

**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro: influência da infecção na
via de apresentação de antígenos MHC de classe I**

Ricardo Camargo

**Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima
Coorientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá (*in memoriam*)**

Brasília

2014



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro: influência da infecção na via de apresentação de antígenos MHC de classe I

Ricardo Camargo

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Coorientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá (*in memoriam*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do grau de Doutor em Biologia Molecular.

Brasília

2014

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia do Gene do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília e parte no Laboratório de Bioquímica da Universidade de Humboldt, Berlim, Alemanha, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAP-DF.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Coorientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá
(*in memoriam*)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima

Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular (CEL/IB).

Orientador – Presidente da banca

Profa. Dra. Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Bioquímica e
Imunologia

Membro externo

Profa. Dra. Carla Nunes de Araújo

Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia (FCE/UnB)

Membro externo

Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau

Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Membro externo

Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira

Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Membro interno

Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos

Universidade de Brasília – Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)

Suplente

AGRADECIMENTOS

À Profa. Beatriz pela oportunidade e paciência, amizade, apoio, disposição e pelo enorme aprendizado. Agradeço todos os conselhos e “puxões de orelha”. Muitíssimo obrigado!

Ao prof. Cezar pela amizade, inspiração e motivação. Após a sua partida, Cezar, ficaram os ensinamentos, a saudade e profunda admiração. Muito obrigado por tudo...dedico este trabalho a você.

À Liliam Faria pela amizade e pela imprescindível contribuição para este trabalho. Juntos percorremos a estrada sinuosa e curiosa da tal interação *T. cruzi*-hospedeiro. Digamos que escrevemos dois importantes capítulos dessa longa jornada. Muito obrigado...

Aos meus pais, Fátima e Sebastião, pelo apoio durante esta caminhada, pelo incentivo, amor e amizade, e também, por sempre acreditarem nos meus sonhos.

À minha grande companheira e esposa Leila e à sua família. Leila, obrigado por ter me ajudado tanto tanto tanto nessa jornada. Sem você isto tudo seria muito mais difícil. Amo-te...

Aos meus irmãos, Marcelo e Eduardo, e cunhada Mariana, pela companhia e até mesmo pelas discussões em torno de um assunto tão “distante”.

Aos meus parentes que mesmo de tão longe sempre me apoiaram e ficam felizes com as minhas conquistas.

A toda galera do Laboratório LaBioGene. Ao Agnelo, Anderson, Aurea, Daniel, Lílian, Renata, Samuel e em especial aos irmãos do coração Agenor e Fabiana. Valeu pessoal, pela amizade, cooperação e pelos momentos de descontração. Agradeço muito muito à Marinez pela amizade e disposição.

Aos amigos Victor e Camila. Discussões e papos sempre bem-vindos.

À Profa. Cecília Favali e à Sarah pela ajuda com a citometria, pelos conselhos e discussões.

Ao Luis Sakamoto pelo companheirismo e discussões enriquecedoras.

Ao prof. Marcelo Brígido e a Ana, coordenador e secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da UnB.

Aos amigos alemães: Alex, Dra. Ulrike e em especial ao Prof. Dr. P-M Kloetzel. Muito obrigado pela oportunidade e acolhida durante a visita à Universidade de Humboldt em Berlim, Alemanha.

Aos amigos da BioMol, Bioquímica e Virologia. Em especial ao Prof. Bergmann e ao Prof. Carlos André pela solicitude e por permitirem o uso da estrutura de seus laboratórios.

Agradeço também aos órgãos que financiaram este trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

RESUMO

Ao longo da evolução o *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas) desenvolveu estratégias bastante eficientes para evadir-se do sistema imune de seu hospedeiro mamífero. Como consequência, a infecção por este organismo tende a ser crônica, sugerindo que o *T. cruzi* escapa da vigilância do sistema imune por meio da regulação negativa das vias de processamento de antígenos. Na via de apresentação de antígenos intracelulares MHC de classe I, a grande maioria dos peptídeos antigênicos é gerada pelo proteassoma, um complexo proteico multicatalítico responsável pela degradação de proteínas. Entretanto, sob estimulação com interferon- γ (IFN- γ), as subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ do proteassoma constitutivo são substituídas pelas subunidades $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL-1$ e $\beta 5i/LMP7$, formando o imunoproteassoma. O imunoproteassoma tem a sua atividade proteolítica modificada e especializada na geração de peptídeos apresentados pelas moléculas de MHC de classe I. Nesse cenário, nós avaliamos se a expressão e a atividade do proteassoma constitutivo, do imunoproteassoma e também de outros componentes da via de MHC classe I são alteradas pela infecção com *T. cruzi* em linhagem de célula não imune. Em análises por RT-PCR e géis bidimensionais, foi demonstrado que a expressão e a composição do proteassoma constitutivo não são afetadas pelo parasita. Em contraste, nós mostramos que a biossíntese das subunidades do imunoproteassoma $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, de PA28 β , de TAP1 e da molécula de MHC de classe I foi inibida em culturas de células infectadas e tratadas com IFN- γ . Nessas culturas, as atividades proteolíticas do proteassoma também foram drasticamente reduzidas. Em experimentos de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, nós constatamos que a infecção com *T. cruzi* reduz a densidade de moléculas de MHC de classe I na superfície da célula hospedeira. Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que o protozoário *Trypanosoma cruzi* é capaz de modular especificamente a sua infecção por meio de um mecanismo pós-transcricional que inibe a expressão dos componentes da via de MHC de classe I.

ABSTRACT

Over the course of evolution, *Trypanosoma cruzi* (etiologic agent of Chagas disease) developed efficient strategies to evade the immune system of your mammal host. As consequence, the infection by this parasite tends to be chronic, suggesting that *T. cruzi* escapes the immune surveillance by down regulating the antigen processing routes. Within the antigen presentation pathway of MHC class I, the majority of intracellular antigenic peptides are generated by the proteasome, a multicatalytic complex responsible for protein degradation. However, upon IFN- γ stimulation, the catalytic constitutive subunits of the proteasome are replaced by the subunits β 1i/LMP2, β 2i/MECL-1 and β 5i/LMP7 to form the immunoproteasome. The immunoproteasome has its protease activity modified promoting the generation of suitable peptides to be presented on MHC class I molecule. In this scenario, we analyzed whether the expression and activity of the constitutive and the immunoproteasome as well as other components of the MHC class I pathway are altered during the infection of non-immune cells with *T. cruzi*. By RT-PCR and two-dimensional gel electrophoresis analysis, we showed that the expression and composition of the constitutive proteasome is not affected by the parasite. In contrast, the biosynthesis of the immunoproteasome subunits β 1i, β 2i, β 5i also PA28 β , TAP1 and MHC class I molecule was down-regulated in infected-IFN- γ -treated cell cultures. In these cultures, the proteasomal proteolytic activities were also down-regulated. By flow cytometry and immunofluorescence microscopy, we observed that infection with *T. cruzi* reduces the density of MHC class I molecules on the surface of the host cell. Taken together, our results provide evidence that the protozoan *T. cruzi* specifically modulates its infection through an unknown posttranscriptional mechanism that inhibits the expression of the MHC class I pathway components.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa global do número de pessoas infectadas com <i>T. cruzi</i>	3
Figura 2. Formas de vida do <i>T. cruzi</i>	5
Figura 3. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	6
Figura 4. Diferenças entre o proteassoma constitutivo e o imunoproteassoma.....	16
Figura 5. Processamento de antígenos via MHC de classe I.....	17
Figura 6. Análise dos níveis de mRNA e da composição proteica do proteassoma constitutivo de células HeLa durante a infecção com <i>T. cruzi</i>	19
Figura 7. Esquema do modelo experimental.....	26
Figura 8. Análise dos níveis de mRNA do imunoproteassoma durante a infecção por <i>T. cruzi</i>	34
Figura 9. Análise comparativa da expressão proteica das subunidades imunoproteassomais de células HeLa durante a infecção com <i>T. cruzi</i>	37
Figura 10. Análise das atividades proteolíticas de proteassomas durante a infecção com o <i>T. cruzi</i>	40
Figura 11. Análise da expressão de TAP1 e da molécula de MHC de classe I durante a infecção com <i>T. cruzi</i>	42
Figura 12. Efeito da infecção com <i>T. cruzi</i> na expressão da molécula de MHC de classe I na superfície celular de células HeLa.....	44

ABREVIATURAS

BSA – Soro albumina bovina

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

HPRT1 – Hipoxantina fosforibosiltransferase 1

HRP – Peroxidase do rábano

IFN- γ – Interferon-gama

IL - Interleucina

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – PCR quantitativa

PE - Ficoeritrina

RT-PCR – Transcrição reversa acoplada à PCR

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TAP – Proteína transportadora associada à apresentação de antígenos

TBST – Tampão tris salino com Tween 20

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UTR – Região não traduzida

β 2M – Beta 2-microglobulina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3 Progressão da Doença de Chagas	7
1.4 Resposta imune à infecção por <i>T. cruzi</i>	8
1.5 Mecanismos de evasão e persistência do <i>T. cruzi</i>	11
1.6 Sistema Ubiquitina/Proteassoma e apresentação de antígenos via MHC de classe I.....	13
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 MATERIAL	22
3.1.1 Linhagens celulares.....	22
3.1.2 Anticorpos.....	22
3.1.3 Meios de Cultura.....	23
3.1.4 Soluções e Tampões	23
3.2 MÉTODOS	25
3.2.1 Culturas de células e Infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.2.2 Obtenção de tripomastigotas para infecção	25
3.2.3 Modelo Experimental	26
3.2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA	27
3.2.5 Real-Time RT-qPCR.....	27
3.2.6 Preparo dos extratos celulares	28
3.2.7 Western Blots	29
3.2.8 Ensaio de Atividade Proteassomal	29
3.2.9 Microscopia de fluorescência e Citometria de Fluxo.....	30
3.2.10 Eletroforese unidimensional em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	31
3.2.11 Eletroforese em gel de agarose para DNA e RNA	31
3.2.12 Quantificações por densitometria	31
3.2.13 Análises Estatísticas.....	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Análise dos níveis dos mRNAs do imunoproteassoma durante a infecção com <i>T. cruzi</i>	33

4.2	A infecção com <i>T. cruzi</i> anterior ao tratamento com IFN- γ inibe a síntese proteica das subunidades imunoproteassomais.	35
4.3	A infecção com <i>T. cruzi</i> altera as atividades proteolíticas do proteassoma do hospedeiro.	38
4.4	A infecção com o <i>T. cruzi</i> também afeta a expressão de TAP1 e da molécula de MHC de classe I.....	41
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
8	APÊNDICES	67
A.	Tabela de oligonucleotídeos	67
B.	Artigo Científico.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Descrita pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909), a doença ainda é considerada um grave problema de saúde pública nas Américas.

Inicialmente uma enzootia, a tripanossomíase tornou-se endêmica em muitas regiões da América Latina como consequência de um desequilíbrio ecológico provocado pela ocupação e pelo desenvolvimento de atividades antrópicas em áreas silvestres e rurais, favorecendo a domiciliação dos insetos vetores. Embora, primariamente limitada ao continente americano em virtude da transmissão vetorial, a doença ganhou expressão mundial. Nas últimas décadas, devido principalmente ao fluxo migratório de pessoas infectadas para áreas não endêmicas, o número de casos detectados nos Estados Unidos, Canadá, Europa e em países do Leste do Pacífico aumentou significativamente (WHO, 2014). Os últimos dados da Organização Mundial da Saúde mostram que aproximadamente 7-8 milhões de pessoas estão infectadas com o *T. cruzi* e cerca de 25 milhões estão expostas ao risco de contaminação (WHO, 2014).

O *T. cruzi* é um parasita digenético que possui como hospedeiros invertebrados triatomíneos hematófagos (ordem Hemiptera) e como hospedeiros vertebrados uma grande variedade de mamíferos. A doença de Chagas é transmitida ao homem por meio do contato com dejeções de triatomíneos infectados pelo parasita. Durante o repasto sanguíneo, estes insetos geralmente picam regiões expostas da pele, como a face, e defecam próximo ao orifício de inoculação de seu aparelho bucal. O *T. cruzi* penetra a pele ou a mucosa quando a pessoa instintivamente coça o local da ferida, espalhando fezes sobre a picada, olhos ou boca. No entanto, há mecanismos alternativos de transmissão, destacando-se a transmissão via oral, ocasionada pela ingestão de alimentos contaminados; a infecção acidental em laboratórios; a transmissão vertical ou congênita; a transmissão transfusional; e a transmissão por transplantes de órgãos infectados. Estas três últimas são as principais vias de

infecção em regiões não endêmicas e em países latino-americanos que estejam em processo de erradicação do vetor (WHO, 2014).

A transmissão oral, comum entre animais no ciclo silvestre, é esporádica e circunstancial em humanos e ocorre pela ingestão de alimentos contendo triatomíneos ou as suas dejeções. Os surtos aparecem de forma súbita, atingindo um número pequeno de pessoas. Diferentes tipos de alimentos podem estar contaminados, como comida caseira, suco de cana ou açaí, sopas e caldos, carne de caça semicruda e leite, quase sempre se registrando a presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento (DIAS et al., 2006). A via oral ganhou maior destaque em 2005, devido ao surto da doença na região litorânea do estado de Santa Catarina. Nesse episódio, segundo dados do Ministério da Saúde, foram identificadas 25 pessoas atingidas pela Doença de Chagas aguda relacionados à ingestão de caldo de cana, sendo que três pacientes evoluíram para óbito (STEINDEL et al., 2005).

Os acidentes laboratoriais também são possíveis mecanismos de transmissão chagásica. Nesses casos, a infecção pode ser devida ao contato com culturas de *T. cruzi*, exposição às fezes infectadas de triatomíneos ou a sangue de paciente ou animal contendo a forma tripomastigota. Apesar de a forma epimastigota ser a predominante em culturas axênicas, tripomastigotas podem estar presentes e causar infecção em casos de contato com mucosas ou micro-lesões de pele. Experimentalmente, já se comprovou a possibilidade de infecção através de mucosa oral e conjuntiva (HERWALDT, 2001).

A transmissão transfusional da doença de Chagas tem se tornado a via mais importante de propagação nos centros urbanos, sendo considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (EUA, Canadá, Europa, Japão e Austrália) (STRASEN et al., 2014).

A partir de 1991, os países mais afetados com a disseminação da tripanossomíase (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) intensificaram suas medidas para controlar a transmissão da doença realizando o combate ao vetor e a ampla triagem nos bancos de sangue e nos centros de transplantes de órgãos. Apesar da redução da transmissão vetorial, o Brasil ainda é considerado endêmico para a doença de Chagas. Estima-se que existam no país cerca de dois a três milhões de indivíduos infectados com *T. cruzi* e que ocorram 6.000 mortes por ano em decorrência de complicações da doença (SVS/MS, 2010, MARTINS-MELO

et al., 2013). Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2010 foram registrados 945 novos casos de tripanossomíase no Brasil (SVS/MS, 2010). Entretanto, é provável que esse número esteja subestimado, ou pelas características da doença, com uma fase aguda fugaz muitas vezes confundida com outras infecções, ou pela precariedade ou ineficiência do serviço médico e de notificação em algumas regiões do Brasil. Nas últimas décadas, mais de 95% dos casos agudos foram notificados nas regiões norte e nordeste, principalmente no estado do Pará e Amapá (SVS/MS, 2010).

Em áreas não endêmicas estima-se que há aproximadamente 300.000 indivíduos infectados nos Estados Unidos, 5.500 no Canadá, 80.000 na Europa e na região do Pacífico ocidental, 3.000 no Japão e 1.500 na Austrália (Fig. 1) (COURA; VIÑAS, 2010). Diante disso, vários desses países estão adotando medidas ligadas principalmente à triagem em bancos de sangue para o combate à disseminação da doença de Chagas.

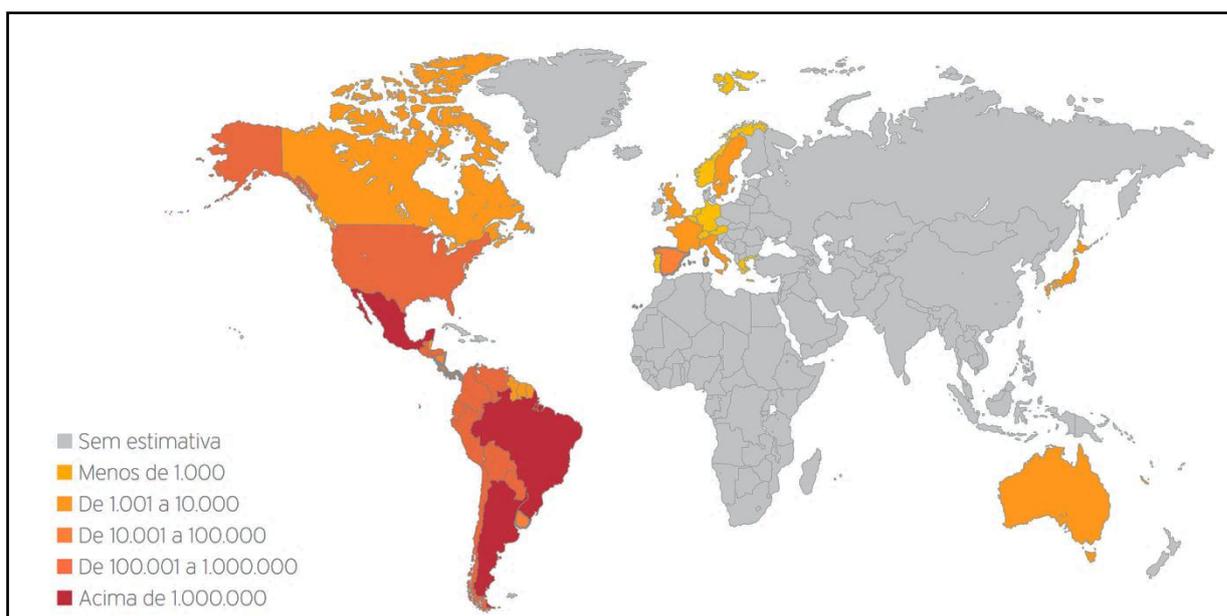


Figura 1. Estimativa global do número de pessoas infectadas com *T. cruzi* (MARCOLIN, 2009).

No atual estágio de controle vetorial e transfusional, a transmissão vertical passou a ser o principal mecanismo de transmissão do *T. cruzi* no Brasil. A transmissão vertical deve ser considerada em crianças nascidas de mães com sorologia positiva para o *T. cruzi*. Para confirmação desses casos é necessário

identificar os parasitas no sangue do recém-nascido e/ou anticorpos de origem não materna (após 6 a 9 meses de idade), desde que excluídos outros mecanismos de transmissão. A taxa de transmissão vertical por *T. cruzi* tem variações regionais de 1% no Brasil e de 4 a 12 % em países do Cone Sul (SVS/MS, 2010).

A quimioterapia específica para a doença de Chagas tem se mostrado problemática e conta apenas com dois fármacos: o composto derivado do nitrofurano, o Nifurtinox (NFX) (Lampit – Bayer) e o composto derivado do nitroimidazol, o Benzonidazol (BZ) (Rochagan – Roche), sendo que no Brasil apenas este último está comercialmente disponível. Ambas as drogas reduzem a duração e a severidade clínica da infecção aguda pelo *T. cruzi* e levam a cura parasitológica em quase 80% dos pacientes tratados nos primeiros estágios da doença (COURA; CASTRO, 2002; COURA, 2009; COURA; PEREIRA-BORGES, 2011). Entretanto, as drogas exibem vários efeitos colaterais e apresentam uma eficácia muito baixa (6 a 10%) no tratamento de pacientes com infecção crônica ou imunodeprimidos (URBINA et al., 1999). Além disso, requerem a administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica e ainda possuem uma grande variação na susceptibilidade de isolados do parasita (URBINA et al., 1999; COURA; CASTRO, 2002).

1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* apresenta um ciclo biológico bastante complexo que inclui basicamente quatro formas de vida distintas (Fig. 2). No hospedeiro invertebrado são encontradas as formas epimastigota e tripomastigota metacíclico, enquanto que no hospedeiro vertebrado são encontradas as formas amastigota (intracelulares) e tripomastigota sanguíneo. Os tripomastigotas (Fig 2A e 2B), com aproximadamente 25 µm de comprimento, são caracterizados pelo cinetoplasto (região rica em DNA de sua única mitocôndria) localizado entre o núcleo e a porção posterior do corpo celular. O flagelo emerge da bolsa flagelar adjacente ao cinetoplasto, externaliza-se em um segmento de membrana ondulante que atravessa o corpo celular do parasita, ultrapassando a sua porção anterior. Morfologicamente, os tripomastigotas metacíclicos (Fig. 2A) são mais delgados e longilíneos do que a forma sanguínea (Fig. 2B), que geralmente é menor e mais robusta. As amastigotas (Fig. 2C), com

aproximadamente 4 µm de diâmetro, são caracterizadas pelo formato arredondado, cinetoplasto visível, corpo achatado com pequeno flagelo interno e ausência de membrana ondulante. Os epimastigotas (Fig. 2D), com 20 a 40 µm de comprimento, têm forma de fuso, cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido.

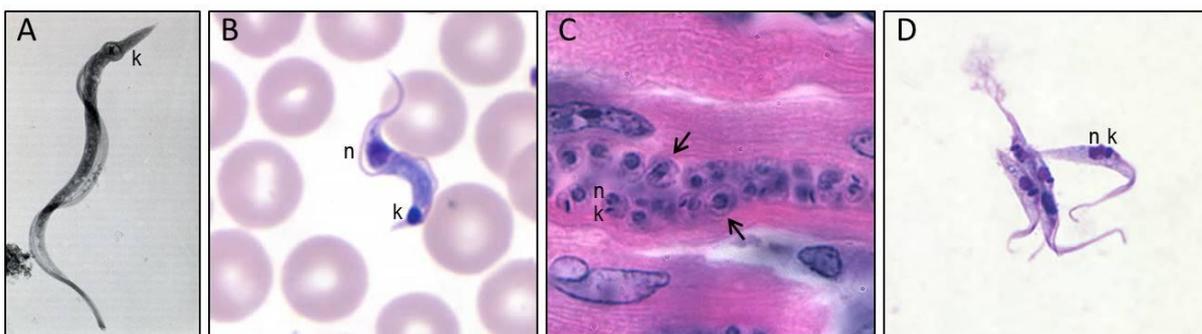


Figura 2. Formas de vida do *T. cruzi*. (A) Tripomastigota metacíclico. Microscopia eletrônica (CONTRERAS et al., 2002). (B) Tripomastigota sanguíneo em esfregaço de sangue. (C) Amastigotas em fibra muscular cardíaca (setas). (D) Epimastigota em cultura axênica. n-núcleo, k-cinetoplasto. B, C e D (DPDx, 2014).

No hospedeiro mamífero, os tripomastigotas metacíclicos, formas infectivas não-replicativas presentes nas dejeções dos triatomíneos, (Fig. 3-I e II) penetram as células do hospedeiro mamífero (ex. fibroblastos, macrófagos, adipócitos e células epiteliais) por um processo de interação parasita-célula hospedeira envolvendo uma grande variedade de proteínas de membrana e moléculas sinalizadoras (revisado por FERNANDES et al., 2012). Nesta região, há o recrutamento e fusão de lisossomos do hospedeiro, resultando na internalização do *T. cruzi* em um vacúolo parasitóforo (TARDIEUX et al., 1992). O parasita permanece neste vacúolo por um curto período, onde logo inicia a sua diferenciação em amastigota, escapa para o citoplasma e começa a sua multiplicação por fissão binária (Fig. 3-II e III) (LEY et al., 1990; BURLEIGH; ANDREWS, 1995). Em seguida, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas (Fig. 3-IV) que romperão a célula hospedeira e cairão no espaço intersticial e na corrente sanguínea, podendo infectar outras células (Fig. 3-V). Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo se infecta ao ingerir sangue contendo tripomastigotas (Fig. 3-VI). Essas formas passam por transformações no tubo digestivo do inseto tornando-se epimastigotas (Fig. 3-VII e VIII), as quais se dividem repetidamente por fissão binária até que atinjam a porção final do trato digestivo do

hospedeiro invertebrado e lá retomam a forma tripomastigota metacíclico (TYLER; ENGMAN, 2001; DE SOUZA, 2002).

Embora o *T. cruzi* seja capaz de infectar diferentes tipos celulares, ele possui tropismo por células gliais, fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas (BRENER, 1973). Logo, clinicamente a infecção pode causar o desenvolvimento de complicações neurológicas, mas principalmente cardíacas e digestivas, sobretudo na fase crônica, podendo culminar com a morte do indivíduo, como demonstrado pelas estatísticas que indicam que aproximadamente 14.000 pessoas morrem por ano em consequência dessa enfermidade (WHO, 2014).

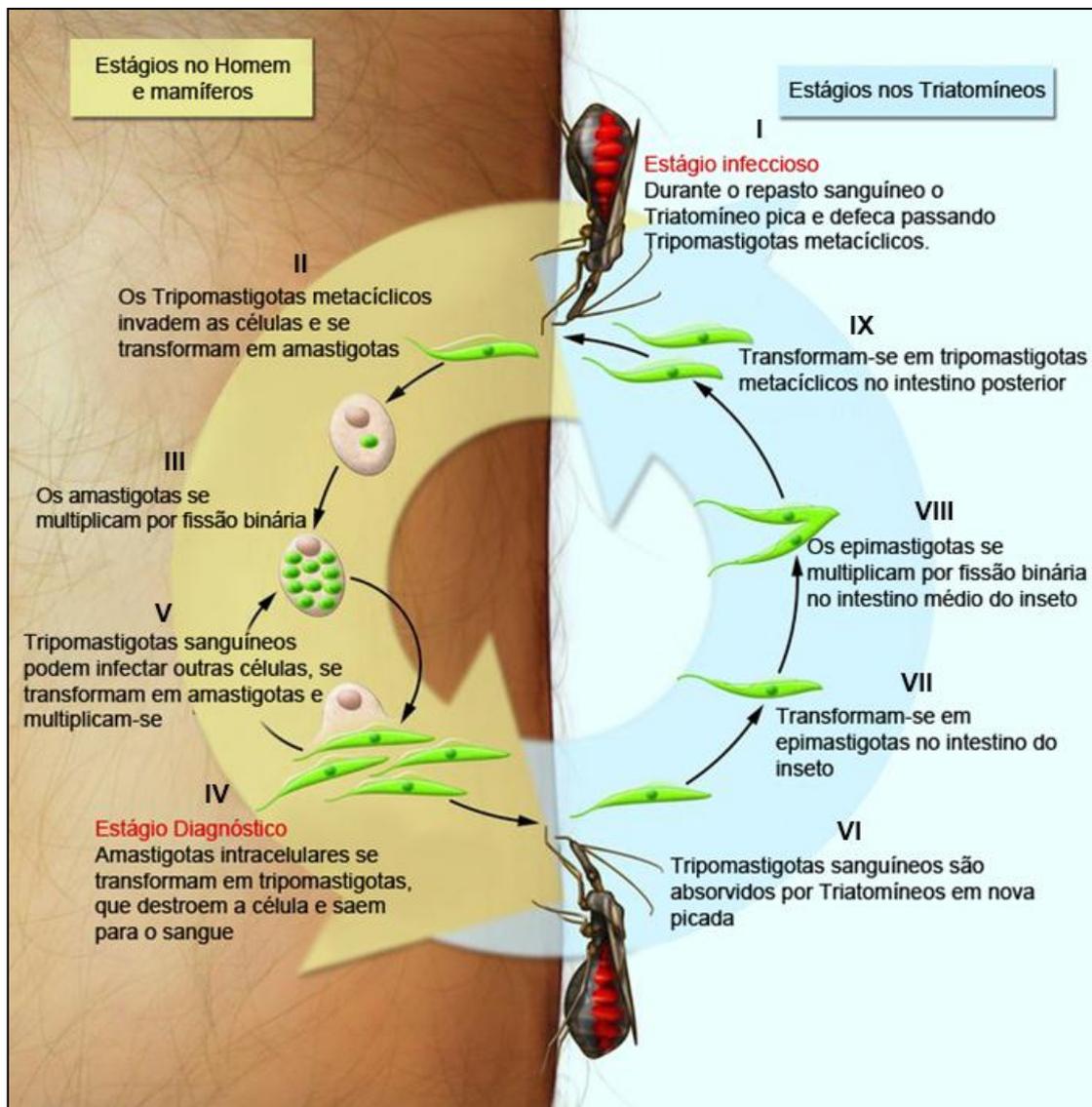


Figura 3. Ciclo de vida do *T. cruzi*. (Adaptado de STUART et al., 2008).

1.3 Progressão da Doença de Chagas

A doença de Chagas geralmente apresenta um curso clínico bifásico dividido em fase aguda e crônica.

A fase aguda se prolonga por cerca de 30 a 90 dias, sendo caracterizada no geral por um grande número de formas tripomastigotas circulantes. Esta fase tem as características clínicas de uma infecção generalizada e de gravidade variável. Em alguns casos, observa-se febre e manifestações clínicas nos locais de inoculação, como o sinal de Romaña e o Chagoma. Os casos fatais costumam exibir nas necropsias intensa miocardite e/ou meningo-encefalite, por vezes com grave broncopneumonia bacteriana como complicação. Os parasitas intracelulares são encontrados em vários órgãos, principalmente no interior do miocárdio. A inflamação no miocárdio costuma ser muito intensa, difusa, em desproporção com o número de células parasitadas. Há evidências morfológicas indicativas da participação do sistema imune na ampliação desta resposta inflamatória. Contudo, este estágio ainda é pouco compreendido em humanos devido à sua curta duração e a uma sintomatologia tão fugaz que pode passar totalmente despercebida (revisado por DUTRA et al., 2014).

