimentos futuros. Foram realizadas então 4 inoculações intraperitoniais em camundongo, com doses de aproximadamente 20 µg de proteína por inoculação para cada animal. Uma semana após as 4 inoculações uma gota de sangue foi retirada do cauda de cada animal, para verificar se havia resposta imunológica. Após a confirmação da resposta e titulação do soro, os mesmos foram coletados por punção cardíaca.

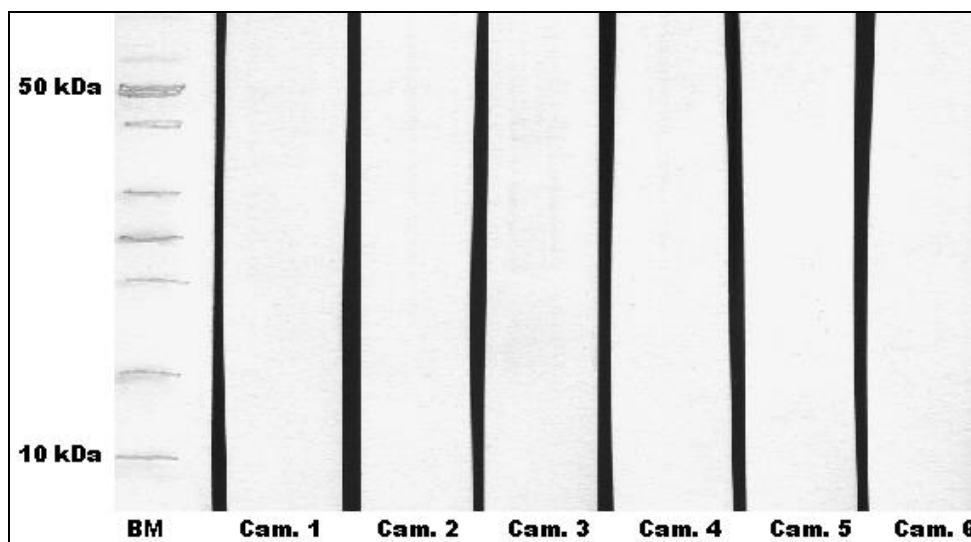


Figura 4.19 Teste de soro pré-ímmune.

Imunoblot de extratos protéicos de *T. cruzi* contra soro de camundongos antes de serem imunizados com as proteínas recombinantes. Revelação por fosfatase alcalina. M - padrão de massa molecular Bench Mark (Invitrogen).

4.3.5 Análise da expressão relativa das proteínas PA26, HsIV, HsIUATPase, Rpn7, Rpn10, alfa-7 e ubiquitina durante a metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi*

Os anti-soros gerados contra as proteínas recombinantes foram utilizados para a detecção das proteínas em extratos celulares de *T. cruzi* por ensaios do tipo *Western blot*.

Os anti-soros contra as proteínas alfa-7, Rpn7 e 10 reconheceram polipeptídios com peso molecular de aproximadamente 26, 37 e 46 kDa respectivamente, em todos os extratos de *T. cruzi* analisados (Figura 4.20 A,B e C), correspondentes aos tamanhos das proteínas. As proteínas detectadas apresentaram pequenas variações nos diferentes extratos. O gel contendo os extratos utilizados, corado com Coomassie Blue, foi utilizado como normalizador para as quantidades de proteínas (Figura 4.20D).

O anti-soro contra a proteína PA26 reconheceu um polipeptídio de aproximadamente 26 kDa presente em todos os tempos analisados (Figura 4.21). Sua expressão não apresentou variações significativas durante a metaciclogênese. Após a transferência das proteínas do gel para a membrana, esta foi corada com Ponceau S e utilizada como controle das quantidades de proteínas (Figura 4.21 - direita).

Os anti-soros contra as proteínas HsIV e HsIUATPase, reconheceram polipeptídios com peso molecular de aproximadamente 23 e 52 kDa em todos os tempos analisados e não apresentaram variações significativas durante a metaciclogênese (Figuras 4.22 e 4.23). Os controles das quantidades de proteínas utilizados confirmaram a não-variação destas proteínas.

O perfil encontrado no imuno blot contra ubiquitina (Figura 4.24) é semelhante ao encontrado em outros eucariotos, apresentando uma “mancha” de alto tamanho, que corresponde à marcação de todas as proteínas que são mono ou multiubiquitiladas, em especial as multiubiquitiladas por possuírem um tamanho bastante aumentado. A ubiquitina não apresentou variações significativas durante a metaciclogênese (figura 4.24).

Todos os anti-soros analisados reconhecerem bandas únicas e específicas nos extratos celulares, sem reações inespecíficas, o que comprova a excelente qualidade dos mesmos.

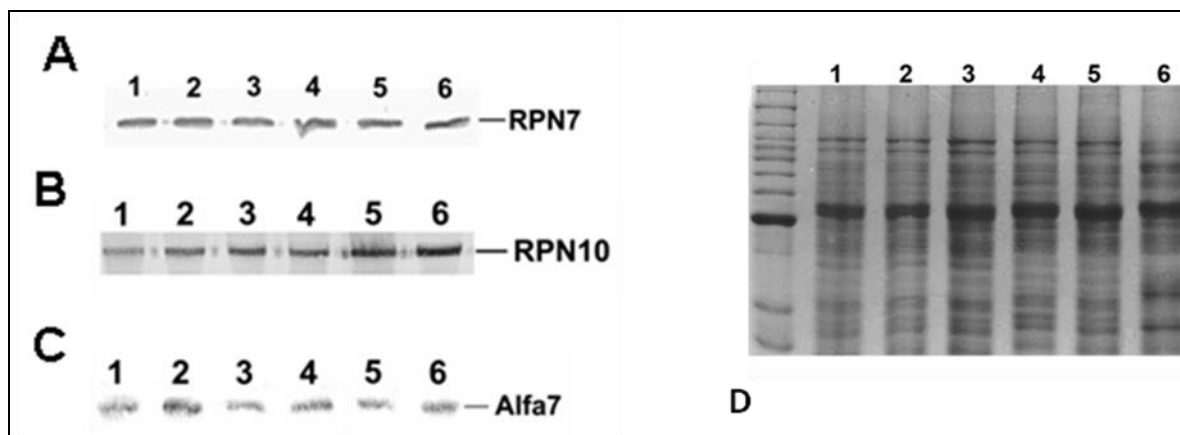


Figura 4.20 Análise do padrão de expressão das proteínas RPN 7, RPN10 e alfa-7 durante a metaciclologênese de *T. cruzi*.

20 µg de extratos protéicos de (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional por 2 horas em meio TAU, (4) epimastigotas aderidos após 12 h de diferenciação, (5) epimastigotas aderidos após 24 h de diferenciação, e (6) tripomastigotas metacíclicos foram utilizados na reação contra os anticorpos de RPN7 **(A)**, RPN10 **(B)** e alfa-7 **(C)** de *T. cruzi*. Foi utilizado um gel corado com Coomassie Blue como normalizador da quantidade de proteínas **(D)**.

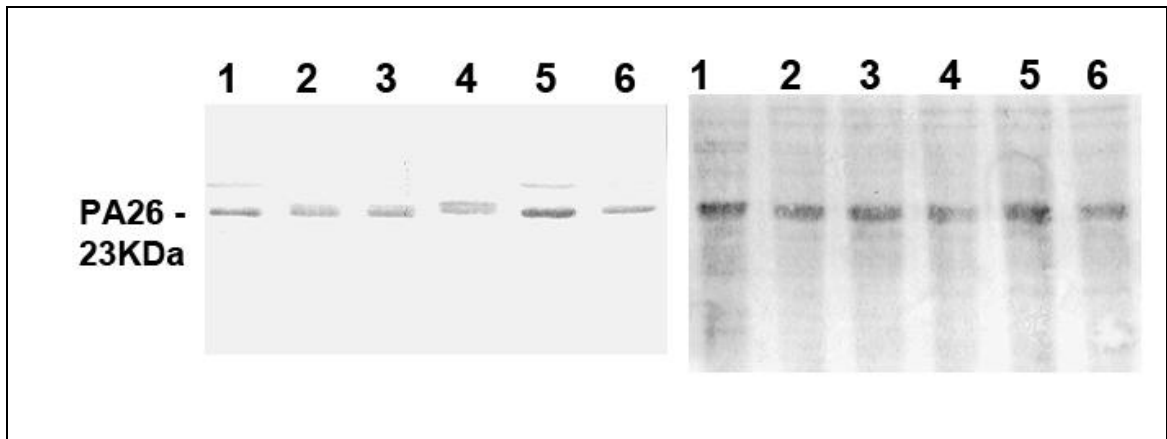


Figura 4.21 Análise do padrão de expressão relativa da proteína PA26 durante a metaciclogênese de *T. cruzi*.

20 µg dos extratos protéicos de (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional por 2 horas em meio TAU, (4) epimastigotas aderidos após 12 h de diferenciação, (5) epimastigotas aderidos após 24 h de diferenciação, e (6) tripomastigotas metacíclicos foram utilizados na reação contra anticorpos anti-PA26 de *T. cruzi*. À direita, membrana corada com Ponceau S após a transferência das proteínas, utilizada como controle normalizador da quantidade de proteínas.

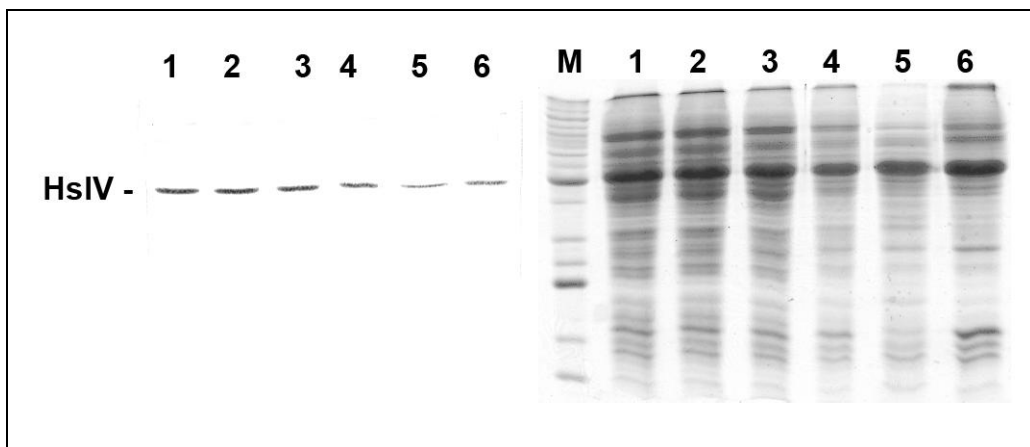


Figura 4.22 Análise do padrão de expressão relativa da proteína HsIV durante a metaciclogênese de *T. cruzi*.

20 µg de (1) extratos protéicos de epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional por 2 horas em meio TAU, epimastigotas aderidos após 12h (4) ou 24h (5) de diferenciação e (6)

tripomastigotas metacíclicos foram utilizados na reação contra anticorpos anti-HslV de *T. cruzi*. Foi utilizado um gel corado com Coomassie Blue como normalizador da quantidade de proteína (à direita).

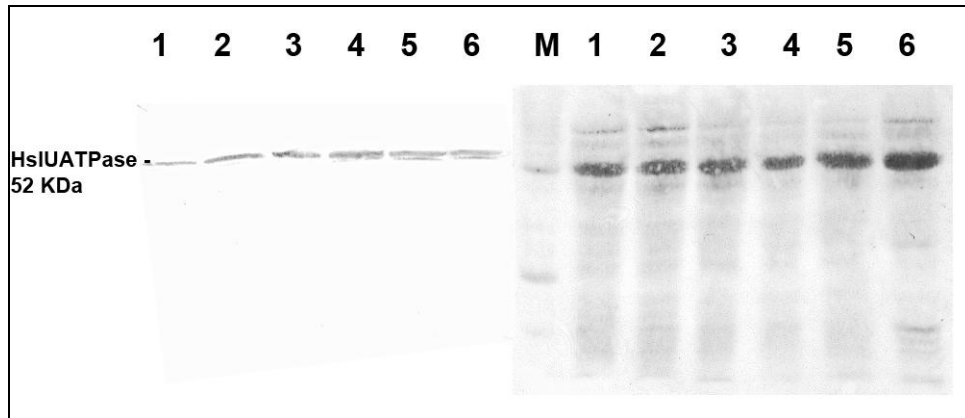


Figura 4.23 Análise do padrão de expressão relativa da proteína HslUATPase durante a metaciclogênese de *T. cruzi*.

20 μ g dos extratos protéicos de (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional por 2 horas em meio TAU, epimastigotas aderidos após 12 h (4) ou 24 h (5) de diferenciação e (6) tripomastigotas metacíclicos foram utilizados na reação contra anticorpos anti-HslUATPase de *T. cruzi*. Foi utilizada a membrana corada com Ponceau S como normalizador da quantidade de proteína (à direita).

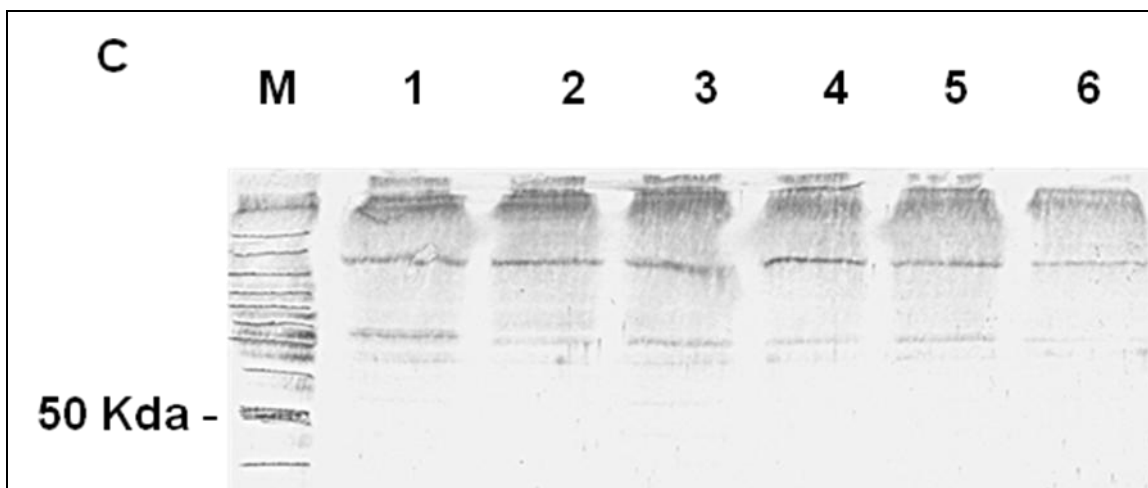


Figura 4.24 Análise do padrão de expressão relativa da proteína ubiquitna durante a metacicloênese de *T. cruzi*.

