



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Microbiana

Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro: Interferência pós-transcricional na expressão da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano

Juliana Vieira Ferreira Name

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos

Brasília

2022



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

Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro: Interferência pós-transcricional na expressão da subunidade β 1i do imunoproteassoma humano

Juliana Vieira Ferreira Name

Orientadora: Profa. Tatiana Amabile de Campos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília para a obtenção de título de Doutor em Biologia Microbiana

Brasília

2022

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Biologia do Gene/ Laboratório de Interação
Parasita-Hospedeiro da Universidade de
Brasília, sob a orientação das Professoras Dra.
Beatriz Dolabela de Lima e Dra. Tatiana
Amabile de Campos

Este trabalho é em memória de Agnelo Rodrigues de Souza Neto. Um amigo e parceiro para todas as horas desde que eu entrei no laboratório.

Este trabalho é nosso.

À família de coração que eu fiz ao longo da vida, esse trabalho tem um pouco de cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Uso este espaço para poder agradecer às instituições e pessoas que tornaram o desenvolvimento e conclusão deste trabalho possível.

Agradeço à CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior), à Universidade de Brasília (UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana pelo apoio financeiro e confiança que esta pesquisa pode ajudar a sociedade.

À Professora Beatriz Dolabella de Lima pelos ensinamentos, dentro e fora da pesquisa científica.

À Professora Tatiana Amabile de Campos que apareceu em um momento que eu estava pronta para abrir mão de tudo que eu tentei construir neste trabalho e me ajudou a encarar essa situação complicada de frente concluir esse ciclo da melhor forma possível. Sempre serei muito grata por isso, Professora.

Às Professoras Izabela Marques Dourado Bastos Charneau e Cecília Beatriz Fiúza Favali que junto com a Professora Tatiana me ajudaram a manter a cabeça focada no que precisava ser feito e corrigir pontos importantes no trabalho. Obrigada a vocês três por me acolherem e ajudarem a concluir este trabalho.

Às professoras Flávia e Carla que também estavam lá ajudando, tirando algumas dúvidas e dando sugestões sobre ideias que eu comentava.

Aos amigos de laboratório, Agnelo, Lívia, Sarah, Beatriz, Lorena, Arthur, Kaio, Milene, Laura, Rafaella, agradeço pelas ajudas de bancada e por tornarem essa caminhada mais leve, espero que eu possa ter feito o mesmo com vocês.

À Fabiana que sempre ajudou em tudo que podia, preparando meios e reagentes e, principalmente, por emprestar o ouvido quando eu precisava e pelos conselhos.

Este momento não seria possível sem aqueles que fazem parte da minha vida fora dos laboratórios de pesquisa.

Agradeço à minha mãe, Rosangela, por sempre ter cuidado de mim como pôde e ser a base para eu poder me dedicar a este trabalho. À minha avó Rita que cuida de mim da melhor forma. À Neide que ajudou a me criar e cuida das minhas coisas até hoje. Ao Jake que mais uma vez esteve sempre pertinho me acompanhando e apoiando do seu jeitinho, mesmo quando eu não podia dar muita atenção para ele.

Ao meu tio Orlando que foi conselheiro e amigo em momentos cruciais nesta caminhada.

Aos meus irmãos, Rafael, Pedro, Carol, Allan, Laura, Hérick, vocês estavam comigo bem antes deste processo começar e me acompanharam até o fim. Obrigada por vocês me ajudarem a ficar em pé e seguir caminhando quando a caminhada parecia impossível. Obrigada por serem porto onde eu podia parar e respirar quando a caminhada estava pesada demais. Sem vocês, esse momento em que eu escrevo estas palavras talvez não chegasse. Espero que eu possa ser para vocês pelo menos metade da amiga que vocês são para mim. Este trabalho é tão de vocês quanto meu.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. Introdução (Mini review)	5
2. Justificativa	25
3. Objetivo	32
4. Material e Método	33
5. Resultados	38
6. Discussão	51
7. Conclusão	56
8. Perspectivas	56
9. Referências Bibliográficas	57
10. Anexos	68

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	23
Figura 2	24
Figura 3	26
Figura 4	26
Figura 5	27
Figura 6	30
Tabela 1	34
Figura 7	37
Figura 8	40
Figura 9	41
Figura 10	42
Figura 11	44
Figura 12	45
Figura 13	47
Figura 14	48
Figura 15	49
Figura 16	50
Figura 1 (Anexo)	68
Figura 2 (Anexo)	68
Figura 3 (Anexo)	69
Figura 4 (Anexo)	69
Tabela 1 (Anexo)	70

LISTA DE ABREVIATURAS

DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco's (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde Aprimorada)
IFN- γ	Interferon gama (gamma Interferon)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
UTR	<i>Untranslated Regions</i> (Regiões não traduzidas)

RESUMO

A Doença de Chagas é provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é considerada endêmica em 21 países da América Latina e, de acordo com a OMS, acomete entre 6 e 7 milhões de pessoas ao redor do mundo. Estudos demonstram a capacidade do parasita em evadir o sistema imune de seu hospedeiro, se replicando e mantendo a infecção por anos. Em alguns destes estudos, foi demonstrado que o parasita interfere em nível pós-transcricional na expressão de proteínas componentes da via de apresentação MHC classe I, especificamente as subunidades induzíveis do imunoproteassoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$), a subunidade PA28 α , a proteína TAP e o MHC I. Um estudo especificamente, apresentou a hipótese de esta interferência ocorrer nas regiões 5' e 3' UTR dos mRNAs destas proteínas. Com base nisto, o presente trabalho se propôs a validar esta teoria utilizando como modelo a subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma. Para este fim, essas duas regiões foram amplificadas e clonadas flanqueando o gene repórter *EGFP* em um vetor de expressão para células eucarióticas. Com este vetor (denominado pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF) e um vetor de controle (pEGFP) foram realizados testes onde células HeLa passaram por um processo de transfecção transiente com estes vetores antes ou após exposição destas células ao parasita *T. cruzi* cepa Y. Os resultados obtidos demonstraram que há uma supressão na expressão do gene repórter do vetor pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF apenas quando as células foram transfectadas 20 horas antes da exposição ao parasita, indicando que as regiões não traduzidas do mRNA são alvo de ação do parasita, mas apenas nas primeiras horas de interação do parasita com a célula hospedeira.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, imunoproteassoma, modificação pós-transcricional, imuno evasão.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is considered endemic in 21 Latin American countries and, according to the WHO, affects 6 to 7 million people around the world. Studies demonstrate the parasite's ability to evade the host's immune system, replicating and maintaining the infection for years. In some of these studies, it was demonstrated that the parasite interferes at a post-transcriptional level in the expression of component proteins of the MHC class I presentation pathway, specifically the inducible subunits of the immunoproteasome ($\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$), the PA28 α subunit, the TAP protein and the MHC I. In previous work, it was hypothesized that this interference may occur in the 5' and 3' UTR regions of the mRNAs of these proteins. Based on this, the present work proposed to validate this theory by using the $\beta 1i$ subunit of the immunoproteasome as a model. For this, these two regions were amplified and cloned flanking the EGFP reporter gene in an expression vector for eukaryotic cells. With this vector (pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF) and a control vector (pEGFP) tests were performed where HeLa cells underwent a transient transfection process before or after exposure of these cells to the parasite *T. cruzi* strain Y. The results obtained showed that there is a suppression in the expression of the reporter gene of the pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF vector only when the cells were transfected 20 hours before exposure to the parasite, indicating that the untranslated regions of the mRNA are targets of the parasite's action, but only in the first hours of interaction of the parasite with the host cell.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, immunoproteasome, post-transcriptional regulation, immune evasion.

INTRODUÇÃO

1.

The evasion of *Trypanosoma cruzi* from mammalian immune system

Article type: Mini Review

Authors: Juliana Vieira Ferreira Name^{1,2}, Tatiana Amabile de Campos^{1,2, *}, Izabela Marques Dourado Bastos³

Affiliations:

1. Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.
2. Laboratory of Molecular Analysis of Pathogens, Department of Cell Biology, Institute of Biosciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.
3. Pathogen-Host Interface Laboratory, Institute of Biosciences, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

* Corresponding author: Tatiana Amabile de Campos, PhD. tatianadecampos@unb.br, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil. CEP: 70.910-900.