Aproximadamente 30-40% dos indivíduos infectados evoluem para um estado de aparente equilíbrio parasita-hospedeiro sem manifestações clínicas (NAGAJYOTHI et al., 2012). Esse estado de infecção silenciosa é denominado forma crônica indeterminada ou assintomática. Para ser mais preciso ao diagnóstico, exige-se que esta forma seja identificada não só pelas evidências sorológicas e/ou parasitológicas da infecção, como também pela demonstração radiológica e eletrocardiográfica de normalidade dos aparelhos digestivo e circulatório (CARVALHO et al., 1995). Em cerca de 30% dos casos, os pacientes evoluem para a forma crônica cardíaca e 10% para a forma digestiva, mas a maioria não mostra uma tendência clínica (RASSI et al., 2010).

A fase crônica sintomática é classificada de acordo com as formas clínicas apresentadas: cardíaca, digestiva ou mista. Esta fase é caracterizada por baixa parasitemia, pelo elevado número de anticorpos circulantes e por extensas lesões nos órgãos parasitados. Na forma cardíaca ocorre principalmente miocardite crônica e fibrosante e/ou hipertrofia do coração. Os pacientes com a forma digestiva apresentam alterações hipertróficas no esôfago e colón intestinal. Já a forma mista é

caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente (RASSI et al., 2010).

1.4 Resposta imune à infecção por *T. cruzi*

Muitas das manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se diretamente a resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasita. Em cada fase da infecção existe uma resposta imune específica com um repertório de células e citocinas objetivando a eliminação do parasita.

No início de uma infecção experimental são observados eventos desencadeados pela imunidade inata do hospedeiro e posteriormente uma resposta específica que requer um conjunto de mecanismos combinados, incluindo a participação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, produção de anticorpos, indução de citocinas por várias populações de linfócitos e a ativação de macrófagos (GARG, 1997). Em camundongos, nos primeiros dias a infecção é acompanhada por um aumento significativo no soro da citocina Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), Interferon-gama (IFN- γ) e de Óxido Nítrico (NO), seguido por uma drástica redução dos mesmos (REVELLI et al., 1999; TARLETON, 2007).

Componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas, macrófagos e células *Natural Killer* (NK), parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi*. (TARLETON, 2007; MAYA et al., 2007). Essas células possuem em sua superfície uma classe de receptores (os PRRs) capazes de detectar e reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (os PAMPs), induzindo direta ou indiretamente uma resposta imune do hospedeiro. Dentre os diversos PRRs, proteínas transmembrana denominadas de receptores do tipo Toll (TLR) são os mais bem estudados. Membros dessa família reconhecem componentes essenciais dos mais variados micro-organismos (TARLETON, 2007). Diferentes grupos identificaram moléculas no *T. cruzi* que atuam como agonistas dos receptores TLR, induzindo a produção de NO e a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em células de linhagem monocítica (revisado por RODRIGUES et al., 2012). A primeira classe de moléculas do *T. cruzi* a ser caracterizada como PAMPs foi a das âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol ligadas à glicoproteínas semelhantes à mucinas. Essas proteínas estão distribuídas na superfície do parasita e foram

identificadas como potentes ativadores do heterodímero TLR2/TLR6 em camundongos e humanos (CAMPOS et al., 2001; GAZZINELLI; DENKERS, 2006). Outros estudos indicam que ácidos nucleicos derivados do *T. cruzi* também atuam como PAMPs. Foi demonstrado que fragmentos de DNA genômico do *T. cruzi* (motivos CpG não metilados) são capazes de estimular macrófagos e células dendríticas a produzirem citocinas pró-inflamatórias via receptores endossomais do tipo TLR9, assim como RNAs via TLR7. Esses dois receptores ativam NF- κ B via MyD88, culminando na produção de TNF- α e IL-12 (revisado por RODRIGUES et al., 2012).

No controle da infecção, as células NK são fundamentais por serem fonte primária de IFN- γ na fase aguda, por lisarem alvos reconhecidos por seus PRRs e por promoverem uma ponte entre os eventos de resposta inata e adaptativa (VITELLI-AVELAR et al., 2006; SATHLER-AVELAR et al., 2009). Foi demonstrado que a depleção das células NK resultou em parasitemia e mortalidade aumentadas em camundongos na fase aguda da infecção (CARDILLO et al., 1996). A ativação de macrófagos na resposta à infecção também é um evento bastante importante, visto que a secreção de IL-12 estimula a síntese de IFN- γ pelas células NK, retroalimentando a produção de IL-12, TNF- α , assim como NO, contribuindo para a eliminação do parasita (CAMARGO et al., 1997). Além disso, os macrófagos adquirem, processam e apresentam antígenos para células T e B, e são uma fonte de moléculas co-estimulatórias para a ativação das mesmas. Embora TNF- α , IFN- γ e o NO contribuam para aumentar a destruição de parasitas por macrófagos e proteger células da infecção, o *T. cruzi* escapa desse efeito protetor e os mecanismos que induzem essa evasão não são bem definidos (revisado por TARLETON, 2007).

A resposta inata é acompanhada pela ativação dos linfócitos B, T CD4⁺ e T CD8⁺, que juntos produzem uma resposta robusta, mas que na maioria dos casos não consegue eliminar o parasita. Visto que o *T. cruzi* é um parasita intracelular, a resposta mediada por células, principalmente relacionada à ativação dos linfócitos T CD8⁺, é um evento fundamental no combate à infecção. Estudos em camundongos desprovidos de linfócitos T (por timectomia neonatal, geneticamente modificados ou por inativação por anticorpos anti-CD4 ou anti-CD8) indicam que ambas as populações, CD4⁺ e CD8⁺, são igualmente essenciais para o controle da parasitemia e a sobrevivência do hospedeiro, tanto na fase aguda quanto na crônica

(ROTTENBERG et al., 1993; TARLETON et al., 1994; COTTA-DE-ALMEIDA et al., 1997). Em termos efetores, os linfócitos T CD8⁺ podem conter a infecção por inúmeros mecanismos, incluindo a secreção de citocinas, o que induz a produção de atividades microbicidas na célula hospedeira, e também por atividades citolíticas por meio da secreção de perforinas e granzimas, assim como a ativação da via Fas/Fas ligante (MARTIN e TARLETON, 2004). Contudo, o papel dos linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção ainda necessita de esclarecimentos. Sugere-se que a maior contribuição das células T CD8⁺ para o combate à infecção é a produção de IFN- γ , surpreendentemente mais relevante do que a sua atividade citolítica (MARTIN; TARLETON, 2004). Como descrito anteriormente, o efeito protetor do IFN- γ na infecção com *T. cruzi* está relacionado à sua capacidade de induzir a produção de IL-12, TNF- α e principalmente NO nos macrófagos. Vários estudos mostram que o IFN- γ também é capaz de induzir a produção de NO em células musculares, tipo celular pelo qual o *T. cruzi* tem tropismo (MUÑOZ et al., 1992; GRAZZINELLI et al., 1992; FICHERA et al., 2004). A importância do IFN- γ no controle da infecção por *T. cruzi* foi estabelecida por experimentos nos quais a neutralização por meio do tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais (CARDILLO et al., 1996) ou a deleção gênica (MARTINS et al., 1999) do IFN- γ aumentou drasticamente a susceptibilidade à infecção. Como será tratado à frente, o IFN- γ é o principal indutor dos genes do imunoproteossoma e dos componentes da via de MHC classe I, via relacionada à apresentação de antígenos intracelulares aos linfócitos T CD8⁺.

Anticorpos contra *T. cruzi* têm sido frequentemente observados em pacientes e em animais que contraem a doença. Alguns estudos demonstraram que anticorpos anti-*T. cruzi* são responsáveis pela sobrevivência de camundongos suscetíveis ao longo da fase inicial da infecção, além disso, essas imunoglobulinas manteriam a parasitemia controlada na fase crônica da doença (UMEKITA et al., 1988; BERMEJO et al., 2011). No camundongo infectado pelo *T. cruzi* ocorre logo uma ativação policlonal de células B na fase aguda, que persiste na fase crônica (D'IMPERIO LIMA et al., 1985; D'IMPERIO LIMA et al., 1986; MINOPRIO et al., 1986). Esta ativação causa uma hipergamaglobulinemia poliisotípica importante e reversível, sendo caracterizada por um aumento considerável de imunoglobulinas e uma resposta específica ao parasita, que também é poliisotípica e estável. Nesta resposta se detectam altas concentrações de IgG2a e IgG2b entre os anticorpos anti-*T. cruzi*, e IgG2a entre os anticorpos inespecíficos (SPINELLA et al., 1992; EL

BOUHDIDI et al., 1994), podendo esse isotipo atingir 50% das imunoglobulinas totais do soro (HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, 1994).

Embora proteínas do parasita sejam capazes de induzir uma resposta imune e a expansão clonal de células B, a contribuição dessas células e o papel dos anticorpos na resistência adquirida à infecção pelo *T. cruzi* ainda é motivo de discussão (ACOSTA RODRIGUEZ et al., 2007).

Outro fator a ser levado em consideração é o equilíbrio da resposta imune do hospedeiro. Esta deve ser potente o bastante para eliminar o parasita, mas regulada ao ponto de não causar injúrias ao próprio organismo. Então, para evitar possíveis lesões aos tecidos infectados, respostas pró-inflamatórias disparadas pelo *T. cruzi* são contrabalanceadas por respostas anti-inflamatórias desencadeadas principalmente pelas citocinas IL-10 e TGF- β (HUNTER et al., 1997; LI; FLAVELL, 2008). As células intermediadoras desse equilíbrio são os linfócitos T CD4⁺. Assim, a resposta do tipo Th1 está mais relacionada com o efeito protetor anti-*T. cruzi*, enquanto que a resposta Th2 está envolvida com os mecanismos anti-inflamatórios (TARLETON et al., 2000, DOSREIS et al., 2011). Na fase aguda tardia, o efeito antagonista da resposta do tipo Th2 pode estar relacionado com a persistência do parasita e esse pode ser o “preço pago” pela atenuação dos possíveis danos causados pelo próprio hospedeiro (DOSREIS et al., 1997).

1.5 Mecanismos de evasão e persistência do *T. cruzi*

Ao longo da evolução, o *T. cruzi* desenvolveu estratégias bastante eficientes para evadir-se do sistema imune de seu hospedeiro vertebrado. Em consequência disto, a infecção por este organismo tende a ser crônica e a qualidade da resposta do sistema imunológico varia consideravelmente nas diferentes fases da infecção e até mesmo entre as diferentes cepas ou linhagens do parasita. É sabido que a evasão do sistema imune e a persistência do *T. cruzi* dependem de uma combinação de fatores, incluindo a liberação pelo *T. cruzi* de moléculas imunomodulatórias, a variabilidade de seus antígenos de superfície, o mimetismo molecular e a resistência ao sistema complemento (revisado por DOSREIS, 2011).

Com relação à atividade anti-complemento, vários trabalhos mostram que as formas tripomastigota sanguínea e metacíclica expressam em sua superfície

moléculas que interferem na ativação das vias clássica e alternativa do complemento (revisado por OUAISSI et al., 2005). Três glicoproteínas, gp160, gp58/68 e T-DAF, foram descritas como fatores que inibem a montagem e/ou aceleraram o decaimento da C3 convertase, a enzima central na cascata do complemento (KIPNIS et al., 1985; KIPNIS et al., 1987, HALL et al., 1991; NORRIS; SCHRIMPF, 1994).

Estudos recentes sugerem que o *T. cruzi* possui um sistema antioxidante capaz de suprimir os efeitos do NO e íons superóxidos nos fagossomos de macrófagos (revisado por NAGAJYOTHI et al., 2012). Esse sistema é composto por enzimas detoxificadoras que produzem e utilizam compostos redutores a fim da inativação dos derivados reativos do oxigênio (PARODI-TALICE et al., 2007). Dessa maneira, o parasita não é destruído e pode alcançar o citoplasma da célula hospedeira.

A superfície do *T. cruzi* é totalmente recoberta por mucinas, glicoproteínas que contribuem para a proteção do parasita e estão envolvidas em várias etapas da infecção - da aderência e invasão à fuga do lisossomo. Geralmente, essas proteínas estão ancoradas do lado externo da membrana plasmática por moléculas de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). As mucinas são codificadas por uma grande família gênica bastante polimórfica perfazendo cerca de 6% dos genes preditos em *T. cruzi*. Assim, ao longo do seu ciclo de vida o parasita varia o seu repertório de proteínas de superfície dificultando o reconhecimento e o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz (BUSCAGLIA et al., 2006).

Freire-de-Lima et al. (2009) demonstraram que o *T. cruzi* utiliza uma enzima, a trans-sialidase (TcTS), para manipular a sialilação de células T CD8⁺ permitindo o escape do parasita do sistema imune e o estabelecimento da infecção no hospedeiro. As trans-sialidasas compõem uma família de proteínas codificadas por mais de 1.400 genes e estão ligadas, em sua maioria, à membrana do parasita através de âncoras de GPI (EL-SAYED et al., 2005; FREITAS et al., 2011). Essas enzimas atuam especificamente removendo resíduos de ácido siálico ligados na posição α -2,3 de glicoproteínas, glicolipídeos e oligossacarídeos do hospedeiro, transferindo-os para moléculasceptoras localizadas na superfície do parasita (FREIRE-DE-LIMA et al., 2009). Como uma mudança fisiológica, após a ativação, os linfócitos T CD8⁺ são desializados, aumentando a sua atividade efetora por modular a acessibilidade de seus receptores às moléculas de MHC de classe I (MOODY et

al., 2001; DANIELS et al., 2001; MOODY et al., 2003). No entanto, durante a infecção, o *T. cruzi* utiliza a TcTS para resializar a superfície das células T CD8⁺, o que dificulta a interação antígeno-célula efetora, enfraquecendo a resposta imune celular (FREIRE-DE-LIMA et al., 2009). Além disso, vários estudos sugerem que o ácido siálico assim como a TcTS estão envolvidos na aderência e invasão das células hospedeiras pelo parasita. Em infecções *in vitro*, células de ovário de hamster chinês (CHO) deficientes em ácido siálico apresentaram parasitemia significativamente menor do que as células selvagens (CIAVAGLIA et al., 1993; MING et al., 1993). Em outro trabalho, o papel da TcTS na invasão celular foi demonstrado experimentalmente utilizando-se um inibidor irreversível para a atividade glicosiltransferase (CARVALHO et al., 2010). Assim, o tratamento com o inibidor NeuNAcFNP reduziu a infecção em células de mamífero. Também, alguns grupos mostraram que a retirada de resíduos de ácido siálico de glicoproteínas presentes na membrana do fagolisossomo pela TcTS é um processo importante no escape do parasito para o citoplasma da célula hospedeira (HALL et al., 1992; HALL; JOINER, 1993; RUBIN-DE-CELIS et al., 2006).

Embora alguns mecanismos de evasão e persistência do parasita estejam elucidados, este ainda é um cenário bastante complexo onde há muito para ser explorado. Portanto, novos estudos são fundamentais, sobretudo para entendermos os mecanismos que perpetuam a infecção objetivando o desenvolvimento de vacinas eficazes e drogas mais seletivas.

1.6 Sistema Ubiquitina/Proteassoma e apresentação de antígenos via MHC de classe I

Tendo em vista que o *T. cruzi* tem parte do seu ciclo de vida no citoplasma da célula hospedeira, é sabido que nesse contexto os seus antígenos são apresentados ao sistema imunológico por células imune e não imune em moléculas de MHC de classe I (TARLETON et al., 1995). O principal responsável pela geração desses peptídeos antigênicos é o proteassoma, um complexo proteico multicatalítico ATP-dependente responsável pela degradação de proteínas citosólicas e nucleares geralmente poliubiquitinadas (revisado por COUX et al., 1996; TOMKO et al., 2011).

Arrigo et al. (1988) propuseram o nome proteassoma para indicar a sua natureza proteolítica e particulada e, desde então, este termo tem sido amplamente utilizado.

O proteassoma é um componente essencial tanto em células eucarióticas quanto em procarióticas e revelou-se uma partícula bastante conservada. Foi descrito em bactérias (TAMURA et al., 1995; HUMBARO; MAUPIN-FURLOW, 2013), arqueias (RIVETT, 1993; MAUPIN-FURLOW, 2013) e em todos eucariotos até então estudados, de leveduras a mamíferos. Nos eucariotos os proteassomas estão presentes no núcleo e no citoplasma, podendo representar até 1% das proteínas totais da célula (COUX et al., 1996). Os proteassomas desempenham papel central no *turnover* proteico, pois eliminam proteínas anormais resultantes de mutações ou problemas conformacionais. Além disso, atuam na regulação de proteínas que controlam a progressão do ciclo celular e apoptose, assim como é o principal responsável pela geração de peptídeos antigênicos apresentados nas moléculas de MHC de classe I aos linfócitos T CD8⁺. O endereçamento dessas proteínas para degradação no proteassoma é feito via ubiquitina. A ubiquitina é uma pequena proteína composta por 76 aminoácidos, altamente conservada e bastante abundante nos eucariotos. Reações sequenciais intermediadas pelas enzimas E1, E2 e E3 ativam, conjugam e transferem, respectivamente, resíduos de ubiquitina para os substratos proteicos, marcando-os para a degradação no proteassoma (revisado por CHIECHANOVER, 2005).

Diferentes tipos de proteassomas variando as subunidades catalíticas e os complexos regulatórios são descritos em eucariotos. Em vertebrados, o núcleo catalítico desta complexa protease, denominado proteassoma 20S, é composto por 28 polipeptídeos (massa molecular entre 21 a 35 kDa) arranjados na forma de quatro anéis, cada um com sete subunidades, sobrepostos na forma de um cilindro $\alpha/\beta/\beta/\alpha$. Os dois anéis internos formam a câmara catalítica do proteassoma e as suas subunidades são denominadas de beta ($\beta 1$ a $\beta 7$) (GROLL et al., 1997; GROLL et al., 2000). As subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ são cataliticamente ativas. Os dois anéis externos formados por subunidades alfa ($\alpha 1$ a $\alpha 7$) fornecem o arcabouço para a montagem do complexo, controlam a abertura da câmara catalítica e associam-se a complexos regulatórios. Um desses reguladores é o complexo proteico ATP-dependente 19S. As suas funções incluem o reconhecimento, o desenovelamento e a introdução das proteínas poliubiquitinadas no interior da câmara proteolítica

(revisado por KISH-TRIER et al., 2013). Juntos o núcleo 20S e o regulador 19S formam o proteassoma 26S (Figura 4a).

O proteassoma 20S é denominado de protease multicatalítica devido à presença de três subunidades proteolíticas com atividades particulares. Como citado anteriormente, as subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ são cataliticamente ativas. Essas proteínas possuem resíduos de treonina em seu N-terminal capazes de clivar ligações peptídicas (BOCHTLER, 1999). Baseando-se em análises de difração de raios-X e por ensaios enzimáticos, no complexo a subunidade $\beta 1$ é a responsável pela atividade de peptidil-glutamil hidrolase ou do tipo caspase, clivando peptídeos após resíduos de aminoácidos ácidos (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). A subunidade $\beta 2$ está relacionada à atividade do tipo tripsina, clivando após resíduos de aminoácidos básicos e a subunidade $\beta 5$ com atividade do tipo quimotripsina, clivando após resíduos hidrofóbicos (ORLOWSKI; WILK, 2000; GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002; GROLL; HUBER, 2003).

A montagem do complexo 20S é um processo altamente regulado que garante o posicionamento correto de cada uma das 14 subunidades diferentes em seus quatro anéis, mantendo a sua integridade e funcionalidade (LUPAS et al., 1993; CHEN; HOCHSTRASSER, 1996; RAMOS et al., 1998; ARENDT; HOCHSTRASSER, 1999; BURRI et al., 2000; WITT et al., 2000).

Em células do sistema hematopoiético ou sob estimulação com IFN- γ ou TNF- α , situação que acontece durante a infecção com *T. cruzi*, as subunidades constitutivas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ são respectivamente substituídas na partícula 20S do proteassoma por três outras proteínas: $\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL-1 e $\beta 5i$ /LMP7 (Figura 1b) (FRUH et al., 1994; revisado por SIJTS; KLOETZEL, 2011). O IFN- γ também induz as proteínas ativadoras do proteassoma: PA28 α e PA28 β que juntas formam o complexo regulador PA28, também conhecido como 11S. Este é um complexo hexamérico ou heptamérico composto por três subunidades PA28 α e por três ou quatro PA28 β (Figura 4b) (MA et al., 1992; DUBIEL, 1992; revisado por RECHSTEINER et al., 2000). As betas induzidas incorporadas ao núcleo catalítico 20S e a substituição de pelo menos um dos reguladores 19S pelo complexo regulador 11S formam o imunoproteassoma (AKI et al., 1994). O imunoproteassoma tem a sua atividade proteolítica modificada e especializada na geração dos peptídeos apresentados pelas moléculas de MHC de classe I. Agora a subunidade $\beta 1i$, assim como a $\beta 5i$, possuem atividade catalítica do tipo quimotripsina e a $\beta 2i$

apresenta atividade do tipo tripsina (DRISCOLL et al., 1993; BOES et al., 1994; KUCKELKORN et al., 1995; USTRELL et al., 1995).

Embora a incorporação das subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$ não seja pré-requisito para geração de peptídeos antigênicos, a atividade enzimática modificada dos complexos proteassomais produzem pequenos peptídeos, geralmente com 8 a 9 resíduos de aminoácidos, com extremidades hidrofóbicas ou básicas que são ideais para o carregamento na fenda da molécula de MHC de classe I (KUEHN; DAHLMANN, 1996; SIJTS; KLOETZEL, 2011). Além disso, a diversidade do repertório de peptídeos imunogênicos gerados pelo imunoproteassoma é consideravelmente maior do que o produzido pelo proteassoma constitutivo (HEINK et al., 2005; GRAFF et al., 2011).

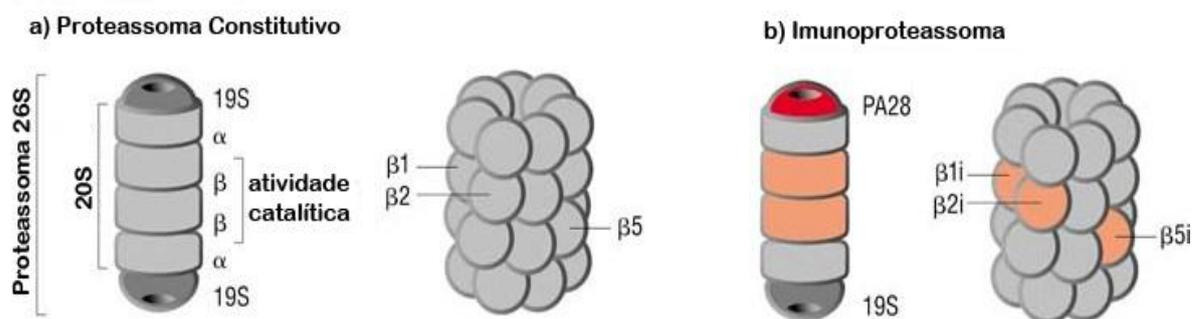


Figura 4. Diferenças entre o proteassoma constitutivo e o imunoproteassoma. O proteassoma 20S é um cilindro formado por quatro anéis heptaméricos sobrepostos com atividade multicatalítica. **(a)** O proteassoma 20S constitutivo possui em cada uma de suas extremidades o complexo regulatório 19S, que juntos compõem o proteassoma 26S. As suas subunidades catalíticas são $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, com atividades do tipo caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente. Após a indução com IFN- γ , as três subunidades catalíticas $\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$, substituem as três subunidades catalíticas constitutivas do proteassoma, formando o imunoproteassoma **(b)**. $\beta 1i$ possui atividade do tipo quimotripsina, $\beta 2i$ do tipo tripsina e $\beta 5i$ do tipo quimotripsina. Além disso, o imunoproteassoma possui em uma de suas extremidades o complexo regulatório PA28. Dessa maneira, o imunoproteassoma tem a sua atividade proteolítica modificada e especializada na geração de peptídeos apresentados pelas moléculas de MHC classe I. (Adaptado de DEFRANCO et al., 2007).

A ligação dos proteassomas com a apresentação de antígenos está relacionada especificamente com a via de processamento intracelular ou citoplasmática, a qual pode culminar com a ativação dos linfócitos citotóxicos T CD8⁺ com posterior destruição da célula infectada (AKI et al., 1994). Conforme mostrado no esquema da Figura 5, inicialmente há o reconhecimento e a degradação dos antígenos encontrados no citoplasma pelo proteassoma/imunoproteassoma e por aminopeptidases citoplasmáticas. Os peptídeos gerados são transportados para o

lúmen do retículo endoplasmático por meio de um carreador dependente de ATP composto por duas proteínas transportadoras associadas à apresentação de antígenos denominadas de TAP1 e TAP2 (ROELSE et al., 1994; NEISIG et al., 1995). Os genes dessas proteínas estão situados no locus de MHC de classe II e também são induzidos por IFN- γ . Uma vez dentro do retículo endoplasmático, os peptídeos são processados por aminopeptidases reticulares (ERAP) e, então, são carregados na fenda das moléculas de MHC de classe I, estabilizando a montagem da cadeia alfa com a β_2 -microglobulina (GROETTRUP et al., 1996). Somente após o carregamento do peptídeo na fenda da molécula de MHC de classe I, o complexo trimolecular é liberado das chaperoninas (tapasinas, calnexina e calsequestrina) e transportado via complexo de Golgi para a superfície celular, para só então ser apresentado aos linfócitos T CD8⁺ (GOLDBERG; ROCK, 1992; HAHN et al., 1996).

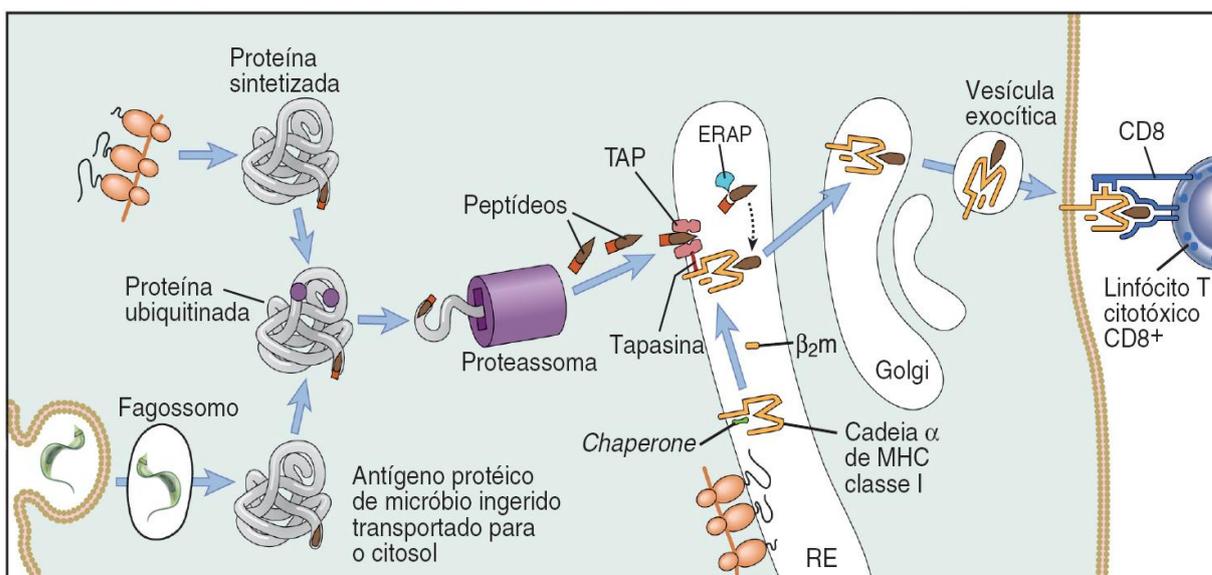


Figura 5. Processamento de antígenos via MHC de classe I. Durante a infecção, proteínas provenientes do parasita são degradadas pelo proteassoma em pequenos peptídeos com 8 a 20 resíduos de aminoácidos. Estes são transportados para o interior do retículo endoplasmático através do complexo TAP e lá se ligam às moléculas de MHC de classe I. O complexo trimolecular é liberado e enviado através do Golgi para a superfície da membrana plasmática, para então serem apresentados aos linfócitos T CD8⁺. (Modificado de ABBAS et al., 2008).

No contexto de apresentação de antígenos de patógenos intracelulares é notória a importância da produção de IFN- γ por componentes do sistema imune. É sob o estímulo desta citocina que há a troca das subunidades proteassomais, assim como a mudança em sua atividade proteolítica, além disso, induz a expressão do complexo regulatório 11S, de TAP1 e TAP2 e também da própria molécula de MHC de classe I (YANG et al., 1996).