20 µg dos extratos protéicos de (1) epimastigotas de 3 dias, (2) epimastigotas de 5 dias, (3) epimastigotas sob estresse nutricional por 2 horas em meio TAU, epimastigotas aderidos após 12 h (4) ou 24 h (5) de diferenciação e (6) tripomastigotas metacíclicos foram utilizados na reação contra anticorpos anti-ubiquitina de *T. cruzi*.

4.3.6 Ensaio de localização celular

A localização celular das proteínas alfa-7 (subunidade catalítica do proteossomo 20S), Rpn10 (subunidade regulatória do ativador 19S), PA26 (subunidade do ativador do proteossomo 20S), HsIV (subunidade do proteossomo-like) foi realizada em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Desse modo foi possível avaliar mudanças na localização dos proteossomo entre as formas replicativas e infectivas de *T. cruzi*.

Os resultados apresentados a seguir foram confirmados três vezes em parasitas originados de três diferentes metacicloênese. A confiabilidade é reforçada pela qualidade dos anticorpos, que não apresentaram reação inespecífica com o soro pré-imune ou reconhecimento de bandas extras nos *imunoblots*.

4.3.6.1 Localização celular de alfa-7

Os resultados obtidos mostraram que a proteína alfa-7 apresentou um padrão de distribuição citoplasmática granular e uma acúmulo no cinetoplasto (Figura 4.23C) das formas epimastigotas (Figura 4.23). Através da marcação com DAPI e sobreposição das imagens foi possível confirmar a co-localização com o cinetoplasto (Figura 4.23D).

Em tripomastigotas metacíclicos, alfa-7 localizou-se predominantemente no cinetoplasto, apresentando uma forte reação específica (Figura 4.24). Observamos também uma marcação distribuída pelo citoplasma e núcleo da célula. A marcação com DAPI e sobreposição das imagens permitiu evidenciar a forte presença no cinetoplasto (Figura 4.24D)

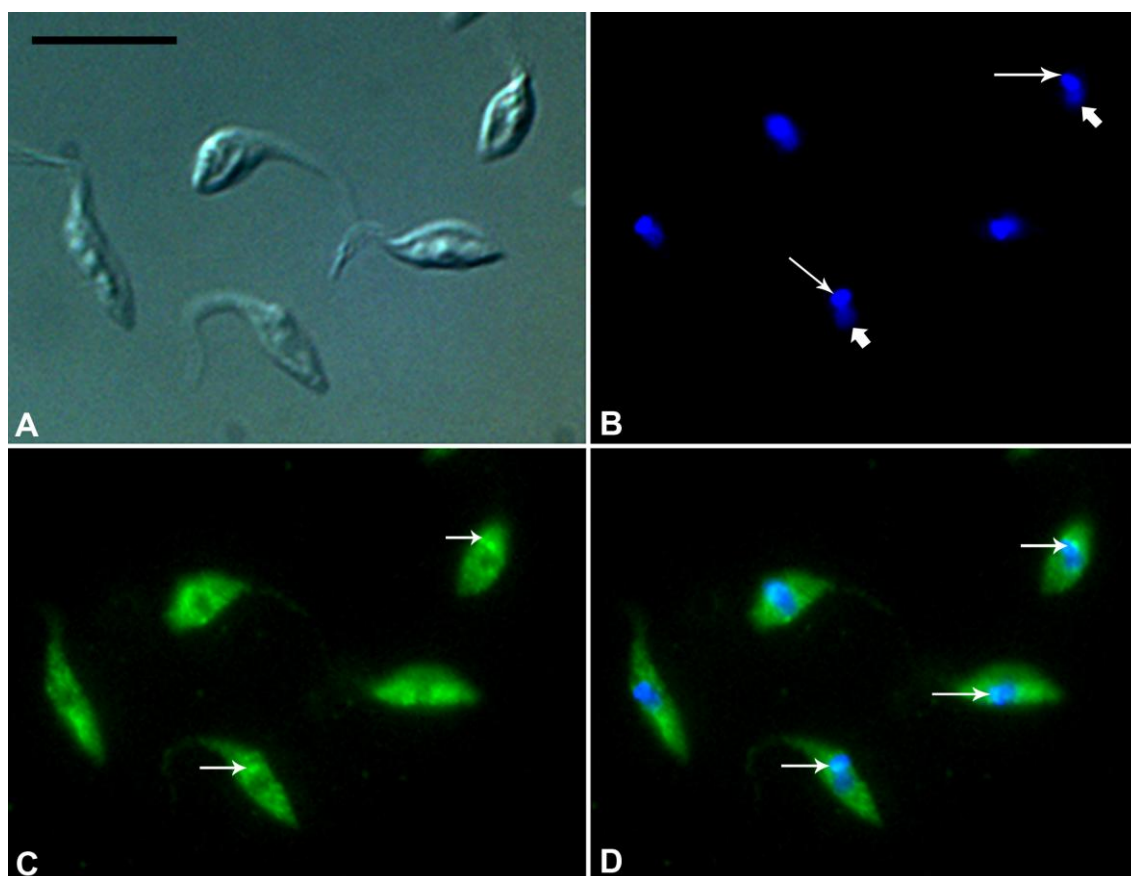


Figura 4.25 Imunolocalização da proteína Alfa-7 em epimastigotas.

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra alfa-7 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência

verde), indicando a presença de grânulos de acúmulo no cinetoplasto (setas, C). (A) Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo (seta menor) e cinetoplasto (seta maior) marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra alfa-7 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens obtidas com a marcação com AlexaFluor 488 e DAPI, demonstrando a co-localização da proteína com o cinetoplasto (setas). Barra de escala = 10 μ m.

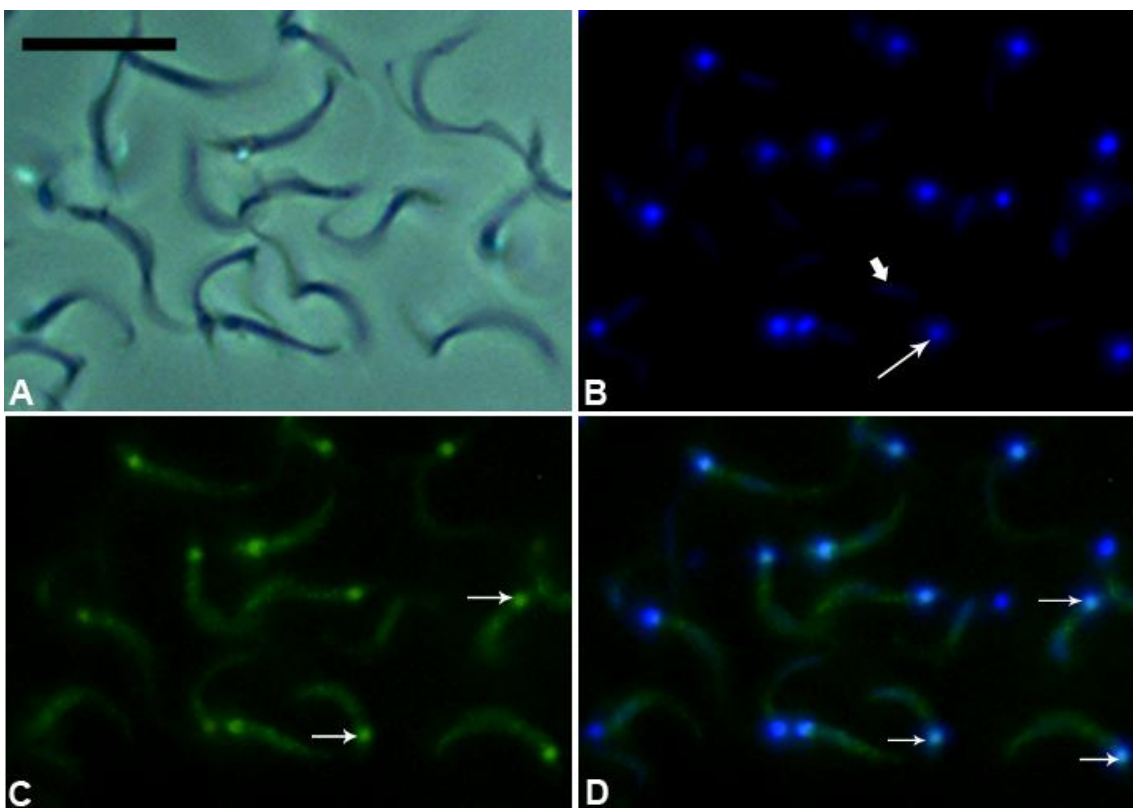


Figura 4.26 Imunolocalização da proteína Alfa-7 em tripomastigotas metacíclicos.

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra alfa-7 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência verde), indicando a localização predominante no cinetoplasto (setas, C). (A) Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo (seta menor) e cinetoplasto (seta maior) marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra alfa-7 e posterior incubação

com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor 488 e DAPI, mostrando co-localização da proteína com o cinetoplasto (setas). Barra de escala = 10 μ m.

4.3.6.2 Localização celular de RPN10

A proteína RPN10 apareceu distribuída por todo o citoplasma das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Porém, um acúmulo foi observado no núcleo de ambos as formas (Figuras 4.25C e 4.26C). A marcação com DAPI e sobreposição das imagens revelou que a proteína apresentou co-localização com o núcleo, mas não estava presente no cinetoplasto de ambas as formas analisadas (Figuras 4.25D e 4.26D).

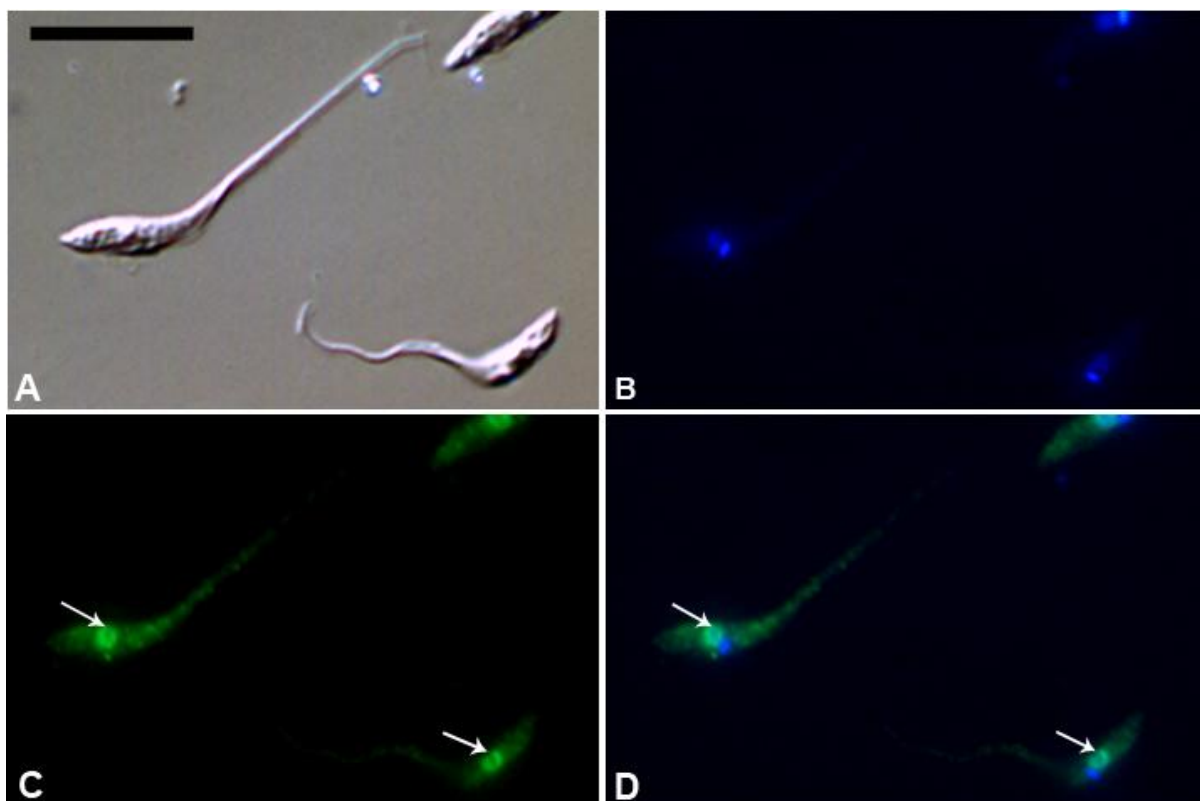


Figura 4.27 Imunolocalização da proteína Rpn10 em epimastigotas.

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra Rpn10 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência verde), indicando a localização predominante no núcleo (setas, C). (A)

Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo e cinetoplasto marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra Rpn10 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor488 e DAPI, mostrando co-localização da proteína com o núcleo (setas). Barra de escala = 10 μ m.

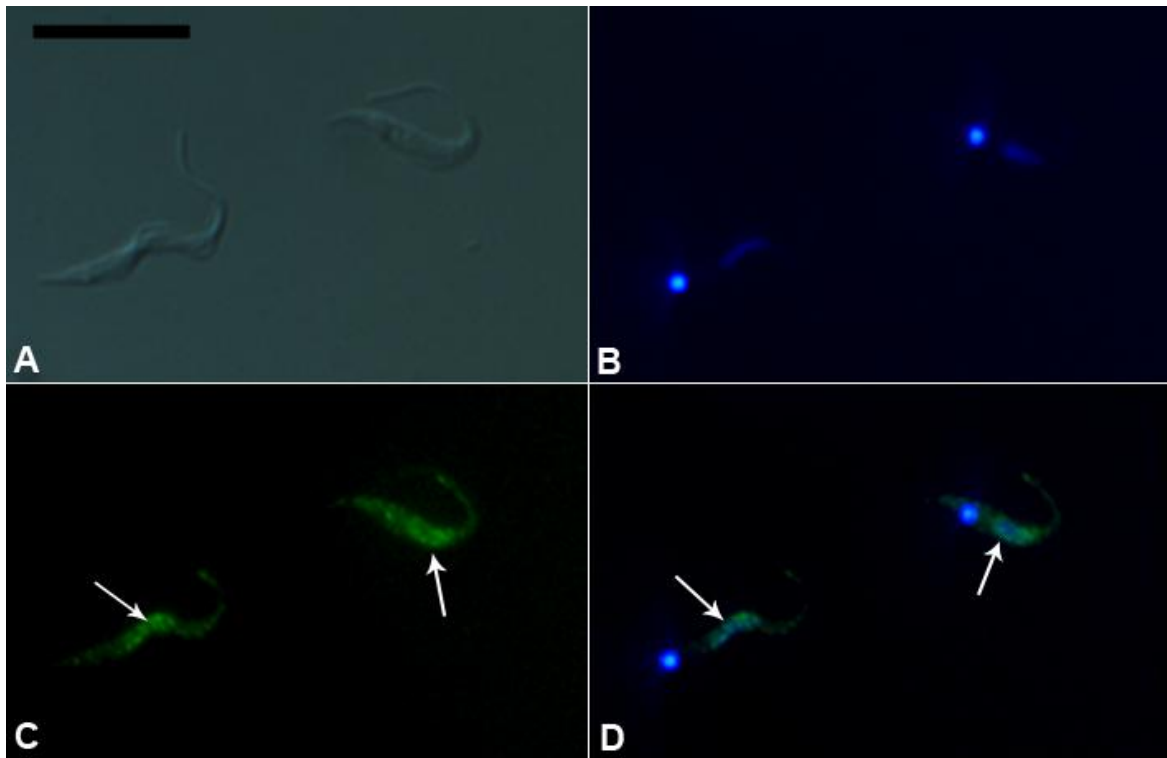


Figura 4.28 Imunolocalização da proteína Rpn10 em tripomastigotas metacíclicos.