Abstract

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas disease (CD), illness that affects approximately 7 million individuals worldwide, mainly in Latin America. The parasite presents a highly complex and adapted life cycle that transits between invertebrate and vertebrate hosts. At about 30% -40% of infected individuals develop some pathology related to CD, as cardiopathies and digestive disorders such as megacolon and megaesophagus. To contain the parasite proliferation, the host organism triggers immunological responses. In this way, the immunoproteasome confers a crucial role. As a multi-catalytic structure, immunoproteasome generates parasites protein fragments with MHC I molecule affinity prioritizing the presentation of antigens by the affected cell. However, *T. cruzi* employs mechanisms to overcome the immunoproteasome to promote the host colonization. In this review we presented the interaction *T. cruzi* with host immunoprotease and the mechanisms exhibited by them to colonize the host.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, Immunoproteasome, Proteasome

Introduction

Chagas disease (CD) or American trypanosomiasis is a protozoonosis caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). According to the WHO, about six to seven million people worldwide are infected by the parasite (WHO, 2021), and around 7000 have died due to complication or secondary pathologies. Most of cases are reported in 21 countries in Latin America, where the disease is considered endemic with occurrence of vectorial transmission by Triatomines insects (MARTINS-MELO *et al.* 2012; CUCUNUBÁ *et al.* 2016).

CD is prevalent at central and south America, where natural vector transmission occurs. The first epidemiological profile change happened due to the human migration from rural to urbanized regions, in the 1970s and 1980s. Since the 1990's, cycles of immigration from the endemic regions to non-endemic countries, as Portugal, Spain, Italy, Australia, New Zealand, and Japan escalated and part of those asymptomatic immigrants carrying the parasite to Europe and Japan (SCHMUNIS and YADON, 2010; KLEIN *et al.* 2012; NUNES *et al.* 2013; JACKSON *et al.* 2014; CARDOSO *et al.* 2016). In those non-endemic countries, the transmission occurs by organs transplantation and blood transfusion from chronic and asymptomatic individuals; and by vertical transmission in cases of congenital Chagas disease (KLEIN *et al.* 2012). In the 1970s and 1980s, the populational migration to urbanized regions resulted in a change of disease's epidemiological profile. Nowadays CD is found throughout the American continent, Europe, Australia, New Zealand, and Japan (NUNES *et al.* 2013; JACKSON *et al.* 2014; CARDOSO *et al.* 2016).

At the infection site, the disease is discharged due to the metacyclic trypomastigotes internalization by leukocytes, epithelial cells, macrophages, and fibroblasts (TYLER and ENGMAN, 2001; SOUZA *et al.* 2010; DHIMAN and GARG, 2011; BERN, 2015). Inside the cells, *T. cruzi* multiplies and can spread to different organs, causing symptoms as cardiomegaly and colonmegaly (RASSI *et al.* 2012; PÉREZ-MOLINA and MOLINA, 2018; WHO, 2021). As an intracellular parasite, the mechanisms to escape from innate immune response are essential to its survival and spreading into the host.

Likewise, the hosts have several mechanisms to control and to eliminate the pathogen. Among these mechanisms, the immunoproteasome presents a crucial role:

antigen processing and presentation, especially by MHC I. The action of the immunoproteasome in this process is evidenced by the participation in the differentiation of T helper cells to types 1 and 17 (cells with a pro-inflammatory profile); by to help in the maintenance and proliferation of T cells during the immune response; and by induction of activated T cells producing IL-2, TNF and INF- γ (ZAISS *et al.* 2008; MUCHAMUEL *et al.* 2009; MOEBIUS *et al.* 2010; KINCAID *et al.* 2012; KALIM *et al.* 2012; MURATA *et al.* 2018). As an opposite way, the pathogen overcomes the immune response to survive and colonize the host. The aim of this review was to describe the role of immunoproteasome in the *T. cruzi* multiplication inside the cells, and the mechanisms exhibited by the parasite to overwhelm the immune response produced by the immunoproteasome.

The life cycle of *T. cruzi* and Chagas Disease

Triatoma insect ingests infected blood by *T. cruzi*, a mandatory intracellular parasite that, in this stage of its biological cycle, is found in tissues and the peripheral blood of infected vertebrates predominantly in trypomastigote or amastigote morphologies (up to 10%) (ANDREWS *et al.* 1987; LEY *et al.* 1988; COURA and BORGES-PEREIRA, 2012; BARRIAS *et al.* 2013; WATANABE COSTA *et al.* 2016). Once in the insect's gastrointestinal tract, the parasite differentiates to epimastigote and multiplies. Thus, the epimastigotes migrate to the final portion of the insect's intestinal tract and bind hydrophobically to the waxy cuticle. This event provokes a nutritional stress that triggers the parasite to differentiate to metacyclic trypomastigote, a process called metacyclogenesis (CONTRERAS *et al.* 1985; BONALDO *et al.* 1988; GARCIA and AZAMBUJA 1991; KLEFFMANN *et al.* 1998; FIGUEIREDO *et al.* 2000; FERNANDES and ANDREWS, 2012; BARTHOLOMEU *et al.* 2014; GONÇALVES *et al.* 2018). The metacyclics come off the cuticle and are excreted by the insect (TYLER and ENGMAN, 2001; GOLDENBERG and AVILA, 2011; TEIXEIRA *et al.* 2012; CRUZ-SAAVEDRA *et al.* 2020) (Figure 1).

The most common *T. cruzi* transmission pathway to mammalian host occurs during the blood meal by *Triatoma* insects. At this time, the parasite in the insect's excretion can reach the host's mucosa or sub cutaneal skin layer through the injuries generated by the epidermis bite. In addition, the parasite can be transmitted by congenital

pathway, blood transfusion, organ transplantation, and by contaminated food and drinks ingestion. Beside the vector transmission, the other pathways are very relevant to the increase cases of CD in non-endemic countries (DIAS *et al.* 2011; HOWARD *et al.* 2014; LUQUETTI *et al.* 2015; PERÉZ-MOLINA and MOLINA, 2018).

After host infection, the disease developed can be divided into acute and chronic phases. The first phase (acute phase) is, in most cases, asymptomatic, with a mortality rate of 2 to 8%. When symptomatic and caused by vector bite, the acute phase is characterized by “chagoma”, erythema and edema at the infection site (observed at around 50% of the cases). If the infection occurs in the ocular mucous membrane, it is possible to visualize the classic sign of the acute phase, known as the Romaña sign (RASSI *et al.* 2012; CHATELAIN, 2017; PÉREZ-MOLINA and MOLINA, 2018; WHO, 2021). Other signs observed in acute phase, regardless of the infection site, are: enlarged lymph glands, breathing difficulty, fever, headache, pallor, muscle pain, swelling, and abdominal or chest pain. All the symptoms of the acute phase, if present, disappear regardless of the treatment with trypanocidal drugs has been carried out, on average up to 2 months after initial contact (WHO, 2021).

The chronic phase is observed between two and three months after the initial infection. Among the infected individuals, 30 to 40% develop a specific pathology related to the infection, usually 10 to 30 years after the parasite body entering. Up to 30% of patients develop disease-related cardiomyopathies, and approximately 10% develop neurological, digestive disorders (megacolon and megaesophagus) or other diffuse pathologies as a late result from the infection (RASSI *et al.* 2010; PERÉZ-MOLINA and MOLINA, 2018; WHO, 2021). The manifestations of these clinical conditions are directly linked to the occurrence of inflammatory responses in the injured tissues and to the infection progresses in those tissues (DUTRA *et al.* 2009; GOLDENBERG and AVILA, 2011; CUCUNUBÁ *et al.* 2016; WHO, 2021).

Immune system response associated to *T. cruzi* infection

In the acute phase, the parasite replication control is mediated by macrophages, neutrophils, and natural killer cells (SOUZA *et al.* 2010; DHIMAN and GARG, 2011). In this way, the inflammatory cytokines play an important role (DUTRA *et al.* 2009). The host can respond to infection by three distinct and complementary ways: (i) direct

detection and destruction of the parasite by macrophages and dendritic cells; (ii) activation of an antigen-specific immune response triggered by professional phagocytes (macrophages and dendritic cells); (iii) and detection of the parasite by cells of non-hematopoietic lineage, considered the main targets of the parasite (TARLETON, 2007; POVEDA *et al.* 2014). The responses generated by the individual's immune system leads to a drastic decreased of parasites cells in the body. However, these responses are not enough for the complete *T. cruzi* elimination and to containment of the disease's progress (CHATELAIN, 2017).