Evidências da importância do imunoproteassoma no processamento de antígenos intracelulares vieram de estudos que mostram que a superexpressão das subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$, e $\beta 5i$ aumentaram a apresentação de diferentes epítopos virais na superfície celular. Como por exemplo, o epítipo NP118 da nucleoproteína do vírus da coriomeningite linfocitária (SCHWARZ et al., 2000) e o epítipo derivado da proteína GagI do vírus da leucemia murina de Moloney (van HALL et al., 2000). Além disso, foi mostrado que a deficiência das imunsubunidades $\beta 1i$ ou $\beta 5i$ reduz o repertório de linfócitos T citotóxicos e conseqüentemente a eficiência da resposta imune (FEHLING et al., 1994; CHEN et al., 2001; KHAN et al., 2004). Dois outros estudos mostram que a deleção de $\beta 5i$ reduziu em 25-50% a densidade de moléculas de MHC de classe I na superfície celular (FEHLING et al., 1994; GROETTRUP et al., 2010).

Desde a sua descoberta, o proteassoma tem sido objeto de intensa investigação. Embora, haja um grande progresso na elucidação de suas estruturas e funções, o envolvimento nos processos de controle da infecção parasitária ainda necessita de um estudo sistemático. Diante desse cenário, decidimos avaliar a influência da infecção com *T. cruzi* na biogênese dos principais componentes da via MHC de classe I em linhagem de células não imune, dentre eles, o proteassoma.

Em trabalhos anteriores de nosso grupo, Faria et al. (2008) investigaram se a biogênese do proteassoma constitutivo é afetada pela infecção com o *T. cruzi* em linhagem de células não imunes. Por RT-PCR semiquantitativo determinou-se a expressão dos mRNAs das subunidades constitutivas $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ do proteassoma de células HeLa. Como mostrado nas figuras 6A e 6B, os níveis dos RNAs mensageiros das subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ e também de $\alpha 1$ e $\alpha 6$ não foram alterados pela presença do parasita (Tc , $Tc \rightarrow IFN-\gamma$ e $IFN-\gamma \rightarrow Tc$ em relação ao controle). Assim, a infecção com o *T. cruzi* parece não ter efeito sobre a transcrição dos genes do proteassoma constitutivo.

Em nível proteico, avaliou-se o impacto da infecção com *T. cruzi* na composição e na abundância das subunidades do proteassoma constitutivo. Para isso, imunoprecipitados de proteassomas de células HeLa infectadas ou não com o *T. cruzi* foram analisados por eletroforese em géis bidimensionais. O padrão e a abundância das subunidades proteassomais obtidos após 24 h de infecção foram praticamente idênticos ao padrão das células não infectadas (Fig 6C e 6D). Portanto, tomados em conjunto, os resultados das análises da expressão dos mRNAs e da

abundância e composição proteica indicam que a biogênese do proteassoma constitutivo da célula hospedeira não é afetada pela infecção com *T. cruzi*.

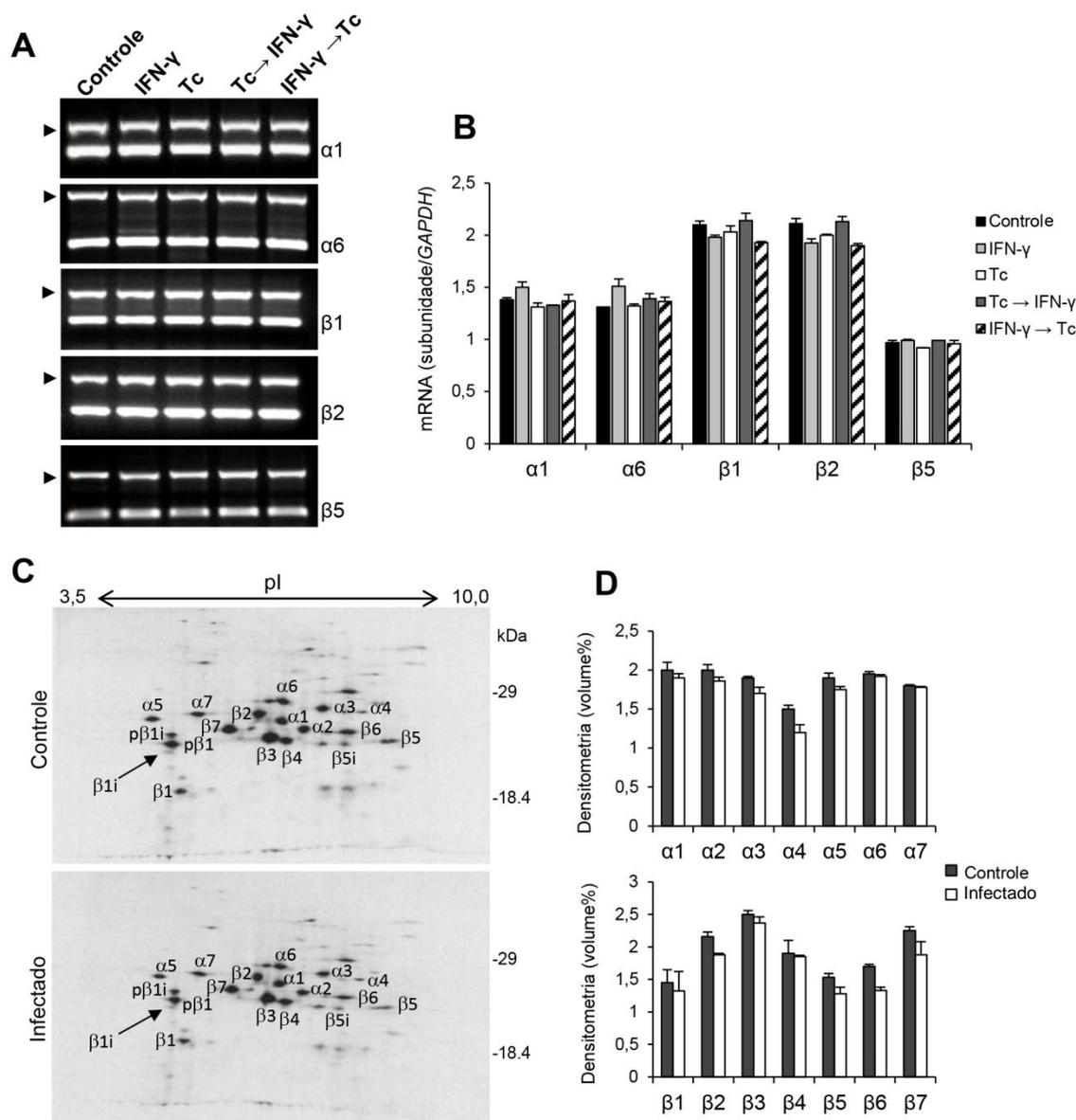


Figura 6. Análise dos níveis de mRNA e da composição proteica do proteassoma constitutivo de células HeLa durante a infecção com *T. cruzi*. (A) A expressão das subunidades α 1, α 6, β 1, β 2 e β 5 foi determinada por RT-PCR semiquantitativo usando o RNA total de células HeLa tratadas com IFN- γ e/ou infectadas com *T. cruzi*. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio. As reações foram realizadas como duplex-PCR, empregando *GAPDH* como controle interno (setas). (B) Os níveis dos mRNAs foram determinados por densitometria e plotados usando a expressão de *GAPDH* como normalizador experimental. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. (C) Géis bidimensionais de proteassomas imunoprecipitados a partir de extratos de células HeLa não infectadas ou infectadas com *T. cruzi*. Células HeLa em condições padrões de cultura foram expostas ou não ao parasita *T. cruzi* e então cultivadas por 24 h. Na vigésima primeira hora de cultivo, as células foram marcadas metabolicamente com [35 S]-metionina por três horas. Os extratos celulares (100 μ g) foram imunoprecipitados com anticorpos anti-proteassoma humano e então analisados por eletroforese bidimensional. O painel D mostra os níveis proteicos correspondentes às subunidades α e β do proteassoma quantificados por densitometria. Cada valor representa a média \pm o desvio médio de dois experimentos independentes. (Faria, 2008; figura adaptada de Camargo et al. (2014)).

Dois outros manuscritos fortalecem a hipótese das implicações do sistema ubiquitina/proteassoma durante a infecção com *T. cruzi*. Bergeron et al. (2008) demonstraram que a infecção de macrófagos murinos reduz a síntese do imunoproteassoma e de moléculas MHC de classe I via sinalização de SAPK/JNK, possivelmente por meio de uma regulação transcricional. Chou et al. (2008) testando uma vacina de DNA contra um epítipo de *T. cruzi* reforçaram a ideia de que o imunoproteassoma e seu regulador 11S são essenciais para a proteção de camundongos contra o parasita. Os resultados desses dois estudos estão detalhados na discussão (págs. 47-48).

E como novidade, o presente trabalho mostra evidências de que um controle pós-transcricional ainda desconhecido – exercido pelo parasita - opera inibindo a biogênese do imunoproteassoma e de componentes da via de MHC de classe I. Juntos, nossos resultados trazem novos conhecimentos e ideias acerca dos mecanismos relacionados à persistência do *T. cruzi*, a apresentação de antígenos e a imunopatogênese da doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo da influência da infecção com *Trypanosoma cruzi* na via de apresentação de antígenos intracelulares MHC de classe I em linhagem de célula não imune.

Objetivos específicos:

- Avaliar a expressão das subunidades induzidas por interferon-gama do proteassoma de células HeLa infectadas com *T. cruzi*.
- Avaliar a expressão da subunidade β do regulador 11S, de TAP1 e da própria molécula de MHC de classe I em células HeLa infectadas com *T. cruzi*.
- Mensurar as atividades proteolíticas do proteassoma durante a infecção com o *T. cruzi*.
- Analisar por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo a presença e a densidade de moléculas de MHC de classe I na superfície celular durante a infecção com *T. cruzi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Linhagens celulares

As células de mamífero utilizadas como hospedeiras eram da linhagem HeLa, que são células humanas epiteliais, não imunes, aneuploides isoladas de adenocarcinoma de útero.

Para as infecções foi utilizada a forma tripomastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953).

3.1.2 Anticorpos

3.1.2.1 Anticorpos utilizados nas análises por *western blots*

Os anticorpos policlonais de coelho contra as subunidades $\beta 1i/LMP2$, $\beta 5i/LMP7$ do proteassoma humano e o anticorpo monoclonal anti-MHC de classe I (W6/32) eram da marca Abcam. É importante detalhar que o anticorpo anti-MHC de classe I W6/32 reconhece o determinante antigênico comum aos três alelos HLA (A, B e C), do complexo principal de histocompatibilidade de classe I humano. O anticorpo produzido em camundongo anti-PA28 β humano foi adquirido da empresa *Cell Signaling*. O anticorpo anti-TAP1 humano produzido em rato foi adquirido da *Rockland*. O anticorpo policlonal de coelho anti- $\beta 2i/MECL1$ (K223) e o anticorpo anti- $\alpha 6/MCP20$ foram gentilmente doados pelo Instituto de Bioquímica da Universidade Humboldt, Charité, em Berlim. O anticorpo policlonal produzido em camundongo anti- $\alpha 1$ humano foi obtido por GROSSI et al., 1988. O anticorpo anti- α -tubulina de *T. brucei* foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich. Apesar de recomendado para *T. brucei*, esse anticorpo reconhece a α -tubulina de *T. cruzi*. Todos os anticorpos secundários conjugados com peroxidase eram da marca *Biomol*.

3.1.2.2 Anticorpos utilizados na microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

O anticorpo produzido em camundongo anti-HLA de classe I (W6/32) foi adquirido da empresa Santa Cruz Biotechnologies, assim como o anticorpo produzido em cabra anti-IgG de camundongo conjugado com PE.

3.1.3 Meios de Cultura

3.1.3.1 Meio de cultura para células HeLa

Meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium – Gibco, Life Technologies) 13,4 g; Piruvato de sódio 0,11 g; Bicarbonato de Sódio 3,7 g; Água destilada qsp. 900 mL.

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e então esterilizado por filtração em filtro Millipore 0,22 µm. Após a esterilização, o meio foi distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

3.1.4 Soluções e Tampões

PBS (1X)

NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 7 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM

A esterilização foi realizada em autoclave por 20 min a 120°C.

Tripsina verseno (0,5%)

Tripsina 0,05%; PBS 1X; EDTA 2mM

Tampão hipotônico para lise celular

NaCl 10 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 5 mM

TBST (1X)

Tris 25 mM pH 7,4; NaCl. 137 mM; Tween 20 0,1%.

3.1.4.1 Soluções para géis SDS-PAGE

Gel separador 13%

Tris HCl (pH 8,8) 0,375 M; SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida (39:1 p/p) 13%; Persulfato de amônia 1,0%; TEMED 0,1%.

Gel concentrador 4%

Tris HCl (pH 6,8) 0,125 M; SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida (39:1 p/p) 4%; Persulfato de amônia 1,0%; TEMED 0,1%.

Tampão de Corrida Tris-Glicina (5X)

Tris Base 0,125 M; Glicina 1,25 M; SDS 0,5%.

Tampão de Amostra (2X)

Tris HCl (pH 6,8) 0,16 M; Sacarose 24%; SDS 4%; β -Mercaptoetanol 4%; Azul de Bromofenol 0,05%. O tampão foi aliqotado em tubos de 1,5 ml e armazenados a -20 °C.

Solução Corante – Coomassie

Coomassie Blue R250 0,25%; Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%.

Solução Descorante/Fixadora

Metanol 50%; Ácido acético glacial 10%

Tampão de Transferência para *western blot*

Tris base 48 mM; Glicina 39 mM; SDS 0,0375%; Metanol 20%

3.1.4.2 Soluções para géis de agarose

Tampão TBE (10X)

Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M

Tampão de amostra (10X)

TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%

Brometo de Etídeo

Solução estoque: 10 mg/mL em H₂O Milli Q.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Culturas de células e Infecção com *Trypanosoma cruzi*

Para todas as condições propostas em nosso modelo experimental (Mat. e Mét. seção 3.2.3; Fig. 7), monocamadas de células HeLa (8×10^4 células/cm²) foram obtidas 24 h após a semeadura de 4×10^4 células/cm² em meio DMEM (Gibco, Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Life Technologies) e adicionado de antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de ampicilina - ambos Sigma-Aldrich) incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Neste ponto, houve ou a adição de IFN-γ ou a infecção com o *T. cruzi*.

No caso de infecção *in vitro* com o *T. cruzi*, as células foram expostas à suspensão de parasitas na proporção de 40 tripomastigotas para cada célula HeLa durante 24 h ou mais em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Nessa proporção, cerca de 80-100% das células hospedeiras apresentaram amastigotas em seu citoplasma 24 h após a inoculação dos parasitas.

Para a indução das subunidades beta do imunoproteassoma, assim como de PA28β, TAP1 e da molécula de MHC de classe I, as células foram incubadas com 90 U/mL de IFN-γ recombinante humano (Calbiochem) por 24 h antes ou depois da infecção com o *T. cruzi*.

Após cada um dos tratamentos, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X, descoladas com tripsina-verseno (0,05% tripsina; PBS 1X; 2mM EDTA), lavadas três vezes em PBS 1X e coletadas para o devido processamento e análise.

3.2.2 Obtenção de tripomastigotas para infecção

Os tripomastigotas foram cultivados e purificados a partir de culturas de células L6 derivadas de mioblastos de rato (*Rattus norvegicus*). Células L6 em confluência de 50% em meio DMEM foram infectadas com tripomastigotas na proporção de cinco parasitas para cada célula hospedeira e incubados a 37°C a uma atmosfera com 5% de CO₂. Após aproximadamente cinco dias de incubação, os primeiros tripomastigotas eclodiam das células hospedeiras e estes eram recolhidos diariamente, centrifugados em microcentrífuga a 2.000 g por 10 min e congelados em soro fetal bovino contendo 10 % de DMSO a -80°C. Este processo foi realizado até a obtenção do número total de parasitas necessários para a execução dos experimentos.

3.2.3 Modelo Experimental

A fim de estudar o efeito da infecção com o *T. cruzi* na via de processamento de antígenos intracelulares em células não imunes, cinco frascos contendo células HeLa, mantidos em condições padrões de cultura, foram tratados com IFN- γ e/ou infectados com *T. cruzi* conforme descrito a seguir e ilustrado na figura 7. (A) As células foram cultivadas sem nenhum tratamento (designado de Controle). (B) As células foram tratadas por 24 h com IFN- γ (designado de IFN- γ). (C) As células foram infectadas por 24 h com *T. cruzi* (designado de Tc). (D) As células HeLa foram previamente infectadas por 24 h com *T. cruzi* e posteriormente tratadas com IFN- γ por 24 h (designado de Tc \rightarrow IFN- γ). (E) As células HeLa foram inicialmente tratadas com IFN- γ por 24 h e só então infectadas com o parasita *T. cruzi* por 24 h (designado de IFN- γ \rightarrow Tc). Essas condições simulam três momentos distintos em uma infecção com o *T. cruzi*: 1- invasão sem resposta imune (Tc); 2- invasão com resposta imune subsequente (Tc \rightarrow IFN- γ); 3- invasão em um ambiente com resposta imune já implantada (IFN- γ \rightarrow Tc). Esse modelo experimental foi utilizado ao longo de todo o trabalho, exceto em casos especificados no texto.

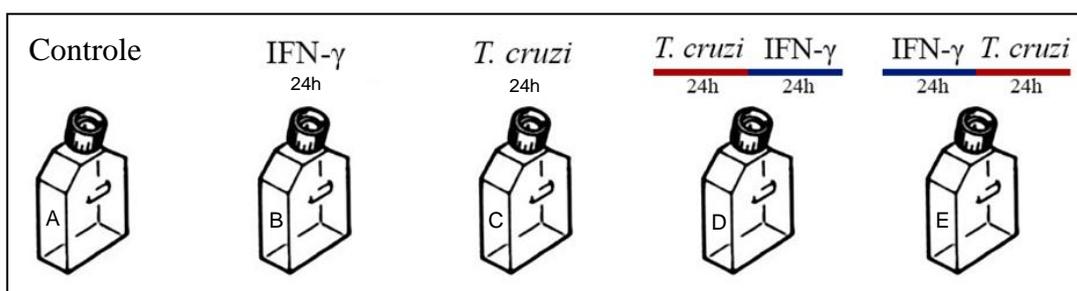


Figura 7. Esquema do modelo experimental.

3.2.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das células HeLa submetidas aos tratamentos propostos em nosso modelo experimental foi extraído com TRIzol[®] (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante. Para um mL de TRIzol[®] utilizado (volume para extração de RNA de 1×10^7 células), adicionou-se 200 μ L de clorofórmio à amostra homogeneizando-a vigorosamente. Após três minutos de incubação à temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada (12.000 g/15 min/ 4°C) e a fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo. Adicionou-se 500 μ L de isopropanol e após 10 min de incubação à temperatura ambiente a amostra foi novamente centrifugada (12.000 g/ 10 min/ 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em etanol 75% gelado (7.500 g/ 5 min/ 4°C). Em seguida, deixou-se o sedimento secando por 15 min à temperatura ambiente e, então, o mesmo foi ressuscitado em 100 μ L de água ultrapura livre de nucleases. A concentração e a qualidade/integridade dos RNAs isolados foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop – Thermo Scientific) a uma absorbância de 260-280 nm e por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Os RNAs foram armazenados a - 80°C até o uso.

A síntese dos cDNAs utilizados nas análises por RT-qPCR foi feita a partir de dois microgramas de RNA total previamente tratados com RQ1 DNase livre de RNase (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Após o tratamento com DNase, os RNAs (2 μ g) foram retrotranscritos usando o kit *High Capacity Reverse Transcription* (Life Technologies) em um volume final de 20 μ L de acordo com o protocolo do fabricante.

3.2.5 Real-Time RT-qPCR

Os sistemas de RT-qPCR (volume final de 10 μ L) continham 1X *Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems), 0,25 μ M de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 4 μ L de cDNA previamente diluído 1:10 em água ultrapura (Ambion). As reações foram feitas no termociclador *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), os dados analisados no programa SDS 2.3 (Applied Biosystems) e os gráficos plotados no programa Excel 2010 (Microsoft). Para todos os pares de *primers* foram feitas curvas de eficiência por meio de diluições seriadas

do cDNA e todos obtiveram valores entre 95-105%. Além disso, a especificidade do *amplicon* gerado nas reações foi avaliada por curvas de desnaturação. Cada uma das amostras foi aplicada em triplicata técnica e três experimentos conduzidos independentemente. Como normalizador experimental foram utilizadas as médias geométricas referentes às expressões dos genes *GAPDH* e *HPRT1*. A expressão destes dois genes foi avaliada em células sob a estimulação com IFN- γ e infecção com *T. cruzi* e nenhum dos tratamentos alterou os níveis dos transcritos. O método utilizado para quantificar relativamente as amostras foi baseado no cálculo do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK et al., 2001), no qual determinou-se como calibrador a condição experimental IFN- γ , ou seja, células HeLa tratadas com IFN- γ por 24 h.

Todos os *primers* utilizados nas reações de *Real-Time* RT-qPCR estão descritos no apêndice A. As sequências dos *primers* utilizados na amplificação de *GAPDH*, *HPRT1* e da subunidade menor da molécula de MHC de classe I denominada β 2-microglobulina (β 2M) foram descritas por Vandesompele et al. (2002). As sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos três alelos da cadeia alfa da molécula de MHC de classe I (HLA-A, -B e -C) foram descritas por Meissner et al. (2010).

3.2.6 Preparo dos extratos celulares

Os extratos celulares, tanto os utilizados nos ensaios de atividade proteossomal quanto nos *western blots*, foram obtidos por meio da lise em tampão hipotônico por sonicação. Resumidamente, o sedimento das células coletadas, conforme descrito no item 3.2.1, foi ressuscitado em 300 μ L de tampão hipotônico gelado (10 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂) e incubado em gelo por 5 min. Em seguida, adicionou-se ao tampão inibidores de proteases (Roche), e então, as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo utilizando um processador ultrassônico (Modelo GE 50T), com 4 pulsos de 20 s com intervalos de 60 s em uma amplitude de 80%. Os extratos obtidos foram clarificados por centrifugação a 12.000 g durante 15 min a 4°C, de modo a eliminar os *debris* celulares. A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando o kit Bio-Rad *Protein Assay* e os extratos armazenados a -80°C até o uso.

3.2.7 Western Blots

A metodologia para os *Western Blots* foi adaptada de Towbin et al. (1979). Inicialmente, quantidades iguais de proteínas (25-50 µg por poço) de cada um dos extratos celulares foram submetidas à eletroforese unidimensional SDS-PAGE (13%). As proteínas separadas em gel foram transferidas para uma membrana de PVDF Immobilon-FL (Millipore) em um sistema semiseco (Bio-Rad) com uma amperagem constante de 0,8 mA/cm².

Imediatamente após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi saturada em uma solução de leite desnatado a 5% em TBST 1X (p/v) por duas horas sob agitação branda a 4°C. Depois, descartou-se a solução com leite e a membrana foi lavada em TBST 1X por 5 min. Após a lavagem, a membrana foi incubada sob agitação leve por 1h e 30 min com o anticorpo primário na devida diluição (vide fabricante) em TBST 1X contendo 5% de leite desnatado (p/v). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em TBST 1X (5 min para cada lavagem) e posteriormente, incubada com o anticorpo secundário apropriado conjugado com HRP (Biomol) na diluição de 1:1.000 em TBST 1X contendo 5% de leite desnatado (p/v). Após a incubação por 1h e 30 min sob agitação, a membrana foi novamente lavada três vezes em TBST 1X, antes de ser submetida à revelação. Utilizou-se para a revelação o reagente ECL *plus* (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as especificações do fabricante. O tempo de exposição e a revelação dos filmes radiográficos foram feitos até o aparecimento das bandas e o contraste desejado.

3.2.8 Ensaio de Atividade Proteassomal

A quantificação da atividade enzimática do proteassoma foi realizada usando o kit Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like, Trypsin-Like e Caspase-Like (Promega). Os ensaios foram feitos com adaptações no protocolo do fabricante. Os substratos luminogênicos Z-LRR-aminoluciferina, Suc-LLVY-aminoluciferina e Z-nLPnLD-aminoluciferina correspondente às atividades do tipo tripsina, quimotripsina e caspase-like, respectivamente, foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante. Os ensaios foram realizados a 25°C em placas opacas brancas de 96 orifícios e analisados em espectrofotômetro (Spectra Max M5 – Molecular Devices). A cada um dos poços foi adicionado um micrograma de proteína proveniente do

extrato total diluído em 10 mM HEPES (pH 7,6). A proporção de amostra e reagente (v/v) foi sempre de 1:1 em um volume final de 50 μ L de reação. Os sistemas (amostra+substrato) foram incubados por 10 min antes da leitura no espectrofotômetro. A atividade específica do proteassoma foi estimada, para cada um dos tratamentos e substratos, por meio de amostras pré-incubadas por 15 min com o inibidor do proteassoma denominado MG-132 (Sigma Aldrich) (50 μ M de MG-132 por poço). Logo, o resultado da subtração da intensidade de luminescência das amostras sem inibição com as com inibição reflete unicamente a atividade proteassomal. Cada amostra foi aplicada em triplicata técnica e os experimentos feitos independentemente em triplicata.

3.2.9 Microscopia de fluorescência e Citometria de Fluxo

As células HeLa foram crescidas, colhidas e tratadas como descrito no modelo experimental (Seção 3.2.3, Mat. e Mét.). Após a contagem, $1,0 \times 10^6$ células foram bloqueadas em PBS 1X contendo BSA a 0,1% durante 15 min e posteriormente incubadas por 30 min em banho de gelo com o anticorpo anti-HLA de classe I (W6/32) (Santa Cruz Biotechnologies) (1 μ g Ab/ 10^6 células). Em seguida, as células foram lavadas em PBS 1X gelado e incubadas por 30 min com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com PE (Santa Cruz Biotechnologies) (0,5 μ g Ab/ 10^6 células). Depois, as células foram lavadas e fixadas em paraformaldeído a 1% em PBS 1X. A análise por citometria de fluxo foi realizada no equipamento FACSVerser (BD Biosciences) e os dados analisados no programa FACSuite (BD Biosciences). Para cada amostra foram adquiridos $2,0 \times 10^4$ eventos, dos quais > 99% exibiram sinal positivo para a marcação da molécula de MHC de classe I. A densidade de moléculas de MHC de classe I na superfície celular foi determinada como a média da intensidade de fluorescência (MFI).

Para a microscopia de imunofluorescência, uma alíquota das mesmas amostras de células já marcadas para a citometria de fluxo foram misturadas com o reagente *ProLong Gold antifade* contendo DAPI (Invitrogen) na proporção de 1:1, em seguida, foram aplicadas sobre uma lâmina e cobertas com uma lamínula. Antes da microscopia, as lâminas foram incubadas durante 24 h numa sala escura, para só então, serem analisadas no microscópio confocal TCP SP5 (Leica Microsystems).

3.2.10 Eletroforese unidimensional em gel desnaturante (SDS-PAGE)

A confecção dos géis e a corrida eletroferética foram realizadas com adaptações no protocolo descrito por Laemmli (1970). As soluções utilizadas para o SDS-PAGE estão descritas na seção 3.1.4.1 do material e métodos. O gel separador possuía uma malha de poliacrilamida a 13% e o concentrador a 4%, ambos com a proporção 30:1 (acrilamida:bisacrilamida) As eletroforeses foram realizadas com uma amperagem constante de 25 mA à temperatura ambiente. Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue R250 segundo Maniatis et al. (1989).

3.2.11 Eletroforese em gel de agarose para DNA e RNA

O gel de agarose na concentração desejada foi feito em tampão TBE 0,5X, sendo empregado o corante brometo de etídeo na concentração final de 0,5 µg/mL. Para os RNAs tudo foi preparado com materiais e reagentes livres de RNase. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X utilizando-se uma voltagem constante de aproximadamente 5 V/cm. A visualização dos ácidos nucléicos foi realizada em transluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografada no fotodocumentador (BIO-RAD).

3.2.12 Quantificações por densitometria

As análises densitométricas foram realizadas no programa ImageJ versão 1.47 (SCHENEIDER et al., 2012). Para as quantificações dos *western blots*, as intensidades das bandas obtidas nos experimentos foram normalizadas ao sinal das subunidades constitutivas $\alpha 1$ ou $\alpha 6$ e então plotadas em um gráfico adimensional.

3.2.13 Análises Estatísticas

Todos os valores apresentados ao longo do trabalho são médias das réplicas biológicas \pm o desvio padrão. O número de réplicas de cada experimento está

indicado na legenda das figuras. A significância dos resultados foi determinada pelo teste-t, não pareado, bicaudal e os níveis apontados nos gráficos são: n.s – não significante, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Todos os gráficos e análises estatísticas foram feitas no programa Excel 2010 (Microsoft).

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos níveis dos mRNAs do imunoproteassoma durante a infecção com *T. cruzi*.

A fim de avaliar o efeito da infecção com *T. cruzi* na expressão do imunoproteassoma, os níveis dos mRNAs das subunidades catalíticas $\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$, da subunidade regulatória PA28 β e da subunidade constitutiva $\alpha 1$ foram determinados por *Real-Time* RT-qPCR (Fig. 8). Como calibrador utilizamos as amostras de HeLa apenas tratadas com IFN- γ por 24 h (amostra IFN- γ). Assim, todos os valores mostrados nos gráficos remetem a quantificação relativa a esta condição experimental.