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra Rpn10 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência verde), indicando a localização predominante no cinetoplasto (setas, C). (A) Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo e cinetoplasto marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra Rpn10 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor

488 e DAPI, mostrando co-localização da proteína com o núcleo (setas). Barra de escala = 10 μm .

4.3.6.3 *Localização celular de PA26*

A proteína PA26 encontrou-se distribuída de uma maneira difusa nas formas epimastigotas (Figura 4.27C). O núcleo e o cinetoplasto dos parasitas também apresentaram marcação (Figura 4.27D)

Em tripomastigotas metacíclicos a marcação foi granular, apresentando pontos de acúmulo por todo o citoplasma, núcleo e cinetoplasto (Figura 4.28C). Com a sobreposição das imagens confirmou-se a marcação no núcleo e no cinetoplasto dos parasitas (Figura 4.28D).

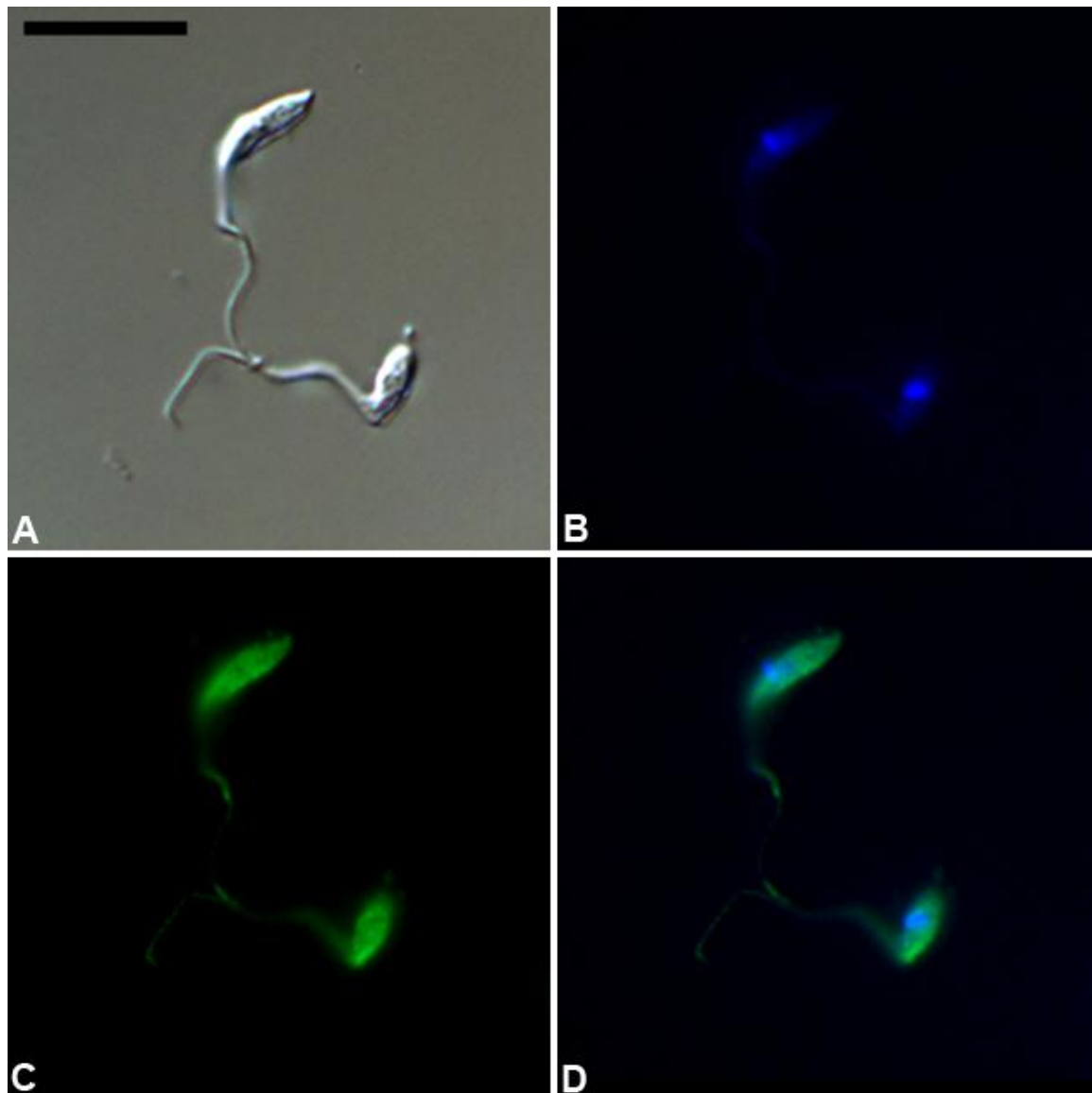


Figura 4.29 Imunolocalização da proteína PA26 em epimastigotas.

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra PA26 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência verde), indicando localização difusa por todo o parasita (C). (A) Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo e cinetoplasto marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra PA26 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor 488 e DAPI. Barra de escala = 10 μ m.

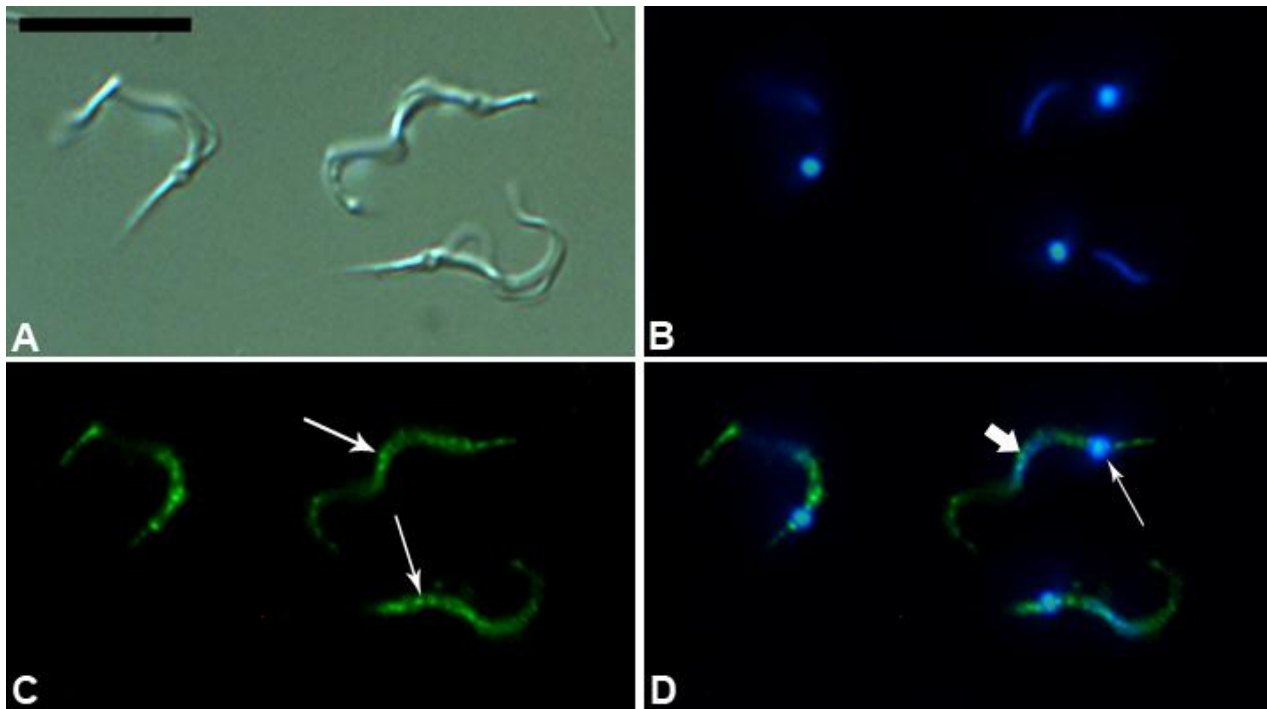


Figura 4.30 Imunolocalização da proteína PA26 em tripomastigotas metacíclicos.

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra PA26 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência verde), indicando um padrão de distribuição granular por todo o parasita (setas, C). (A) Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo e cinetoplasto marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra PA26 e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor 488 e DAPI, mostrando a presença da proteína no núcleo (seta menor) e cinetoplasto (seta maior). Barra de escala = 10 μ m

4.3.6.5 Localização celular de HsIV

A proteína HsIV apresentou uma interessante distribuição celular. Nas formas epimastigotas foi detectada em todo o parasita, com alguns pontos de acúmulo (Figura 4.29C). A marcação com DAPI (Figura 4.29B) e sobreposição

das imagens revelou uma forte co-localização com o cinetoplasto (Figura 4.29D, seta maior).

Em tripomastigotas metacíclicos ocorreu também uma distribuição citoplasmática granular com alguns pontos de acúmulo. Também houve forte marcação no cinetoplasto e uma fraca reação com o núcleo (Figura 4.30C). A marcação com DAPI e sobreposição das imagens confirmou o observado (Figura 4.30D).

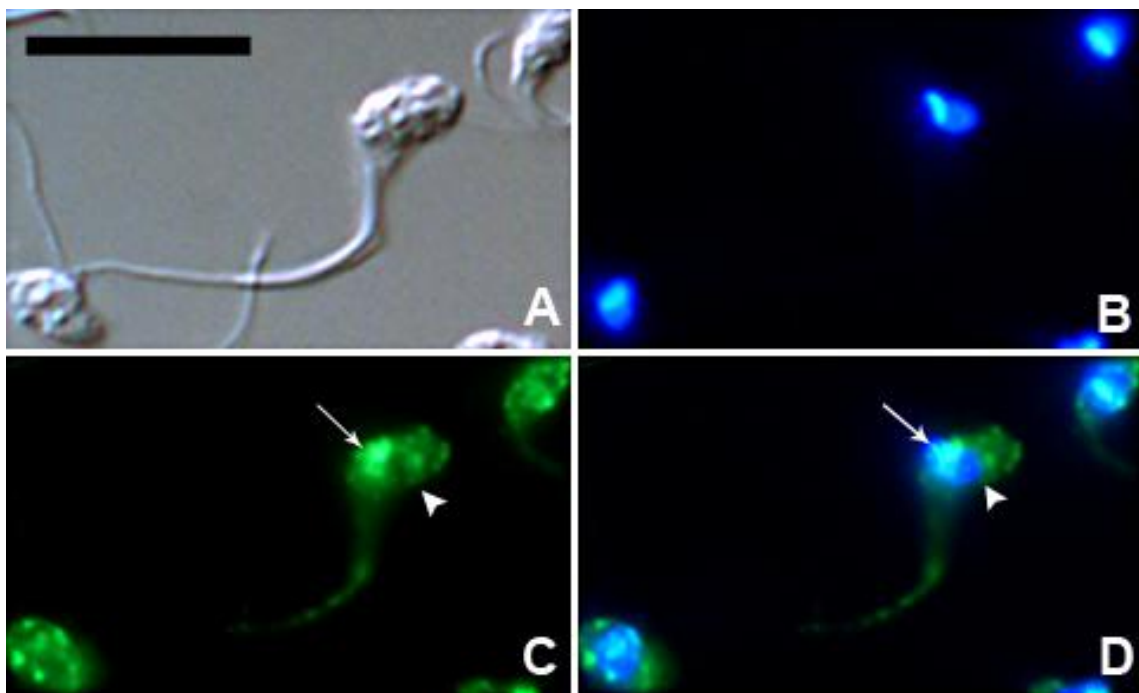


Figura 4.31 Imunolocalização da proteína HsLV em epimastigotas

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra HsIV e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência verde), indicando forte marcação no cinetoplasto (seta maior, C). (A) Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo e cinetoplasto marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra HsIV e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor 488 e DAPI, mostrando co-localização predominante da proteína com o

cinetoplasto (setas maior) e fraca presença no núcleo (seta menor). Barra de escala = 10 μ m.