After parasite entry in vertebrate host, metacyclic trypomastigotes can infect many nucleated cells (TYLER and ENGMAN, 2001). The first ones are those present in the parasite inoculation site, as fibroblasts, dendritic cells, macrophages, and epithelial cells. *T. cruzi* internalization depends on the interactions between several molecules from host cells surface and the parasite. These interactions lead to the parasite's adhesion to the host cell and then its internalization, initiating the intracellular phase of *T. cruzi* biological cycle (SOUZA *et al.* 2010; FERNANDES and ANDREWS, 2012).

The parasitophorous vacuole (PV) is formed when the parasite is internalized by the cell. Within the PV, the trypomastigote releases enzymes, such as transialidase and neuramidase, that remove sialic acid residues from the PV membrane. Thus, PV become it sensitive to the action of Tc-Tox, a peptide that keeps homology as a factor 9 of the complement system in humans. Due to the PV acidification, this peptide starts to destroy the its membrane probably by pores formation caused by Tc-Tox action (ANDREWS and WHITLOW 1989; ANDREWS *et al.* 1990; LEY *et al.* 1990; SOUZA *et al.* 2010). The trypomastigotes transforms into amastigote and secretes enzymes that participate in the degradation of the PV releasing the amastigote into cytoplasmic environment, where it starts to divide itself by binary fission (ANDREWS *et al.* 1990; SOUZA; BARRIAS, 2017) (Figure 1). Thus, the amastigotes convert into trypomastigotes, break the host cell membrane, and infect other cells, especially which ones for the parasite have greater tropism. In that phase of their biological cycle, the blood trypomastigotes circulating can be also ingested by the invertebrate vectors, restarting the parasite cycle (TYLER and ENGMAN, 2001; SOUZA *et al.* 2010; CRUZ-SAAVEDRA *et al.* 2020) (Figure 1D-E).

For tissues host spreading and colonization, *T. cruzi* harbor multiple immune evasion mechanisms. Among them, the parasite makes use of a set of molecules that provides ways of deceiving the complement system. This is observed in many steps in

complement activation pathway that results in the inhibition of C3 convertase formation, as calreticulin, GP160, a complement regulatory protein, Trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF) and Complement C2 receptor inhibition trispanning (CRIT) (CARDOSO *et al.* 2016).

Proteasome/Immunoproteasome response to *T. cruzi* and the parasite overcome

The ubiquitin/proteasome system (UPS) is an important component in generating an immunological response against pathogenic agents. This system is present in eukaryotic cells and assists in the maintenance of cellular homeostasis. UPS is responsible for the degradation of cytosolic and nuclear proteins to small peptides that are, then, degraded into amino acids for the *de novo* protein synthesis. The system acts in the deconstruction of altered proteins or uncorrected folding and is an essential regulator in irreversible cellular processes, such as the presentation of antigens, differentiation and cell growth and metabolic adaptation. It also exercises homeostasis and cellular processes regulation such as cell differentiation; apoptosis; protein degradation; and mediates processes such as: cell signaling, and cleavage of exogenous proteins to antigen presentation (GROLL and POTTS, 2011; STADTMUELLER and HILL, 2011; TOMKO and HOCHSTRASSER, 2013).

The proteasome is a barrel shaped protein complex composed of two external α rings and two internal β rings, where the catalytic subunits are located (Figure 2). The 20S nucleus of the complex has a mass of 700 kDa and is composed by 28 protein subunits organized into four heptameric rings. This organization generates a cylindrical shape composed of four rings with dimensions of 160 Å in length and 120 Å in diameter. Two outer rings are identical and composed by seven different α (α 1- α 7) subunits that help the structural integrity. These subunits act as a binding site for regulatory complexes responsible for controlling the access of cytosolic proteins to the inner rings of the proteasome (19S complex), and stimulate the peptide activity of the catalytic subunits (GOLDBERG, 2007; SMITH *et al.* 2007; OGOREVIC *et al.* 2018). The two inner rings are identical and composed by seven different β subunits (β 1 - β 7) surrounding the central chamber, the site where three of these β subunits (1, 2 and 5) perform proteolysis (MOREL *et al.* 2000; GROLL and POTTS, 2011, WINTER *et al.* 2017). Out of to the catalytic nucleus there's a 19S regulatory complex that can recognize ubiquitinated

proteins and allow it to access the nucleus, where they are degraded (KIMURA *et al.* 2015).

Differences in protein cleavage are determined by the composition of each proteolytic subunit. The $\beta 1$ subunit performs the peptidyl-glutamyl hydrolase-like cleavage (caspase-like), cleaving peptides after acidic amino acid residues; the $\beta 2$ subunit performs trypsin-like cleavages, which cleaves preferentially after basic amino acid residues; the $\beta 5$ subunit realizes chymotrypsin-like cleavage, that cleaves the peptide after hydrophobic residues (BOCHTLER, 1999; ORLOWSKI and WILK, 2000; GLICKMAN and CIECHANOVER, 2002; KISSELEV *et al.* 2012).

When a stimulus occurs through pro-inflammatory cytokines such as $\text{INF-}\gamma$ (released during the invasion of the host cell by *T. cruzi*) (Figure 2B), the regulatory complex is replaced by the 11S. This complex presents the proteasome activators α and β ($\text{PA}28\alpha$ and $\text{PA}28\beta$). Thus, $\beta 1i$, $\beta 2i$ and $\beta 5i$ catalytic subunits, the POMP protein (proteasome maturation protein), and the UmP1 (proteasome maturation factor) are expressed for the immunoproteasome formation. The auxiliary protein (POMP) has greater affinity with the $\beta 5i$ subunit than with $\beta 5$ and as a result the cell starts to preferentially produce the immunoproteasome rather than the proteasome (LEE and KIM, 2011).

These new subunits turn the proteasome into a more efficient antigenic peptides processor, since there is a decreasing in peptide cleavage right after acidic amino acids. In this way, this cleavage increases hydrophobic and basic peptides production, the ones that binds more efficiently to class I MHC molecules (ROCK and GOLDBERG, 1999; MOREL *et al.* 2000). Another characteristic of the immunoproteasome is the ability to assemble quickly, about 21 minutes, four times faster than those time required for the constitutive proteasome (HEINK *et al.* 2005). The $\beta 1i$ subunit starts to selectively repress the cleavage after acidic residues and increases that of hydrophobic residues; the $\beta 2i$ subunit cleaves specifically after basic residues; the $\beta 5i$ subunit cleaves after hydrophobic residues, for this reason, this proteasome's isoform is called immunoproteasome. The differences observed between the proteasome and the immunoproteasome and the latter having its formation apparently linked to the response commonly generated by the presence of antigens. In addition, studies that demonstrate that a malfunction of this complex, due to deficient or excessive function, leads to pathological processes raise the hypothesis that the cleavages promoted by the immunoproteasome have a relevant role in

modulating the body's immune response (GACZYNSKA *et al.* 1993; GACZYNSKA *et al.*, 1994, ORLOWSKI and WILK, 2000; GROETTRUP *et al.* 2001; BOSE *et al.* 2001; ESKANDARI, 2017; WINTER *et al.* 2017).

The antigenic peptides generated by the immunoproteasome are transported to the lumen of the endoplasmic reticulum by a carrier associated with antigen processing (TAP) where it undergoes further processing and is linked to a newly synthesized MHC I molecule. The complex “peptide-MHC I molecule” is sent to the cell membrane, where stimulates the activation of cytotoxic T lymphocytes (T CD8 +), cells that participate in the control of infection and is found in large numbers at parasite’s site infection. The abundant presence of T CD8 + lymphocytes is important in the replication controlling of the parasite, but it is also pointed out as one of the responsible for the destruction of tissues of the host by inducing the death of the cells present in the site (PADILLA *et al.* 2009; CHEMALI *et al.* 2011; HUTCHINSON *et al.* 2011; TARLETON, 2015).