Nota-se que o tratamento das células HeLa com IFN- γ induziu a expressão das imunsubunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$, também de PA28 β independente da presença do parasita e também da ordem de tratamento e infecção (condição IFN- γ , Tc \rightarrow IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc). Entretanto, verificamos que as células não infectadas tratadas com IFN- γ (condição IFN- γ) apresentaram uma abundância de mRNAs para as três subunidades beta induzidas e para PA28 β significativamente maior do que os tratamentos contendo infecção (Tc \rightarrow IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc). Nas culturas infectadas e depois tratadas (Tc \rightarrow IFN- γ) a expressão relativa às células HeLa não infectadas e tratadas (IFN- γ) foi 40% menor para $\beta 1i$, 32% para $\beta 2i$, 50% menor para $\beta 5i$ e 33% menor para PA28 β . Nas culturas tratadas com IFN- γ e só depois infectadas (IFN- γ \rightarrow Tc) a expressão relativa à condição experimental "IFN- γ " foi 37% menor para $\beta 1i$, 35% menor para $\beta 2i$, 48% menor para $\beta 5i$ e 19% menor para PA28 β . Todavia, mesmo que a amplitude da indução dos mRNAs das subunidades imunoproteassomais não seja igual ao das células não infectadas, é importante observar que houve indução e que as abundâncias desses transcritos foram semelhantes nas amostras infectadas e tratadas e nas tratadas e infectadas (Tc \rightarrow IFN- γ com IFN- γ \rightarrow Tc).

Além disso, nota-se que as células HeLa possuem uma expressão basal discreta das subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ e PA28 β , a qual também não é afetada pelo *T. cruzi* (amostras Controle e Tc).

A quantificação relativa da subunidade constitutiva $\alpha 1$ do proteossoma não apresentou nenhuma variação significativa entre os cinco tratamentos, ou seja, os níveis de seu mRNA não são alterados pelo tratamento com IFN- γ e tampouco pela presença do parasita, o que corrobora os resultados obtidos por RT-PCR semiquantitativo por Faria (2008).

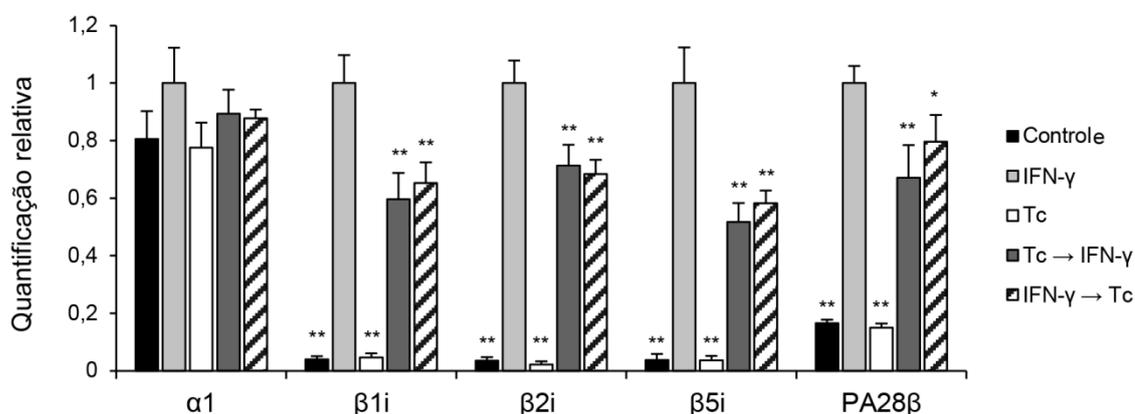


Figura 8. Análise dos níveis de mRNA do imunoproteossoma durante a infecção por *T. cruzi*. A abundância dos mRNAs das subunidades $\alpha 1$, $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ e PA28 β foram determinadas por *real-time* RT-qPCR. A quantificação relativa dos transcritos foi calculada por meio da normalização com os controles endógenos *GAPDH* e *HPRT1* utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os níveis dos mRNAs foram plotados relativamente à condição experimental "IFN- γ ". Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2 A infecção com *T. cruzi* anterior ao tratamento com IFN- γ inibe a síntese proteica das subunidades imunoproteassomais.

Uma vez demonstrado que o parasita tem um impacto na transcrição das subunidades induzidas por IFN- γ , foi de interesse avaliar a expressão proteica dos componentes do imunoproteassoma durante a infecção com o *T. cruzi*. Com esse propósito, análises por *western blot* foram realizadas utilizando anticorpos específicos para as subunidades β 1i, β 2i, β 5i, PA28 β e também para α 6. Consistente com os resultados anteriores (Fig. 6C-D) e conforme mostrado na Figura 9A e 9B, a expressão da subunidade constitutiva α 6 foi similar em todos os tratamentos, indicando que nem a infecção nem o tratamento com IFN- γ influenciam a sua expressão. Assim, esta foi utilizada como normalizador experimental.

Após estimulação com IFN- γ , os níveis proteicos das subunidades β 2i e PA28 β dobraram nas células não infectadas e foram cerca de dez vezes maior para as subunidades β 1i e β 5i quando comparados ao controle (Fig. 9A-B, amostra IFN- γ comparada ao Controle). Nota-se que esses mesmos níveis permaneceram ou foram ligeiramente maiores quando as células foram tratadas com a citocina e posteriormente infectadas com *T. cruzi* (amostra IFN- γ →Tc). No entanto, curiosamente, as células HeLa que foram inicialmente infectadas com *T. cruzi* e só depois tratadas com IFN- γ (Tc→IFN- γ) exibiram uma drástica redução na resposta à citocina, pois apresentaram níveis de expressão proteica das subunidades imunoproteassomais muito próximos ao do controle. Além disso, observa-se que as células HeLa possuem uma expressão basal de β 1i, β 2i, β 5i e PA28 β , entretanto, esses níveis também foram diminuídos com a infecção (amostra Tc). Interessante que uma vez induzidas pelo IFN- γ , os níveis das quatro subunidades permaneceram inalterados na presença do parasita (amostra IFN- γ →Tc). Sendo assim, esses dados sugerem que o *T. cruzi* não degrada as subunidades imunoproteassomais e sim bloqueia as suas biossínteses, haja vista que os mRNAs das culturas infectadas e tratadas (Tc→IFN- γ) são igualmente expressos aos das culturas tratadas e infectadas (IFN- γ →Tc) (Fig. 8C). Em resumo, a infecção com *T. cruzi* anterior ao tratamento com IFN- γ impede a síntese das subunidades do imunoproteassoma.

Diante desses resultados surgiu um importante questionamento: o tempo de infecção e conseqüentemente a densidade parasitária citoplasmática poderiam influenciar a gênese desse mecanismo inibitório? Essa pergunta surgiu porque nas

culturas em que houve infecção e em seguida o tratamento com IFN- γ (Tc \rightarrow IFN- γ), condição experimental cuja biossíntese do imunoproteassoma foi suprimida, o processo infeccioso durou 48 h. Enquanto que nas culturas com tratamento anterior à infecção (IFN- γ \rightarrow Tc) o processo durou apenas 24 h. Será que esse viés experimental poderia ser a causa do fenômeno observado na condição Tc \rightarrow IFN- γ ?

Para avaliar se o aumento no tempo de infecção (com conseqüente acréscimo na densidade parasitária citoplasmática) influencia a gênese do mecanismo inibitório da tradução, nós realizamos um ensaio no qual células HeLa foram estimuladas por 24 h com IFN- γ antes de serem infectadas por 24 h, 48 h e 72 h. Como controle foram utilizadas células HeLa tratadas com IFN- γ por 24 h, deixadas em cultivo por mais 48 h ou 72 h. Subseqüentemente, os extratos proteicos obtidos foram analisados por *western blot*. Os anticorpos usados nesse experimento foram específicos para PA28 β , visto que o mecanismo de inibição atua sobre a sua expressão, e para a subunidade proteassomal α 1, proteína constitutiva que não apresentou variações em seus níveis nos cinco tratamentos. Assim, esta foi utilizada como normalizador experimental.

Primeiramente, observamos nos controles induzidos (amostras IFN- γ 48h e 72 h) que o nível proteico de PA28 β aumentou e não variou por até 72 h após o tratamento com IFN- γ (Fig. 9C-D). De acordo com os trabalhos de Nandi et al. (1997), Tanaka et al. (1989), Cuervo et al. (1995) e Hendil (1988), as subunidades proteassomais, assim como o próprio complexo, possuem meia-vida maiores do que dois dias, podendo chegar até 15 dias dependendo do tipo celular e do tecido analisado. Interessante que a estabilidade de PA28 β notada no controle tratado foi similar às culturas infectadas com o *T. cruzi*, sem apresentar decaimento até 72 h. Com isso, podemos concluir que tempos maiores de infecção (maior densidade parasitária citoplasmática) não estão relacionados com o disparo do mecanismo inibitório observado na Figura 9A e 9B. Provavelmente, isso se deve à presença do parasita antes da estimulação com o IFN- γ .

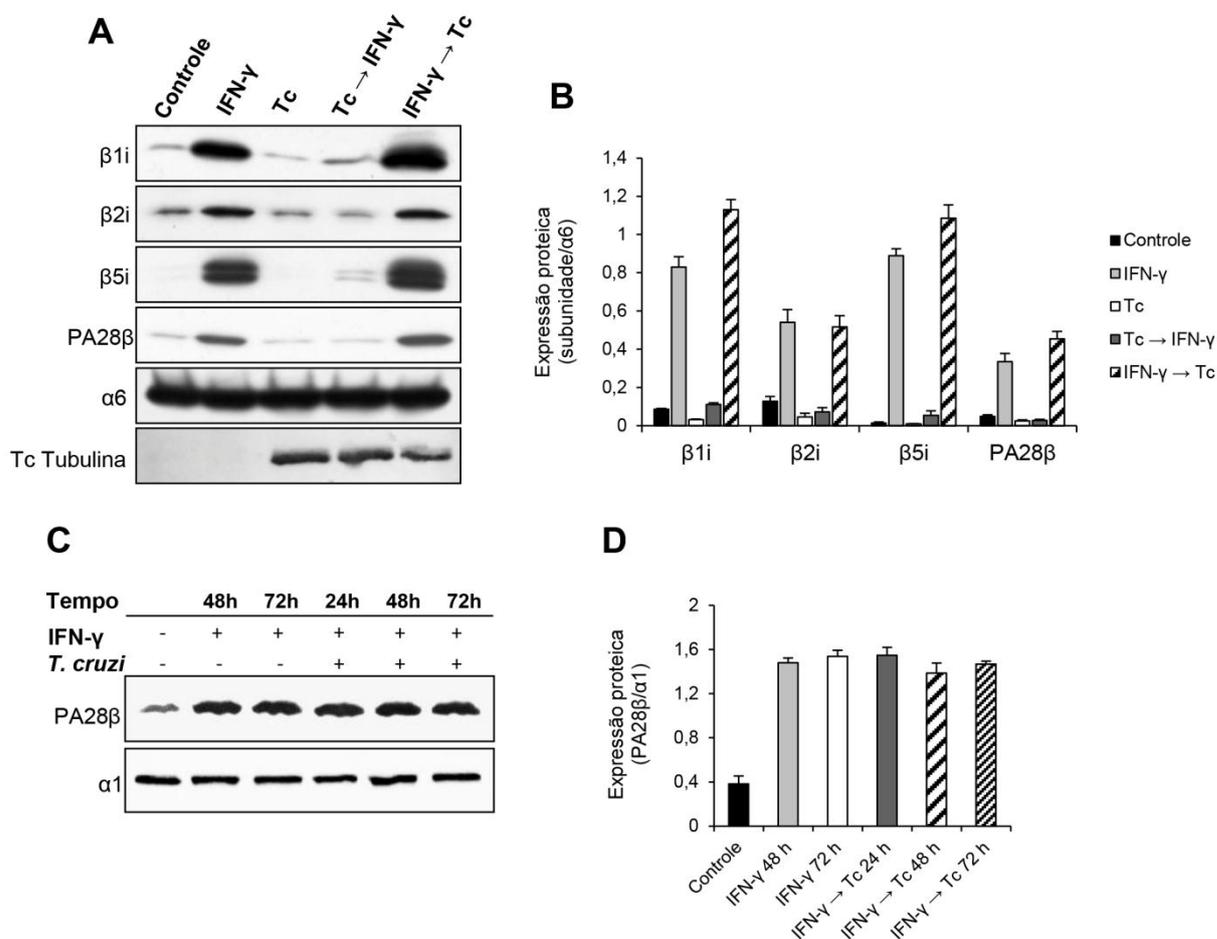


Figura 9. Análise comparativa da expressão proteica das subunidades imunoproteassomais de células HeLa durante a infecção com *T. cruzi*. (A) Extratos de células HeLa (25-50 μ g) tratadas com IFN- γ e/ou infectadas com *T. cruzi* foram analisados por *western blot* utilizando anticorpos contra as subunidades do imunoproteassoma. A infecção foi confirmada utilizando anticorpo anti-tubulina de *T. cruzi*. (B) Os níveis proteicos foram determinados por densitometria e os seus valores plotados em um gráfico usando a expressão da subunidade $\alpha 6$ como normalizador experimental. (C) Análise por *western blot* da expressão de PA28 β em diferentes tempos de tratamento com IFN- γ e infecção com *T. cruzi*. Células HeLa foram pré-tratadas com IFN- γ por 24 h e então infectadas com *T. cruzi* por 24, 48 e 72 h. (D) Os níveis proteicos foram determinados por densitometria e os seus valores plotados em um gráfico usando a expressão da subunidade $\alpha 1$ como normalizador experimental. Todos os valores nesta figura representam a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes.

4.3 A infecção com *T. cruzi* altera as atividades proteolíticas do proteassoma do hospedeiro.

Sabendo que os proteassomas são complexos proteicos responsáveis pela degradação de proteínas intracelulares e que as suas atividades são do tipo quimotripsina, tripsina e caspase, nós analisamos os perfis catalíticos dos proteassomas durante a infecção com o *T. cruzi*. Assim, pudemos relacionar a expressão das imunsubunidades com a magnitude de suas respectivas atividades, sobretudo, no intrigante caso das culturas infectadas e posteriormente tratadas com IFN- γ . Para este fim, realizamos ensaios proteolíticos empregando extratos celulares (Fig. 10A), obtidos conforme o modelo experimental proposto, combinados com substratos luminogênicos específicos para cada uma das atividades proteassomais. Embora, nestes ensaios tínhamos a presença de dois grupos de proteassomas, o das células hospedeiras e o dos parasitas, as atividades mensuradas foram relativas quase que exclusivamente aos proteassomas das células HeLa, pois comparativamente obtivemos valores próximos nas culturas controle e nas infectadas (Tc).

Com relação à atividade do tipo quimotripsina (Fig. 10B), observa-se que após o tratamento com IFN- γ a hidrólise do substrato luminogênico aumentou aproximadamente 70% nas células não infectadas (IFN- γ). O mesmo valor foi encontrado na condição experimental "IFN- γ →Tc". Já nas culturas em que a infecção antecedeu o tratamento com a citocina (Tc→IFN- γ) a atividade quimotriptica apresentou valores próximos ao do controle (apenas 18% maior), quase retomando a atividade basal do imuno- e do proteassoma. Nas culturas apenas infectadas com *T. cruzi* (Tc), a hidrólise do peptídeo luminogênico foi reduzida em cerca de 20% quando comparada ao controle.

O perfil de hidrólise triptica foi parecido ao obtido nos ensaios de quimotripsina, porém com diferenças ou amplitudes não tão acentuadas entre as cinco condições experimentais (Figura 10C). A estimulação com IFN- γ aumentou em 35% a hidrólise do substrato luminogênico nas células não infectadas (IFN- γ) e em 40% nas culturas tratadas e infectadas (IFN- γ →Tc). Nos outros dois tratamentos (Tc e Tc→IFN- γ), os valores foram similares aos do controle.

Esses resultados estão em consonância com os níveis proteicos mostrados na figura 9A-B, sugerindo uma relação direta entre a proteólise e a expressão das

subunidades do imunoproteassoma responsáveis pela atividade do tipo quimotripsina e tripsina. Vale lembrar que nesta partícula a atividade quimotríptica é assinalada às subunidades $\beta 1i$ e $\beta 5i$ e a tríptica à $\beta 2i$. Desse modo, a condição experimental “Tc \rightarrow IFN- γ ” ilustra perfeitamente a influência da infecção na biossíntese e na atividade do imunoproteassoma do hospedeiro. Ainda, é importante notar que quando o imunoproteassoma é induzido essas duas atividades catalíticas aumentam e não são afetadas pela infecção com o *T. cruzi* (IFN- γ \rightarrow Tc).

Além da atividade do tipo quimotripsina e tripsina, nós também mensuramos a atividade do tipo caspase (Fig. 10D). Independente da infecção, nas condições experimentais onde a síntese do imunoproteassoma foi induzida a hidrólise do substrato luminogênico foi reduzida em cerca de 20% (IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc). Isso era esperado, haja vista que após a estimulação com IFN- γ a subunidade constitutiva $\beta 1$ é substituída pela $\beta 1i$ durante a neossíntese do proteassoma. Essa mudança aumenta a capacidade do proteassoma de clivar pequenos peptídeos após resíduos hidrofóbicos ao invés de clivar após resíduos ácidos (GACYNSKA et al., 1993). Conforme observado na figura 6, a expressão da subunidade $\beta 1$ e a sua incorporação nas partículas maduras do proteassoma não são alteradas pela infecção com o *T. cruzi*. Assim, a atividade do tipo caspase também não é afetada pelo parasita, uma vez que os níveis de hidrólise do substrato foram similares ao do controle (Tc em relação controle). Na condição experimental onde a biossíntese do imunoproteassoma foi suprimida (Tc \rightarrow IFN- γ), a amplitude da atividade catalítica também foi próxima à do controle. Com isso, conclui-se que a infecção com o *T. cruzi* não afeta a atividade do tipo caspase, mas a estimulação do IFN- γ com a consequente indução do imunoproteassoma afeta.

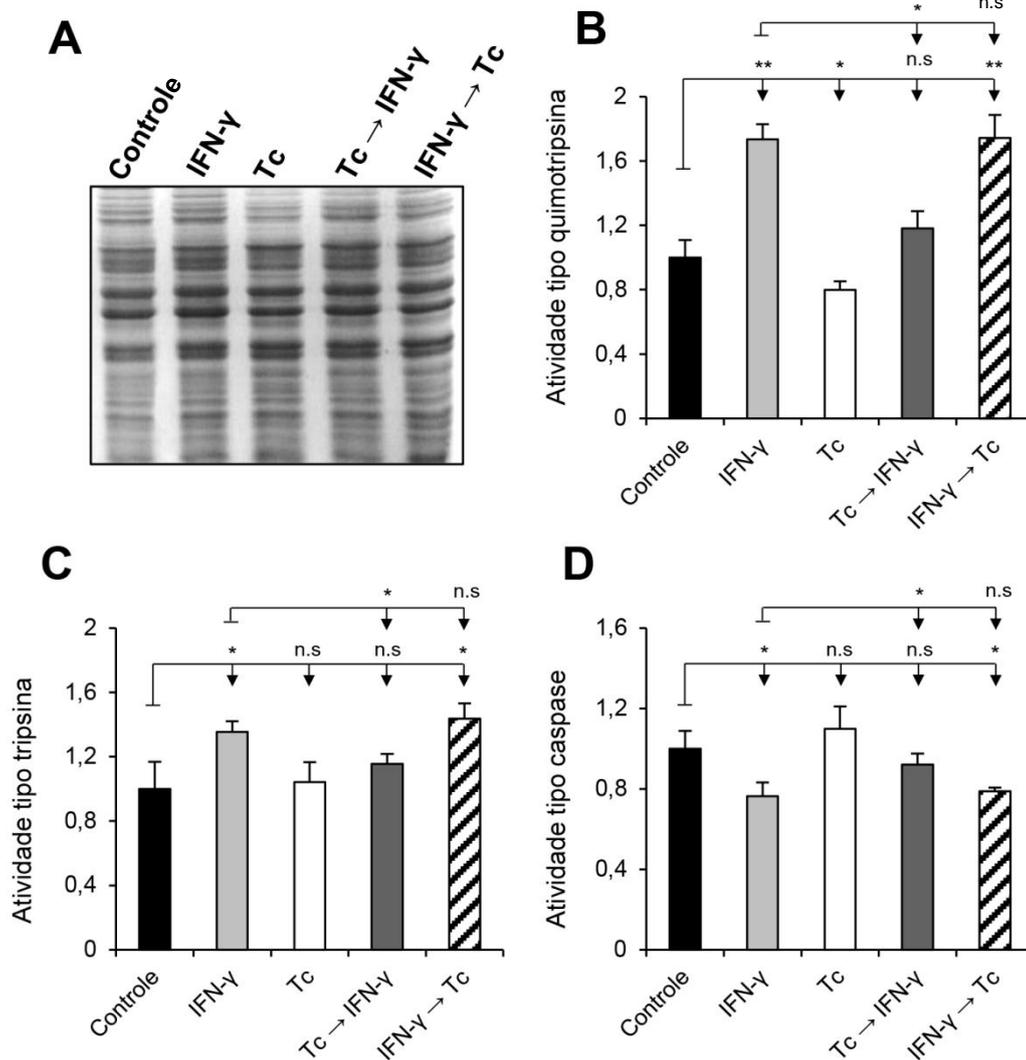


Figura 10. Análise das atividades proteolíticas de proteassomas durante a infecção com o *T. cruzi*. Os ensaios proteolíticos foram feitos utilizando extratos de células HeLa tratadas com IFN- γ e/ou infectadas com *T. cruzi* combinados com substratos luminogênicos específicos para avaliar as atividades do tipo quimotripsina, tripsina e caspase do proteassoma. A atividade do proteassoma foi estimada, para cada um dos tratamentos e substratos, por meio de amostras tratadas com o inibidor de proteassoma denominado MG-132. A média das intensidades de luminescência foram plotadas relativamente ao controle. Em A observa-se um gel SDS-PAGE 13% corado com coomassie blue a título de checagem das quantificações e carregamento do extrato proteico (20 μ g por poço). (B) Atividade do tipo quimotripsina, (C) tipo tripsina e (D) tipo caspase. Cada valor representa a média da triplicata biológica \pm o desvio padrão, cada amostra também foi aplicada em triplicata técnica.

4.4 A infecção com o *T. cruzi* também afeta a expressão de TAP1 e da molécula de MHC de classe I

Uma vez demonstrado que a infecção com o *T. cruzi* inibe a biossíntese do imunoproteassoma do hospedeiro, foi de interesse avaliar a expressão de outros importantes componentes da via de MHC de classe I. Dentro desta via analisamos a expressão de TAP1 e da própria molécula de MHC de classe I, ambos induzidos pela citocina IFN- γ . Os transcritos foram quantificados por *real-time* RT-qPCR e a expressão proteica avaliada por *western blot*.

Semelhante aos resultados obtidos para o imunoproteassoma, a transcrição de TAP1, da β 2-microglobulina e dos três alelos que codificam a cadeia alfa da molécula de MHC de classe I foi induzida após a estimulação com IFN- γ . Isso ocorreu independente da presença do parasita e também da ordem de tratamento e infecção (Fig. 11A, IFN- γ , Tc \rightarrow IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc). No entanto, os níveis de mRNA das células infectadas foram significativamente menores do que os níveis das células não infectadas (Tc \rightarrow IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc em relação a IFN- γ). Todavia, houve indução e a abundância destes transcritos foi quase a mesma em ambos os tratamentos (Tc \rightarrow IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc). Embora reduzidos, na condição experimental "IFN- γ \rightarrow Tc" os níveis dos RNAs mensageiros foram suficientes para uma expressão proteica detectável e próxima das células não infectadas e tratadas com IFN- γ (Fig. 11B-C). Já nas culturas em que a infecção precedeu o tratamento com a citocina, a expressão proteica da molécula de MHC de classe I e de TAP1 foi similar aos níveis basais apontados no controle (Fig. 11B-C, Tc \rightarrow IFN- γ). Assim, em nosso modelo experimental, TAP1 e a molécula de MHC de classe I exibiram o mesmo comportamento que as subunidades imunoproteassomais e que PA28 β . Logo, a infecção com *T. cruzi* anterior ao tratamento com IFN- γ também suprime a síntese proteica de TAP1 e da molécula de MHC de classe I.

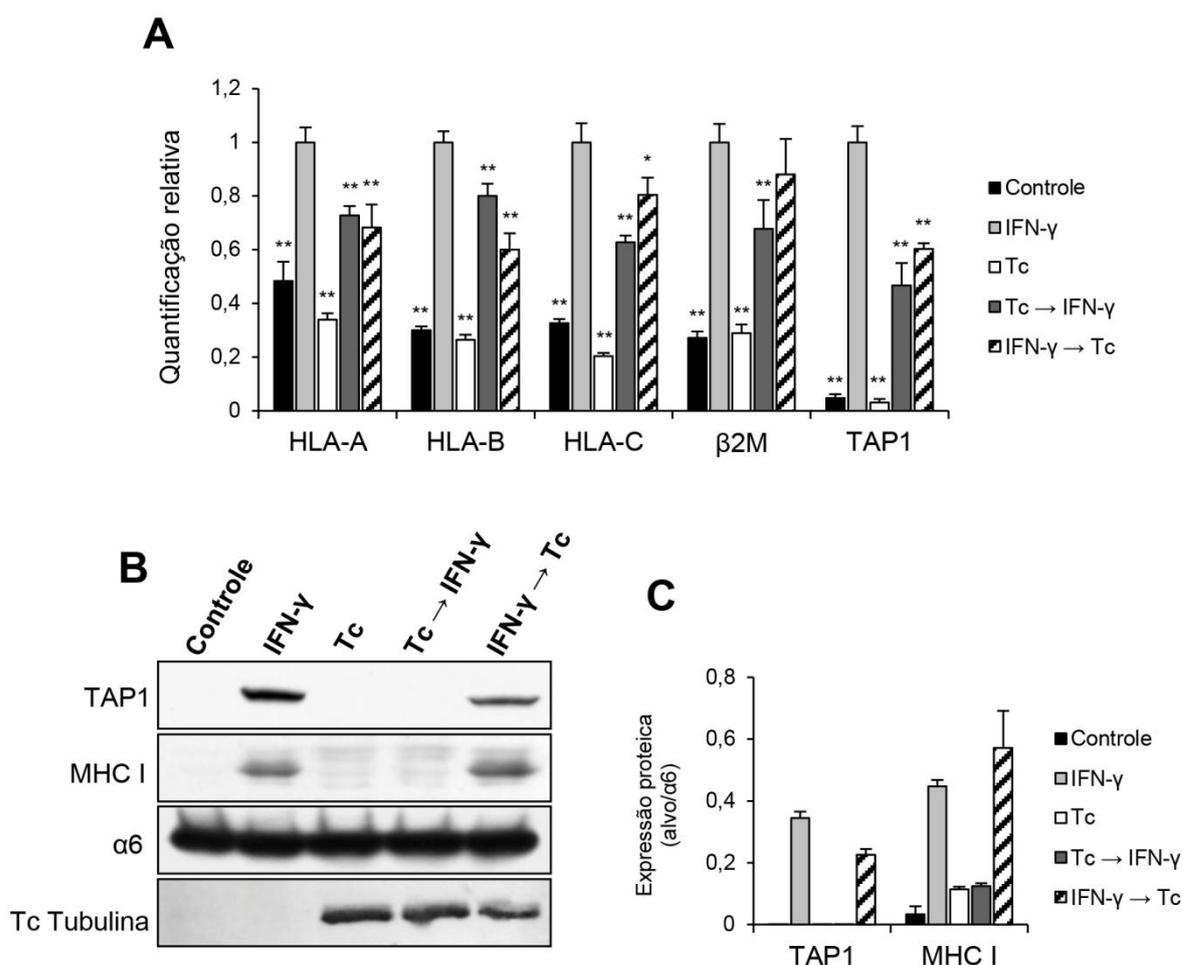


Figura 11. Análise da expressão de TAP1 e da molécula de MHC de classe I durante a infecção com *T. cruzi*. (A) A abundância dos mRNAs de *TAP1*, β 2M e dos alelos *HLA-A*, *-B* e *-C* foi determinada por *real-time* RT-qPCR utilizando o RNA total de células HeLa tratadas com IFN- γ e/ou infectadas com *T. cruzi*. A quantificação relativa dos transcritos foi calculada por meio da normalização com os controles endógenos *GAPDH* e *HPRT1* utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os níveis dos mRNAs foram plotados relativamente à condição experimental "IFN- γ ". Cada valor representa a média da triplicata biológica \pm o desvio padrão. (B) Extratos de células HeLa (25-50 μ g) tratadas com IFN- γ e/ou infectadas com *T. cruzi* foram analisados por *western blot* utilizando anticorpos anti-TAP1 e anti-MHC de classe I conforme indicado. (C) Os níveis proteicos foram determinados por densitometria e os seus valores plotados em um gráfico usando a expressão da subunidade α 6 como normalizador experimental. A infecção foi confirmada utilizando anticorpo anti-tubulina de *T. cruzi*. Cada valor representa a média \pm o desvio padrão de três experimentos independentes.