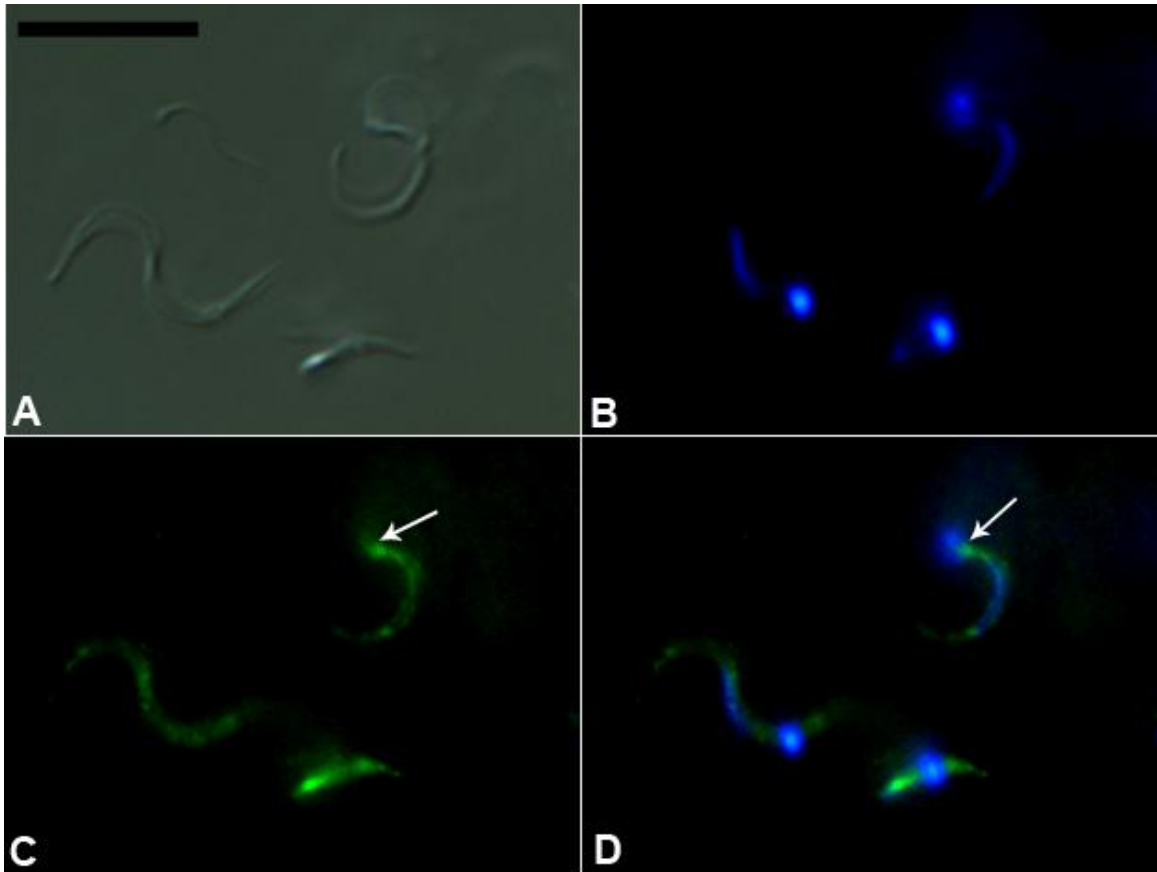


Figura 4.32 Imunolocalização da proteína HsIV em tripomastigotas metacíclicos

A localização celular foi realizada utilizando anti-soro específico contra HsIV e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488 (fluorescência verde), indicando localização predominante no cinetoplasto (setas, C). (A) Parasitas visualizados por contraste interferencial; (B) Imagem mostrando núcleo e cinetoplasto marcados com DAPI; (C) Imagens obtidas com anti-soro específico contra HsIV e posterior incubação com anticorpo secundário AlexaFluor 488; (D) Sobreposição das imagens da marcação com AlexaFluor 488 e DAPI, mostrando co-localização da proteína com cinetoplasto (setas) e núcleo. Barra de escala = 10 μ m.

5 DISCUSSÃO

A avaliação da via de degradação mediada por proteossomos representa um desafio, devido à sua complexidade e dinâmica. O objetivo desta tese foi realizar uma investigação sobre esta via durante o processo de diferenciação celular (metaciclogênese) *in vitro* do protozoário patogênico *Trypanosoma cruzi*, onde os parasitas sofrem profundas modificações em sua morfologia, fisiologia, bioquímica. Com o propósito de ampliar a compreensão sobre o papel biológico dos proteossomos e como essa via de degradação está atuando durante a metaciclogênese de *T. cruzi*, utilizamos diferentes abordagens, que serão discutidas a seguir.

5.1. AVALIAÇÃO CELULAR DA METACICLOGÊNESE COM O USO DE INIBIDORES DE PROTEOSSOMO

Diversos trabalhos demonstraram que inibição do proteossomo com lactacistina afeta o desenvolvimento de vários parasitas protozoários (Gonzales *et al.*, 1996; Gantt *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2000). Nossos resultados mostraram que a incubação de epimastigotas de *T. cruzi* com inibidores específicos de proteossomo (lactacistina, PSI e MG132) provocou a inibição do crescimento celular e metaciclogênese deste parasita *in vitro*.

O inibidor lactacistina possui grande especificidade na inibição dos proteossomos, de todas as espécies de arqueobactérias a mamíferos (Coux *et al.*, 1996), não apresentando nenhum efeito detectável sobre a maioria das outras proteases, com exceção da catepsina A (Ostrowska *et al.*, 1997). No entanto, os inibidores de proteossomo PSI e MG132 são menos específicos, atuando sobre outras proteases. Por essa razão, selecionamos lactacistina para estudar seu efeito sobre o crescimento e diferenciação do parasita *T. cruzi*.

A metaciclologênese é o processo pelo qual as formas não infectivas (epimastigotas) de *T. cruzi* se transformam em formas patogênicas (tripomastigotas metacíclicas). Durante a metaciclologênese *in vivo*, as formas epimastigotas aderem ao epitélio do intestino do inseto vetor antes de transformarem-se em tripomastigotas metacíclicas (Boker & Schaub 1984; De Souza, 1984). A adesão é feita via flagelo através de interações hidrofóbicas não-específicas com a camada superficial do epitélio do intestino (Gonzales-Perdomo *et al.*, 1988; Kollien *et al.*, 1998), sendo considerada um pré-requisito para a diferenciação aos estágios infecciosos (Zeledón *et al.*, 1984; Kollien *et al.*, 1998). Não se sabe como a aderência dos epimastigotas desencadeia o processo de diferenciação, mas tanto a adesão quanto a metaciclologênese são desencadeados por estresse nutricional (Figueiredo *et al.*, 2000).

Nossos resultados de microscopia óptica com parasitas corados pelo Giemsa mostraram que formas epimastigotas incubadas em meio de diferenciação tratado com lactacistina aderiam à parede do frasco de cultura, mas não se diferenciavam em tripomastigotas metacíclicas, sendo liberadas ainda sob a forma epimastigota. Estes parasitas apresentaram uma forma mais curta e arredondada quando comparados com os controles. No entanto, a maioria dos parasitas encontrados no sobrenadante de culturas controle era formada por tripomastigotas metacíclicas. Estas conclusões foram confirmadas por observações feitas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Nas análises por MET observou-se uma perda de granulosidade nos reservossomos dos parasitas. Este resultado era esperado, uma vez que estudos anteriores mostraram que o conteúdo dos reservossomos desaparece gradualmente durante o processo de metaciclologênese (Figueiredo *et al.*, 1994). Isto provavelmente ocorre devido ao consumo das reservas metabólicas do parasita durante o processo de transformação. Além disso, diversas células tratadas com lactacistina apresentaram condensação e fragmentação do DNA nuclear e do cinetoplasto, sugerindo que estas células estariam em um processo de apoptose. Este resultado é consistente com os dados observado na análise por citometria de fluxo (Figura 4.9 – barras brancas), onde foi

demonstrado um aumento do número de parasitas com DNA fragmentado em culturas tratadas com a droga.

Nossos dados de citometria de fluxo demonstraram que formas epimastigotas cultivadas em meio LIT contendo lactacistina tiveram o ciclo celular parado na fase G2. Esses dados concordam com os obtidos por Mutomba & Wang, 1998 em formas procíclicas de *T. brucei* e são consistentes com a participação de proteossomos na regulação da concentração celular de ciclinas na divisão de tripanossomatídeos (Van Hellemond & Mottram 2000)

Em culturas controle de epimastigotas em divisão celular as células seguem da fase G1 para a fase S, depois para a fase G2 + M, e finalmente voltam para fase G1. Se as condições extracelulares são desfavoráveis, ocorre um atraso na progressão do ciclo celular em G1 e as células podem entrar em um estado especial de repouso (fase G0). A metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi* é desencadeada por submissão de formas epimastigotas a um estresse nutricional em meio TAU, seguida de incubação dos mesmos em meio de diferenciação TAU3AAG. Sob estas condições, os epimastigotas param de se dividir e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, ou podem entrar em G0. Desse modo, a proporção de células em G1 aumenta (Figura 4.9 - barras escuras), pois os parasitas tornam-se tripomastigotas metacíclicos.

No entanto, nossos dados de citometria de fluxo de parasitas tratados com lactacistina revelaram um grande número de células na fase G2 (Figuras 4.8 e 4.9). O meio TAU3AAG é um meio pobre que não tem suporte para a síntese de DNA e a multiplicação dos parasitas. Assim, é possível que essas células sejam epimastigotas da cultura original do LIT já em fase G2 que aderiram ao substrato e não conseguiram se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos, liberando-se então para o sobrenadante sob a forma de epimastigotas. Estes resultados reforçam o já observado anteriormente, de que a inibição da atividade de proteossomos não bloqueia a adesão de parasitas, mas pode afetar fatores ou proteínas que desencadeiam a diferenciação celular.

Em um estudo anterior, lactacistina na concentração de 1 μ M não impediu a diferenciação de *T. brucei* (Mutomba *et al.*, 1998). No entanto, outro

estudo mostrou que a transformação intracelular de amastigotas para tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* é impedida com a inibição do proteossomo, embora isto não tenha impedido a invasão celular. Além disso, tratamento com lactacistina promoveu a conjugação de ubiquitina às proteínas dos flagelos e acúmulo de substratos ubiquitinados durante essa transformação (Gonzalez *et al.*, 1996; De Diego *et al.*, 2001).

Estes resultados, em conjunto com os nossos, indicam que a atividade do proteossomo é necessária para a remodelação dos tripanossomas. É possível que os mecanismos que regulam as alterações morfológicas estágio-específicas nos protozoários sejam conservados e dependentes de proteossomos. Tais mecanismos provavelmente agem através de proteínas que mantêm a forma do parasita, como os elementos do citoesqueleto, proteínas e enzimas envolvidas nas vias metabólicas, além de uma série de proteínas de superfície. Além da degradação dessas proteínas, o proteossomo pode estar envolvido na degradação de proteínas reguladoras que tem um papel central no disparo dos mecanismos que promovem as mudanças estágio-específicas.

Nossos resultados sugerem que fatores que desencadeiam a metaciclogênese *in vitro* são afetados pelo tratamento com lactacistina, induzindo a liberação dos parasitas a partir do substrato, sem diferenciação celular. Assim, a inibição da atuação da via proteolítica mediada pelo proteossomo pode interromper o sinal que desencadeia a cascata de diferenciação celular do *T. cruzi*. Não está claro como o processo de diferenciação é disparado, mas a adesão e o estresse nutricional desempenham um papel importante na metaciclogênese (Figueiredo *et al.*, 2000). Além disso, estudos anteriores mostraram que a metaciclogênese de *T. cruzi* é estimulada por AMP cíclico e ativadores de adenilato ciclase (Gonzalez-Perdomo *et al.*, 1988; Fraidenraich *et al.*, 1993, Garcia *et al.*, 1995). Assim, a identificação de possíveis alvos para a degradação por proteossomos, como as proteínas que disparam a metaciclogênese, pode ajudar a elucidar o mecanismos envolvidos na diferenciação celular em *Trypanosoma cruzi*.

5.2. AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE MEDIADA PELO PROTEOSSOMO

Os proteossomos são responsáveis pela maior parte da degradação de proteínas em células eucarióticas (revisto por Ciechanover, 2006; Goldbeg, 2007). Sabe-se que sob determinadas condições, na mesma célula diferentes grupos de proteínas podem ser enviados para o proteossomo por diferentes mecanismos. A degradação pode ocorrer de forma dependente ou independente de ubiquitina e ATP. As proteínas ubiquitinadas são reconhecidas pelo complexo regulador 19S (PA700), enquanto que o reconhecimento de proteínas não marcadas envolve outros ativadores com PA28/26, PA200 e o próprio 20S.

Apesar do genoma de *T. cruzi* possuir todos os genes das subunidades do 20S, bem como os dos complexos reguladores PA700, PA26, PA200 e PI31, não existem estudos sobre a ativação do proteossomo 20S por estes distintos complexos e sua contribuição para a degradação proteolítica. Assim, com o intuito de investigar os mecanismos utilizados na degradação proteossomal durante a metacicloênese *in vitro* de *T. cruzi*, realizamos ensaios proteolíticos das atividades 20S e 26S.

No ensaio proteolítico das atividades do proteossomo 20S, utilizamos substratos fluorogênicos exógenos para quantificar as três atividades proteolíticas (tripsina-símile, quimotripsina-símile e caspase-símile). Os resultados obtidos mostraram que as atividades semelhantes à tripsina e quimotripsina são mais elevadas do que a atividade semelhante à caspase em todos os parasitas analisados nos diferentes tempos da metacicloênese (Figura 4.11A). Esses resultados também indicam que o proteossomo 20S está ativo em todas as fases da diferenciação, pois o inibidor de proteossomo MG132, utilizado como controle da reação, inibiu de forma eficiente as atividades semelhantes a quimotripsina e caspase (Lee & Goldeberg, 1998). A diferença apresentada nas três atividades peptidásicas em *T. cruzi* suporta a

existência de uma grande heterogeneidade nos proteossomos de protozoários (revisado por Paugam *et al.*, 2003).

Huang *et al.*, 1999 demonstraram que proteossomos 20S purificados de formas procíclicas e sanguíneas de *T. brucei* possuem atividade semelhante à tripsina maior do que quimotripsina, enquanto que o inverso é encontrado na maioria dos proteossomos de eucariotos superiores. A elevada atividade semelhante à quimotripsina observada em nossos resultados pode estar relacionada à presença do proteossomo-like HslVU na fração enriquecida usada para o ensaio proteolítico. O HslVU degrada proteínas em procariotos de uma maneira semelhante ao proteossomo 26S em eucariotos. A co-existência do proteossomo 26S com o HslVU foi inicialmente considerada improvável (De Mot *et al.*, 1999). No entanto, dados genômicos recentes sugerem que *T. cruzi*, *Leishmania* e *Plasmodium* (Couvreur *et al.*, 2002; Gille *et al.*, 2003) possuem tanto o proteossomo 26S como o HslVU. A caracterização bioquímica de HslVU de *Plasmodium sp* revelou que esse complexo atua na degradação de substratos específicos para treonina protease, quimotripsina e caspase-símile, com valores de K_m de $58,22 \pm 5,5$, $19,18 \pm 2,1$ e $377,97 \pm 25,2 \mu M$, respectivamente (Gowthamam *et al.*, 2007), mostrando que a atividade predominante é a quimotripsina-símile.

Nossos resultados indicaram a presença do complexo HslVU durante a metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi*, isso justificaria a atividade quimotripsina-símile elevada, já que o extrato bruto utilizado para o ensaio proteolítico não foi purificado e sim enriquecido e pode conter os diversos proteossomos.

Nós quantificamos a atividade proteossomal 26S através da dosagem de tirosina liberada por proteólise endógena. Nossos resultados mostraram que durante a metaciclogênese a proteólise endógena não foi estimulada por ATP e ubiquitina (Figura 4.12A e E), ou seja, nenhum aumento na degradação protéica foi observado. Isto sugere a existência de mecanismos de degradação mediados pelo proteossomo que são dependentes e independentes de ubiquitina e ATP.