The host cells harboring parasites trigger the recruitment of innate immune cells and the release of pro-inflammatory cytokines, such as TNF and INF- γ , especially in the acute phase of the disease. INF- γ also acts as a signal for cells to produce the immunoproteasome. The parasite in the cytosol, alive or in fragments, have the potential to generate antigens that can be presented via MHC I, leading to a TCD8 cell response that helps to control parasites multiplication. In later stage of the disease, the adaptive immune response involving T helper 1 cells, TCD8 anti-*T. cruzi* continue to control the parasitemia and B cells produce antibodies. However, all these responses are ineffective to parasite cleaning, an event related to the development of later pathologies of the chronic phase. Studies speculate that the delay on response, may relay on the need of host’s cells to achieve enough antigens generated by amastigotes to produce an immune response. However, the competition of antigens for available MHC I molecules and the high number of polymorphic parasites antigens generates a slow and unfocused immune response. Altogether, these events may allow the parasite to reach a number difficult to eradicate from the host (MARTIN *et al.* 2006; CARDILLO *et al.* 2007; TARLETON, 2007; ALVAREZ *et al.* 2008; RODRIGUES *et al.* 2008; JUNQUEIRA *et al.* 2010; TARLETON, 2015; CARDOSO *et al.* 2016; LOVO-MARTINS *et al.* 2018).

In that way, this delayed response may constitute an immune evasion mechanism employed by *T. cruzi* to survive into the host. To evaluate the hypothesis of parasite’s capacity to impair an effective response through immunoproteasome, Camargo *et al.*

(2014) analyzed the expression of the proteasome, immunoproteasome and the MHC I by HeLa cells infected with *T. cruzi*, pre-stimulated or not with IFN- γ . The researchers demonstrated *T. cruzi* acted as an inhibitory factor on the translation of mRNAs for the β 1i, β 2i, β 5i and PA28 β subunits, the TAP1 protein and the MHC I receptor.

Previous studies developed by the same group suggested a post-transcriptional interfering mechanism for the expression these immunoproteasome catalytic subunits, as well as TAP1 and MHC I (MAÇANEIRO, 2009; CAMARGO et al. 2014). By using HeLa infected cells, immunoproteasome proteolytic activity and MHC expression were observed in five situations: one without infection and/or treatment (as control); the second by IFN- γ cells stimulation for 24 hours; the third by trypomastigotes cells infection for 24 hours; the fourth trypomastigotes cells infection to for 24 hours and then IFN- γ stimulation for 24 hours; and the fifth by IFN- γ stimulation for 24 hours and then trypomastigotes exposition for 24 hours. By using RT-PCR, Western Blotting and flow cytometry, it was demonstrated the *T. cruzi* has an inhibitory effect in the mRNA translation for β 1i, β 2i, β 5i and PA28 β subunits, TAP1 protein and the MHC I receptor, since their mRNA was observed but a low concentration of their correspondent proteins.

Based on these findings, *T. cruzi* may employ mechanisms to survive into the cell host by immunoproteasome overcome through the translation control of its proteolytic subunits. Further studies are needed to elucidate how this process act to expression interference; whether it happens in a direct way (a parasite's molecule acts on these RNAs molecules) or by an indirect way (the parasite induces the cell to arrest its own RNAs) that are the targets for inhibition used by *T. cruzi*; and what are the parasite's molecules used for this.

Acknowledgements and Financial Support

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Universidade de Brasília (UnB) and the Microbial Biology Post-graduation program for supporting the studies for this paper.

References

- AHN, JY, TANAHASHI, N, AKIYAMA, K, HISAMATSU, H, NODA, C, TANAKA, K, CHUNG, CH, SHIBMARA, N, WILLY, P J, MOTT, J D, SLAUGHTER, CA and DEMARTINO, GN** (1995) Primary structures of two homologous subunits of PA28, a γ -interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Letters*. 366, 1, 37–42. doi: 10.1016/0014-5793(95)00492-R.
- ALVAREZ, MG, POSTAN, M, WEATHERLY, DB, ALBAREDA, MC, SIDNEY, J, SETTE, A, OLIVERA, C, ARMENTI, AH, TARLENTON, RL and LAUCELLA, SA** (2008) HLA class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2(9):e288. doi: 10.1371/journal.pntd.0000288.
- ANDREWS, NW, HONG, KS, ROBBINS, ES and NUSSENZWEIG, V** (1987) Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 64, 474-484. doi: 10.1016/0014-4894(87)90062-2.
- ANDREWS, NW and WHITLOW, MB** (1989) Secretion of *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33, 3, 249–256. doi: 10.1016/0166-6851(89)90086-8.
- ANDREWS, NW, ABRAMS, CK, SLATIN, SL and GRIFFITHS, G** (1990) A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore forming activity at low pH. *Cell*, 61, 7, 1277–1287. doi: 10.1016/0092-8674(90)90692-8.
- BARRIAS, ES, CARVALHO, TMU and SOUZA, W** (2013) *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology*. 4, 186. doi: 10.3389/fimmu.2013.00186.
- BARTHOLOMEU, DC, PAIVA, RMC, MENDES, TAO, DAROCHA, WD and TEIXEIRA, SMR** (2014) Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. *PLOS Pathogens*, 10, 12. doi: 10.1371/journal.ppat.1004399.
- BERN, C** (2015) Chagas' Disease. *The New England Journal Of Medicine*, 373;5. doi: 10.1056/NEJMra1410150.
- BOCHTLER, M** (1999) The Proteasome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 295-317. doi: 10.1146/annurev.biophys.28.1.295.
- BONALDO, MC, SOUTO-PADRON, T, DE SOUZA, W and GOLDENBERG, S** (1988) Cell±substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology*, 106, 1349-1358. doi: 10.1083/jcb.106.4.1349.
- BOSE, S, BROOKS, P, MASON, GG and RIVETT, A J** (2001) γ -Interferon decreases the level of 26S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation, *Biochemical Journal*, 353, 291-297. doi: 10.1042/0264-6021:3530291.
- CAMARGO, R, FARIA, LO, KLOSS, A, FAVALI, CBF, KUCKELKORN, U, KLOETZEL, P C, SÁ, CM, and LIMA, BD** (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.

CARDILLO, F, POSTOL, E, NIHEI, J, AROEIRA, LS, NOMIZO, A and MENGEL, J (2007) B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 122(4):584–95. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02677.x.

CARDOSO, MS, CUNHA, JRL and BARTHOLOMEU, DC (2016) Evasion of the Immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in Immunology*, 6, 659. doi: 10.3389/fimmu.2015.00659.

CHATELAIN, E (2017) Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 98–103. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.002.

CHEMALI, M, RADTKE, K, DESJARDINS, M and ENGLISH, L (2011) Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 1533–1541. doi: 10.1007/s00018-011-0660-3.

CONTRERAS, VT, SALLES, JM, THOMAS, N, MOREL, CM and GOLDENBERG, S (1985) In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(3):315–327. doi: 10.1016/0166-6851(85)90073-8.

COURA, JR and BORGES-PEREIRA, J (2012) Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), 286-296.

CRUZ-SAAVEDRA, L, VALLEJO, GA, GUHL, F and RAMÍREZ, JD (2020) Transcriptomic changes across the life cycle of *Trypanosoma cruzi* II. *PeerJ* 8: e8947. doi: 10.7717/peerj.8947.

CUCUNUBÁ, ZM, OKUWOGA, O, BASÁÑEZ, MG and NOUVELLET, P (2016) Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*, 9:42. doi: 10.1186/s13071-016-1315-x.

DHIMAN, M and GARG, NJ (2011) NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *Journal of Pathology*, 225, 583–596. doi: 10.1002/path.2975.

DIAS, JCP, AMATO NETO, V and LUNA, EJA (2011) Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(3), 375-379. doi: 10.1590/S0037-86822011005000032.

DUTRA, WO, MENEZES, CAS, VILLANI, FNA, DA COSTA, GC, DA SILVEIRA, ABM, REIS, DA and GOLLOB, KJ (2009) Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human

Chagas disease. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl. I), 208-218. doi: 10.1590/S0074-02762009000900027.