Para confirmar estes resultados e avaliar a expressão de moléculas maduras de MHC de classe I na superfície celular, nós realizamos experimentos de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo para as cinco condições experimentais propostas (Fig. 12). Para quantificar precisamente a intensidade de fluorescência, as amostras utilizadas na microscopia foram as mesmas utilizadas na citometria de fluxo. Além do anticorpo anti-MHC de classe I, para as microscopias as células foram coradas com DAPI a fim de detectar os parasitas e avaliar a densidade da infecção. Consistente com os níveis proteicos observados no *western blot* (Fig. 11), a expressão da molécula de MHC de classe I na superfície celular foi significativamente menor (20%) nas células infectadas (Tc) em comparação ao controle (Fig. 12A-C). A expressão dessa molécula também foi reduzida (cerca de 40% menor do que a condição "IFN- γ ") onde a infecção ocorreu antes do tratamento com IFN- γ (Fig. 12A-B, Tc \rightarrow IFN- γ). Nas imagens desta condição experimental (Fig. 12A, Tc \rightarrow IFN- γ) a diferença na expressão da molécula de MHC de classe I pode ser facilmente visualizada quando são comparadas as células infectadas (destacadas por setas) com as células HeLa não infectadas ou pouco infectadas. Contudo, nas culturas onde a infecção ocorreu após a estimulação com IFN- γ (IFN- γ \rightarrow Tc) a expressão do MHC de classe I na superfície celular não foi afetada pelo parasita durante 24 horas de infecção. Nesta condição, bem como das células não infectadas, o tratamento com IFN- γ aumentou em 48% a quantidade de moléculas de MHC classe I na superfície celular (Fig. 12B-C, IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc).

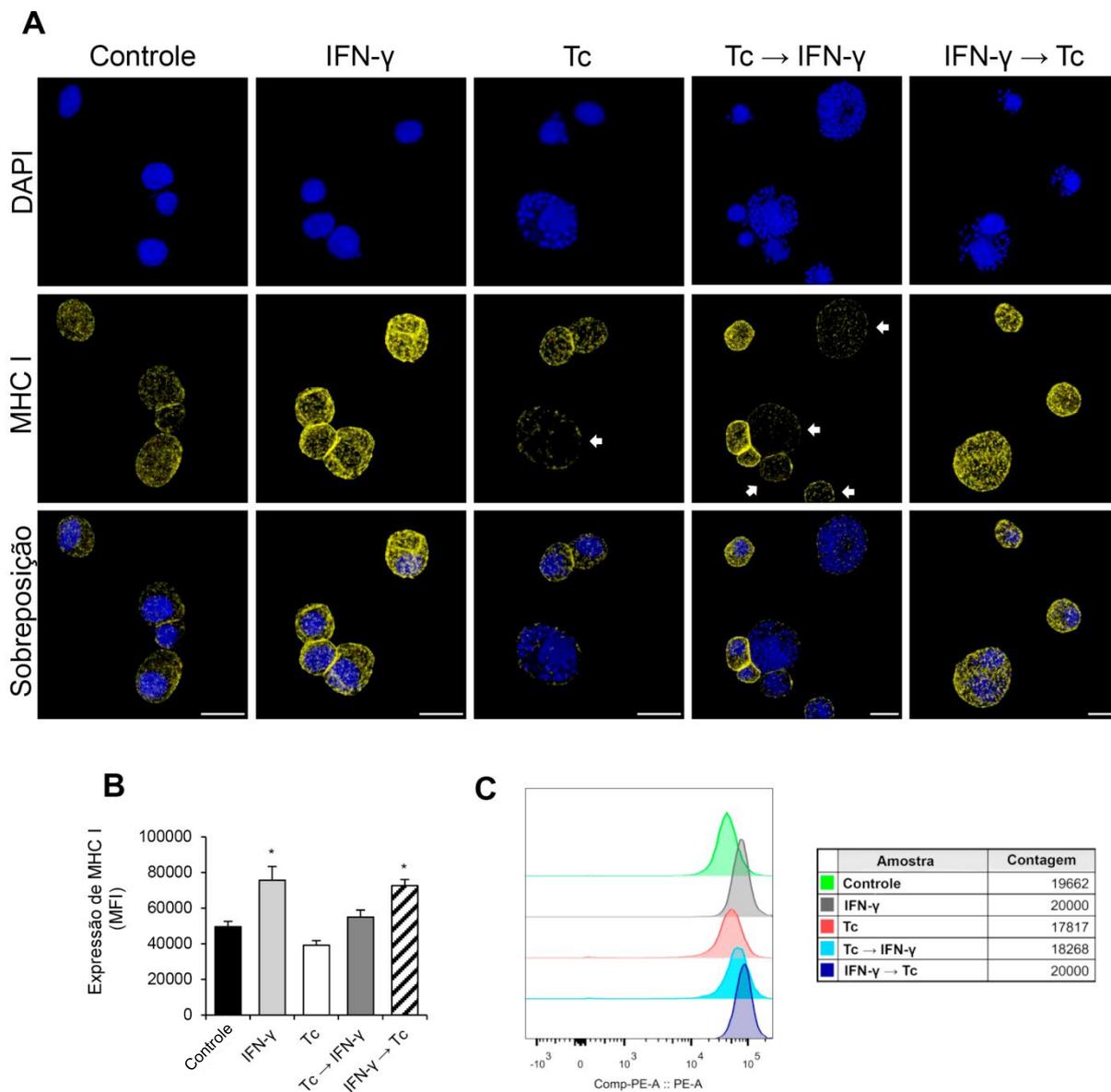


Figura 12. Efeito da infecção com *T. cruzi* na expressão da molécula de MHC de classe I na superfície celular de células HeLa. (A) Microscopia de fluorescência de células HeLa tratadas com IFN- γ e/ou infectadas com *T. cruzi* marcadas com anti-MHC de classe I (amarelo) e DAPI (azul). As setas destacam as células infectadas que claramente tiveram a expressão de MHC classe I reduzida durante a infecção com o *T. cruzi*. Barras = 25 μ m. Para quantificar a expressão do MHC de classe I na superfície celular alíquotas das amostras utilizadas na microscopia foram analisadas por citometria de fluxo. (B) A expressão da proteína foi determinada como a média da intensidade de fluorescência (MFI). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. (C) Histograma de um dos experimentos analisados por citometria de fluxo.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós estudamos o impacto da infecção com *T. cruzi* na via de apresentação de antígenos intracelulares MHC de classe I em células HeLa. Nossos resultados mostram que a biossíntese das subunidades do imunoproteassoma $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, e também de PA28 β , TAP1 e da molécula de MHC de classe I foi regulada negativamente durante a infecção com *T. cruzi*.

Uma vez que a geração de peptídeos antigênicos derivados do citoplasma é atribuída principalmente ao imunoproteassoma, mas também ao proteassoma constitutivo, nosso grupo inicialmente investigou se o *T. cruzi* afeta a expressão e a composição do proteassoma constitutivo de células HeLa (FARIA et al., 2008). Nesse estudo, observou-se que a infecção com *T. cruzi* não teve efeito sobre a expressão das subunidades do proteassoma, tanto em nível de mRNA quanto proteico. No presente trabalho, nós demonstramos que após o tratamento com IFN- γ os níveis dos mRNAs das subunidades induzidas do imunoproteassoma foram menores nas células infectadas em comparação com células não infectadas. Esse efeito pode estar relacionado com a depleção de receptores de membrana para o IFN- γ ocasionada por processos endocíticos durante a invasão do parasita. Poderia também ter relação com a densidade de amastigotas no citoplasma da célula hospedeira afetando as vias de sinalização ou o próprio metabolismo celular. Todavia, mesmo que a indução dos mRNAs dos componentes imunoproteassomais não seja igual ao das células não infectadas é importante observar que houve indução e que a abundância desses transcritos são semelhantes quando comparadas as amostras de culturas infectadas e tratadas com as tratadas e infectadas (Tc \rightarrow IFN- γ e IFN- γ \rightarrow Tc).

Em nível proteico, nós observamos que a infecção com *T. cruzi* anterior ao tratamento com IFN- γ inibe a síntese das subunidades imunoproteassomais $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ e também de PA28 β . O interessante é que embora os níveis dos mRNAs desses genes nessa condição (Tc \rightarrow IFN- γ) tenham sido similares aos das culturas tratadas e infectadas (IFN- γ \rightarrow Tc) os níveis proteicos foram bem diferentes. Quando induzidos por IFN- γ , a presença do parasita não alterou os níveis proteicos das subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ e também de PA28 β , sugerindo que o *T. cruzi* não degrada essas proteínas. Por outro lado, nas culturas de células HeLa em que a infecção ocorreu anterior ao tratamento com IFN- γ a expressão dessas proteínas retomou os níveis

basais. Uma vez que os níveis de mRNA das condições experimentais Tc→IFN- γ e IFN- γ →Tc foram os mesmos, mas os de proteína não, nós propomos que a infecção com *T. cruzi* bloqueia a biossíntese do imunoproteassoma por meio de um controle pós-transcricional ainda desconhecido.

Uma vez demonstrado que a infecção com *T. cruzi* inibe a biossíntese do imunoproteassoma do hospedeiro, nós avaliamos se TAP1 e a própria molécula de MHC de classe I também tiveram a sua expressão comprometida durante a infecção. De modo semelhante aos resultados obtidos para o imunoproteassoma, a biossíntese de TAP1 e da molécula de MHC de classe I foi modulada pelo parasita, aparentemente por um mecanismo inibitório atuante sobre a síntese proteica. Nos ensaios de imunofluorescência, a diferença na expressão de MHC de classe I na superfície celular pôde ser facilmente observada quando comparamos células HeLa infectadas e posteriormente tratadas com o IFN- γ (Tc→IFN- γ) com as culturas tratadas e infectadas (IFN- γ →Tc). Nessas imagens ficou evidente que a infecção anterior ao tratamento com IFN- γ bloqueia o efeito estimulatório desta citocina. Além disso, a infecção por si só reduziu significativamente o número de moléculas de MHC de classe I na superfície da célula hospedeira (condição Tc). Esse fenômeno provavelmente compromete a apresentação de antígenos intracelulares favorecendo a persistência do parasita. Dois estudos relataram que a expressão de MHC de classe I na superfície celular foi reduzida pelo *T. cruzi* durante a infecção de células imunes (BERGERON et al., 2008; VAN OVERTVELT et al., 2002). A redução da expressão de MHC de classe I também foi observada como consequência da infecção por vírus (SCHRIER et al., 1983; MULLBACHER, 1992; JENNINGS et al., 1985; KOHONEN-CORISH et al., 1989), bem como o seu aumento (KING et al., 2003; KING; KESSON 1988; KRAUS et al., 1992).

Analisando a expressão de PA28 β , nós demonstramos que o desencadeamento desse fenômeno inibitório não é dependente do tempo de infecção e, conseqüentemente, da densidade parasitária. No entanto, isso acontece devido à presença do parasita anterior ao tratamento com IFN- γ suprimindo a síntese proteica. Em nosso conhecimento, essas são as primeiras evidências de que um protozoário intracelular é capaz de modular especificamente a sua infecção por meio de um mecanismo pós-transcricional que afeta a tradução de proteínas do hospedeiro.

Além da expressão do imunoproteassoma, nós analisamos as atividades proteolíticas dos proteassomas durante a infecção com *T. cruzi*. Nos ensaios enzimáticos, de acordo com os níveis das proteínas, observou-se uma relação direta entre o grau de proteólise e a expressão das subunidades do imunoproteassoma responsáveis pelas atividades do tipo quimotripsina e tripsina. Uma vez que $\beta 1i$ e $\beta 5i$ tiveram as suas sínteses inibidas nas culturas infectadas e tratadas com IFN- γ (Tc \rightarrow IFN- γ), a atividade do tipo quimotripsina foi reduzida para próximo dos níveis basais. O mesmo aconteceu para a subunidade $\beta 2i$, assim, a atividade do tipo tripsina também foi regulada negativamente pelo parasita. Estequiometricamente, o núcleo 20S do proteassoma constitutivo e do imunoproteassoma possuem potenciais iguais para a hidrólise triptica. Contudo, constatamos que a estimulação por IFN- γ aumenta a atividade do tipo tripsina. Provavelmente, isso acontece devido à rápida montagem e maturação do imunoproteassoma, mas também pela maior processividade do complexo (revisado por SIJTS; KLOETZEL, 2011).

A atividade do tipo caspase parece não ter sido afetada pelo *T. cruzi*. A expressão de $\beta 1$ e a sua incorporação em partículas maduras do proteassoma não foram alteradas durante a infecção (FARIA et al., 2008), mas sim pelo tratamento com IFN- γ em virtude da sua substituição pela subunidade $\beta 1i$. A atividade do tipo tripsina e, principalmente, do tipo quimotripsina parecem ser as mais relevantes para a geração de peptídeos antigênicos. Isto se deve porque a clivagem de proteínas após resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e básicos produz peptídeos com extremidades ótimas para o encaixe na fenda da molécula de MHC de classe I (KUEHN; DHLMANN, 1996; AKI et al., 1994; SIJTS; KLOETZEL, 2011). Além disso, a associação do regulador PA28 a pelo menos uma das extremidades do núcleo do imunoproteassoma 20S está relacionada com o aumento da produtividade e da diversidade de peptídeos imunogênicos (HEINK et al., 2005; GRAFF et al., 2011). Consequentemente, a supressão da síntese das imunsubunidades- β e de PA28 durante a infecção com *T. cruzi* pode influenciar a quantidade e a qualidade dos peptídeos imunogênicos gerados, fatores que limitariam o reconhecimento da célula hospedeira por linfócitos T CD8⁺ impedindo uma resposta imune eficaz.

Dois trabalhos reforçam a hipótese sobre as implicações do sistema ubiquitina-proteassoma na apresentação de antígenos e na persistência do parasita durante a infecção com *T. cruzi*. Chou et al. (2008) testando *in vivo* uma vacina de DNA contra um epítipo de *T. cruzi* reforçaram a ideia de que o imunoproteassoma e

o seu regulador PA28 são essenciais para o efeito protetor anti-parasita. Nesse estudo, a imunidade anti-*T. cruzi* induzida pela vacina foi suprimida em camundongos deficientes para as subunidades $\beta 1i$ e $\beta 5i$ do imunoproteassoma ou para o regulador PA28 $\alpha\beta$. Bergeron et al. (2008) mostraram que a infecção de macrófagos murinos com *T. cruzi* reduz a síntese do imunoproteassoma e a expressão de MHC de classe I via sinalização SAPK/JNK. Nesse trabalho, foi demonstrado que a infecção pelo *T. cruzi* em macrófagos induz a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas moléculas inibem a atividade da proteína tirosina fosfatase (PTP), alterando o estado de fosforilação das proteínas do hospedeiro. Dentre as proteínas fosforiladas estão os segundos mensageiros da via de sinalização SAPK/JNK, os quais seriam os responsáveis pela regulação negativa da síntese dos mRNAs das subunidades do imunoproteassoma e da molécula de MHC classe I. Como novidade, os nossos resultados adicionam um novo nível de complexidade à biogênese do imunoproteassoma durante a infecção pelo *T. cruzi*, haja vista que os experimentos foram conduzidos em células não imunes e que a regulação é pós-transcricional.

Já que o proteassoma é o complexo proteolítico chave para a geração de peptídeos apresentados em moléculas de MHC de classe I, não só o *T. cruzi*, mas outros micro-organismos infecciosos e principalmente vírus desenvolveram estratégias para burlar o sistema ubiquitina-proteassoma de seus hospedeiros impedindo o reconhecimento desses patógenos pelo sistema imunológico. Por exemplo, a proteína X do vírus da hepatite B interage com a subunidade $\alpha 7$ do proteassoma inibindo as atividades do tipo tripsina e quimotripsina (HU et al., 1999). Outros trabalhos mostraram que células infectadas com o adenovírus tipo 12E1A e com HPV tipo 18 E7 exibiram uma redução nos níveis de mRNA e de proteína de TAP1 e TAP2, $\beta 1i$ e $\beta 5i$ (ROTEM-YEHUDAR et al., 1996; PROFFIT; BLAIR, 1997; GEORGOPOULOS et al., 2000). Um outro exemplo bem conhecido de um vírus que inibe especificamente o processamento proteassomal é o vírus Epstein-Barr (EBV). O genoma do EBV codifica a proteína EBNA1 (EBV *nuclear antigen 1*), que escapa do processamento do proteassoma (LEVITSKAYA et al., 1995). Essa é uma proteína multifuncional envolvida em diferentes processos do ciclo viral (SMITH; SUDGEN, 2013). Estudos sobre o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) mostraram que a infecção em macrófagos afeta a incorporação das subunidades induzidas do imunoproteassoma reduzindo as atividades catalíticas do proteassoma. Também, foi

mostrado que a proteína NS3 do vírus da hepatite C reduz a atividade peptidolítica da subunidade $\beta 5i$ *in vitro* (KHU et al., 2004).

Tomados em conjunto, os nossos resultados mostram que as subunidades induzidas por IFN- γ do imunoproteassoma, PA28 β , TAP1 e a molécula de MHC de classe I tiveram as suas expressões reduzidas pela infecção por *T. cruzi* por meio de um controle pós-transcricional ainda desconhecido. Sugerimos que esse controle se dê por meio de um mecanismo de inibição específico da síntese proteica possivelmente causado por um impedimento na iniciação da tradução ou até mesmo pela citolocalização dos mRNAs em questão. Sabe-se que a repressão da tradução de alguns mRNAs acontece pela ligação de proteínas regulatórias à sequências específicas contidas na região 5' ou 3' UTR desses mensageiros. Em nosso conhecimento, não há estudos que mostrem a inibição específica da tradução de mRNAs do hospedeiro durante infecções. No entanto, vários trabalhos demonstram que alguns vírus interferem de maneira generalizada na tradução das proteínas do hospedeiro, principalmente afetando a meia-vida ou atividade de fatores de iniciação da síntese proteica (revisado por TORIBIO; VENTOSO, 2010). Mesmo que não seja em uma infecção, um mecanismo bem elucidado em nível molecular de regulação específica da iniciação da tradução é o da ferritina em eucariotos. A ferritina é uma proteína envolvida na estocagem de ferro intracelular e na região 5' UTR de seu mRNA há uma estrutura em forma de grampo denominada elemento responsivo ao ferro (IRE). Quando a concentração de ferro está baixa, proteínas regulatórias do ferro (IRP1 ou IRP2) associam-se ao IRE bloqueando o acoplamento do complexo ribossomal de pré-iniciação da tradução 43S, inibindo a síntese proteica (revisado por SONNENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Tomando a ferritina como exemplo, é sabido que o *T. cruzi* secreta uma gama enorme de fatores e proteínas relacionadas ao seu próprio metabolismo e principalmente ao processo infeccioso (DOSREIS, 2011; BAYER-SANTOS et al., 2013). É possível que um ou vários desses fatores (proteínas ou RNAs) secretados pelo parasita se associem aos mRNAs dos componentes da via de MHC de classe I e exerçam um papel modulador/inibitório durante a infecção.

Nesse cenário, uma questão importante surgiu: haja vista que as sequências dos mRNAs que codificam as imunoproteínas- β , PA28 β , TAP1 e a molécula de MHC de classe I são bastante diferentes umas das outras e que os níveis dos transcritos não são drasticamente afetados pela infecção por *T. cruzi*. Será que a

inibição da síntese dos componentes da via de MHC de classe I, neste modelo experimental, é um fenômeno específico ou é algo generalizado?

Podemos responder esta pergunta observando os resultados mostrados nas figuras 6C e 6D. Nesses experimentos, as células HeLa expostas ao *T. cruzi* foram marcadas metabolicamente com ³⁵S-metionina ao longo das últimas três horas de incubação da cultura, assim como o controle. Logo, o radioisótopo estava disponível para ser incorporado às proteínas recém-sintetizadas apenas após a vigésima primeira hora de infecção. Após a contagem em cintilador (com valores similares entre as duas condições experimentais: controle e infectado – dados não mostrados), 100 µg de extrato total de células HeLa infectadas ou não com o *T. cruzi* foram imunoprecipitados com anticorpos anti-proteassoma humano e então analisados por eletroforese em géis bidimensionais (FARIA, 2008). Dessa forma, pudemos ter uma ideia do funcionamento da maquinaria de síntese proteica por meio da incorporação de ³⁵S-metionina durante a infecção com *T. cruzi*.

Como visto anteriormente, a abundância das proteínas radiomarcadas foi praticamente idêntica entre as células infectadas e não infectadas (Fig. 6C-D). Isso significa que o funcionamento da maquinaria de tradução não é afetado pela infecção com *T. cruzi*. Assim, a inibição da síntese dos componentes da via de MHC de classe I é provavelmente um fenômeno específico e não um impedimento geral na tradução proteica como consequência da infecção. Além disso, este processo provou ser tão específico que não afeta até mesmo o proteassoma constitutivo. Contudo, faz-se necessário a análise da expressão de outras proteínas não relacionadas com componentes da via de MHC de classe I ou até mesmo a análise comparada de um proteoma da infecção feito de acordo com as condições propostas em nosso modelo experimental.

Apesar da evidência de uma resposta aparentemente vigorosa de células T CD8⁺ específicas ao *T. cruzi*, a grande maioria dos chagásicos não conseguem eliminar totalmente a carga parasitária, refletindo na cronicidade da doença. Assim, nossos resultados trazem novos conhecimentos sobre a apresentação de antígenos durante a infecção pelo *T. cruzi* e pode ser uma pista para os mecanismos de persistência do parasita e uma explicação para a resposta subótima mediada pelos linfócitos T CD8⁺. Talvez porque o reconhecimento das células infectadas pelos linfócitos T CD8⁺ seja comprometido pela falta de epítomos imunogênicos derivados exclusivamente da atividade do imunoproteassoma. Estudos mostram que em

alguns casos as respostas mediadas por células são dependentes de antígenos gerados exclusivamente por proteólise no imunoproteassoma (revisado por SIJTS; KLOETZEL, 2011). Além disso, o comprometimento da expressão de TAP1 e da própria molécula de MHC de classe I prejudica a apresentação de antígenos na superfície celular desfavorecendo o reconhecimento da célula infectada.

Como perspectiva, realizaremos estudos para elucidar precisamente os mecanismos inibitórios induzidos pelo parasita. A identificação desses mecanismos regulatórios pode fornecer importantes alvos para o desenvolvimento de drogas anti-*T. cruzi* efetivas e capazes de curar a infecção crônica pelo parasita. Além disso, é nosso interesse verificar a regulação da biossíntese do imunoproteassoma e dos demais componentes da via de MHC de classe I em outros tipos celulares para os quais o parasita demonstra um elevado grau de tropismo, tais como células encontradas no coração, em tecido nervoso e digestivo e realizar estudos *in vivo*. Também, seria bastante interessante analisar o efeito da infecção em células imunes, por exemplo, células dendríticas que possuem o imunoproteassoma expresso constitutivamente.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos evidências de que o *T. cruzi* é capaz de modular especificamente a sua infecção por afetar a síntese das subunidades do imunoproteassoma e de componentes da via de MHC de classe I do hospedeiro por meio de um mecanismo pós-transcricional. Desse modo, o parasita reduziu as atividades proteolíticas do proteassoma, provavelmente, minimizando a produção e a variedade de peptídeos antigênicos gerados pelo hospedeiro. Além disso, a baixa expressão de TAP1 e da própria molécula de MHC de classe I comprometem a apresentação de antígenos na superfície das células infectadas, desfavorecendo respostas imunes mediadas por linfócitos T citotóxicos. Possivelmente, esses fenômenos estão relacionados com a persistência do parasita no ambiente intracelular e com o escape da resposta imune do hospedeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª ed. Rio de Janeiro. Ed. Elsevier, p. 570, 2008.

ACOSTA RODRIGUEZ. E.V.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: Can we strike first? **Scand J Immunol**, 66: 137–142, 2007.

AKI, M., et al. Interferon-gamma induces diferente subunit organizations and functional diversity of proteasomes. **J. Biochem.**, 115: 257-269, 1994.

ARENDT, C.S.; HOCHSTRASSER, M. Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. **EMBO J.**, 18: 3575-3585, 1999.

ARRIGO, A.P.; et al. Identity of the 19S "prosome" particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). **Nat**, 331: 192-194, 1988.

BAUMEISTER, W.; CEJKA, M.K.; SEEMULLER, E. The Proteasome: Macromolecular Assembly Designed to Confine Proteolysis to a Nanocompartment. **J. Biol. Chem.**, 378: 121-30, 1997.

BAYER-SANTOS, E.; et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **J Proteome Res** 1;12(2):883-97, 2013.

BERGERON, M., et al. Abnormal IFN-g-dependent immunoproteasome modulation by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. **Parasite Immunol.**, 30, 280 -292, 2008.

BERMEJO, D. A.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. **Immunol**, 132(1): 123–133, 2011.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, 7(6): 1513-23, 1979.

BOCHTLER, M. The proteasome. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, 28: 295-317, 1999.

BOES, B.; et al. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. **J. Exp. Med.**, 179(3):901–909, 1994.

BONNER, W.M.; LASKEY, R.A. A film detection Method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. **Euro. J. Biochem.** 46, 83–88, 1974.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Annu. Biochem.** 72, 248–254, 1976.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbio.** 27, 347–382, 1973.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbio.** 49, 175–200, 1995.

BURRI, L.; et al. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97(19): 10348-10353, 2000.

BUSCAGLIA, C.A.; et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, 4: 229-236, 2006.

CAMARGO, M.M.; et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **J. Immunol.**, 159: 6131-6139, 1997.

CAMPOS, M. A.; et al. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, 167(1): 416–423, 2001.

CARDILLO, F.; et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. **Infect. Immun.**, 64(1): 128-134, 1996.

CARVALHO, E.M.; ALMEDIA, R.P.; JESUS, A.R. DE. Imunidade e infecção. **Medicina**, 28(3): 253-283, 1995.

CARVALHO, S. T.; et al. A new class of mechanism-based inhibitors for *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and their influence on parasite virulence. **Glycobiol** 20: 1034–1045, 2010.

CHAGAS, C. Nouvelle espèce de trypanosomiase humaine. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique** 102(5): 352–355, 1909.

CHEN, P.; HOCHSTRASSER, M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion assembly. **Cell**, 86: 961-972, 1996.

CHEN, W.; et al. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8+ T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. **J Exp Med** 193: 1319–1326, 2001.

CHOU, B.; et al. Critical contribution of immunoproteasome in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid

encoding a CTL epitope fuse to green fluorescence protein. **Mic. Infection.**, 10 :241 – 250, 2008.

CIAVAGLIA, M. C.; DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 193: 718–721, 1993.

CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6(1):79–87, 2005.

CLAVEROL, S.; et al. Mapping and structural dissection of human 20S proteasome using proteomic approaches. **Mol. Cell. Proteom.**, 1: 567-578, 2002.

CONTRERAS, V.; et al. Early and late molecular and morphologic changes that occur during the *in vitro* transformation of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to amastigotes. **Biol Res** 35(1), 2002.

COTTA DE ALMEIDA, V.; et al. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Clinic. Immunol. Immunopathol.**, 82(2): 125-132, 1997.

COURA, J.R. Present Situation and new Strategies for Chagas disease Chemotherapy - a proposal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104: 549-554, 2009.

COURA, J.R. Tripanosomose, Doença de Chagas. **Cienc. Cult.**, 55(1): 1-7, 2003.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 106: 641-645, 2011.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature outlook Chagas disease**, 2010. Disponível em www.nature.com/outlooks. Acesso em: 20 de abril de 2014.

COURA, J.R; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease Chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97: 3-24, 2002.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. Structure and functions of the 20S and 26S Proteasomes. **Annu. Rev. Biochem.**, 65: 801-47, 1996.

CUERVO, A.M.; et al. Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. **Eur. J. Biochem.**, 227, 792–800, 1995.

D'IMPERIO LIMA, M. R.; et al. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Immunol**, 15:201-203, 1985.

D'IMPERIO LIMA, M. R; et al. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. **J Immunol**, 137: 353-356, 1986.

DANIELS, M. A.; et al. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. **Immunity** 15: 1051–1061, 2001.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Res.**, 12: 1013-25, 2002.

DEFRANCO, A.L.; LOCKSLEY, R.M.; MIRANDA, R. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. EUA: **New Sci. Press Ltd.** p. 113, 2007.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Ver. Soc. Brás. Med. Trop.**, 39(4): 370-375, 2006.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97: 603-612, 2002.

DIVISION OF PARASITIC DISEASES (DPDx), Center of disease control and prevation American Tripanosomiasis. (CDC). Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/trypanosomiasisameirican.htm>. Acessado em 28/01/2014.

DOSREIS, G.A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Today**, 13: 335-342, 1997.

DOSREIS, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma Cruzi*, the etiological agente of Chagas disease. **Braz. J. Biol. Res.**, 44(2): 84-90, 2011.

DRISCOLL, J.; et al. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. **Nature**, 365(6443):262–264, 1993.

DUBIEL, W.; et al. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. **J. Biol. Chem.**, 267: 22369-22377, 1992.

DUTRA, W.O.; et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol** doi: 10.1111/pim.12107, 2014.