A Figura 4.12C reforça essa teoria, já que conjugados ubiquitinados foram detectados no extrato utilizado para o ensaio proteolítico (presença de

bandas acima de ~40 kDa). Este resultado indica que o extrato de proteínas contém a maquinaria ativa para conjugação da ubiquitina, pois quando o proteossomo 20S é inibido com inibidor específico MG132, a quantidade de conjugados poliubiquitinados aumentada.

Nossos resultados demonstraram a presença de uma via proteolítica dependente de ubiquitina. No entanto, adição de ubiquitina e ATP não foi suficiente para causar um aumento real da taxa de proteólise, sugerindo assim que a via já deve estar funcionando na sua capacidade máxima. Adição de ubiquitina não conduziu a uma nova rodada de ubiquitinação, pois a ubiquitina adicionada não foi utilizada permanecendo acumulada (Figura 4.12C, linha 2). Esta possibilidade é reforçada pela ausência de ubiquitina livre nos diferentes extratos utilizados antes do ensaio proteolítico endógena (Figura 4.12D).

Um mecanismo semelhante foi observado em *Schistosoma mansoni*, onde a adição de ATP e ubiquitina estimulou a atividade proteolítica proteossomal endógena apenas cerca de 2,5 vezes em cercárias, embora em vermes adultos a ativação tenha sido de cerca de 20 vezes (Guerra-Sá *et al.*, 2005). Observamos também que as formas infectivas (tripomastigotas metacíclicas) de *T. cruzi* tiveram uma baixa atividade proteolítica endógena em relação às outras etapas da diferenciação, como em *S. mansoni* (Guerra-Sá *et al.*, 2005).

A análise em conjunto dos dados da Tabela 5 e da Figura 4.12A, C, D e E, com a detecção de 20S em todas as fases da metaciclogênese (Figura 4.20A), sugere a existência de um mecanismo de degradação mediada pelo proteossomo, porém independente de ubiquitina.

Há inúmeras evidências de que a degradação proteossomal ubiquitina-independente é geralmente subestimada. O proteossomo 26S, que degrada preferencialmente proteínas poli-ubiquitinadas, não é o complexo predominante nas células, podendo até ser menos abundante do que o 20S livre e os proteossomos híbridos (revisto por Tanahashi *et al.*, 2000). Assim, durante a metaciclogênese de *T. cruzi* as diversas conformações de proteossomos podem estar trabalhando em conjunto na degradação de proteínas, bem como 20S livre.

Nossos resultados mostraram que, durante metaciclologênese não há picos de degradação mediada pela ubiquitina, pois um perfil semelhante de conjugados ubiquitinados foi observado em todas as fases analisadas durante a diferenciação. Além disso, observou-se que as subunidades reguladoras 7 e 10, que reconhecem substratos ubiquinados, não variam significativamente durante a metaciclologênese (Figura 4.20A, B e C).

Embora a ubiquitinação não apresente variações durante a metaciclologênese, substratos degradados são pontos de não-retorno para o ciclo celular, pois a inibição do proteossomo leva à morte dos parasitas. Estes dados abrem perspectivas para estudos sobre a importância da degradação proteossomal independente de ubiquitina durante metaciclologênese de *T. cruzi*.

Os resultados das medidas da expressão relativa de proteínas carboniladas mostraram uma variação significativa nos níveis de proteínas oxidadas nas diferentes fases de diferenciação, com um aumento principalmente em epimastigotas de 5 dias, epimastigotas aderidos e epimastigotas após 24h. Por outro lado, houve uma diminuição em tripomastigotas metacíclicos em relação aos outros parasitas. Variações também foram observadas nas atividades proteolíticas de 20S e 26S. Esses resultados sugerem que o proteossomo 20S e 26S pode estar atuando na degradação de proteínas oxidadas, uma vez que os substratos naturais de proteólise independente de ubiquitina são proteínas oxidadas ou mal dobradas.

Muitos dados na literatura indicam que o proteossomo 20S degrada proteínas oxidadas e mal dobradas de uma maneira independente de ubiquitina e ATP (Grune *et al.*, 1996; Grune *et al.*, 2003; Ferrington *et al.*, 2001; Hoyt & Coffino, 2004; Orłowski & Wilk, 2003), entretanto o proteossoma 26S tem apenas uma capacidade mínima para degradar seletivamente proteínas oxidadas.

Análise bioquímica de lisados protéicos de células de mamíferos e leveduras revelou cerca de trinta substratos intrínsecos que são degradados pelos proteossomos 20S e 26S, independente de ubiquitina (Baugh *et al.*, 2009). O proteoma de *Trypanosoma cruzi* contém a maior parte destas proteínas (Atwood *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que durante a transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos ocorre um aumento na produção de proteínas envolvidas nas defesas antioxidantes (Atwood *et al.*, 2005). Parodi *et al.* (2007) identificaram durante metaciclogênese várias proteínas envolvidas na manutenção redox. Estas proteínas apresentaram uma expressão diferencial, o que sugere que o estresse nutricional pode modificar o estado redox do parasita, provavelmente pela ativação e/ou desativação de vias metabólicas. Neste contexto, o estado redox poderia modular a quantidade de oxidação e ubiquitinação de proteínas durante a metaciclogênese *in vitro*. Desse modo, durante a metaciclogênese o proteossomo poderia desempenhar um papel importante na manutenção da homeostase celular, através da degradação seletiva de proteínas oxidadas e degradação de proteínas danificadas.

A proteólise dependente de ubiquitina (26S) apresenta pequenas variações durante os diferentes estágios de diferenciação, com uma diminuição em epimastigotas aderidos após 12h e em tripomastigotas metacíclicos. Pequenas variações também foram observadas na proteólise 20S durante as distintas fases de diferenciação, com uma diminuição de quase 50% em tripomastigotas metacíclicos. Essas variações podem ser justificadas por modificações pós-traducionais nas proteínas formadoras do proteossomo (Mason *et al.*, 1996). Fosforilação é a modificação pós-traducional melhor estudada (Bose *et al.*, 1999). Sabe-se que ela regula as atividades enzimáticas dos proteossomos, estando envolvida no reconhecimento do substrato e na abertura do anel do cilindro através da ligação com os diferentes complexos regulatórios (Iwafune *et al.*, 2002).

Análise proteômica de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* submetidos à metaciclogênese identificou várias isoformas de uma série de proteínas, provavelmente devido a modificações pós-traducionais. Algumas proteínas encontradas nessa análise também apresentaram uma expressão diferencial durante a metaciclogênese, sugerindo que as modificações pós-traducionais podem ser uma parte fundamental da estratégia do parasita para a regulação da expressão gênica durante a diferenciação (Parodi *et al.*, 2007).

Enfim, nossos resultados sugerem um distinto mecanismo de regulação do proteossomo em *T. cruzi*, onde a ubiquitina não é a única molécula sinalizadora de proteólise. É possível que em tripanossomos a ubiquitina esteja envolvida em outros processos celulares como endocitose e sinalização celular, como já descrito por Chung *et al* (2008).

Durante a metaciclogênese, vários complexos formando diferentes proteossomos possivelmente coexistam e atuem em conjunto. O proteossomo 20S pode estar ligado aos complexos regulatórios (PA700, PA200 e PA26) e a ação coordenada faz possível a coexistência na célula de proteólise, mediada por proteossomos, de proteínas marcadas com ubiquitina e de proteínas oxidadas. Neste contexto, modificações pós-traducionais permitiriam a ligação dos diferentes complexos regulatórios ao 20S, alterando quais substratos potenciais seriam degradados (Glickman *et al.*, 2005) e alterando assim também a função dos proteossomos entre os diferentes estágios de diferenciação do *T. cruzi*.

5.3. LOCALIZAÇÃO CELULAR DOS PROTEOSSOMOS

Apesar dos proteossomos serem abundantes e onipresentes nas células, o estudo de sua localização celular não é tarefa fácil, pois eles existem sob múltiplas formas: proteossomos 20S livres, proteossomos 26S (20S + um ou dois PA700), 20S associados a PA28/PA26 e os proteossomos híbridos (proteossomo 20S associado com um PA28 e um PA700) (DeMartino & Slaughter, 1999; Glickman & Ciechanover, 2002). Existem outras formas de híbridos formados da associação do 20S com outros reguladores *in vivo*, mas estes ainda não estão bem caracterizados. A localização e proporção relativa das diferentes espécies moleculares de proteossomo dependem do tipo de célula, da fase do ciclo celular e condições metabólicas (Brooks, *et al.*, 2000; Russell & Johnston, 1999; Tanahashi *et al.*, 2000).

Nós realizamos a localização intracelular do proteossomo 20S (subunidade catalítica - Alfa 7), subunidade regulatórias 19S (Rpn10), PA26 e

do proteossomo-*like* (subunidade HsIV) em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*.

Os resultados obtidos na localização celular da subunidade catalítica do proteossomo 20S - alfa 7 demonstraram que estes proteossomos estão localizados no núcleo, citoplasma e predominantemente no cinetoplasto, tanto em formas epimastigotas quanto em formas tripomastigotas metacíclicos (Figuras 4.25C e 4.26C).

Em outros eucariotos unicelulares com leveduras, os proteossomos estão localizados quase que exclusivamente no núcleo (Li *et al.*, 2002). Por outro lado, em células de mamíferos vários estudos utilizando microscopia eletrônica mostram que os proteossomos são encontrados no núcleo e citoplasma das células, geralmente com maior abundância no citoplasma (Steiger *et al.*, 1980).

Recentemente, Guitiérrez *et al.* (2009) demonstraram, através de experimentos de fracionamento celular, a presença de proteossomos ativos no cinetoplasto de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Além disso, análise por microscopia eletrônica revelou a presença da subunidade catalítica alfa-5 do proteossomo 20S no núcleo, citoplasma e também no cinetoplasto de formas epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e amastigotas, como observado em nossos resultados de localização celular da subunidade catalítica alfa -7.

Durante a transformação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos, o cinetoplasto é profundamente remodelado, mudando drasticamente sua estrutura em forma de bastão para uma forma arredondada. No entanto, o significado biológico dessa mudança e como ela é dirigida não estão bem compreendidos. É possível que a remodelação do cinetoplasto envolva a expressão de novos conjuntos de proteínas e degradação de antigos grupos. Parece provável que esses processos exijam proteólise, sendo possível o envolvimento de proteossomos. Os nossos resultados de MET da metaciclogênese tratada com inibidor específico de proteossomo (Figura 4.7) reforçam esta hipótese, pois as formas epimastigotas após 72 horas de cultivo em meio TAU3AAG apresentaram grânulos densos de condensação e fragmentação do DNA no cinetoplasto. Em células de mamíferos foi

demonstrado que as enzimas topoisomerasas são degradadas no proteossomo, sendo que estas enzimas em tripanossomatídeos estão presentes no cinetoplasto (Deasai *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2001).

Analisando nossos resultados por um ponto de vista evolutivo, estes não são completamente inesperados. Além de localizarmos a subunidades catalítica alfa-7 predominantemente no cinetoplasto de *T. cruzi*, outra subunidade (HslV) do proteossomo-like HslVU também apresentou a mesma localização (Figura 4.31 e 4.32).

O complexo HslVU é um precursor do proteossomo 20S que possui aspectos estruturais e bioquímicos semelhantes a ele, incluindo a presença de uma treonina NH₂-terminal, inibida por inibidores proteossomo (Gille *et al.*, 2003; Rohrwild *et al.*, 1997). A estrutura N-terminal das proteínas formadoras de HslV e HslU sugeriu uma localização mitocondrial para as duas proteínas. Essas proteínas parecem essenciais para a biogênese e manutenção da mitocôndria, através da degradação de proteínas danificadas e do controle dos níveis de proteínas reguladoras, garantindo assim a integridade do genoma mitocondrial, da expressão gênica e da interação entre proteínas (Kaiser & Langer, 2000)

Recentemente, foi demonstrado que o proteossomo-like HslVU de *T. brucei* localiza-se na mitocôndria do parasita e tem a função de controlar a replicação/segregação do kDNA, do genoma mitocondrial do tripanossoma (Ziyin *et al.*, 2008).

Devido aos dados apresentados na literatura e às evidências encontradas em nossos resultados, não podemos descartar a hipótese de que os dois complexos 20S e HslVU se auto-compartimentalizam e co-existam na mesma organela em *T. cruzi*.

A proteína Rpn10 faz parte do complexo regulatório PA700 (19S) Este se liga ao 20S para formar o proteossomo 26S. O proteossomo 26S degrada preferencialmente proteínas poli-ubiquitinadas através da via conhecida com sistema proteossomo-ubiquitina. Nossos resultados obtidos na localização celular de Rpn10 mostraram uma distribuição no citoplasma, ao longo do

flagelo e principalmente no núcleo das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas. A distribuição citoplasmática apresentou-se granular com pontos mais intensos que também foram observados ao longo do flagelo.

Diversos trabalhos demonstraram que vários componentes do sistema proteassoma-ubiquitina (UPS) residem no núcleo da célula e as proteínas nucleares são substratos para degradação proteossomal. No entanto, as investigações concentram-se predominantemente na degradação de proteínas citoplasmáticas, mostrando que isso gera peptídeos para apresentação de antígenos (Rock *et al.*, 1994) e degradação de proteínas danificadas e mal dobradas (Reits *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000). Entretanto, existe um grande número de evidências sobre o envolvimento direto de um sistema proteossoma-ubiquitina nuclear (nUPS) no reparo do DNA, na replicação, na transcrição e no controle de qualidade nuclear (Mendez *et al.*, 2002; Baker & Grant, 2005; Chen & von Mikecz, 2005; Gardner *et al.*, 2005; Rockel *et al.*, 2005).

Além disso, estudos sobre os fatores epigenéticos que regulam a expressão gênica estão revelando tanto funções não-proteolíticas dos componentes do UPS quanto de degradação proteossomal no núcleo celular, fornecendo evidências que sugerem que o nUPS esteja envolvido na regulação da estrutura da cromatina (Jia *et al.*, 2005).

Várias subunidades 20S de proteossomos têm sinais de localização nuclear associados com grupos de aminoácidos ácidos que controlam a sua importação para o núcleo (Tanaka *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997). Foi demonstrado que durante a progressão do ciclo celular ocorre um aumento na localização nuclear de proteossomos em células HeLa e PTK2 (Palmer *et al.*, 1994). Experimentos com células de mamíferos sobre a dinâmica de distribuição dos proteossomos dentro de células vivas indicaram uma localização entre o citoplasma e o envelope nuclear durante a mitose. Após reorganização de envelope nuclear, o proteossomo moveu-se unidirecionalmente para o núcleo até a próxima mitose (Reits *et al.*, 1997).