- ESKANDARI, S, SEELEN, MA, LIN, G and AZZI, JR** (2017) The immunoproteasome: An old player with a novel and emerging role in alloimmunity. *American Journal of Transplantation*, 17(12):3033-39. doi: 10.1111/ajt.14435.
- FERNANDES, MC and ANDREWS, NW** (2012) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Review*, 36,734–747. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.
- FIGUEIREDO, RC, ROSA, DS and SOARES, MJ** (2000) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *Journal of Parasitology*, 86(6):1213–1218. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[1213:DOTCEM]2.0.CO;2.
- GACZYNSKA, M, ROCK, KL and GOLDBERG, AL** (1993) g-Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*, 365, 264-267. doi: 10.1038/365264a0.
- GACZYNSKA, M, ROCK, KL, SPIES, T and GOLDBERG, AL** (1994) Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 91, 9213-9217. doi: 10.1073/pnas.91.20.9213.
- GARCIA, ES and AZAMBUJA, P** (1991) Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, 7:240–4. doi: 10.1016/0169-4758(91)90237-i.
- GLICKMAN, MH and CIECHANOVER, A** (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 82, 373-428. doi: 10.1152/physrev.00027.2001.
- GONÇALVES, CS, ÁVILA, AR, DE SOUZA, W, MOTTA, MCM and CAVALCANTI, DP** (2018) Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & Vectors*, 11:83. doi: 10.1186/s13071-018-2664-4.
- GOLDBERG, AL** (2007) Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochemical Society Transactions*, 35(1):12-17. doi: 10.1042/BST0350012.
- GOLDENBERG, S and AVILA, AR** (2011) Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. *Advances in Parasitology*, 75:285–305. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00013-7.
- GROETTRUP, M, KHAN, S, SCHWARZ, K and SCHMIDTKE, G** (2001) Interferon-g inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: Why? *Biochimie*, 83, 367-372. doi: 10.1016/s0300-9084(01)01251-2.

- GROLL, M and POTTS, BC** (2011) Proteasome Structure, Function, and Lessons Learned from Beta-Lactone Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 2850-2878. doi: 10.2174/156802611798281320.
- HEINK, S, LUDWIG, D, KLOETZEL, PM and KRÜGER, E** (2005) IFN- γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *PNAS*, 102:9241 - 9246. doi: 10.1073/pnas.0501711102.
- HOWARD, EJ, XIONG, X, CARLIER, Y, SOSA-ESTANI, S and BUEKENS, P** (2014) Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*, 121: 22–33. doi: 10.1111/1471-0528.12396.
- HUTCHINSON, S, SIMS, S, O'HARA, G, SILK, J, GILEADI, U, CERUNDOLO, C and KLENERMAN, P** (2011) A Dominant Role for the Immunoproteasome in CD8+ TCell Responses to Murine Cytomegalovirus, *PLOS ONE*, 6, 2, e14646. doi: 10.1371/journal.pone.0014646.
- JACKSON, Y, PINTO, A and PETT, S** (2014) Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Tropical Medicine & International Health*, 19:212–8. doi: 10.1111/tmi.12235.
- JUNQUEIRA, C, CAETANO, B, BARTHOLOMEU, DC, MELO, MB, ROPERT, C, RODRIGUES, MM and GAZZINELLI, RT** (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12:e29. doi: 10.1017/S1462399410001560.
- KALIM, KW, BASLER, M, KIRK, CJ and GROETTRUP, M** (2012) Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 189, 4182–4193. doi: 10.4049/jimmunol.1201183.
- KIMURA, H, CATUREGLI, P, TAKAHASHI, M and SUZUKI, K** (2015) New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *Journal of Immunology Research*, Article ID 541984. doi: 10.1155/2015/541984.
- KINCAID, EZ, CHE, JW, YORK, I, ESCOBAR, H, REYES-VARGAS, E, DELGADO, JC, WELSH, RM, KAROW, LM, MURPHY, AJ, VALENZUELA, DM, YANCOPOULOS, GD and ROCK, KL** (2012) Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nature Immunology*, 13, 129–135. doi: 10.1038/ni.2203.
- KISSELEV, AF, VAN DER LINDEN, WA and OVERKLEEF, HS** (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chemistry & Biology*, 19:99–115. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.01.003.
- KLEFFMANN, T, SCHMIDT, J and SCHAUB, GA** (1998) Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 548-555. doi: 10.1111/j.1550-7408.1998.tb05115.x.

- KLEIN, N, HURWITZ, I and URVASULA, R** (2012) Review Article: Globalization of Chagas Disease: A Growing Concern in Nonendemic Countries. *Epidemiology Research International*, v 2012. doi:10.1155/2012/136793
- LEE, W and KIM, KB** (2011) The Immunoproteasome: An Emerging Therapeutic Target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 2923-2930. doi: 10.2174/156802611798281348.
- LEY, V, ANDREWS, NW, ROBBINS, ES and NUSSENZWEIG, V** (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, 168, 649-659. doi: 10.1084/jem.168.2.649.
- LEY, V, ROBBINS, ES, NUSSENZWEIG, V and ANDREWS, NW** (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *Journal of Experimental Medicine*, 171, 2, 401–413. doi: 10.1084/jem.171.2.401
- LOVO-MARTINS, MI, MALVEZI, AD, ZANLUQUI, NG, LUCCHETTI, BFC, TATAKIHARA, VLH, MÖRKING, PA, OLIVEIRA, AG, GOLDENBERG, S, WOWK, PF and PINGE-FILHO, P** (2018) Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9, 896. doi: 10.3389/fimmu.2018.00896.
- LUQUETTI, AO, TAVARES, SBDN, SIRIANO, LDR, OLIVEIRA, RA, CAMPOS, DE, MORAIS, CA and OLIVEIRA, EC** (2015) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 369–76. doi: 10.1590/0074-02760140410.
- MAÇANEIRO, LOF** (2009) Expressão de imunoproteassomas em células infectadas com *Trypanosoma cruzi*. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular, *Repositório Institucional Da Unb*, <https://repositorio.unb.br/handle/10482/3802>
- MARTIN, DL, WEATHERLY, DB, LAUCELLA, SA, CABINIAN, MA, CRIM, MT, SULLIVAN, S, HEIGES, M, CRAVEN, SH, ROSENBERG, CS, COLLINS, MH, SETTE, A, POSTAN, M and TARLETON, RL** (2006) CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathogens*, 2(8):e77. doi: 10.1371/journal.ppat.0020077.
- MARTINS-MELO, FR, RAMOS, JRAN, ALENCAR, CH and HEUKELBACH, J** (2012) Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6:817–24. doi: 10.3855/jidc.2459.
- MOEBIUS, J, VAN DEN BROEK, M, GROETTRUP, M and BASLER, M** (2010) Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice. *European Journal of Immunology*, 40:3439–3449. doi: 10.1002/eji.201040620.

- MOREL, S, LEVY, F, BURLET-SCHILTZ, S, BRASSEUR, F, PROBST-KEPPER, ML, PEITREQUIN, AL, MONSARRAT, B, VAN VELTHOVEN, R, CEROTTINI, JC, BOON, T, GAIRIN, JE and VAN DEN EYNDE, BJ** (2000) Processing of Some Antigens by the Standard Proteasome but Not by the Immunoproteasome Results in Poor Presentation by Dendritic Cells. *Immunity*, 12, 107–117. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80163-6.
- MUCHAMUEL, T, BASLER, M, AUJAY, MA, SUZUKI, E, KALIM, KW, LAUER, C, SYLVAIN, C, RING, ER, SHIELDS, J, JIANG, J, SHWONEK, P, PARLATI, F, DEMO, SD, BENNETT, MK, KIRK, CJ and GROETTRUP, M** (2009) A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature Medicine*, 15, 781–787. doi: 10.1038/nm.1978.
- MURATA, S, TAKAHAMA, Y, KASAHARA, M and TANAKA, K** (2018) The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nature Immunology*, 19, 923–931. doi: 10.1038/s41590-018-0186-z.
- NUNES, MCP, DONES, W, MORILLO, CA, ENCINA, JJ and RIBEIRO, AL** (2013) Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology JACC*, 62, 9, 767 -776, 2013. doi: 10.1016/j.jacc.05.046.
- OGOREVC, E, SCHIFFRER, ES, SOSIČ, I and GOBEC, S** (2018) A patent review of immunoproteasome inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, ISSN:1354-3776. doi: 10.1080/13543776.2018.1484904.
- ORLOWSKI, M and WILK, S** (2000) Catalytic Activities of the 20S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(1): 1-16. doi: 10.1006/abbi.2000.2036.
- PADILLA, AM, BUSTAMANTE, JM and TARLETON, RL** (2009) CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Current Opinion in Immunology*, 21,385–390. doi: 10.1016/j.coi.2009.07.006.
- PÉREZ-MOLINA, JA. and MOLINA, I** (2018) Chagas Disease. *Lancet*, 391: 82–94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- POVEDA, C, FRESNO, M, GIRONÈS, M, MARTINS-FILHO, OA, RAMÍREZ, JD, SANTI-ROCCA, J, MARIN-NETO, JA, MORILLO, CA, ROSAS, F and GUHL, F** (2014) Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLOS ONE*, 9, 3, e91154. doi: 10.1371/journal.pone.0091154.
- RASSI, A JR, RASSI A and MARIN-NETO, JA** (2010) Chagas disease. *Lancet*, 375:1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- RASSI, Jr, A, RASSI, A and REZENDE, JM** (2012) American Trypanosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, 275–291. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.002.