EL BOUHDIDI, A.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic both hypergammaglobulinemia and parasite-specific response involving high levels of IgG2a and highly avid IgG1 antibodies. **Parasite Immunol**, 16:69-76, 1994.

EL-SAYED, N. M.; et al.. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Sci**, 309, 404–409, 2005.

FARIA, L.O. **Expressão de Imunoproteossoma em células infectadas com *Trypanosoma cruzi***. Tese de doutorado, Pós Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2008.

FARIA, L.O.; LIMA, B.D.; MARTINS-DE-SÁ, C. Trypanosoma cruzi: Effect of the infection on the 20S proteasome in non-immune cells. **Exp. Parasitol.**, 120 261-268, 2008.

FEHLING, H.J.; et al. MHC Class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. **Science** 265: 1234–1237, 1994.

FERNANDES, M.C.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol. Rev.**, 36: 734-747, 2012.

FICHERA, L.E.; et al. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. **Infect Immun**, 72:359–363, 2004.

FREIRE-DE-LIMA, L.; et al. *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8⁺ T cell responses. **J. Biol. Chem.** 285, 13388–13396, 2010.

FREITAS, L. M.; et al. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. **PLoS ONE** 6, 25914. doi: 10.1371/journal.pone.0025914, 2011.

FRUH, K.; et al. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. **EMBO J.**, 13 (14): 3236-44, 1994.

GACYNSKA, M; ROCK, K.L.; GOLDBERG, A.L. Gamma interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis. **Nat.** 363, 262–264, 1993.

GARG, N.; NUNES, M.P.; TARLETON, R.L. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. **J. Immunol.**, 158: 3293-3302, 1997.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host-parasitism. **Nat Rev Immunol**, 6(12): 895–906, 2006.

GAZZINELLI, R.T.; et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, 22:2501–2506, 1992.

GEORGOPOULOS, N.T.; PROFFITT, J.L.; BLAIR, G.E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncol.**, 19: 4930-4935, 2000.

GLICKMAN, M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol. Rev.**, 82: 373-428, 2002.

GOLDBERG, A.L.; ROCK, K.L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. **Nat.**, 357: 375-379, 1992.

GRAFF, N.; et al. PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, 41: 926-935, 2011.

GROETTRUP, M.; et al. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. **Immunol. Today**, 17(9): 429-435, 1996.

GROETTRUP, M.; KIRK, C.J.; BASLER, M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? **Nat. Rev. Immunol.** 10: 73–78, 2010.

GROLL, M., et al. A gated channel into the proteasome core particle. **Nat. Struct. Biol.**, 7(11):1062–1067, 2000.

GROLL, M., et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. **Nat.** 386(6624): 463–471, 1997.

GROLL, M.; HUBER, R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. **Internat. J. Biochem.**, 35: 606-616, 2003.

GROSSI DE SÁ, M.F.; et al. Cytolocalization of prosomes as a function of differentiation. **J. Cell Sci.** 89, 151–165, 1988.

HAHN, Y.S.; YANG, B.; BRACIALE, T.J. Regulation of antigen processing and presentation to class I MHC restricted CD8+ T lymphocytes. **Immunol. Rev.**, 151: 31-49, 1996.

HALL, B. F.; et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J. Exp. Med.** 176: 313–325, 1992.

HALL, B. F.; JOINER, K. A. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. **J. Eukaryot. Microbiol.** 40: 207–213, 1993.

HALL, B.F.; JOINER, K.A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. **Parasitol. Today**, 12, A22–A27, 1991.

HEINK, S.; et al. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 102(26):9241–9246, 2005.

HENDIL, K.B. The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells. **Biochem. Int.**, 17, 471–477, 1988.

HERWALDT, BL. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinic. Microbiol. Rev.**, 14(4): 659-688, 2001.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Humoral and cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and disease. In: Chagas' disease and the nervous system. **Sci. Publi.** 547: 273-283, 1994.

HU, Z.; et al. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. **J Virol** 73: 7231–7240, 1999.

HUMBARD, M. A; MAUPIN-FURLOW, J. A. Prokaryotic proteasomes: nanocompartments of degradation. **J Mol Microbiol Biotechnol**, 23(4-5): 321-334, 2013.

HUNTER, C.A.; et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 158: 3311-3316, 1997.

JACKSON, M.R.; NILSSON, T.; PETERSON, P.A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. **EMBO J.** 9, 3153–3162, 1990.

JENNINGS, S.R.; et al. Effect of herpes simplex virus types 1 and 2 on surface expression of class I major histocompatibility complex antigens on infected cells. **J. Virol.** 56: 757–766, 1985.

JOERIS, T.; et al. The Proteasome System in Infection: Impact of b5 and LMP7 on Composition, Maturation and Quantity of Active Proteasome Complexes. **PLoS ONE**, 7(6): e39827. doi:10.1371/journal.pone.0039827, 2012.

KHAN, S.; et al. A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. **J Virol** 78: 1831–1842, 2004.

KHU, Y.L.; et al. Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoproteasome, and affects its proteasome activity. **Biochem. J.** 384: 401–409, 2004.

KING, N.J.; KESSON, A.M. Interferon-independent increases in class I major histocompatibility complex antigen expression follow flavivirus infection. **J. Gen. Virol.** 69: 2535–2543, 1988.

KING, N.J.; SHRESTHA, B.; KESSON, A.M. Immune modulation by flaviviruses. **Adv. Virus Res.** 60: 121–155, 2003.

KIPNIS, T. L.; KRETTLI, A. U.; DIAS DA SILVA, W. Transformation of trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. **Scan. J. Immunol.**, 22(2): 217-226, 1985.

KIPNIS, T. L.; SUCUPIRA, M.; DIAS DA SILVA, W. Transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote bloodstream forms by immune IgM and its Fabm fragment into activators of the alternative complement pathway. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 20: 105-114, 1987.

KISH-TRIER, E.; HILL, C.P. Structural biology of the Proteasome. **Annu. Rev. Biophys.** 42, 2013.

KLOETZEL, P.M. Antigen processing by the proteasome. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2, 179–187, 2001.

KOHONEN-CORISH, M.R.; BLANDEN, R.V.; KING, N.J. Induction of cell surface expression of HLA antigens by human IFN- γ encoded by recombinant vaccinia virus. **J. Immunol.** 143: 623–627, 1989.

KRAUS, E.; et al. Augmentation of major histocompatibility complex class I and ICAM-1 expression on glial cells following measles virus infection: evidence for the role of type-1 interferon. **Eur. J. Immunol.** 22: 175–182, 1992.

KUCKELKORN, U.; et al. Incorporation of major histocompatibility complex–encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. **Eur. J. Immunol.** 25(9):2605–2611, 1995.

KUEHN, L.; DAHLMANN, B. Proteasome activator PA28 and its interaction with 20S proteasomes. **Arch. Biochem. Biophys.**, 329(1): 87-96, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nat.**, 227, 680–685, 1970.

LEVITSKAYA, J.; et al. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein–Barr virus nuclear antigen-1. **Nat.**, 375: 685–688, 1995.

LEY, V.; et al. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J. Exp. Med.** 171, 401–413, 1990.

LI, M.O.; FLAVELL, R.A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. **Immunity**, 28: 468-476, 2008.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods.**, 25: 402-408, 2001.

LUPAS, A.; KOSTER, A.J.; BAUMEISTER, W. Structural features of 26S and 20S proteasomes. **Enzy. Prot.**, 47: 252-273, 1993.

MA, C.P.; SLAUGHTER, C.A.; DEMARTINO, G.N. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain) **J. Biol. Chem.**, 267:10515–10523, 1992.

MARCOLIN, N. Mais uma tentativa. Matéria publicada na revista **Pesquisa FAPESP** de setembro de 2009 v. 163, 2009.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol Rev.**, 201:304-371, 2004.

MARTINS DE SÁ, C.; et al. The Prosomes: Ubiquity and Inter-Species Structural Variation. **J Mol Biol.**, 187: 479-493, 1986.

MARTINS, G. A.; et al. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Infec & Immun** 67: 3864-3871, 1999.

MARTINS-MELO, F.R.; et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica.**, 130:167-174, 2013.

MAUPIN-FURLOW, J. A. Archaeal Proteasomes and Sanylation. **Subcell Biochem**, 66: 297-327, 2013.

MAYA, J.D., et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp. Biochem. Physiol.**, 146: 601-620, 2007.

MEISSNER, T.B.; et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 107: 13794–13799, 2010.

MIKAMI, S.; et al. An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors. **Protein Expr Purif.**, 46(2): 348-57, 2006.

MING, M.; et al. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol.** 59: 243–253, 1993.

MINOPRIO, P.M.; et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and -B-cell responses. **Scand J Immunol**, 24:661-668, 1986.

MOODY, A. M.; et al. Developmentally regulated glycosylation of the CD8 α coreceptor stalk modulates ligand binding. **Cell** 107: 501–512, 2001

MOODY, A. M.; et al. Sialic Acid Capping of CD8 β Core 1-O-Glycans Controls Thymocyte-Major Histocompatibility Complex Class I Interaction. **J. Biol. Chem.** 278: 7240–7246, 2003

MULLBACHER, A. Viral escape from immune recognition: multiple strategies of adenoviruses. **Immunol. Cell Biol.**, 70: 59–63, 1992.

MUNOZ FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol.**, 22:301–307, 1992.

NAGAJYOTHI, F.; et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell. Microbiol.**, 14(5): 634-643, 2012.

NANDI, D.; et al. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. **EMBO J.**, 16, 5363–5375, 1997.

NEISIG, A., et al. Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. **J. Immunol.**, 150: 1446-1457, 1995.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 236-243, 1994.

O'FARRELL, P.Z.; GOODMAN, H.; O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell** 12, 1133–1142, 1977.

ORLOWSKI, M.; WILK, S. Catalytic Activities of the 20S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. **Arch. Biochem. Biophys.**, 383(1): 1-16, 2000.

OUAISSI, A.; OUAISSI M. Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. **Arch Immunol Ther Exp.**, 53: 102-114. 2005.

PARODI-TALICE, A.; et al. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **J Mass Spectrom.**, 42: 1422–1432, 2007.

PROFFITT, J.A.; BLAIR, G.E. The MHC-encoded TAP1/LMP2 bidirectional promoter is down-regulated in highly oncogenic adenovirus type 12 transformed cells. **FEBS Lett.**, 400: 141-144, 1997.

RAMOS, P.C., et al. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. **Cell**, 92: 489-499, 1998.

RASSI, A.; JR, RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet.**, 375: 1388–1402, 2010.

RECHSTEINER, M.; REALINI, C.; USTRELL, V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and Class I antigen presentation. **Biochem. J.**, 345: 1-15, 2000.

REVELLI, S.; et al. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, 85(2): 147-50, 1999.

RIVETT, A.J. Proteasomes: Multicatalytic proteinase complexes. **Biochem J.**, 291: 1-10, 1993.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J Parasitol Res**, doi:10.1155/2012/507874, 2012.

ROELSE, J.; et al. Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. **J. Exp. Med.**, 180: 1591-1597, 1994.

ROTEM-YEHUDAR, R.; et al. LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for Class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic Adenovirus 12. **J. Exp. Med.**, 183: 499-514, 1996.

ROTTENBERG, M.E., et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.**, 61(12): 5129-5133, 1993.

RUBIN-DE-CELIS, S. S.; et al. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cell. Microbiol.** 8: 1888–1898, 2006.

SATHLER-AVELAR, R.; et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 104(Suppl. I): 246-251, 2009.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Met.** 9: 671–675, 2012.

SCHRIER, P.I.; et al. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. **Nat.**, 305: 771–775, 1983.

SCHWARZ, K.; et al. Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 α/β , enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic Choriomeningitis Virus T Cell epitope. **J Immunol.**, 165: 768–778, 2000.

SIJTS, E.J., KLOETZEL, P.M. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. **Cell Mol Life Sci.**, 68(9):1491-502, 2011.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folha Clin. Biol.**, 20: 191-207, 1953.

SMITH, D.W.; SUGDEN, B. Potential cellular functions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) of Epstein-Barr virus. **Viruses.**, 11:226–240, 2013.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. **Cell**, 136: 731-745, 2009.

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp Parasitol**, 74:6-56, 1992.

STEINDEL, M.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A.J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciênc. Hoje**, 37 (217): 32-38, 2005.

STRASEN, J.; et al. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clin Res Cardion.**, 103:1-10, 2014.

STUART, K.; et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.**, 118(4): 1301-1310, 2008.

SVS/MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim eletrônico epidemiológico: Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública, 2: 10-11, 2010.

TAMURA, T.; et al. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. **Curr Biol.**, 5: 766-774, 1995.

TANAKA, K. The proteasome: Overview of structure and functions **Proc. Jpn. Acad.**, Ser. B., 85(1): 12-36, 2009.

TANAKA, K.; ICHIHARA, A. Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver. **Biochem Biophys Res Commun.**, 31;159(3):1309–1315, 1989.

TANAKA, K.; ICHIHARA, A. Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver. **Biochem Biophys Res Commun.**, 159: 1309–1315, 1989.

TARDIEUX, I.; et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, 71, 1117–1130, 1992.

TARLETON, R.L. Immune System Recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol.**, 19(4): 430-4, 2007.

TARLETON, R.L.; et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect Immun.**, 62:1820–1829, 1994.

TARLETON, R.L.; et al. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class-I and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int. Immunol.**, 8 (1): 13-22, 1995.

TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; ZHANG, L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 165: 1520-1525, 2000.

TARLETON, R.L.; KUHN, R. E. Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing interleukin 2. **J. Immunol.**, 133(3): 1570-5, 1984.

TOBIBIO, T.; VENTOSO, I. Inhibition of host translation by virus infection in vivo. **PNAS**, 107(21): 9837-9842, 2010.

TOMKO, R.J.J.R.; HOCHSTRASSER M. Order of the proteasomal ATPases and eukaryotic proteasome assembly. **Cell. Biochem. Biophys.**, 60(1-2):13-20, 2011.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and application. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 76(9): 4350-4354, 1979.

TYLER, K.M; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revised. **Int. J. Parasitol.**, 31: 472-81, 2001.

UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. **Immunol Lett** 17(1): 85–89, 1988.

URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease: the how and the why. **J. Mol. Med.**, 77:332-338, 1999.

URBINA, J.A.; DOCAMPO R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, 19: 495-500, 2003.

USTRELL, V.; PRATT G.; RECHSTEINER M. Effects of interferon gamma and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92(2):584–588, 1995.

VAN HALL, T.; et al. Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. **J Exp Med.**, 192: 483–494, 2000.

VAN OVERTVELT, L.; et al. *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8(+) T lymphocytes. **Int. Immunol.**, 14: 1135–1144, 2002.

VANDESOMPELE, J.; et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Gen Biol.**, 3: research0034.1–research0034.11, 2002.

VITELLI-AVELAR, D.M.; et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25High T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin. Exp. Immunol.**, 145: 81-92, 2006.

WHO – World Health Organization (2014) Fact Sheet N°340 – Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em 12 de janeiro de 2014.

WIIT, E.; et al. Characterization of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7 ($\beta 5i$) incorporation into 20S proteasomes. **J. Mol. Biol.**, 301: 1-9, 2000.

YANG, B.; et al. The requirement for proteasome activity in class I major histocompatibility complex antigen presentation is dictated by the length of preprocessed antigen. **J. Exp. Med.**, 183: 1545-1552, 1996.

8 APÊNDICES

A. Tabela de oligonucleotídeos

Tabela 1. *Primers* utilizados nas análises por RT-qPCR

Gene	# acesso	sense 5'-3'	antisense 5'-3'	TA (°C)	Amplicon (pb)
$\alpha 1$	NM_002791.1	CATTTGAACAGACAGTGAA	TAGAGCAACAAGGTGAGC	60	158
$\beta 1i$	NM_002800.4	AGGAGGTCAGGTATATGGA	AATAGCGTCTGTGGTGAA	60	157
$\beta 2i$	NM_002801.2	CCCAAAATCTACTGCTGTG	GTACCTGAAGAGCGTCTG	60	156
$\beta 5i$	NM_004159.4	ATATGTTCTCCACGGGTAG	ATATTGACAACGCCTCCA	60	157
<i>PA28β</i>	NM_002818.2	CTTTTCCAGGAGGCTGAGG	CGGAGGGAAGTCAAGTCA	60	113
<i>HLA-A</i>	NM_002116.7	AAAAGGAGGGAGTTACACTCAGG	GCTGTGAGGGACACATCAGAG	60	69
<i>HLA-B</i>	NM_005514.6	CTACCCTGCGGAGATCA	ACAGCCAGGCCAGCAACA	60	255
<i>HLA-C</i>	NM_002117.5	CACACCTCTCCTTTGTGACTTCAA	CCACCTCCTCACATTATGCTAACA	60	98
$\beta 2M$	NM_004048	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	60	86
<i>TAP1</i>	NM_000593	CTCATGTCCATTCTACCATAGCCAG	ACAGCCCCAAACACCTCTCC	60	116
<i>HPRT1</i>	NM_000194	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	60	94

B. Artigo Científico



Trypanosoma cruzi Infection Down-Modulates the Immunoproteasome Biosynthesis and the MHC Class I Cell Surface Expression in HeLa Cells

Ricardo Camargo¹, Liliam O. Faria¹, Alexander Kloss², Cecília B. F. Favali¹, Ulrike Kuckelkorn², Peter-Michael Kloetzel², Cezar Martins de Sá^{†1}, Beatriz D. Lima^{1*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal, Brazil, ² Institute für Biochimie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Abstract

Generally, *Trypanosoma cruzi* infection in human is persistent and tends to chronicity, suggesting that the parasite evade the immune surveillance by down regulating the intracellular antigen processing routes. Within the MHC class I pathway, the majority of antigenic peptides are generated by the proteasome. However, upon IFN- γ stimulation, the catalytic constitutive subunits of the proteasome are replaced by the subunits $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL-1$ and $\beta 5i/LMP7$ to form the immunoproteasome. In this scenario, we analyzed whether the expression and activity of the constitutive and the immunoproteasome as well as the expression of other components of the MHC class I pathway are altered during the infection of HeLa cells with *T. cruzi*. By RT-PCR and two-dimensional gel electrophoresis analysis, we showed that the expression and composition of the constitutive proteasome is not affected by the parasite. In contrast, the biosynthesis of the $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ immunosubunits, PA28 β , TAP1 and the MHC class I molecule as well as the proteasomal proteolytic activities were down-regulated in infected-IFN- γ -treated cell cultures. Taken together, our results provide evidence that the protozoan *T. cruzi* specifically modulates its infection through an unknown posttranscriptional mechanism that inhibits the expression of the MHC class I pathway components.

Citation: Camargo R, Faria LO, Kloss A, Favali CBF, Kuckelkorn U, et al. (2014) *Trypanosoma cruzi* Infection Down-Modulates the Immunoproteasome Biosynthesis and the MHC Class I Cell Surface Expression in HeLa Cells. PLoS ONE 9(4): e95977. doi:10.1371/journal.pone.0095977

Editor: Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, Brazil

Received: February 21, 2014; **Accepted:** March 31, 2014; **Published:** April 21, 2014

Copyright: © 2014 Camargo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: bdlima@unb.br

† Deceased

Introduction

American trypanosomiasis or Chagas disease is caused by the haemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and affects approximately 7–8 million people worldwide [1]. In humans, *T. cruzi* infection usually develops from an acute phase, characterized by high parasitemia and a robust immune response, to a clinically variable chronic phase. In this phase parasite proliferation is largely contained but the infection is persistent, particularly in the myocardium and smooth muscle, which may lead to the development of cardiac and digestive complications (for a review see [2]).

Although *T. cruzi* exhibits tropism to muscle cells in the mammalian host, the infective forms of the parasite, trypomastigotes, are highly motile and capable to infect different cell types [3]. After invasion, the parasites differentiate into amastigotes, escape from the parasitophorous vacuole to the cytoplasm and begin multiplication by binary fission [4–6]. Once *T. cruzi* has part of its life cycle in the host cell cytoplasm, it is known that in this context parasite antigens may be presented by immune and non-immune cells on surface-expressed major histocompatibility complex (MHC) class I molecules for recognition by CD8⁺ T

lymphocytes [7,8]. In murine models of infection, it has been shown that CD8⁺ T lymphocytes play crucial roles in the control of the *T. cruzi* parasitemia [9,10]. The CD8⁺ T lymphocytes protect the host against *T. cruzi* through their cytolytic activity [11] and their production of interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), two pro-inflammatory cytokines known to be involved in infection control [12,13]. Antigenic peptides presented to CD8⁺ T cells by MHC class I are generated mainly by the action of the proteasome, a multicatalytic complex responsible for the degradation of cytosolic and nuclear proteins generally polyubiquitylated. In the immune context, the proteasomes acting with downstream aminopeptidases generate peptide fragments of a size appropriate for transport by the transporter associated with antigen presentation (TAPs) into the endoplasmic reticulum for docking to the peptide binding groove of the MHC class I molecule [14–18].

Different types of proteasomes varying catalytic subunits and regulatory complexes are known in eukaryotes. The core 20S standard proteasome is a barrel-shaped particle composed of four heptameric stacked rings. The two outer rings consist of seven different but related α -subunits ($\alpha 1$ – $\alpha 7$). They provide the proteasome structure, interact with regulatory factors and

complexes, such as the 19S ATP-dependent regulator, and control the access of proteins into the catalytic chamber [19]. The two inner rings are each composed of seven different β subunits ($\beta 1$ – $\beta 7$). The 20S standard proteasome has three major proteolytic activities defined as caspase-, trypsin- and chymotrypsin-like, with the corresponding catalytic sites being assigned to the subunits $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$, respectively [20]. In some cells of hematopoietic system, or during an immune response after IFN- γ or TNF- α stimulation, these three constitutively expressed subunits are replaced by the inducible subunits $\beta 1i$ /LMP2, $\beta 2i$ /MECL-1, and $\beta 5i$ /LMP7 to form the so-called immunoproteasome [21,22]. The IFN- γ also induces the synthesis of the proteasome activator proteins PA28 α and PA28 β , components of the 11S regulatory complex [23–25]. The subunit replacements and the association of the 11S regulator to at least one end of the 20S core alter the cleavage pattern of the proteasome, optimizing the generation of small peptides for loading on the groove of MHC class I molecules [25–27]. These changes are also related to increase the production of immunogenic peptides compared to standard proteasome [28,29].

Evidence of the significance of immunoproteasome in antigen processing came from studies showing that the overexpression of $\beta 1i$, $\beta 2i$, and $\beta 5i$ in cell lines enhanced the presentation of different viral epitopes, such as the NP118 epitope of the lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein [30] or an epitope derived from the GagL protein of Moloney murine leukemia virus [31]. In addition, the deficiency in the immunosubunits $\beta 1i$ or $\beta 5i$ reduced the cytotoxic T lymphocyte repertoire and thus the efficiency of the immune response [32–34]. Furthermore, it was also shown that the deletion of $\beta 5i$ decreased the MHC class I cell surface expression by about 25–50% [32,35].

Despite the demonstrated role of CD8⁺ T cells in defense against *T. cruzi* [10,36,37], the parasite persists for many years in the mammalian host, suggesting that *T. cruzi* escapes from the immune system by down-regulating the intracellular antigen processing routes. Given that MHC class I antigen presentation provides the basis for CD8⁺ T cells immunity, we decided to analyze if the expression and the proteolytic activity of the constitutive and the immunoproteasome as well as the expression of other components of the MHC class I pathway are altered during the infection of HeLa cells with the protozoan *T. cruzi*. Here, we report that the $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ immunosubunits as well as PA28 β , TAP1 and the MHC class I molecule have their synthesis suppressed on the infected-IFN- γ -treated cell cultures. The proteasomal proteolytic activities were also affected by the infection. We demonstrate that this effect is not through general inhibition of the response to IFN- γ , but due to an unknown posttranscriptional regulation imposed by the parasite. Thus, our results bring new knowledge and insights about the mechanisms related to *T. cruzi* persistency, antigen presentation and immunopathogenesis. This could potentially have an impact on vaccines strategies and drugs development.

Materials and Methods

Cell lines and parasite cultures

HeLa, a human epithelial carcinoma non-immune cell line, was cultivated in standard DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium – Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Gibco, Life Technologies), 100 μ g/mL ampicillin (Sigma-Aldrich) and 100 μ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

The Y strain of *T. cruzi* [38] was used in all experiments. Trypomastigotes were grown and purified from cultures of a rat myoblast cell line (L6) as previously described [39].

In vitro infection of cells with *T. cruzi* and IFN- γ treatment

Monolayers of HeLa (8×10^4 cells/cm²) were obtained 24 h after plating 4×10^4 cells/cm² in DMEM-10% FBS on 80 cm² flasks. Trypomastigotes were incubated with HeLa cells at 37°C for 24 h or longer at a parasite-host cell ratio of 40:1. At this ratio, 80–100% of the host cells presented amastigotes inside their cytoplasm after 24 h of parasite inoculation [40].

For induction of the proteasome immunosubunits as well as TAP1 and MHC class I molecule, cells were incubated with 90 U/mL of recombinant human IFN- γ (Calbiochem) for 24 h before or 24 h after the infection with *T. cruzi*.

After each treatment, cells were washed twice in PBS, detached with trypsin-versene solution (0.05% trypsin, 1 \times PBS, 2 mM EDTA), washed three times with cold PBS, and collected for proper processing and analysis.

Experimental model

In order to study the effect of *T. cruzi* infection on the intracellular antigen processing routes in non-immune cells, HeLa cells were cultivated in five different conditions described as follows. First, cells were cultured without any treatment (designated as control). Second, cells were stimulated for 24 h with IFN- γ (named as IFN- γ). Third, cells were infected for 24 h with *T. cruzi* (Tc). Fourth, HeLa cells were previously infected with *T. cruzi* for 24 h and subsequently treated with IFN- γ for 24 h (Tc \rightarrow IFN- γ). Fifth, cells were initially stimulated with IFN- γ for 24 h and then infected with *T. cruzi* for 24 h (IFN- γ \rightarrow Tc). With this experimental model we simulated three distinct moments in an infection with *T. cruzi*: (a) invasion without immune response (Tc); (b) invasion with subsequent immune response (Tc \rightarrow IFN- γ); (c) invasion in an environment with an established immune response (IFN- γ \rightarrow Tc). This model was used throughout all the experiments, except in specified cases.

RT-PCR and RT-qPCR Analyses

For semi-quantitative RT-PCR and quantitative real-time RT-qPCR analyses the RNA samples were isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of the isolated RNA was determined using a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific) and 1% agarose gel electrophoresis. For cDNA synthesis, 2 μ g of total RNA were pre-treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega) and transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions.

For semi-quantitative RT-PCR, two microliters of cDNA were used for amplification in 30 μ L PCR reaction containing 0.1 mM dNTPs (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 1 \times PCR Buffer, 1.5 U Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen) and 0.3 (μ M of each primer) (genes of proteasome)/0.1 (*GAPDH*) μ M of each primer. The proteasomal and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) primers were used for simultaneous amplification in one reaction tube. PCR conditions were as follows: 94°C/1 min; 94°C/30 s, 56°C/30 s, 72°C/40 s–30 cycles; 72°C/1 min. Ten microliters of the PCR products were analyzed in 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide.

Real-time RT-qPCR reactions (final volume of 10 μ L) contained 1 \times fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems), 0.25 μ M forward-primer, 0.25 μ M reverse-primer and 4 μ L cDNA diluted 1:10 in UltraPure Water (Ambion). The amplifi-

cation was performed on StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), and SDS 2.3 software (Applied Biosystems) and Excel 2010 software (Microsoft) were used for data analysis and graphing, respectively. The expression of *GAPDH* and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) were used together as reference genes. The relative expression was calculated based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [41], and the calibrator used was the IFN- γ treatment.

All primers used in semi-quantitative RT-PCR analysis are described in Ref. [40]. Primers used in real-time RT-qPCR for amplification of *GAPDH*, *HPRT1* and for the small subunit of the MHC class I molecule called β 2-microglobulin (β 2M) are described in Ref. [42]. Primers for the three human MHC class I alpha chain alleles, which are also called human leukocyte antigens (HLA) –A, –B and –C, are described in supporting information of Ref. [43]. The following primers were used in real-time RT-qPCR for amplification of immunoproteasome subunits and *TAP1*. mRNA accession numbers are indicated.

α 1: fwd 5'-CATTGGAACAGACAGTGGAA-3', rev 5'-TAGAGCAACAAGGTGAGC-3'; NM_002791.1.

β 1i: fwd 5'-AGGAGGTCAGGTATATGGA, rev 5'-AATAGCGTCTGTGGTGAA-3'; NM_002800.4.

β 2i: fwd 5'-CCCAAAATCTACTGCTGTG-3', rev 5'-GTACCTGAAGAGCGTCTG-3'; NM_002801.2.

β 5i: fwd 5'-ATATGTTCTCCACGGGTAG-3', rev 5'-ATATTGACAACGCCTCCA-3'; NM_004159.4.

PA28 β : fwd 5'-CTTTTCCAGGAGGCTGAGG-3', rev 5'-CGGAGGGAAGTCAAGTCA-3'; NM_002818.2.

TAP1: fwd 5'-CTCATGTCCATTCTCACCATAGCCAG-3', rev 5'-CAGCCCCAAACACCTCTCC-3'; NM_000593.