No entanto, as subunidades do 19S (Rpt2 e Rpt4) de *S. cerevisiae*, encontram-se localizadas predominantemente no núcleo ao longo do ciclo

celular (Russell *et al.*, 1999). Em leveduras, assim com em *T. cruzi*, o envelope nuclear não se rompe durante a mitose (mitose fechada). Portanto, podemos especular que se o mecanismo de importação do proteossomo para o núcleo é conservado, o proteossomo 26S deve ser encontrado principalmente no núcleo, como observamos em nossos resultados.

O PA26 é um ativador que se liga ao proteossomo 20S de uma maneira independente de ATP e estimula a degradação de proteínas pelo 20S sem a marcação com ubiquitina. Em *T. cruzi*, a proteína PA26 apresentou uma distribuição difusa na forma epimastigota e uma distribuição granular com locais de acúmulo em tripomastigotas metacíclicas.

A localização celular do ativador PA28 (11S), o correspondente de PA26 em células de mamíferos, é predominantemente citoplasmática (Brooks *et al.*, 2000). No entanto, Fabumine *et al* (2001) demonstraram que interferon- γ induz o acúmulo de PA28 e imunoproteossomos no núcleo. A localização celular de PA26 encontrada em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* pode ser compatível com uma função fisiológica que difere da dos outros organismos. Nossos resultados sobre as atividades proteolíticas durante a metaciclogênese fornecem evidências para a existência de uma via de degradação proteossomal independente de ubiquitina e ATP. Não podemos descartar a hipótese que o PA26 tenha uma função relevante na degradação de proteínas em *T. cruzi*.

Nossos dados mostraram que a distribuição intracelular dos proteossomos em *T. cruzi* varia dependendo do estágio de diferenciação. Apesar dos proteossomos estarem presentes em toda a célula, e os níveis relativos de proteínas não apresentarem variações significativas (análises por *Western blot* dos diferentes componentes do proteossomo), foi possível demonstrar um acúmulo de proteossomos em determinadas regiões e organelas como o cinetoplasto e núcleo. Isto provavelmente reflete a necessidade de um aumento da proteólise de substratos específicos nestas localizações intracelulares. Desse modo, podemos sugerir que os proteossomos estão co-existindo na célula ao longo da metaciclogênese, sendo ativados em locais específicos conforme a necessidade celular.

Análise em conjunto dos resultados da expressão relativa dos proteossomos e a avaliação das atividades enzimáticas 20S e 26S mostram que os proteossomos estão presentes e ativos em todos os estágios da metaciclologênese de *T. cruzi*, embora existam diferenças na localização intracelular e nas atividades enzimáticas. Estes dados, adicionados à inibição do crescimento e metaciclologênese pela lactacistina, reforçam a idéia de que em *T. cruzi* os proteossomos podem estar envolvidos em diferentes funções biológicas, tais como o ciclo celular, a divisão celular e o remodelamento de forma do parasita durante a diferenciação para as formas tripomastigotas.

Este trabalho forneceu informações importantes para a compreensão inicial do funcionamento das diferentes vias de degradação mediadas por proteossomos durante a metaciclologênese de *T. cruzi*. A avaliação da degradação proteossomal em um processo de diferenciação celular forneceu uma visão global da dinâmica de distintos complexos envolvidos na degradação de proteínas. Os resultados obtidos nesta tese representam assim o primeiro passo para a determinação da relevância biológica dos proteossomos em *T. cruzi*. As abordagens utilizadas avaliaram alguns aspectos importantes da via, mas é necessário aprofundar esse estudo através de ferramentas proteômicas que poderão fornecer dados valiosos sobre a regulação da ligação dos diferentes ativadores do proteossomo, bem como sobre a identificação de proteínas alvos desses complexos.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos nesta tese de doutorado, concluímos que:

6.1. Efeito da inibição do proteossomo de *T. cruzi*

- Inibidores específicos de proteossomo (lactacistin, MG132 e PSI) bloqueiam o crescimento celular e o processo de metaciclogênese *in vitro* de *T. cruzi*.
- Formas epimastigotas com atividade proteossomal inibida por lactacistina (5 μ M) apresentaram condensação e fragmentação do DNA nuclear e do cinetoplasto, sugerindo que estas células estariam em um processo de apoptose.
- Os parasitas tratados com lactacistina durante a metaciclogênese *in vitro* tiveram o ciclo celular parado na fase G2, como determinado por citometria de fluxo.
- A atividade de proteossomos é necessária para a remodelação da célula durante a metaciclogênese
- Parasitas tratados com lactacistina durante a metaciclogênese *in vitro* aderem ao substrato, mas não diferenciam. Possivelmente os fatores que desencadeiam a metaciclogênese *in vitro* são afetados pelo tratamento com lactacistina, induzindo a liberação dos parasitas a partir do substrato, sem diferenciação celular.

6.2. Degradação proteossomal durante a metaciclogênese de *T. cruzi*

- Os proteossomos estão presentes e ativos durante a metaciclologênese *in vitro*, sendo que as atividades semelhantes à tripsina e quimotripsina são mais elevadas do que a atividade semelhante à caspase.
- Durante a metaciclologênese a proteólise endógena mediada por proteossomo 26S não é estimulada por ATP e ubiquitina. Nenhum aumento na degradação protéica foi observado, sugerindo a existência de mecanismos de degradação mediados por proteossomo que são dependentes e independentes de ubiquitina e ATP.
- As atividades proteolíticas de 20S e 26S apresentaram variações nos diferentes parasitas analisados durante a metaciclologênese
- Um perfil semelhante de conjugados ubiquitinados foi observado em todas as fases analisadas durante a diferenciação
- Análise da quantidade de proteínas oxidadas mostrou uma variação significativa nos níveis nas diferentes fases de metaciclologênese. Houve um aumento principalmente em epimastigotas de 5 dias e em epimastigotas aderidos e epimastigotas após 24h de stress. Por outro lado, houve uma diminuição em tripomastigotas metacíclicos em relação aos outros parasitas. Esses resultados sugerem que o proteossomo 20S pode estar atuando na degradação de proteínas oxidadas, uma vez que os substratos naturais de proteólise independente de ubiquitina são proteínas oxidadas ou mal dobradas.

6.3. Expressão relativa das proteínas proteossomais durante a metaciclologênese de *T. cruzi*

- Os níveis de proteossomo 20S (alfa7) e subunidades reguladoras 07 e 10, além de proteossomos PA26 e HsIVU não variam significativamente durante metaciclologênese e não são estágio-específicos

- A proteína da subunidade catalítica alfa 7 mostrou localização no núcleo, citoplasma e predominantemente no cinetoplasto de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.
- A localização celular de Rpn10 mostrou uma distribuição no citoplasma, ao longo do flagelo e principalmente no núcleo das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos. A distribuição citoplasmática apresentou-se granular, com pontos mais intensos que também foram observados ao longo do flagelo.
- A proteína PA26 apresentou uma distribuição difusa por toda a forma epimastigota e uma distribuição granular com locais de acúmulo de marcação em formas tripomastigotas metacíclicos.
- O proteossomo-like HsIV apresentou uma localização predominante no cinetoplasto das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos.
- Estes resultados sugerem que os diferentes complexos estão presentes ao longo da metaciclogênese, no entanto apresentam diferentes localizações intracelulares. Isto provavelmente reflete a necessidade de um aumento da proteólise de substratos específicos nestas localizações intracelulares

7 PERPECTIVAS

Os resultados desta tese abrem novas perspectivas de investigação sobre o papel biológico dos proteossomos no metabolismo de *T. cruzi*:

- Identificação de alvos de degradação e de proteínas que interagem com as via dependente e independente de ubiquitina, através de ensaios de imunoprecipitação com anticorpos contra Rpn10, PA26 e proteossomo-*like* HsIVU e análise por espectrometria de massa;
- Análise da regulação dos proteossomos, através da identificação de modificações pós-traducionais nas subunidades do 20S e nos complexos regulatórios dos proteossomos, durante a metaciclogênese;
- Confirmação da localização celular dos proteossomos por imunocitoquímica, com uso de microscopia eletrônica de transmissão;
- Co-localização do proteossomo com os diferentes complexos regulatórios durante o processo de metaciclogênese.
- Investigação da dinâmica de localização através de ensaios de fusão com proteínas com GFP

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25(17):3389-402, 1997.
- ALVES, C.R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; NOGUEIRA, N.F.; BOURGUINGNON, S.C.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P. GONZALEZ, M.S. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental parasitology**, 11: 44-52, 2007.
- ANBANANDAM, A.; ALBARADO, D. C.; TIRZIU, D. C.; SIMONS, M.; VEERARAGHAVAN, S. Molecular basis for proline- and arginine-rich peptide inhibition of proteasome. **J. Mol. Biol.** 384: 219–227, 2008.
- ÁVILA, A.R.; YAMADA-OGATTA, S.F.; DA SILVA, MONTEIRO. V.; KRIEGER, M.A.; NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol Biochem Parasitol**, 117: 169-77, 2001.
- ATWOOD, J.A.; WEATHERLY, D.B.; MINNING, T.A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F.R.; ORLANDO, R.; TARLETON, R.L.; The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**. 309: 473, 2005.
- BAJOREK, M. & GLICKMAN, M. H. Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasomal channel. **Cell. Mol. Life. Sci.** 61: 1–10, 2004.
- BAKER, S. P. & GRANT, P. A. The proteasome: not just degrading anymore. **Cell**. 123: 361-363, 2005.
- BAUGH, J. M.; VIKTOROVA, E., G.; PILIPENKO, E., V. Proteasome can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. **J. Mol Biol.** 386: 814-827, 2009.
- BENCE, N.F.; SAMPAT, R.M.; KOPITO, R.R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. **Science**. 292: 1552–1555, 2001.
- BIAŁY, L.P.; ZIEMBA, H.T.; MARIANOWSKI, P.; FRACKI, S.; BURY, M.; WÓJCIK, C. Localization of a proteasomal antigen in human spermatozoa: Immunohistochemical electron microscopic study. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. 39:129–130, 2001.
- BLICKWEDEHL, J.; AGARWAL, M.; SEONG, C.; PANDITA, R. K.; MELENDY, T., SUNG, P.; PANDITA, T. K. AND BANGIA, N. Role for proteasome activator PA200 and postglutamylation proteasome activity in genomic stability. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105: 16165–16170, 2008.
- BOCHTLER, M.; HARTMANN, C.; SONG, H. K.; BOURENKOV, G. P.; BARTUNIK, H. D. & HUBER, R. The structures of HslU and the ATP-dependent protease HslU–HslV. **Nature**. 403: 800–805, 2000.
- BOCHTLER, M.; DITZEL, L.; GROLL, M.; HARTMANN, C. & HUBER, R. The proteasome. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 28: 295–317, 1999.
- BÖKER, C.A. & SCHAUB, G.A. Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. **Z Parasitenk.** 70: 459-469, 1984.
- BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol.** 106:1349-58, 1988.
- BOSE, S.; MASON, G.G.; RIVETT, A.J. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. **Mol Biol Rep.** 26:11-4, 1999.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Rev of Microbiology**. 27: 347-82, 1973.

- BRIANE, D.; OLINK-COUX, M.; VASSY, J.; OUDAR, O.; HUESCA, M.; SCHERRER, K.; FOUCRIER, J. Immunolocalization of a specific type of prosome close to the bile canaliculi in fetal and adult rat liver. **European Journal of Cell Biology**. 57: 30–39, 1992.
- BROOKS, P.; FUERTES, G.; MURRAY, R.Z.; BOSE, S.; KNECHT, E.; RECHSTEINER, M.C.; HENDIL, K.B.; TANAKA, K.; DYSON, J.; RIVETT, J. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. **The Biochemistry Journal**. 346: 155–161, 2000.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 6: 93-100, 1964.
- CANÇADO, J.R. IN: BRENNER Z, ANDRADE AZ E BARRAL-NETTO M (eds) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Ed. Guanabara Koogan AS, 2000.
- CANO, M.I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTES, A.; LEVIN, M.J.; GONZALEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J.L. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol Biochem Parasitol**. 71: 273-8, 1995.
- CASCIO, P.; CALL, M.; PETRE, B. M.; WALZ, T.; GOLDBERG, A. L. Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. **EMBO J**. 21: 2636–2645, 2002.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1: 159-218, 1909.
- CHEN, M. & VON MIKECZ, A. Xenobiotic-induced recruitment of autoantigens to nuclear proteasomes suggests a role for altered antigen processing in scleroderma. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 1051: 1-8, 2005.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium thiocyanate – Phenol – Chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, 162: 156-159, 1987.
- CHUNG, W.L.; LEUNG, K.F.; CARRINGTON, M.; FIELD, M.C. Ubiquitylation is required for degradation of transmembrane surface proteins in trypanosomes. **Traffic**. 9(10):1681-97,2008.
- CIECHANOVER, A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. **Hematology** 2006: 1–12, 2006.
- CIECHANOVER, A. & SCHWARTZ, A. L. The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** .95: 2727-2730, 1998.
- CLAYTON CE Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, 21: 1881-8, 2002.
- COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 94. 1: 37-49, 1999.
- CONTRERAS, V. T.; NAVARRO, M. C.; DE LIMA, A. R.; DURAN, F.; ASKUE, J.; FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97(8): 1213-1220, 2002.
- CONTRERAS, V.T.; ARAUJO-JORGE, T.C.; BONALDO, M.C.; THOMAS, N.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.L.; GOLDENBERG, S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 83: 123-33,1988.
- CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M., GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**. 16: 315-27, 1985.

- COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.; BOIA, M.N.; FERNANDES, O.; BONFANTE, C.; CAMPOS, J.E.; SANTOS, L.; DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 44: 159-65, 2002.
- COUVREUR, B.; WATTIEZ, R. ; BOLLEN, A. ; FALMAGNE, P. ; LE, RAY. D. ; DUJARDIN, J.C. Eubacterial HslV and HslU subunits homologs in primordial eukaryotes. **Mol Biol Evol**. 19:2110–7, 2002.
- COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDEBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S the proteasomes. **Ann Rev Biochem**.65:801-47, 1996.
- DALLAGIOVANNA, B.; PLAZANET-MENUT, C.; OGATTA, S.F.Y.; ÁVILA, A.R.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin binding-like proteins is post-transcriptionally regulated during metacyclogenesis. **Exp Parasitol**. 99: 7-16, 2001.
- DANIEL, J.A.; TOROK, M.S.; SUN, Z.W.; SCHIELTZ D.; ALLIS C.D.; YATES JR 3RD; GRANT P.A. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. **J Biol Chem**. 279(3):1867-71, 2004.
- DAVIES, K.; J. A. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. **Biochimie**. 83: 301–310, 2001.
- DEASAI, S.D.; LI, T.K.; RODRIGUEZ-BAUMAN, A.; RUBIN, E.H.; LIU, L.F. Ubiquitin/26S proteasomemediated degradation of topoisomerase I as a resistancemechanism to camptothecin in tumor cells. **Cancer Res**. 61:5926–32, 2001.
- DEVERAUX, Q.; VAN NOCKER, S.; MAHAFFEY, D.; VIERSTRA, R.; RECHSTEINER, M. Inhibition of ubiquitin-mediated proteolysis by the Arabidopsis 26 S protease subunit S5a. **J. Biol. Chem**. 270: 29660–29663, 1995.
- DE CONTO, F.; MISSORINI, S.; ARCANGELETTI, C.; PINARDI, F.; MONTARRAS, D.; PINSET, C.; VASSY, J.; GERAUD, G.; CHEZZI, C.; SCHERRER, K. Prosome cytodistribution relative to desmin and actin filaments in dividing C2.7 myoblasts and during myotube formation in vitro. **Experimental Cell Research**. 233: 99–117,1997.
- DE DIEGO, J.L.; KATZ, J.M.; MARSHALL, P.; GUTIERREZ, B.; MANNING, J.E.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALEZ, J. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. **Biochemistry**. 40:1053-62, 2001.
- DE MARTINO, G.N. & SLAUGHTER, C.A. The Proteasome, a Novel Protease Regulated by Multiple Mechanisms. **The Journal Of Biological Chemistry** . 274: 32, 22123–22126, 1999.
- DE MOT, R.; NAGY, I.; WALZ, J.; BAUMEISTER, W. Proteasomes and other self compartmentalizing proteases in prokaryotes. **Trends Microbiol**. 2:88–92, 1999.
- DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int Rev Citol**. 86: 197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 103: 313-325, 2008.
- DIETRICH, P.; SOARES, M.B.; AFFONSO, M.H.; FLOETER-WINTER, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**. 1(125): 103-107, 1993.
- DO LEE & GOLDEBERG, A. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends in cell biology**. 8, 1998.
- ELIAS, M.C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol Biochem Parasitol**. 112: 79-90, 2001.
- ELSASSER, S.; GALI, R. R.; SCHWICKART, M.; LARSEN, C. N.; LEGGETT, D. S.; MULLER, B.; FENG, M. T.; TUBING, F.; DITTMAR, G. A.; FINLEY, D. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin- like protein domains. **Nat. Cell Biol**. 4:725–730, 2000.

- FABUNMI, R. P.; WIGLEY, W. C., THOMAS, P. J., DEMARTINO, G. N. Interferon-gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. **Journal of Cell Science**. 114: 29–36, 2001.
- FAGAN, J.M.; WAXMAN, L.; GOLDBERG, A.L. Skeletal muscle and liver contain a soluble ATP + ubiquitin-dependent proteolytic system. **Biochemical Journal**. 243: 335–343, 1987.
- FEHLKER, M.; WENDLER, P.; LEHMANN, A. AND ENENKEL, C. Bim3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. **EMBO**. 4: 959–963, 2003.
- FERRINGTON, D.A.; SUN, H.; MURRAY, K.K.; COSTA, J.; WILLIAMS, T.D.; BIGELOW, D.J.; SQUIER, T.C. Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. **J. Biol. Chem**. 276: 937–945, 2001.
- FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; ROSA, D.S.; SOARES, M.J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **Parasitology**. 80: 1213-1218, 2000.
- FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; STEINDEL, M.; SOARES, M.J. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation. **Parasitology**. 80: 517-522, 1994
- FORSTER, A. & HILL C.P. Proteasome degradation: enter the substrate. **Trends Cell Biol**. 13: 550–553, 2003.
- FRAGOSO, S.P.; PLAZANET-MENUT, C.; CARREIRA, M.A.; MOTTA, M.C.; DALLAGIOVANA, B.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nuclear ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. 126: 113- 7, 2003.
- FRAGOSO, S.P.; MATTEI, D.; HINES, J.C.; RAY, D.; GOLDENBERG, S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. **Mol Biochem Parasitol**. 94: 197-204, 1998.
- FRAIDENRAICH, D.; PENA, C.; ISOLA, E.L.; LAMMEL, E.M.; COSO, O.; ANEL, A.D.; PONDOR, S.; BARELLE, F.; TORRES, H.N.; FLAWIA, M.M. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by α -globin fragment from *Triatoma* hindgut: Effect on differentiation of epimastigotes to trypomastigote forms. **Proc Natl Acad Sci USA**. 90: 10140-10144, 1993.
- GACZYNSKA, M.; OSMULSKI, P.A.; Small-molecule inhibitors of proteasome activity. **Methods Mol. Biol**. 301: 3–22, 2005
- GACZYNSKA, M.; ROCK, K. L.; SPIES, T.; GOLDBERG, A. L. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 91: 9213-9217, 1994.
- GANTT, S.M.; MYUNG, M.M.; BRIONES, M.R.S.; WEI, D.L.; COREY, E.J.; OMURA, S.; NUSSENZWEIG, V.; SINNIS, P. Proteasome Inhibitors block developmental of *Plasmodium spp*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. 42: 2731-2738, 1998.
- GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *T. cruzi*. In Z Brener, ZA Andrade, M Barral Netto (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 41-7. 2000.
- GARCIA, E.S.; GONZALEZ, M.S.; DE AZAMBUJA, P.; BARALLE, F.E.; FRAIDENRAICH. D.; TORRES, H.N.; FLAWIA, M.M. Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying alpha D-globin sequences. **Exp Parasitol** 81: 255-261, 1995.
- GARDNER, R. G.; NELSON, Z. W. AND GOTTSCHLING, D. E. Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. **Cell**. 120: 803-815, 2005.
- GAUTIER-BERT, K.; MUROL, B.; JARROUSSE, A.; BALLUT, L.; BADAOU, S.; PETIT, F.; SCHMID, H. Substrate affinity and substrate specificity of proteasomes with RNase activity. **Molecular Biology Reports**. 30: 1–7, 2003.

- GILLE, C.; GOEDE, A.; SCHLOETELBURG, C.; PREISSNER, R.; KLOETZEL, P.M.; GOBEL, U.B. A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome. **J Mol Biol.** 326:1437–48, 2005.
- GILLE, C.; LORENZEN, S.; MICHALSKY, E.; FROMMEL, C. Kiss for strap: user extensions for a protein alignment editor. **Bioinformatics.** 19: 2489–91, 2003.
- GLICKMAN, M. H.; Raveh, D. Proteasome plasticity. **FEBS Lett.** 579: 3214–3223, 2005.
- GLICKMAN, M. H. & CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews.** 82: 373–428, 2002.
- GLICKMAN, M. H.; RUBIN, D. M.; Fu, HONGYONG; LARSEN, C. N.; COUX, O.; WEFES, I.; PFEIFER, G.; CJEKA, Z.; VIERSTRA, R.; WOLFGANG, B.; FRIED, V.; FINLEY, D. Functional analysis of the proteasome regulatory particle. **Mol. Biol. Rep.** 26: 21-28, 1999.
- GOLDBERG, A.L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. **Biochem. Soc. Trans.** 35: 12–17, 2007.
- GOLDEBERG, A.L.; AKOPIAN, T.N.; KISSELEV, A.F.; LEE, D.H.; ROHRWILD, M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. **Biol Chem.** 378: 131-140, 1997.
- GONZALEZ, J.; PINTO-RAMALHO, J.F.; FREVERT, U.; GHISO, J.; TOMLINSO, S.; SCHARFSTEIN, J.; COREY, E.J.; NUSSENZWEIG, V. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. **J Exp Med.** 184:1909–1918, 1996.
- GONZALEZ-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp Parasitol** 66: 205-212, 1988.
- GORDON, C.G.; LAGNIEL, J.; LEE, J.M.; BUHLER, S.; KIEFFER, M.; PERROT, H.; BOUCHERIE, M.B.; TOLEDANO, L. J. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 273: 22480-22489, 1998
- GOWTHAMAN, R.; DINESH, G.; ASIF, M.; VIRANDER, S.; CHAUHAN . Characterization and localization of *Plasmodium falciparum* homolog of prokaryotic ClpQ/HslV protease. **Molecular & Biochemical Parasitology.** 152: 139–148, 2007.
- GROETTRUP, M.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; STANDERA, S.; STOHWASSER, R.; KLOETZEL, P. M. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. **Eur. J. Immunol.** 26: 863-869, 1996.
- GROLL, M.; DITLEL, L.; LOWE, J.; STOCK, D.; BOTCHTLER, M.; BARTUNIK, H. D.; HUBER, R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. **Nature.** 386: 463-471, 1997.
- GRUNE, T.; MERKER, K.; SANDIG, G.; DAVIES, K.J. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 305:709-718, 2003.
- GRUNE, T.; REINHECKEL, T.; DAVIES, K.J. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. **J. Biol. Chem.** 271: 15504–15509, 1996.
- GUERRA-AS, R.; CASTRO-BORGES, W.; EVANGELISTA, E.A.; KETTELHUT, I.C.; RODRIGUES, V. *Schistosoma mansoni*: Functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. **Exp. Parasitol** 109: 228–236, 2005.
- GUTIÉRREZ, B.; OSORIO, L.; MOTTA, M.C.; HUIMA-BYRON, T.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; MUÑOZ, C.; SAGUA, H.; MORTARA, R.A.; ECHEVERRÍA, A.; ARAYA, J.E.; GONZÁLEZ, J. Molecular characterization and intracellular distribution of the alpha 5 subunit of *Trypanosoma cruzi* 20S proteasome. *Parasitology International* (4):367-74, 2009.
- HAASS, C & KLOETZEL, P. M. The *Drosophila* proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development. **Experimental Cell Research** 180: 243–252, 1989.

- HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biol Dis** 2: 11-21, 2003.
- HARGROVE, J. L. & SCHMIDT, F. H. The role of mRNA and protein stability in gene expression. **The FASEB Journal**. 3: 2360-2370, 1989.
- HARTMANN-PETERSEN, R.; GORDON, C. Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 247–259, 2004.
- HEMPHILL, A.; LAWSON, D.; SEEBECK, T. The cytoskeletal architecture of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol Today**. 77: 603-612, 1991.
- HERSHKO, A. Ubiquitin-mediated protein degradation. **J. Biol. Chem.** 263: 15237-15240, 1988.
- HOEGE, C.; PFANDER, B.; MOLDOVAN, G.L.; PYROWOLAKIS, G.; JENTSCH, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. **Nature**. 419(6903):135-41, 2002.
- HOYT, M.A. & COFFINO, P. Ubiquitin-free routes into the proteasome. **Cell. Mol. Life Sci.** 61: 1596–1600, 2004.
- HUA, S.; TO, W.Y.; NGUYEN, T.T.; WONG, M.L.; WANG, C.C. Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 78(1-2): 33-46, 1996.
- HUANG, L.; SHEN, M.; CHERNUSHEVICH, I.; BURLINGAME, A.L.; WANG, C.C.; ROBERTSON, C.D. Identification and isolation of three proteasome subunits and their encoding genes from *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol**. 102: 211–223, 1999.
- INABA, K.; AKAZOME, Y.; MORISAWA, M. Purification of proteasomes from salmonid fish sperm and their localization along sperm flagella. **Journal of Cell Science**. 104: 907–915, 1993.
- IWAFUNE, Y.; KAWASAKI, I.H.; HIRANO, H. Electrophoretic analysis of phosphorylation of the yeast 20S proteasome. **Electrophoresis**. 23: 329–338, 2002.
- JIA, S.; KOBAYASHI, R.; GREWAL, S. I. S. Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Ctr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. **Nat. Cell Biol.** 7: 1007-1013, 2005.
- JOHNSTON, J.A.; WARD, C.L.; KOPITO, R.R. Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins. **The Journal of Cell Biology**. 143: 1883–1898, 1998.
- JOHNSON, P.J.; KOOTER, J.M.; BORST, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell**. 51: 273-281, 1987.
- JOSEFSBERG, L.B.; GALIANI, D.; DANTES, A.; AMSTERDAM, A.; DEKEL, N. The proteasome is involved in the first metaphase-to-anaphase transition of meiosis in rat oocytes. **Biology of Reproduction**. 62: 1270–1277, 2000.
- KÄSER, M. & LANGER, T. Protein degradation in mitochondria. **Sem Cell Develop Biol**. 11:181–90, 2000.
- KHOR, B.; BREDEMEYER, A. L.; HUANG, C. Y.; TURNBULL, I. R.; EVANS, R.; MAGGI, L. B. JR.; WHITE, J. M.; WALKER, L. M.; CARNES, K.; HESS, R. A.; SLECKMAN, B. P. Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. **Mol. Cell Biol**. 26: 2999–3007, 2006.
- KOHL, A. & GULL, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. **Mol Biochem Parasitol**. 93, 1-9, 1998.
- KOLLIEN, A.H.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G.A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. **Acta Tropica**. 70: 127-141, 1998.
- KOOTER, J.M.; VAN DER SPEK, H.J.; WAGTER, R.; D'OLIVEIRA, C.E.; VAN