- ROCK, KL and GOLDBERG, AL** (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annual Review of Immunology*, 17, 739–779. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.739.
- RODRIGUES, MM, ALENCAR, BC, CLASER, C and TZELEPIS, F** (2008) Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(3):220–3. doi: 10.1590/S0100-879X2008005000054.
- SCHMUNIS, GA and YADON, ZE** (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115, 1–2, 14–21. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003
- SMITH, DM, CHANG, SC, PARK, S, FINLEY, D, CHENG, Y and GOLDBERG, A** (2007) Docking of the proteasomal ATPases' C-termini in the 20S proteasomes alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular Cell*, 27:731 - 744. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.033.
- SOUZA, W, CARVALHO, TMU and BARRIAS, ES** (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, Article ID 295394. doi: 10.1155/2010/295394.
- SOUZA, W and BARRIAS, E** (2017) Exosomes in the Pathogenic Protozoan *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Pathology and Clinical Research*, 3, 1. doi: 10.23937/2469-5807/1510054.
- STADTMUELLER, BM and HILL, CP** (2011) Proteasome activators. *Molecular Cell*, 41:8–19. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.020.
- TARLETON, RL** (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*, 19, 430–434. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.003.
- TARLENTON, RL** (2015) CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in Immunopathology*, 37, 233–238. doi: 10.1007/s00281-015-0481-9.
- TEIXEIRA, DE, BENCHIMOL, M, CREPALDI, PH and DE SOUZA, W** (2012) Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of chagas disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6(8): e1749. doi: 10.1371/journal.pntd.0001749.
- TOMKO, RJ and HOCHSTRASSER, M** (2013) Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual Review of Biochemistry* 82:415–445. doi: 10.1146/annurev-biochem-060410-150257.
- TYLER, KM and ENGMAN, DM** (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31, 472–481. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00153-9.

- ZAISS, DMW, DE GRAAF, N and SIJTS, AJAM** (2008) The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *American Society for Microbiology – Infection and Immunity*, 76, 1207–1213. doi: 10.1128/IAI.01134-07.
- WATANABE COSTA, R, SILVEIRA, JF and BAHIA, D** (2016) Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. *Frontiers in Microbiology*, 7, A 388. doi: 10.3389/fmicb.2016.00388.
- WINTER, MB, GRECA, FL, ARASTU-KAPUR, S, CAIAZZA, F, CIMERMANCIC, P, BUCHHOLZ, TJ, ANDERL, JL, RAVALIN, M, BOHN, MF, SALI, A, O'DONOGHUE, AJ and CRAIK, CS** (2017) Immunoproteasome functions explained by divergence in cleavage specificity and regulation. *eLIFE*, 6:e27364. doi: 10.7554/eLife.27364.001
- WORLD HEALTH ORGANISATION** (2021). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis), news-room, fact-sheets, detail. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Appendix

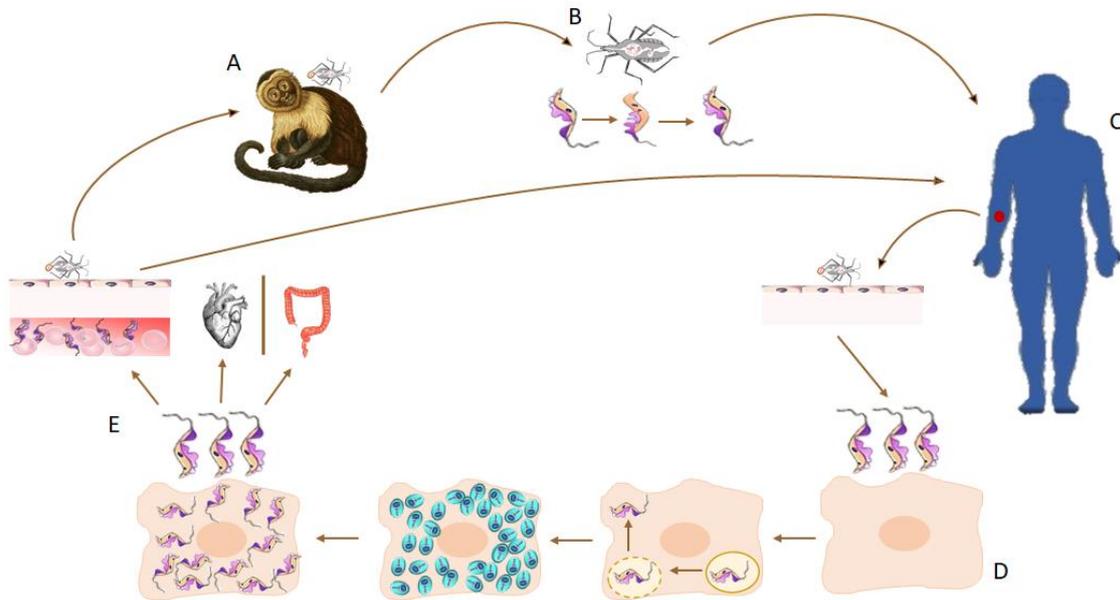


Figure 1. Demonstrative figure of the *T. cruzi* life cycle: A) the insect feeds on the blood of an infected vertebrate host ingesting the parasite; B) in the digestive system the parasite differs from the trypomastigote form to the epimastigote form and starts its multiplication by binary fission and assumes a trypomastigote form in the final portion of the parasite's intestine; C) the infected insect feeds on the blood of an individual and deposits its feces containing the parasite close to the injured area; D) after entering the organism, the parasite infects cells present near the region of entry of the organism and there's the formation of the parasitophore vacuole; the parasite evades the parasitophore vacuole and, in amastigote form, begins its replication in the cytoplasm of the host cell; E) after the replication phase, the parasite changes to the trypomastigote form and breaks the host cell, falling into the bloodstream and migrating to other infection sites where the parasite has a greater tropism (like heart, esophagus and large intestine) or in the bloodstream where it is ingested by a vector insect during its feeding restarting the cycle.