Metabolic radiolabelling, immunoprecipitation, and two-dimensional gel electrophoresis

HeLa cells in standard culture conditions were exposed to *T. cruzi* (40 parasites per HeLa cell) and cultured for 24 h. In the twenty-first hour of culture, DMEM was replaced by methionine-deficient DMEM (Gibco, Life Technologies) and pulse chase was carried out with 100 μ Ci of [35 S] methionine per mL (GE Healthcare Life Sciences). Cells were labeled for 3 h and then washed with PBS, harvested, and lysed on ice with 1% Triton X-100 in PBS in the presence of a protease inhibitor cocktail (Roche). The lysate was clarified by centrifugation at 15,000 g for 15 min at 4°C. The incorporation of radioactivity was determined by liquid scintillation counting (Beckman LS 7000) and the protein content was measured by Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad) [44]. For proteasome immunoprecipitation, equal counts or 100 μ g total lysates were incubated with mAb against human proteasome (p23K, p25K, p33K p27K, p29K and p31K) [45] and processed as described by Jackson et al. (1990) [46]. Immune complexes were precipitated using protein G-Sepharose beads (Fluka) and centrifugation. After extensive washing, immunoprecipitates were resuspended in a non-equilibrium pH gradient electrophoresis sample buffer and subjected to a two-dimensional gel electrophoresis using Ampholines pH 3.5–10 [47]. SDS-PAGE and radiography were carried out as previously described [48,49]. The radiographs were scanned and the spots intensities determined in the Image Master Platinum software version 5.0 (Amersham, GE Healthcare Life Sciences). The control culture was subjected to the same described procedures. The identification of spots was performed by comparing the obtained images with proteomic human 20S proteasome data from Claverol et al. (2002) [50].

Preparation of protein extracts

Protein extracts used in western blots and proteasome activity assays were both obtained by cell lysis in hypotonic buffer by sonication. Briefly, the cell pellet collected from the cell cultures was resuspended in 300 μ L of cold hypotonic buffer (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂) supplemented with protease inhibitors (Roche) and incubated on ice for 5 min. Next, cells were lysed by sonication using an Ultrasonic Processor (Model GE 50T) in ice bath, 4 pulses of 20 s with intervals of 60 s in a range of 80%. The extracts were clarified by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4°C. The protein concentration was determined by Bio-Rad Protein Assay reagent (Bio-Rad) and then the extracts were stored at –80°C until use.

Western Blotting

Equal amounts of total protein extracts (25–50 μ g per lane) were separated on 13% SDS-PAGE gels and transferred to Immobilon-FL PVDF membranes as previously described [51]. Following protein transfer, membranes were blocked in 5% non-fat milk in TBS (25 mM Tris HCl pH 7.4, 137 mM NaCl) and incubated sequentially with primary and HRP-conjugated secondary antibodies. Results were visualized using ECL *plus* reagent (GE Healthcare Life Sciences) and radiography.

Rabbit polyclonal antibodies against β 1i/LMP2, β 5i/LMP7 and mouse monoclonal anti-MHC class I antibody (W6/32) were obtained from Abcam. Anti-MHC class I antibody recognizes the W6/32 antigenic determinant common to HLA-A, –B and –C of the human major histocompatibility complex. Mouse anti-PA28 β was obtained from Cell Signaling and mouse anti-TAP1 from Rockland. Rabbit polyclonal antibodies anti-human β 2i/MECL1 (K223) and α 6/MCP20 were kindly provided by the Institute for Biochemistry, Humbolt University, Charité, Berlin. Mouse polyclonal antiserum anti-human α 1 was obtained previously [45]. Mouse anti-*T. brucei* α -tubulin was obtained from Sigma-Aldrich and was used to recognize *T. cruzi* α -tubulin properly. Secondary antibodies were obtained from Biomol.

Proteasome activity assay

The measurement of the proteasome proteolytic activity was performed using the Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like, Trypsin-Like and Caspase-Like kits from Promega. The luminescent substrates Z-LRR-aminoluciferin, Suc-LLVY-aminoluciferin e Z-nLPnLD-aminoluciferin, used to measure the trypsin-, chymotrypsin- and caspase-like activity, respectively, were prepared according to the manufacturer's protocol. Assays were performed at 25°C in opaque white 96-well plates and quantified by spectrophotometer (Spectra Max M5– Molecular Devices). To each well was added 1 μ g of protein extract diluted in 10 mM HEPES (pH 7.6). The proportion of sample and reagents (v/v) was always 1:1 in a final volume of 50 μ L. The specific activity of proteasome was estimated, for each treatment and substrate, through samples treated with the proteasome inhibitor MG-132 (50 μ M per well) (Sigma Aldrich). Thus, the result of subtracting the intensity of luminescence of samples without MG-132 from those treated with the inhibitor refers only to proteasome activity.

Flow cytometry and Immunofluorescence microscopy

HeLa cells were grown, treated and collected as described above. After counting, 1×10^6 cells were blocked in 0.1% BSA for 15 min and incubated 30 min on ice with mouse anti-HLA class I antibody (W6/32) (Santa Cruz Biotechnologies) (1 μ g Ab/ 10^6 cells). Next, cells were washed in cold PBS and stained 30 min with PE-labelled anti-mouse antibody (Santa Cruz Biotechnolo-

gies) (0.5 μg Ab/ 10^6 cells). Then, cells were washed and fixed in cold 1% paraformaldehyde in PBS. Flow cytometry was performed in FACSVerse (BD Biosciences) and the data analyzed in the BD FACSuite software (BD Biosciences). From each sample were acquired 2×10^4 events and the MHC class I cell surface density was determined as median fluorescence intensity (MFI). For immunofluorescence microscopy, an aliquot from the same stained cells samples were mixed (1:1) with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen), applied on a slide and covered with a coverslip. Prior to microscopy analysis, slides were incubated for 24 h in a dark room and then analyzed in the TCP SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

Densitometry

The densitometric analysis were done using ImageJ software version 1.47 [52]. For quantification of the semi-quantitative RT-PCRs, the intensities of bands related to proteasome amplicons were normalized to the expression of the control gene (*GAPDH*). In the case of western blots, the experiments were normalized to the signal of the constitutive subunits $\alpha 1$ or $\alpha 6$.

Statistics

All values presented in figures throughout the manuscript are means \pm standard deviation of biological replicates. The number of replicates of each experiment is indicated in the figure legend. The significance of the results was determined by unpaired, two-tailed t-test and the indicated significance levels in the graphs are: ns – not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. All graphs and statistical analysis were performed in Excel 2010 software (Microsoft).

Results

The expression and composition of standard proteasome are not altered by *T. cruzi* infection

Initially, we investigated whether *T. cruzi* affects the expression of HeLa constitutive proteasome. The mRNA levels of the $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$ subunits were determined by semi-quantitative RT-PCR analysis. As shown in figures 1A and 1B, the expression of these proteasomal subunits was not altered by the parasite. Thus, *T. cruzi* infection seems to have no effect on transcription of the constitutive proteasome genes. Furthermore, IFN- γ treatment also did not change these mRNA levels.

Next, at the protein level, we examined the impact of *T. cruzi* infection on constitutive proteasome composition. Immunoprecipitations of *in vitro* labeled proteasomes of infected or not infected HeLa cells were performed and analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. The identification of spots was performed using as reference the two-dimensional electrophoretic map of human 20S proteasome described by Claverol et al. (2002) [50]. The abundance of the proteasome subunits and their composition pattern were practically identical between infected and uninfected cells (Fig. 1C–D). Taken together, the results of mRNA and protein expression indicate that the biogenesis of the constitutive proteasome is not affected by the parasite *T. cruzi*. These data are consistent with our previous results [40].

Analysis of immunoproteasome mRNA levels during *T. cruzi* infection

In order to assess the effect of *T. cruzi* infection on immunoproteasome synthesis, we determined by semi-quantitative RT-PCR analysis the mRNA levels of the catalytic immunosubunits $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$ (Fig. 2A–B). As expected, treatment of HeLa cells with IFN- γ induced the expression of the β -immunosubunits

(lane IFN- γ). However, this induction was not affected by *T. cruzi* infection, regardless of the order of parasite inoculation and IFN- γ treatment (Tc \rightarrow IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc). It is important to note that in HeLa cells the subunits $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$ have a discrete basal expression, which is also not affected by infection (control and Tc).

To refine the mRNA quantification and determine accurately its relative abundance, we performed real-time RT-qPCR experiments (Fig. 2C). In addition to analyzing the expression of the $\alpha 1$, $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$ subunits, we included the regulatory subunit PA28 β . The calibrator used was the “IFN- γ ” condition (HeLa treated 24 h with IFN- γ); therefore, all values shown in the graphs are relative to “IFN- γ ” gene expression. Independent of infection, induction of transcription of the $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ subunits and also PA28 β was observed after IFN- γ treatment. But, due to the higher resolution and greater sensitivity of the RT-qPCR technique, we noticed that after IFN- γ stimulation the mRNA levels of the infected cells were significantly lower than those of uninfected cells (Fig. 2C, Tc \rightarrow IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc compared to IFN- γ). In these cell cultures, mRNA expression was decreased by up to 40% for $\beta 1i$, 32% for $\beta 2i$, 50% for $\beta 5i$ and 33% for PA28 β . Even though the immunoproteasome expression was different from IFN- γ -treated uninfected cells the abundance of these transcripts was similar in both treatments (Tc \rightarrow IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc). Relative quantification of the $\alpha 1$ subunit showed no difference between the five treatments. Its mRNA levels were not altered by IFN- γ treatment or by *T. cruzi* infection.

T. cruzi infection prior to IFN- γ -treatment prevents the biosynthesis of HeLa immunoproteasome

Since we have shown that the parasite has an impact on the transcription of IFN- γ -inducible subunits, it was of interest to evaluate the immunoproteasome protein levels during infection. For this purpose, western blot analysis was performed using antibodies against $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ and PA28 β . Consistent with our previous results (Fig. 1C–D), the expression of the $\alpha 6$ subunit was not influenced by infection or by IFN- γ treatment (Fig. 3A). Under IFN- γ stimulation, the protein levels of uninfected HeLa cells (lane IFN- γ) doubled for $\beta 2i$ and PA28 β and were ten times greater for $\beta 1i$ and $\beta 5i$ when compared to control. These levels remained the same or were a little higher when cells were treated with IFN- γ and subsequently infected with *T. cruzi* (IFN- γ \rightarrow Tc). Interestingly, cells that were first infected with *T. cruzi* and then treated with IFN- γ (Tc \rightarrow IFN- γ) exhibited the protein levels of the immunosubunits close to the control. We also observed that HeLa possesses a discrete basal expression of $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ and PA28 β , however, these levels were slightly reduced with *T. cruzi* infection (Tc). It is important to note that once induced by IFN- γ , the protein levels of these subunits remained unchanged in the presence of the parasite (IFN- γ \rightarrow Tc). Thus, these data suggest that *T. cruzi* does not degrade the immunosubunits and PA28 β , but blocks their biosynthesis, given that the mRNAs levels of infected and IFN- γ treated cultures (Tc \rightarrow IFN- γ) are similar to those of treated and infected cultures (IFN- γ \rightarrow Tc) (Fig. 2). In other words, *T. cruzi* infection prior to IFN- γ -treatment prevents the induction of immunoproteasome subunits.

From these findings one important question arose: could time of infection and, consequently, parasite density influence the genesis of this inhibitory mechanism? This question emerged because in the experimental condition “Tc \rightarrow IFN- γ ”, in which immunoproteasome biosynthesis was inhibited, the infectious process lasted 48 h in total, whereas in “IFN- γ \rightarrow Tc” it lasted 24 h. Knowing that cell invasion and amastigote replication, factors that increase parasite density, are directly related to time of infection, we

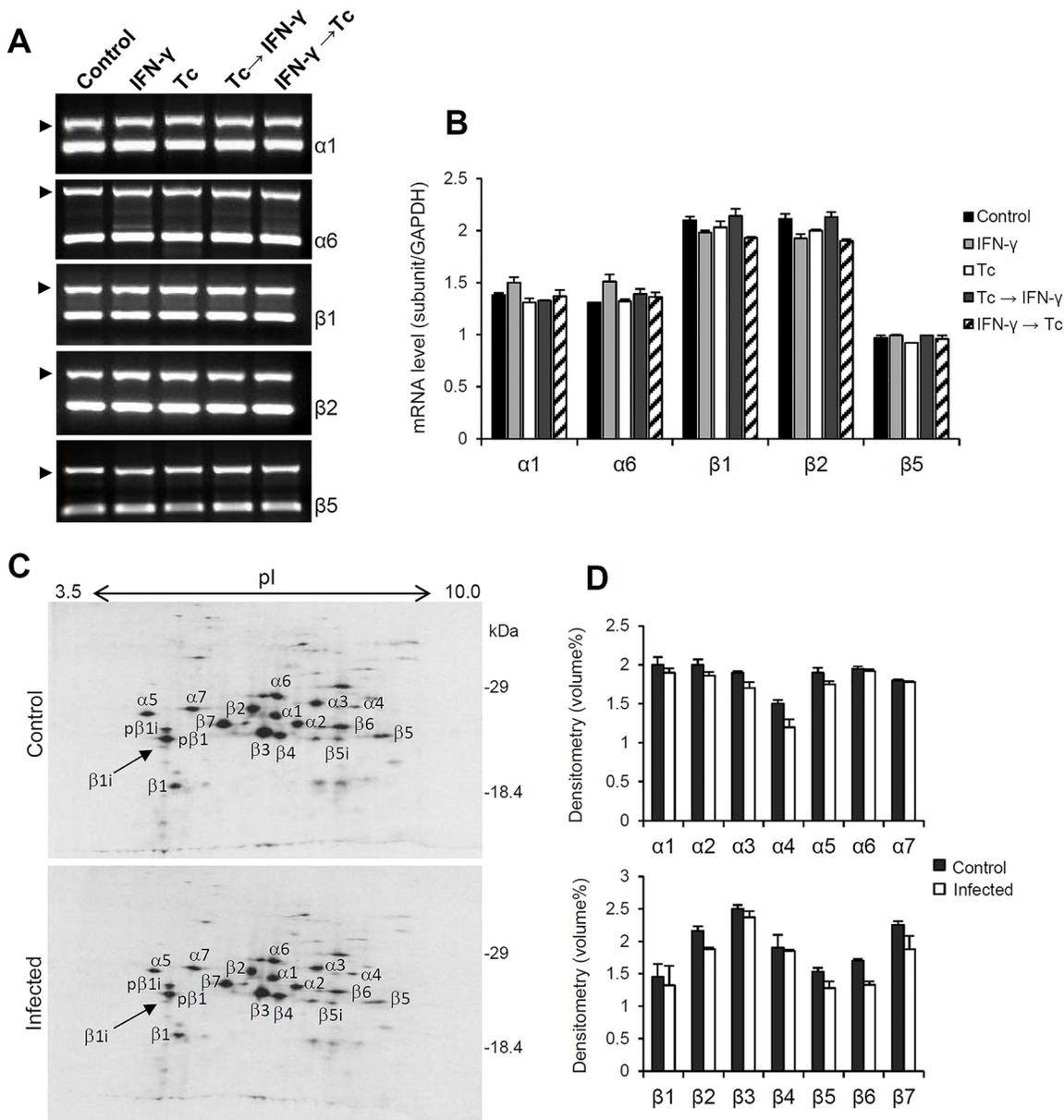


Figure 1. Analysis of mRNA levels and protein composition of HeLa constitutive proteasome during *T. cruzi* infection. Semi-quantitative RT-PCR analysis of $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$ expression were done using total RNA from HeLa cells treated with IFN- γ and/or infected with *T. cruzi*. (A) The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide. The reactions were carried as duplex-PCR, using *GAPDH* as internal control (arrows). (B) mRNA levels were determined by densitometry and plotted using the expression of *GAPDH* as normalizer. Each value represents the mean \pm standard deviation of three individual experiments. (C) Two-dimensional gels of immunoprecipitated proteasomes from HeLa uninfected and infected with *T. cruzi*. HeLa cells in standard culture conditions were exposed or not to *T. cruzi* and cultured for 24 h. In the twenty-first hour of culture, cells were metabolically labeled with [³⁵S]-methionine for three hours. Cell lysates (100 μ g) were immunoprecipitated with anti-human proteasome antibodies and analyzed by two-dimensional electrophoresis. Panel D show the protein levels of proteasome α and β subunits quantified by densitometry. Each value represents the mean \pm mean deviation of two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0095977.g001

performed experiments where HeLa cells were stimulated with IFN- γ for 24 h before being infected for 24 h, 48 h and 72 h. As control, cells were treated with IFN- γ for 24 h and left in culture for 48 h or 72 h. Cell lysates were analyzed by western blot using antibodies against PA28 β and $\alpha 1$ subunit. These two proteins were chosen because the mechanism of inhibition acted upon PA28 β expression, but not upon $\alpha 1$. Since $\alpha 1$ subunit expression was not

affected by infection neither by IFN- γ -treatment, it was used as normalizer.

First, we observed that in the induced controls (IFN- γ : 48 h and 72 h) the PA28 β protein level increased and did not change over 72 h after IFN- γ stimulation (Fig. 3C–D). According to protein turnover studies, the proteasome subunits, as well as the complex itself, have half-lives larger than two days, reaching up to 15 days depending on the cell type and tissue analyzed [53–56]. The

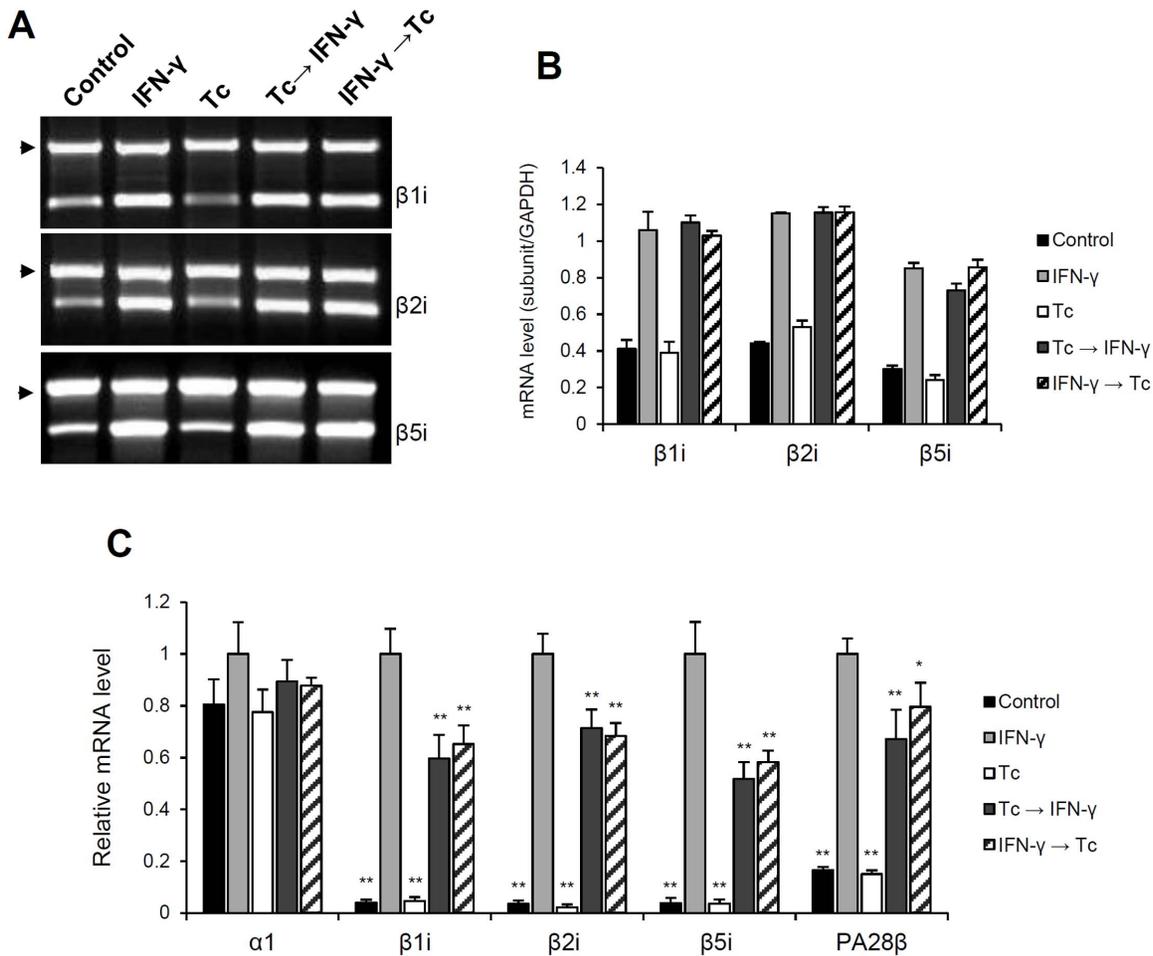


Figure 2. Analysis of immunoproteasome mRNA levels during *T. cruzi* infection. Semi-quantitative RT-PCR analysis of $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$ expression were done using total RNA from HeLa cells treated with IFN- γ and/or infected with *T. cruzi*. (A) The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gels stained with ethidium bromide. The reactions were carried as duplex-PCR, using *GAPDH* as internal control (arrows). (B) mRNA levels were determined by densitometry and plotted using the expression of *GAPDH* as normalizer. Each value represents the mean \pm standard deviation of three individual experiments. The abundance of $\alpha 1$, $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ and PA28 β mRNAs were also determined by real time RT-qPCR. The relative expression of the transcripts was calculated by normalization with *GAPDH* and *HPRT1* housekeeping genes using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. (C) The mRNA levels were plotted relatively to “IFN- γ ” experimental condition (HeLa treated 24 h with IFN- γ). Each value represents the mean \pm standard deviation of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0095977.g002

expression of PA28 β observed in the control was similar to the cultures infected with *T. cruzi*. They did not show any decay up to 72 h. Thus, we conclude that longer time of infection (with consequent increase in cytoplasmic parasite density) is not related to triggering the inhibitory phenomenon observed in figure 3A and is probably due to the presence of the parasite before the IFN- γ stimulation.

T. cruzi infection alters the proteolytic activity of the host proteasome.

Knowing that the 20S proteasome has three major proteolytic activities, defined as chymotrypsin-, trypsin- and caspase-like, we evaluated its catalytic profile during infection in order to relate the expression of the immunosubunits with the magnitude of their activities, especially in the intriguing case of the “Tc \rightarrow IFN- γ ” experimental condition. To this end, enzymatic assays were performed using cell extracts (Fig. 4A), obtained according to the proposed experimental model, combined with luminogenic substrates specific for each proteasomal activity.

Regarding the chymotrypsin-like activity (Fig. 4B), we observed that after IFN- γ stimulation the hydrolysis of the luminogenic substrate was increased approximately 70% in uninfected cells (IFN- γ). The same value was found in the “IFN- γ \rightarrow Tc” experimental condition. In the “Tc \rightarrow IFN- γ ” condition the catalytic level was close to the control (18% higher), almost returning to basal activity of constitutive and immunoproteasome. In cell cultures only infected with *T. cruzi* (Tc), the peptide hydrolysis decreased about 20% when compared to the control. In the trypsin-like assays (Fig. 4C) the differences between the experimental conditions were not so pronounced as in the chymotrypsin tests. IFN- γ treatment increased 35% the substrate hydrolysis in uninfected cells (IFN- γ) and 40% in IFN- γ -treated-infected cultures (IFN- γ \rightarrow Tc). In the other two treatments (Tc and Tc \rightarrow IFN- γ), values were similar to the control. These results are in agreement with the protein levels shown in figure 3A, suggesting a direct relation between proteolysis and expression of the immunoproteasome subunits responsible for the chymotryptic and tryptic activities. In this particle, chymotrypsin-like activity is

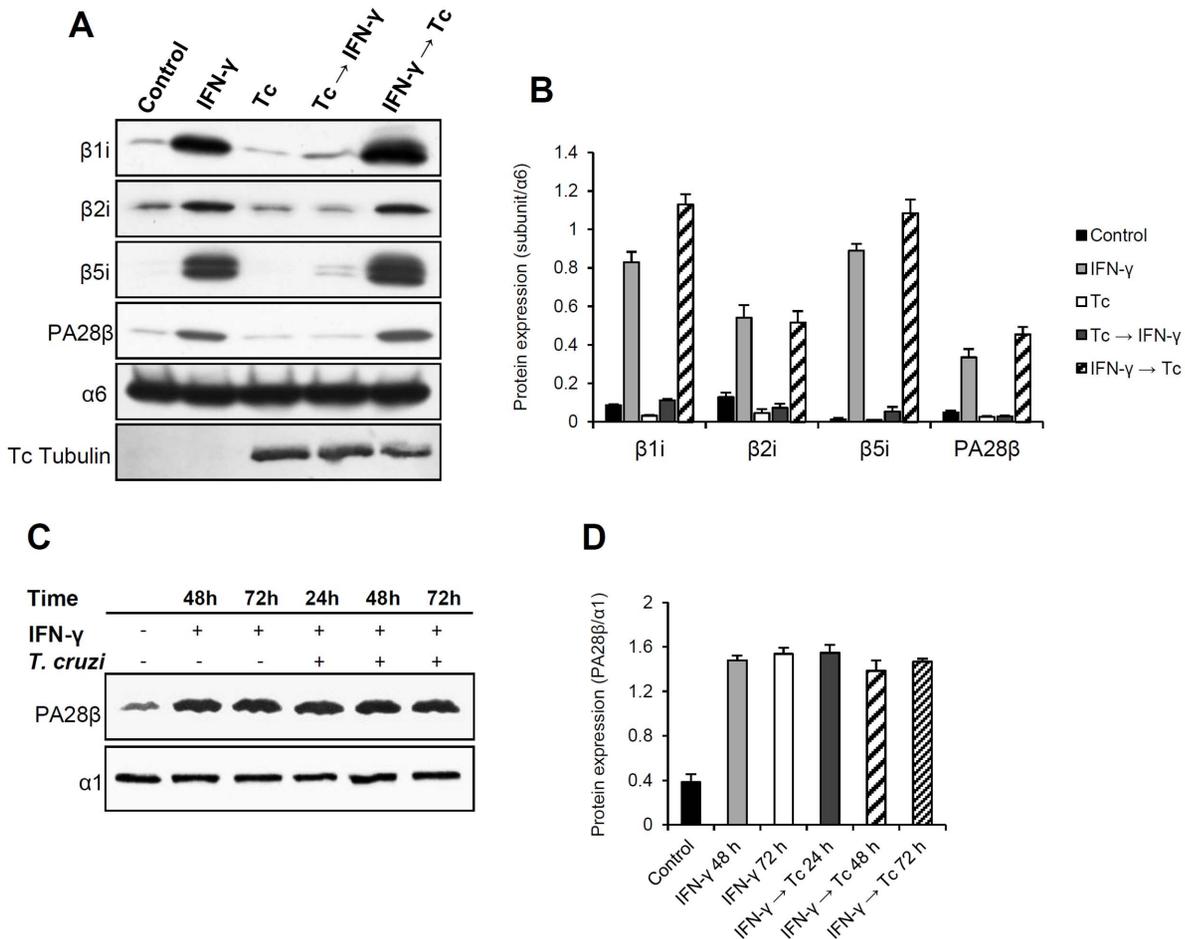


Figure 3. Analysis of immunoproteasome protein expression during *T. cruzi* infection. (A) Lysates (25–50 μ g) of HeLa cells treated with IFN- γ and/or infected with *T. cruzi* were analyzed by western blot using anti-immunoproteasome subunits antibodies as indicated. (B) Protein levels were determined by densitometry and plotted using the expression of $\alpha 6$ subunit as experimental normalizer. Infection was confirmed using anti-tubulin antibody. (C) Western blot analysis of PA28 β expression during different times of infection. HeLa cells were pre-treated with IFN- γ for 24 h and then infected with *T. cruzi* for 24, 48 and 72 h. (D) Protein levels were plotted using the expression of $\alpha 1$ as experimental normalizer. All values in this figure represent mean \pm standard deviation of three individual experiments. doi:10.1371/journal.pone.0095977.g003

assigned to $\beta 1i$ and $\beta 5i$ subunits, and the trypsin-like to $\beta 2i$. As noticed, once immunoproteasome is induced these two catalytic activities increased and were not affected by *T. cruzi* infection (IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc), different from the “Tc \rightarrow IFN- γ ” condition.

In caspase-like assays (Fig. 4D), in the treatments where the immunoproteasome synthesis occurred the substrate hydrolysis were reduced about 20% (IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc). It was expected because after IFN- γ stimulation the $\beta 1$ subunit is replaced by $\beta 1i$ during proteasome neosynthesis. This change increases the proteasomes’ capacity to cleave small peptides after hydrophobic residues instead of cleavage after acidic residues [57]. As observed in figure 1, the expression of $\beta 1$ and its incorporation into mature particles were not altered during *T. cruzi* infection. So, the caspase-like activity was also not affected by the parasite since the peptide hydrolysis levels were similar to the control (lane Tc). In the treatments where the infection suppressed the immunoproteasome synthesis (Tc \rightarrow IFN- γ) the peptide hydrolysis levels were also similar to the control. Thus, we conclude that *T. cruzi* infection does not affect the caspase-like activity, but the induction of the immunoproteasome does.