- DER HOEVEN, F.; JOHNSON, P.J.; BORST, P. The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigens in *T. brucei*. **Cell**, 51: 261-272, 1987.
- KOPP, F.; HENDIL, K. B.; DAHLMANN, B.; KRISTENSEN, P.; SOBEK, A., UERKVITZ, W. Subunit arrangement in the human 20S proteasome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 94: 2939-2944, 1997.
- KOPP, F.; DAHLMANN, B.; KUEHN, L. Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alpha-beta activator: ultrastructure and peptidase activities. **J. Mol. Biol.** 313, 465-471, 2001.
- LEE, H. & GOLDBERG, A.L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends in Cell Biology** 8: 397- 403, 1998.
- LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 233: 346-357, 1994.
- LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.S.; NUSSENSZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **J Exp Med** 168: 649-59, 1988.
- LI, X.; AMAZIT, L.; LONG, W.; LONARD, D. M.; MONACO, J. J.; O'MALLEY, B. W. Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. **Mol. Cell.** 26: 831-842, 2007.
- LI, Z.; ZOU, C.B.; YAO, Y.; HOYT, M.A.; MCDONOUGH, S.; MACKAY, Z.B.; COFFINO, P.; WANG, C.C. An easily dissociated 26S proteasome catalyses an essential ubiquitin-mediated protein degradation pathway in *Trypanosoma brucei*. **J. Biol. Chem.** 277: 15486-15498, 2002.
- MCCUTCHEN-MALONEY, S. L.; MATSUDA, K.; SHIMBARA, N.; BINNS, D. D.; TANAKA, K.; SLAUGHTER, C. A.; DEMARTINO, G. N. cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. **J. Biol. Chem.** 275: 18557-18565, 2000.
- MCGRATH, J. P.; JENTSCH, S.; VARSHAVSKI, A. UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. **Embo J.** 10: 227-236, 1991
- MADISON-ANTENUCCI, S.; GRAMS, J.; HAJDUK, S.L. Editing machines: The complexities of trypanosome RNA editing. **Cell.** 108: 435-8, 2002.
- MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H.O.; BISHOP, J.R.; FALCONE, F.H.; GAVRILESCU, C.; MONTGOMERY, J.L.; SANTORI, M.I.; STERN, L.S.; WANG, Z.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA.** 6: 163-9, 2000.
- MAKIOKA, A.; KUMAGAI, M.; OHTOMO, H.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. **Parasitol Res.** 88:454-9, 2002.
- MAO, Y.; DESAI, S.D.; TING, C.Y.; HWANG, J.; LIU, L.F. 26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complex. **J Biol Chem.** 276:40652-9, 2001.
- MARQUES, A. J.; GLANEMANN, C.; RAMOS, P. C.; DOHMEN, R. J. The C-terminal extension of the beta7 subunit and activator complexes stabilize nascent 20 S proteasomes and promote their maturation. **J. Biol. Chem.** 282: 34869-34876, 2007.
- MASON, G.G.; HENDIL, K.; B. RIVETT, A.J. Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two phosphorylated subunits and the effect of phosphorylation on activity. **Eur. J. Biochem.** 238: 453-462, 1996.
- MENNA-BARRETO, R.F.; CORRÊA, J.R.; PINTO, A.V.; SOARES, M.J.; DE CASTRO, S.L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. **Parasitol Res** 4:895-905, 2007.
- MENDEZ, J.; ZOU-YANG, X. H.; KIM, S.-Y.; HIDAKA, M.; TANSEY, W. P.; STILLMAN, B. Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. **Mol. Cell.** 9: 481-491, 2002.

- MUKHOPADHYAY, D., RIEZMAN, H. Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. **Science**, 315: 201-205, 2007.
- MURATA, S.; KAWAHARA, H.; TOHMA, S.; YAMAMOTO, K.; KASAHARA, M.; NABESHIMA, Y.; TANAKA, K.; CHIBA, T. Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28- gamma. **J. Biol. Chem.** 274: 38211–38215, 1999.
- MUTOMBA, M.C. & WANG, C.C. The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. **Mol Biochem Parasitol** 93:11-22, 1998.
- MUTOMBA, M.C.; TO, W.Y.; HYUN, W.C.; WANG, C.C. Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in African trypanosomes. **Mol Biochem Parasitol.** 90:491-504, 1997.
- NANDI, D.; JIANG, H. B.; MONACO, J. J. Identification of MECL-1 (LMP 10) as the 3rd INF-inducible proteasome subunit. **J. Immunol.** 156: 2361-2364, 1996.
- NEUWALD, A.F.; ARAVIND, L.; SPOUGE, J.L.; KOONIN, E.V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res.** 9(1):27-43, 1999.
- NUNES, L.R.; CARVALHO, M.R.; SHAKARIAN, A.M.; BUCK, G.A. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene.** 2: 157-168, 1997.
- ORLOWSKI, M. & WILK, S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the Proteasome. **Arch. Biochem. Biophys** 415: 1–5, 2003.
- OSTROWSKA, H.; WOJCIK, C.; OMURA, S.; WOROWSKI, K. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. **Biochem Biophys Res Commun.** 234: 729-732, 1997.
- PAL, J.K.; MARTINS, D.S.; SCHERRER, K. Differential synthesis and cytolocalization of prosomes in chick embryos during development. **The International Journal of Developmental Biology.** 38: 525–534, 1994.
- PALMER, A.; MASON, G. G.; PARAMIO, J. M.; KNECHT, E.; RIVETT, A. J. Changes in proteasome localization during the cell cycle. **European Journal of Cell Biology.** 64: 163–175, 1994.
- PARODI-TALICE, A.; MONTEIRO-GOES, V.; ARRAMBIDE, N.; ÁVILA, A.R.; DURAN. R.; CORREA, A.; DALLAGIOVANNA, B.; CAYOTA, A.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; ROBELLO. C. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **J. Mass Spectrom.** 42: 1422–1432, 2007.
- PAUGAM, A.; BULTEAU, A.; DUPOUY-CAMET, J.; CREUZET. C.; FRIGUET, B. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. **TRENDS in Parasitology** 19:55-59, 2003.
- PAUGAM, A.; CREUZET, C.; DUPOUY-CAMET, J.; ROISIN, M.P. Evidence for the existence of a proteasome in *Toxoplasma gondii*: intracellular localization and specific peptidaseactivities. **Parasite.** 4: 267–273, 2001.
- PETIT, F.; JARROUSE, A. S.; DAHLMANN, B.; SOBEK, A.; HENDIL, K. B.; BURI, J.; BRIAND, Y.; SCHMID, H. P. Involvement of proteasomal subunits zeta and iota in RNA degradation. **Biochem. J.** 326: 93-98, 1997.
- PICKART, C. M. & COHEN, R. E. Proteasome and their kin: proteases in machine age. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 5: 177-187, 2004
- REITS, E. A.; VOS, J. C.; GROMME, M.; NEEFJES, J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. **Nature** 404: 774-778, 2000.
- REITS, E. A. J.; BENHAM, A. M.; PLOUGASTEL, B.; NEEFJES, J.; TROWSDALE, J. Dynamics of proteasome distribution in living cells **EMBO J.** 16, 6087–94, 1997.
- ROBERTSON, C.D. The *Leishmania mexicana* proteasome. **Mol. Biochem. Parasitol.** 103: 49-60, 1999.

- ROCK, K. L.; GRAMM, C.; ROTHSTEIN, L.; CLARK, K.; STEIN, R.; DICK, L.; HWANG, D.; GOLDBERG, A. L.. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell** 78: 761-771, 1994.
- ROCKEL, T. D.; STUHLMANN, D.; VON MIKECZ, A. Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. **J. Cell Sci.** 118: 5231-5242, 2005.
- RODRIGUES, C.O.; DUTRA, P.M.; SOUTO-PADRON, T.; CORDEIRO, R.S.; LOPES, A.H. Effect of platelet-activating factor on cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun.** 223: 735-40, 1996.
- RODRIGUEZ, A.; RIOULT, M.G.; ORA, A.; ANDREWS, N. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **J Cell Biol.** 129: 1263-73, 1995.
- ROHRWILD, M.; PFEIFER, G.; SANTARIUS, U.; MULLER, S.A.; HUANG, H.C.; ENGEL, A. The ATPdependent HsIVU protease from *Escherichia coli* is a four ring structure resembling the proteasome. **Nature Str Biol.** 4:133-9, 1997.
- RUSSELL, S.J.; STEGER, K.A.; JOHNSTON, S.A. Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26S proteasome subunits in yeast. **The Journal of Biological Chemistry.** 274: 21943-21952, 1999.
- RYABOVA, L.V.; VIRTANEN, I.; OLINK-COUX, M.; SCHERRER, K.; VASSETZKY, S.G. Distribution of prosome proteins and their relationship with the cytoskeleton in oogenesis of *Xenopus laevis*. **Molecular Reproduction and Development.** 37: 195-203, 1994.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, N.Y, USA. 1989.
- SCOTT, D.A.; DO CAMPO, R.; DVORAK, J.A.; SHI, S.; LEAPMAN, R.D. *In situ* compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.** 102: 157-167, 1997.
- SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu Rev Microbiol.** 49, 117-43, 1995.
- SHAW, M.K.; HE, C.Y.; ROODS, D.S.; TILNEY, L.G. Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology.** 121: 35-47, 2000.
- SCHMIDT, M.; HAAS, W.; CROSAS, B.; SANTAMARIA, P. G.; GYGI, S. P.; WALZ, T.; FINLEY, D. The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 12: 294-303, 2005.
- SCHNAUFER, A.; PANIGRAHI, A. K.; PANICUCCI, B.; IGO Jr, R. P.; SALAVATI, R.; STUART, K. An RNA Ligase Essential for RNA Editing and Survival of the Bloodstream Form of *Trypanosoma brucei*. **Science**, 291(5511): 2159 – 2162, 2001.
- SCHWARTZ, D. & CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. **Cell.** 37: 67-75, 1984.
- SHOLZE, H.; FREY, S.; CEJKA, Z.; BAKKER-GRUNWALD, T. Evidence for the existence of both proteasomes and a novel high molecular weight peptidase in *Entamoeba histolytica*. **J. Biol. Chem.** 271: 6212-6216, 1996.
- SCHUBERT, U.; ANTON, L. C.; GIBBS, J.; NORBURY, C. C.; YEWDELL, J. W.; BENNINK, J. R. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. **Nature.**404: 770-774, 2000.
- SILVEIRA, J.F. In Z BRENER, ZA ANDRADE, M BARRAL NETTO (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2^a Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 127-152, 2000.
- SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. A. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **PNAS**, 97(13): 6986-6993, 2000.
- SQUIER, T.C. Redox modulation of cellular metabolism through targeted degradation of signaling proteins by the proteasome. **Antioxidants & Redox Signal.** 8:217-228, 2006.

- SOARES, M.J.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.. Identification of a large prelysosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci.**102: 157-167, 1992.
- SOARES, M.J.& DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Res.** 77: 461-469, 1991.
- STEIGER, R.F.; OPPERDOES, F.R.; BONTEMPES, J. Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases. **Eur J Biochem.** 105: 163–75, 1980.
- TANAHASHI, N.; MURAKAMI, Y.; MINAMI, Y.; SHIMBARA, N.; HENDIL, K. B.; TANAKA, K. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. **The Journal of Biological Chemistry.** 275: 14336–14345, 2000.
- TANAHASHI, N.; YOKOTA, K.; AHN, J. Y.; CHUNG, C. H.; FUJIWARA, T.; TAKAHASHI, E.; DEMARTINO, G. N.; SLAUGHTER, C. A.; TOYONAGA, T.; YAMAMURA, K.; SHIMBARA, N.; TANAKA, K. Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma- interferon regulation. **Genes Cells.** 2: 195–211, 1997.
- TANAKA, K. The proteasome: Overview of structure and functions. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** 85(1):12-36, 2009.
- TANAKA, K. Molecular biology of the proteasome. **Biochem. Biophys Res. Commun.** 247:537-541, 1998.
- TANAKA, K.; YOSHIMURA, T.; TAMURA, T.; FUJIWARA, T.; KUMATORI, A.; ICHIHARA, A. Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. **FEBS Letters.** 271: 41–46, 1990.
- TANAKA, K. Molecular biology of proteasomes. **Mol. Biol. Rep.** 21: 21-26, 1995.
- TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell.** 71: 1117-30, 1992.
- TEIXEIRA, S. M. R. & DA ROCHA, W. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and Molecular Research,** 2(1): 148-158, 2003.
- TEIXEIRA, S. M. R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31(12): 1503-1516, 1998.
- TOMÁS, A.M.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. **Eur J Biochem.** 244: 596-603, 1997.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA.**76, 4350-4. 1979.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol** 31: 472-81, 2001.
- YAO, Y. & WANG, C. C. Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. **J. Biol. Chem.** 274: 33921–33930, 1997.
- WAALKES, T.P. & UDENFRIEND, S.A. Fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **J. Lab. Clin. Med.** 50:733-736, 1957.
- WANG, H. R.; KANIA, M.; BAUMEISTER, W.; NEDERLOF, P. M. Import of human and Thermoplasma 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences. **European Journal of Cell Biology.** 73: 105–113, 1997.

- WHITBY, F.G.; MASTERS, E.I.; KRAMER, L; KNOWLTON, R.J.; YAO, Y; WANG, C.C.; HILL, C.P. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. **Letter to Nature**. 408: 115-120, 2000.
- WÓJCIK, C.; BENCHAIIB, M.; LORNAGE, J.; CZYBA, J.C.; GUERIN, J.F. Proteasomes in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**. 23: 169–177, 2000.
- WÓJCIK, C.; TANAKA, K.; PAWELETZ, N.; NAAB, U.; WILK, S. Proteasome activator (PA28) subunits, alpha, beta and gamma (Ki antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells. **Eur. J. Cell Biol**. 77: 151–160, 1998.
- ULLU, E. & TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **J. Biol. Chem.**, 270(35):20365-20369. 1995.
- ULRICH, H.; MAGDESIAN, M.H.; ALVES, M.J.; COLLI, W. *In vitro* selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. **J Biol Chem**. 277(23):20756-62, 2002.
- USTRELL, V.; HOFFMAN, L.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. **EMBO J**. 21: 3516–3525, 2002.
- VAN HELLEMOND, J.J. & MOTRAM, J.C. The CYC3 gene of *Trypanosoma brucei* encodes with a short half-life. **Mol Biochem Parasitol**. 111: 245-282, 2000
- VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of Gene Expression in Trypanosomes. **Microbiol. Rev**. 59(2): 223-240, 1995.
- VERMA, R.; ARAVIND, L.; OANIA, R.; MCDONALD, W. H.; YATES, J. R.; 3RD, KOONIN, E. V.; DESHAIES, R. J. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. **Science**. 298: 611–615, 2002.
- VERMA, R. & DESHAIES, R. J, A proteasome howdunit: the case of the missing signal. **Cell**. 101: 341–344, 2000.
- VICKERMAN, K. & TETLEY, L. Recent structural studies on trypanosomes. **Annals Society Belgian Medicine Tropical**. 57(4-5): 441-457, 1977.
- ZAISS, D.M.W.; STANDERA, S.; KLOETZEL, P.M.; SIJTS, A.J.A.M. PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. **PNAS**. 99: 234-246, 2002.
- ZHANG, Z. & ZHANG, R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. **EMBO J**. 27: 852–864, 2008.
- ZELEDON, R. Some morphological and molecular aspects of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 94 (1): 217-8, 1999.
- ZIYIN, LI.; LINDSAY, M. E.; MOTYKA, S.A.; ENGLUND, P.T.; WANG, C. C. Identification of a Bacterial-Like HslVU Protease in the Mitochondria of *Trypanosoma brucei* and Its Role in Mitochondrial DNA Replication **PLOS pathogens**. 4:1-11 2008.

9 ANEXO