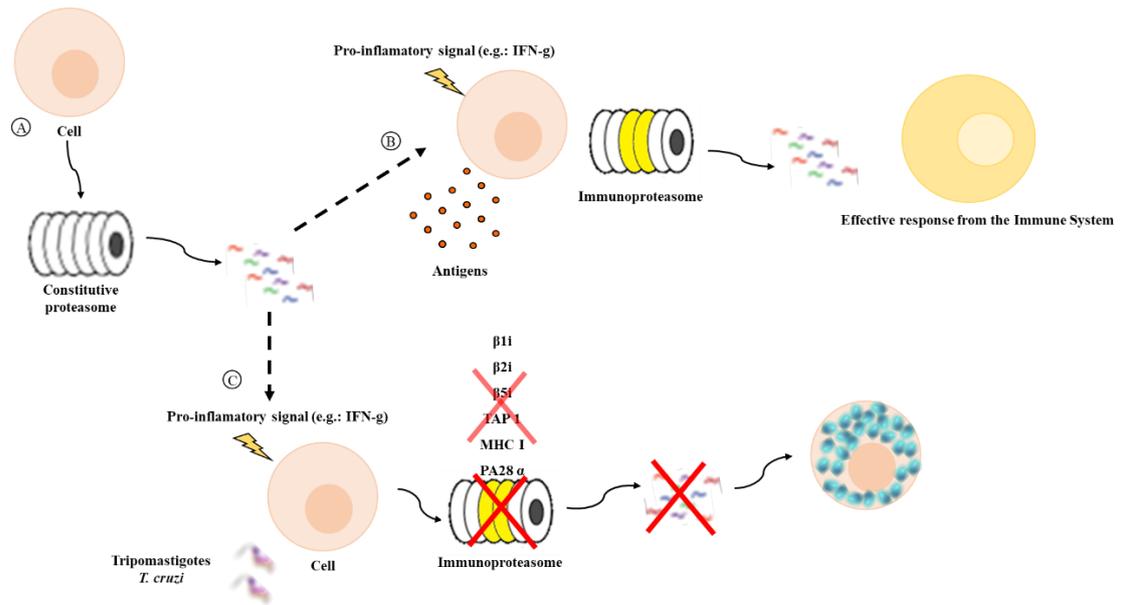


Figure 2. After an inflammatory stimulus, the cells start the synthesis of the immunoproteasome that is more focused on the generation of protein fragments to be presented to immune system's cells. However, during *T. cruzi* infection the affected cells appears to be unable to respond through MHC I path, impairing the immune response.

2. Justificativa

Maçaneiro (2009) (Figura 3) e Camargo et al. (2014) (Figuras 5 e 6) avaliaram a expressão e a atividade proteolítica do proteassoma e do imunoproteassoma e a expressão MHC I em células HeLa infectadas com *T. cruzi*. Para isso, as células HeLa foram cultivadas em cinco grupos onde o primeiro foi sem tratamento (controle); o segundo foi estimulado por 24 horas com IFN- γ ; o terceiro as células foram expostas aos tripomastigotas por 24 horas; o quarto células foram expostas aos tripomastigotas por 24 horas e em seguida tratadas com IFN- γ por 24 horas e o quinto grupo foi estimulado por 24 horas com IFN- γ e em seguida exposto aos tripomastigotas por 24 horas. Por meio de análises desses grupos através de técnicas como transcrição reversa seguida de reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) (Figura 3) e transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) (Figura 4), *western blotting* (Figura 5) e citometria de fluxo, foi demonstrado que a presença do parasita *T. cruzi* atuava como um fator inibitório na tradução dos mRNAs para as subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ e PA28 β , a proteína TAP1 e o receptor MHC I, uma vez que foi observada a presença do mRNA dos mesmos, porém uma baixa concentração de suas proteínas.

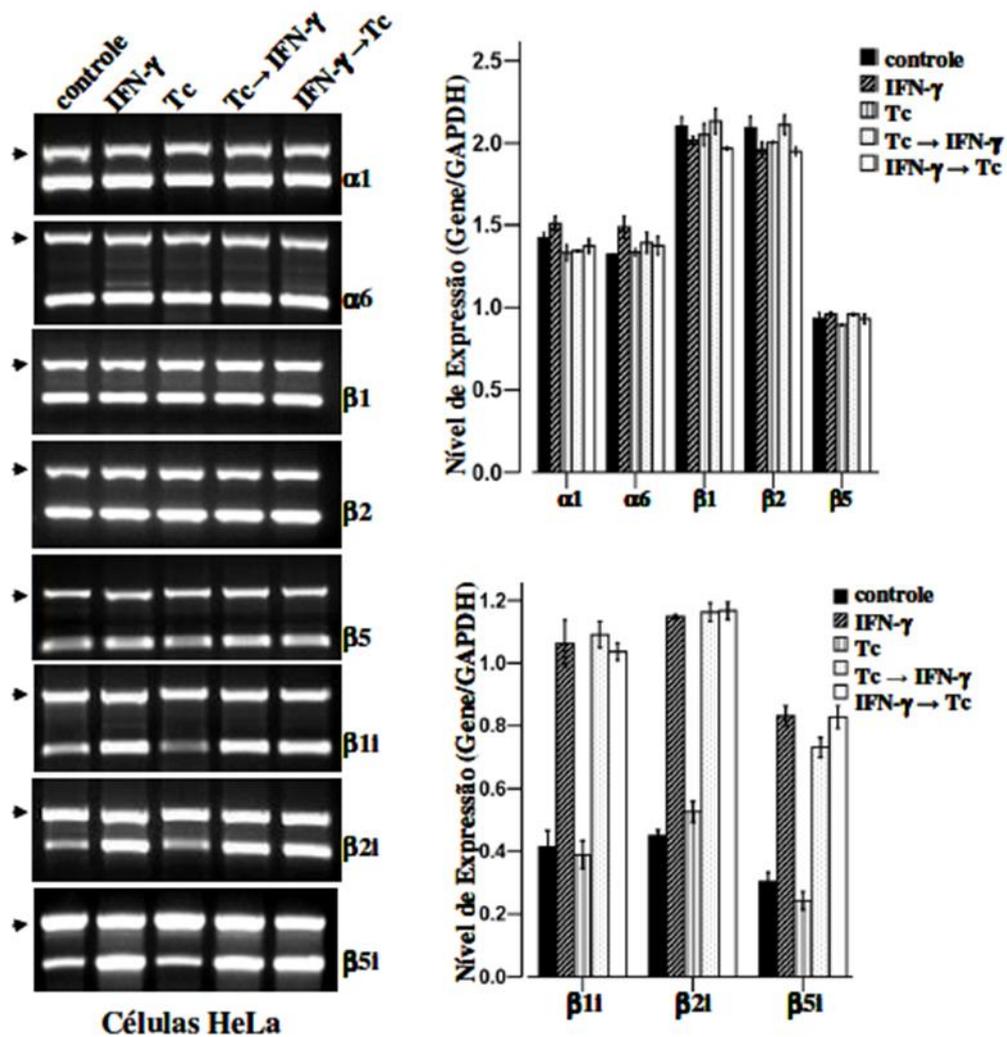


Figura 3. Quantificação do mRNA de subunidades do proteassoma/imunoproteassoma em células HeLa expostas a diversos tratamentos por meio de PCR semi quantitativo (MAÇANEIRO, 2009).

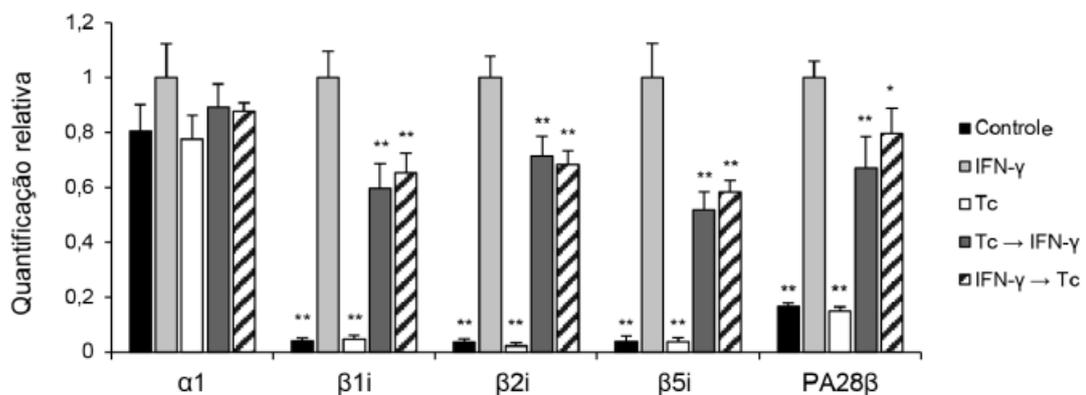


Figura 4. Quantificação do mRNA de subunidades do proteassoma/imunoproteassoma em células HeLa expostas a diversos tratamentos por meio de PCR em tempo real (CAMARGO et al., 2014).