The expression of TAP1 and MHC class I molecule was also affected by *T. cruzi* infection

Once it was demonstrated that infection with *T. cruzi* prevents the host immunoproteasome biosynthesis, it was of interest to assess the expression of other important components of MHC class I pathway. Thus, we analyzed the MHC class I molecule itself and TAP1 expression. The transcripts were quantified by real-time RT-qPCR and the protein expression determined by western blot (Fig. 5).

Similar to the results obtained for the immunoproteasome, transcription of TAP1, $\beta 2M$ and MHC class I was induced after IFN- γ stimulation independent of the parasite inoculation (Fig. 5A). However, the mRNA levels of infected cells were significantly lower than that of uninfected cells (Tc \rightarrow IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc). Nevertheless, there was induction and the abundance of these transcripts was almost the same in both treatments. Although reduced, these levels were sufficient for a detectable protein expression in the “IFN- γ \rightarrow Tc” experimental condition (Fig. 5B–C). In contrast, the expression of MHC class I molecule and TAP1 in the infected-IFN- γ -treated cultures (Tc \rightarrow IFN- γ) were close to basal levels. So, in our experimental model, TAP1

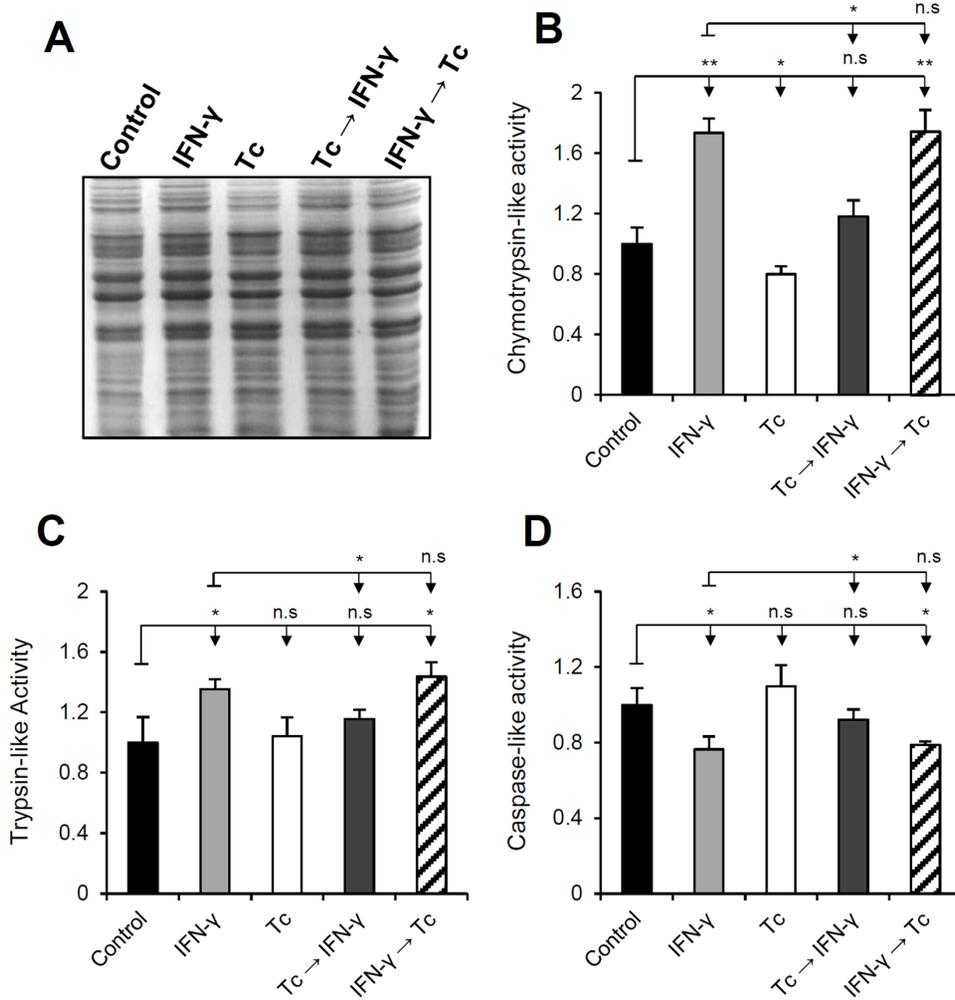


Figure 4. Effect of *T. cruzi* infection on proteasome proteolytic activities. Proteolytic assays were performed using extracts of HeLa cells treated with IFN- γ and/or *T. cruzi*-infected combined with luminogenic substrates specific for chymotrypsin-, trypsin- and caspase-like proteasome activities. The specific activity of the proteasome was estimated, for each treatment and substrate, through samples treated with the proteasome inhibitor MG-132. Mean of luminescence intensities were plotted relatively to the control. Prior to the catalytic assays, cell lysates (20 μ g/lane) were analyzed by SDS-PAGE 13% stained with coomassie blue (A). Gels were used as loading control. (B) Chymotrypsin- (C) trypsin- and (D) caspase-like assays. Each value represents the mean \pm standard deviation of three individual experiments and each sample was analyzed in triplicates. doi:10.1371/journal.pone.0095977.g004

and MHC class I molecule exhibited the same behavior as the immunoproteasome subunits.

To corroborate these results and evaluate the MHC class I cell surface expression, we performed immunofluorescence microscopy and flow cytometry analysis of the five proposed experimental conditions (Fig. 6). To precisely quantify the fluorescence intensity, samples used in microscopy were the same as used in flow cytometry. In addition to anti-MHC class I antibody, cells were stained with DAPI in order to detect the parasites and rate the infection density through microscopy. Consistent with the protein levels observed in the western blot analysis (Fig. 5), cell surface expression of MHC class I molecule was significantly lower (20%) in infected cells (Tc) compared to control (Fig. 6A–B). It was also reduced (40% lower than “IFN- γ ” condition) where the infection occurred before the IFN- γ treatment (Fig. 6A–B, Tc \rightarrow IFN- γ). In the images of this experimental condition (Fig. 6A, Tc \rightarrow IFN- γ) the difference in MHC class I cell surface expression can be easily visualized when comparing the infected cells (highlighted by arrows) to uninfected or poorly infected HeLa cells. But, in cell

cultures where the infection occurred after the IFN- γ stimulation (IFN- γ \rightarrow Tc) the MHC class I surface expression was not affected after 24 h of parasite inoculation. In this condition, as well as in uninfected cells, IFN- γ treatment increased by 48% the amount of MHC class I molecule (Fig. 6B, IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc).

Discussion

Here, we studied the impact of *T. cruzi* infection on the intracellular MHC class I antigen processing routes in HeLa cells. Our results show that the biosynthesis of the immunoproteasome subunits β 1i, β 2i, β 5i as well as PA28 β , TAP1 and MHC class I molecule were down-regulated by the parasite.

Since the generation of cytoplasm-derived antigenic peptides is assigned to both immuno- and standard proteasome, we initially investigated whether *T. cruzi* affects the expression and composition of HeLa constitutive proteasome. We found that infection with *T. cruzi* had no effect on the transcription and protein expression of the constitutive proteasome subunits. In contrast, upon IFN- γ stimulation the mRNA levels of the IFN- γ -inducible

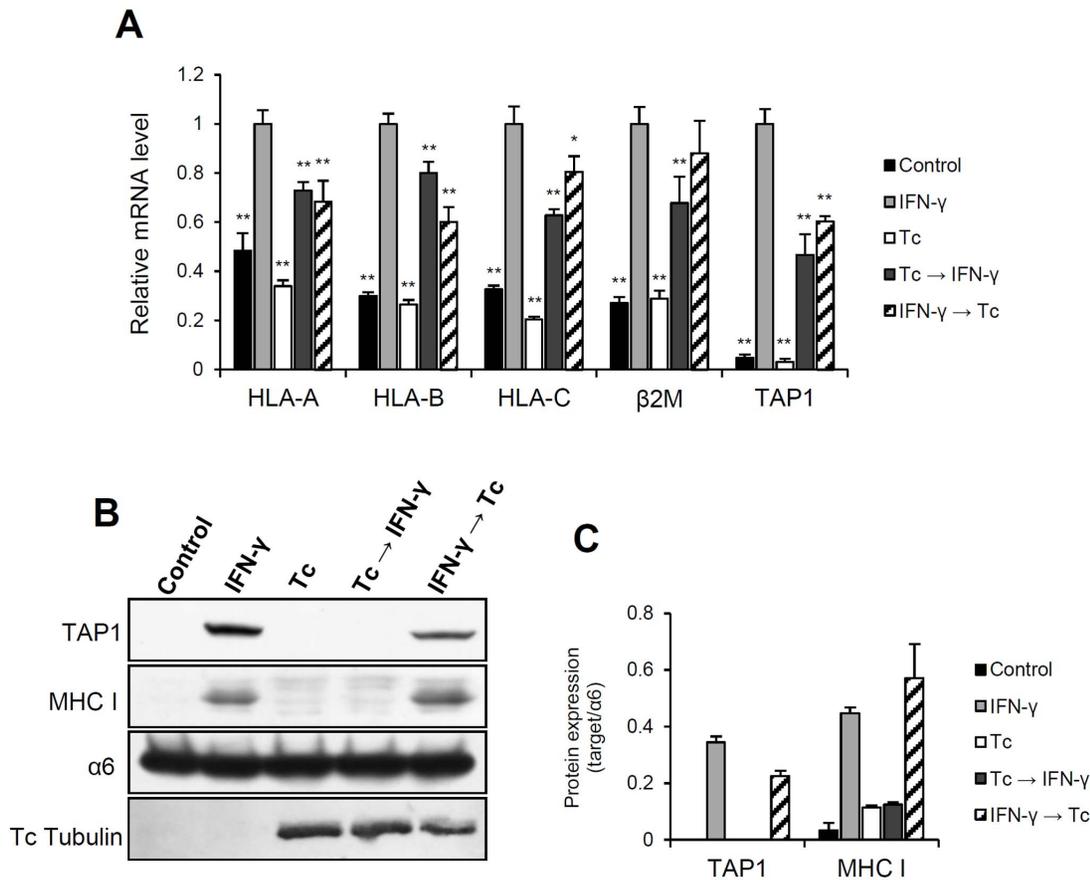


Figure 5. Quantification of mRNA and protein expression of TAP1 and MHC class I molecule during *T. cruzi* infection. (A) The abundance of *TAP1*, β 2M and *HLA* mRNAs were determined by real-time RT-qPCR using the total RNA from HeLa cells treated with IFN- γ and/or infected with *T. cruzi*. The relative expression of the transcripts was calculated by normalization with *GAPDH* and *HPRT1* housekeeping genes using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The mRNA levels were plotted relatively to "IFN- γ " experimental condition (HeLa treated 24 h with IFN- γ). Each value represents the mean \pm standard deviation of three independent experiments. (B) Lysates (25–50 μ g) of HeLa cells treated with IFN- γ and/or infected with *T. cruzi* were analyzed by western blot using human anti-TAP1 and anti-MHC class I antibodies as indicated. Infection was confirmed using anti-tubulin antibody. (C) Protein levels were determined by densitometry and plotted using the expression of α 6 subunit as experimental normalizer. Each value represents the mean \pm standard deviation of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0095977.g005

immunoproteasome subunits were decreased in infected cells in comparison to uninfected cells. This reduction may be related to the depletion of the IFN- γ membrane receptors, possibly caused by endocytic processes during parasite invasion, decreasing the cytokine stimulatory effect. Moreover, it may also be related to the density of amastigotes in host the cell cytoplasm, which may disturb cell signaling pathways or cellular metabolism.

At the protein level, we found that *T. cruzi* infection prior to IFN- γ -treatment prevents the biosynthesis of immunoproteasome subunits β 1i, β 2i, β 5i, also PA28 β , TAP1 and MHC class I molecule. Interestingly, the mRNAs levels of the infected and IFN- γ -treated cultures (Tc \rightarrow IFN- γ) were similar to those of the IFN- γ -treated and infected cultures (IFN- γ \rightarrow Tc), but the protein levels were quite different. After IFN- γ stimulation, the infection did not alter the proteasome immunosubunits, PA28 β , TAP1 and MHC class I protein levels, indicating that *T. cruzi* does not degrade these proteins. On the other hand, in HeLa cultures where infection occurred before the cytokine treatment the expression of these proteins was close to the basal levels. Since the mRNA levels of these two experimental conditions (Tc \rightarrow IFN- γ and IFN- γ \rightarrow Tc) were the same but the protein levels differed, we propose that *T. cruzi* infection blocks the expression of the immunoproteasome

subunits, PA28 β , TAP1 and MHC class I molecule by an unknown posttranscriptional control. We suggest that this is due to specific inhibition of protein synthesis possibly caused by mRNA cytolocalization or impairment on translation initiation. Analyzing the PA28 β expression, we demonstrated that triggering of this inhibitory phenomenon was independent of time of infection and consequently of parasite density, but due to *T. cruzi* inoculation before IFN- γ treatment preventing the protein translation. To our knowledge, this represents the first evidence that an intracellular protozoan parasite modulates its infection through a posttranscriptional mechanism that affects the translation of host proteins favoring its escape from the immune response.

Beside the immunoproteasome expression, we also analyzed its proteolytic activities during *T. cruzi* infection. In the enzymatic assays, in accordance with the protein levels, we found a direct relation between proteolysis and the expression of the immunoproteasome subunits responsible for the chymotryptic and tryptic activities. Since β 1i and β 5i had their protein synthesis down-regulated in infected-IFN- γ -treated cultures (Tc \rightarrow IFN- γ), the chymotrypsin-like activity was decreased close to basal levels. The same occurred to the β 2i, thus, the trypsin-like activity was also down-regulated by the parasite. The trypsin-like activity and

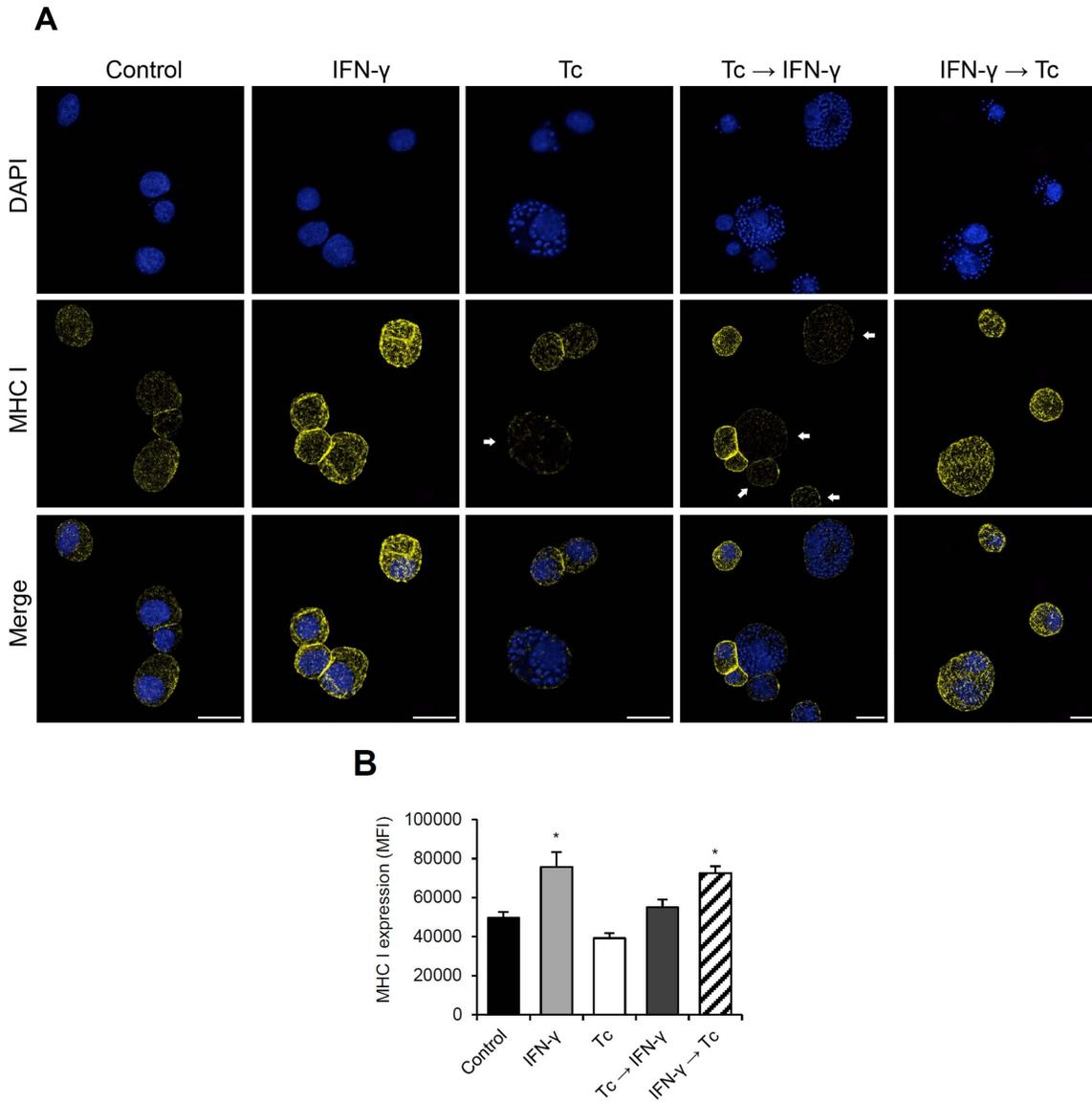


Figure 6. Effect of *T. cruzi* infection on MHC class I cell surface expression. (A) Immunofluorescence microscopy of HeLa cells treated with IFN- γ and/or *T. cruzi*-infected stained with human anti-MHC class I antibody (yellow) and DAPI (blue). The arrows highlight the infected cells that clearly had the MHC class I expression down-modulated by *T. cruzi* infection. Bars = 25 μ m. To precisely quantify the MHC class I cell surface expression, samples used in microscopy were analyzed by flow cytometry. (B) The protein expression was determined as median fluorescence intensity (MFI). Each value represents the mean \pm standard deviation of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0095977.g006

mainly chymotrypsin-like activity seem to be the most relevant to the generation of antigenic peptides. This is because it is thought that cleavage after hydrophobic and basic amino acid residues produces peptides optimal for fitting into the cleft of the MHC class I molecule [25–27]. Also, the association of the PA28 regulator to one end of the 20S immunoproteasome core is related to increase the production of immunogenic peptides [28,29]. Therefore, the down-modulation of PA28 β and the β -immunoproteasome subunits synthesis during *T. cruzi* infection may be related to the poor quantity and quality of the generated immunogenic peptides, factors that could limit the recognition of the host cell by CD8⁺ T lymphocytes preventing an effective immune response.

Two works strengthen the hypothesis about the implications of ubiquitin-proteasome system in antigen presentation and parasite persistency during the *T. cruzi* infection. Chou et al. (2008) [58]

testing a DNA vaccine against an epitope of *T. cruzi* reinforced the idea that the immunoproteasome and their regulator PA28 are essential for the protection of mice against the parasite. Bergeron et al. (2008) [59] showed that the infection of murine macrophages reduces the synthesis of immunoproteasome and MHC class I expression via SAPK/JNK signaling pathway, possibly through a transcriptional mechanism. Other study reported that MHC class I cell surface expression is down-regulated by *T. cruzi* [60], however, during infection of immune cells.

Since the proteasome is the key protease generating peptides for the MHC class I antigen presentation, not only *T. cruzi*, but many other infectious microorganisms and specially viruses have developed strategies to evade the ubiquitin-proteasome system hindering the recognition of these pathogens by the immune cells. For example, protein X of hepatitis B virus interacts with the α 7

subunit of the proteasome and inhibits the trypsin- and chymotrypsin-like activities [61]. Other works showed that cells infected with adenovirus type 12E1A and HPV type 18 E7 exhibited a decrease in both mRNA and protein levels of TAP1 and TAP2, β 1i and β 5i [62–64]. Regarding the MHC class I molecule, its down-regulation has been observed as consequence of virus infection [65–68], as well as its up-regulation [69–71].

Despite the evidence for an apparently vigorous *T. cruzi*-specific CD8⁺ T-cell response [10,36,37], the vast majority of hosts fail to completely clear the parasite loading, reflecting the chronicity of the disease. So, our results bring new knowledge about the antigen presentation process during the *T. cruzi* infection and could be one clue for the mechanisms of parasite persistency and an explanation for the suboptimal CD8⁺ T lymphocyte response. Maybe, this is because the recognition of the infected cells by the CD8⁺ T

lymphocyte is compromised by the lack of immunogenic epitopes derived from immunoproteasome activity. However, other studies should be undertaken to precisely elucidate the inhibitory mechanism induced by the parasite. It is also of interest to verify the immunoproteasome regulation in other cell types for which the parasite shows a high degree of tropism such as cells found in heart, nervous or digestive tissues and also perform *in vivo* studies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RC CMS BDL. Performed the experiments: RC LOF AK CBFF CMS BDL. Analyzed the data: RC LOF AK CBFF BDL. Contributed reagents/materials/analysis tools: CBFF UK PMK CMS BDL. Wrote the paper: RC PMK BDL.

References

- WHO – World Health Organization (2014) Fact Sheet N°340 – Chagas disease (American trypanosomiasis). Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Accessed 12 January 2014.
- Brener Z (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol 27: 347–382.
- Dutra WO, Gollob KJ (2008) Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. Curr Opin Infect Dis 21: 287–292.
- Burleigh BA, Andrews NW (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Annu Rev Microbiol 49: 175–200.
- Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J Exp Med 171: 401–413.
- Tardieux I, Webster P, Ravessloot J, Boron W, Lunn AJ, et al. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. Cell 71: 1117–1130.
- Garg N, Nunes MP, Tarleton RL (1997) Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. J Immunol 158: 3293–3302.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher L (1995) *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class-I and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. Int Immunol 8: 13–22.
- Van Overtvelt L, Andrieu M, Verhasselt V, Conman F, Choppin J, et al. (2002) *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8⁺ T lymphocytes. Int Immunol 14: 1135–1144.
- Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL (2009) CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Curr Opin Immunol 21: 385–390.
- Nickell SP, Stryker GA, Arevalo C (1993) Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. J Immunol 150: 1446–1457.
- Abrahamsohn IA, Coffman RL (1996) *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. Exp Parasitol 84: 231–244.
- Rodrigues AA, Saosa JSS, da Silva GK, Martins FA, da Silva AA, et al. (2012) IFN- γ plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. PLoS Negl Trop Dis 6: e1598.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, et al. (1994) 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.
- Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neeffjes J (2000) The major substrates for TAP *in vivo* are derived from newly synthesized proteins. Nature 404: 774–778.
- Momburg F, Hammerling GJ (1998) Generation and TAP mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. Adv Immunol 68: 191–256.
- Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. Nat. Rev. Mol Cell Biol 2: 179–187.
- Rock KL, York IA, Goldberg AL (2004) Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. Nat Immunol 5: 670–677.
- Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, et al. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. Nature 386: 463–471.
- Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, et al. (1998) Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. J Biol Chem 273: 25637–25646.
- Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, et al. (1994) Interferon- γ stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. J Exp Med 179: 901–909.
- Groettrup M, Souza A, Kucklorn U, Kloetzel PM (1996) Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. Immunol 17: 429–435.
- Ma CP, Slaughter CA, Demartino GN (1992) Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20S proteasome (macropain). J Biol Chem 267: 10515–10523.
- Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M (1992) Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. J Biol Chem 267: 22369–22377.
- Kuehn L, Dahlmann B (1996) Proteasome activator PA28 and its interaction with 20S proteasomes. Arch Biochem Biophys 329: 87–96.
- Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, et al. (1994) Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. J Biochem 115: 257–269.
- Sijts EJ, Kloetzel PM (2011) The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. Cell Mol Life Sci 68: 1491–502.
- Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Kruger E (2005) IFN-gamma induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 9241–9246.
- de Graff N, van Helden MJ, Textoris-Taube K, Chiba T, Topham DJ, et al. (2011) PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides *in vivo*. Eur J Immunol 41: 926–935.
- Schwarz K, van Den Broek M, Kostka S, Kraft R, Soza A, et al. (2000) Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 α / β , enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic Choriomeningitis Virus T Cell epitope. J Immunol 165: 768–778.
- van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, et al. (2000) Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. J Exp Med 192: 483–494.
- Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kühn R, Rajewsky K, et al. (1994) MHC Class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. Science 265: 1234–1237.
- Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Binnink JR (2001) Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8⁺ T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. J Exp Med 193: 1319–1326.
- Khan S, Zimmermann A, Basler M, Groettrup M, Hengel H (2004) A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. J Virol 78: 1831–1842.
- Groettrup M, Kirk CJ, Basler M (2010) Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? Nat Rev Immunol 10: 73–78.
- Marinho CRF, D'Império Lima MR, Grisotto MG, Alvarez JM (1999) Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' Disease. Infect Immun 67: 308–318.
- Tarleton RL, Zhang L (1999) Chagas' Disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? Parasitol 15: 94–99.
- Silva LHP, Nussenzweig V (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. Folia Clin Biol 20: 191–207.
- Andrews NW, Colli W (1982) Adhesion and Interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. J Protozool 29: 264–269.
- Faria LO, Lima BD, de Sá CM (2008) *Trypanosoma cruzi*: Effect of the infection on the 20S proteasome in non-immune cells. Exp Parasitol 120: 261–268.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. Methods 25: 402–408.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Gen Biol 3: research0034.11.
- Meissner TB, Li A, Biswas A, Lee KH, Liu YJ, Bayer E, et al. (2010) NLR family member NLRP5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 13794–13799.

44. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
45. Grossi de Sá MF, Martins de Sá C, Harper F, Coux O, Akhayat O, et al. (1988) Cytolocalization of prosomes as a function of differentiation. *J Cell Sci* 89: 151–165.
46. Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 9: 3153–3162.
47. O'Farrell PZ, Goodman H, O'Farrell PH (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133–1142.
48. Laemmli UK (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
49. Bonner WM, Laskey RA (1974) A film detection Method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 46: 83–88.
50. Claverol S, Burrell-Schiltz O, Girbal-Neuhauser E, Gairin JE, Monsarrat B (2002) Mapping and structural dissection of human 20S proteasome using proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics* 1: 567–578.
51. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and application. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350–4354.
52. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675.
53. Nandi D, Woodward E, Ginsburg DB, Monaco JJ (1997) Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J* 16: 5363–5375.
54. Tanaka K, Ichihara A (1989) Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 159:1309–1315.
55. Cuervo AM, Palmer A, Rivett AJ, Knecht E (1995) Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 227: 792–800.
56. Hendil KB (1988) The 19 S multicatalytic “prosome” proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells. *Biochem Int* 17: 471–477.
57. Gacynska M, Rock KL, Goldberg AL (1993) Gamma interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis. *Nature* 363, 262–264.
58. Chou B, Hisaeda H, Shen J, Duan X, Imai T, et al. (2008) Critical contribution of immunoproteasome in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fuse to green fluorescence protein. *Microbes Infect* 10: 241–250.
59. Bergeron M, Blanchete J, Rouleau P, Olivier M (2008) Abnormal IFN- γ -dependent immunoproteasome modulation by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Parasite Immunol* 30: 280–292.
60. Van Overtvelt L, Andrieu M, Verhasselt V, Connan F, Choppin J, et al. (2002) *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8(+) T lymphocytes. *Int Immunol* 14: 1135–1144.
61. Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O, Goldberg AL, et al. (1999) Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 73: 7231–7240.
62. Rotem-Yehudar R, Groettrup M, Soza A, Kloetzel PM, Ehrlich R (1996) LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for Class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic Adenovirus 12. *J Exp Med* 183: 499–514.
63. Proffitt JA, Blair GE (1997) The MHC-encoded TAP1/LMP2 bidirectional promoter is down-regulated in highly oncogenic adenovirus type 12 transformed cells. *FEBS Lett* 400: 141–144.
64. Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE (2000) Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* 19: 4930–4935.
65. Schrier PI, Bernards R, Vaessen RT, Houweling A, van der Eb AJ (1983) Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* 305: 771–775.
66. Mullbacher A (1992) Viral escape from immune recognition: multiple strategies of adenoviruses. *Immunol Cell Biol* 70: 59–63.
67. Jennings SR, Rice PL, Kloszewski ED, Anderson RW, Thompson DL, Tevethia SS (1985) Effect of herpes simplex virus types 1 and 2 on surface expression of class I major histocompatibility complex antigens on infected cells. *J Virol* 56: 757–766.
68. Kohonen-Corish MR, Blanden RV, King NJ (1989) Induction of cell surface expression of HLA antigens by human IFN- γ encoded by recombinant vaccinia virus. *J Immunol* 143: 623–627.
69. King NJ, Shrestha B, Kesson AM (2003) Immune modulation by flaviviruses. *Adv Virus Res* 60: 121–155.
70. Kraus E, Schneider-Schaulies S, Miyasaka M, Tamatani T, Sedgwick J (1992) Augmentation of major histocompatibility complex class I and ICAM-1 expression on glial cells following measles virus infection: evidence for the role of type-1 interferon. *Eur J Immunol* 22: 175–182.
71. King NJ, Kesson AM (1988) Interferon-independent increases in class I major histocompatibility complex antigen expression follow flavivirus infection. *J Gen Virol* 69: 2535–2543.