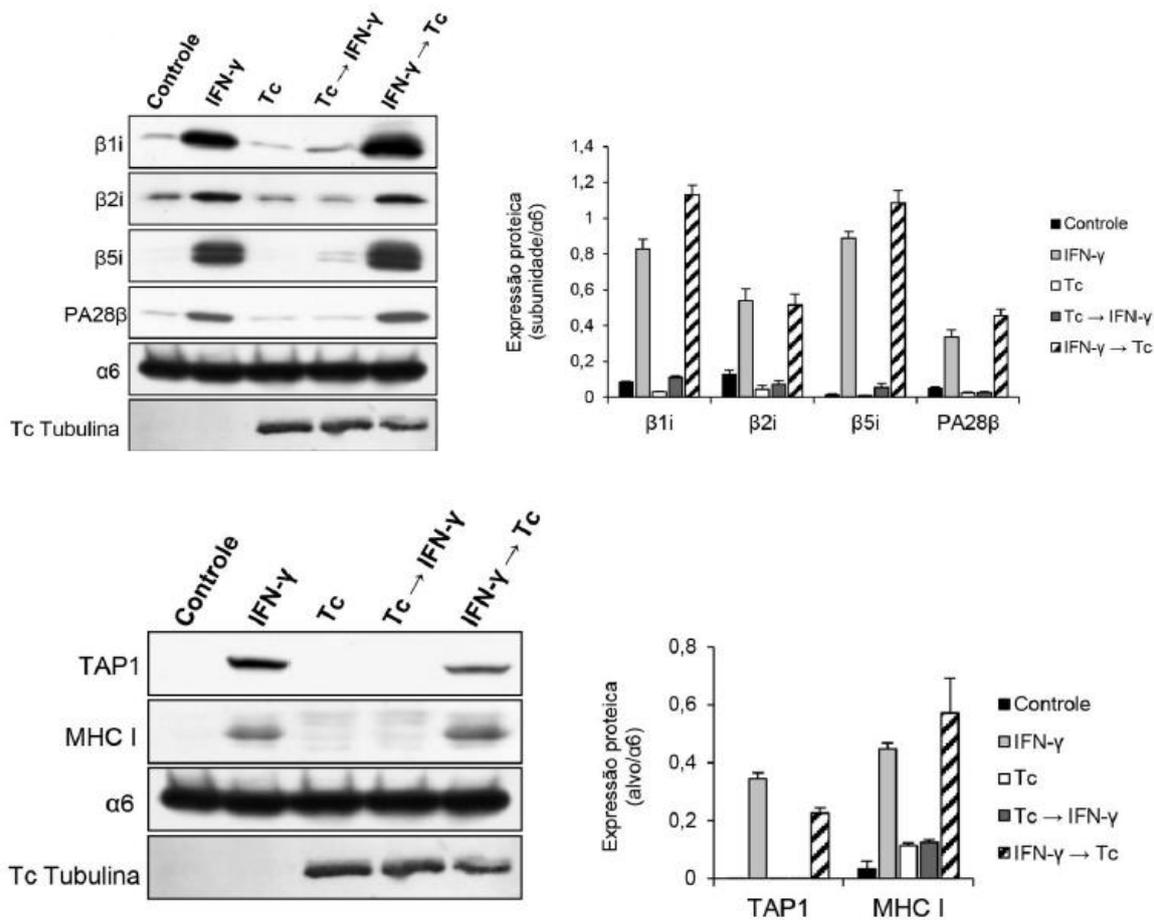


Figura 5. Western blot para avaliar a expressão das subunidades induzidas do imunoproteassoma, a molécula MHC I e a proteína TAP1 (CAMARGO et al., 2014).

Os trabalhos de Maçaneiro (2009) e Camargo et al. (2014) sugerem a existência de um fator interferente pós-transcricional dessas subunidades catalíticas do imunoproteassoma, bem como de TAP1 e MHC I, sendo necessários outros estudos para desvendar como se dá esse processo de interferência na expressão dessas moléculas, quais os alvos para inibição utilizados pelo *T. cruzi* e quais são as moléculas utilizadas pelo parasita para isso.

O controle pós-transcricional é um componente indispensável na manutenção da homeostase celular. Por meio deste, é possível fazer a manutenção da eficiência do mRNA e assim modular a expressão de diversos genes que respondem à estímulos endógenos ou exógenos, como hormônios, nutrientes e estresse (HERSHEY et al, 2012).

Os mecanismos de regulação apresentam espectro de ação diferentes, onde um mecanismo pode afetar a tradução de um único mRNA, um grupo ou a maioria dos

mRNAs presentes. Regulações que envolvem um maior número de moléculas de mRNA geralmente ocorrem por meio de ativação ou inibição de um ou mais componentes do maquinário de tradução. Regulações mais específicas geralmente ocorrem por meio da ação de proteínas *trans*, que afetam a taxa de iniciação da tradução ao reconhecer e se ligar a sítios presentes na região 3' não traduzida de alguns mRNAs específicos, interferindo no processo. Outras formas de regulação são realizadas por meio de microRNAs que se ligam a elementos *cis* no mRNA. Esses elementos são grampos e pseudo-nós, estruturas intramoleculares do mRNA que apresentam a capacidade de interferir na tradução sem a necessidade de fatores de ligação. Estas estruturas *cis* são conhecidas por afetar a iniciação da tradução nas seguintes situações e regiões do mRNA: na região 5' UTR; em sequências internas de acesso para ribossomo (IRES) - que ocorrem na maioria das vezes na sequência 5' UTR e coexiste com o CAP 5', conferindo o potencial de tradução para a molécula de mRNA em situações onde há comprometimentos da tradução dependente de CAP como em casos de estresse celular e apoptose; uORFS (*upstream open reading frames*) que estão presentes em 5' UTR de vários mRNAs e geralmente são responsáveis pela inibição da tradução (GEBAUER et al. 2012; HERSHEY et al, 2012; ROUX; TOPISIROVIC, 2012).

As regiões não traduzidas do mRNA (UTR) são sequências que estão diretamente vinculadas ao controle da expressão gênica, tendo forte impacto no controle pós transcricional do mesmo. Juntamente com outros fatores de interferência no RNA, essas regiões UTR regulam a estabilidade, a exportação para o citoplasma, a localização subcelular e a eficiência de tradução desta molécula, influenciando na quantidade de proteína sintetizada. Essas funções vinculadas às regiões não traduzidas do RNA as tornam alvos importantes na intervenção da síntese proteica (MATOULKOVA et al, 2012).

A regulação da expressão gênica por meio de UTR é feita por diversos mecanismos como o uso de proteínas de ligação específica ao RNA, que interagem com sequências de nucleotídeos localizados nas regiões 5' e 3' UTR. Essas proteínas são capazes de estabilizar/desestabilizar a molécula e/ou inibir/estimular sua tradução. Interações entre RNAs complementares específicos não codantes e sequências específicas localizadas nestas regiões também tem papel relevante no controle pós-transcricional. Sequências repetitivas presentes no RNA também são utilizadas na regulação pós-transcricional. Um exemplo são as proteínas ligantes à CUG, que se ligam a repetições de CUG presentes na região 5' de alguns mRNAs, afetando a eficiência da transcrição.

Outro mecanismo de regulação é o uso de moléculas de RNA de interferência (iRNA), que são agentes tipicamente repressores da tradução e indutores da degradação do mRNA (MIGNONE et al, 2002; IVANOV; ANDERSON, 2013).

De forma geral, o tamanho da região 3' UTR está inversamente correlacionada com a estabilidade do mRNA, a proliferação celular e a taxa de expressão gênica. Deste modo, mRNAs que apresentam uma região 3' UTR curta apresentam maior estabilidade, uma maior capacidade de transcrição e um maior potencial para tradução. Isso porque a região 3' UTR curta evade mecanismos que degradam 3'UTRs longos. Essas regiões mais curtas também apresentam poucos sítios para ligação de mRNAs, sofrendo menos interferências no processo de tradução (SANDBERG et al., 2008; MATOULKOVA et al., 2012).

Com base nos achados anteriores do grupo e com base no conhecimento da importância das regiões UTRs no processo de regulação pós-transcricional, levantamos a hipótese de o parasita poder interferir nessas regiões na subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma. Os testes realizados consistiram em flanquear um gene reporter (EGFP) com as regiões 5' e 3' UTR da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma e inserir essa estrutura (5'UTR-EGFP-3'UTR) no vetor de expressão em eucariotos pEGFP-N3 (Clontech). Após a montagem dessa estrutura, células HeLa foram submetidas a um processo de transfecção estável onde um grupo de células recebeu esse vetor modificado e um outro grupo foi transfectado com o vetor vazio. Após ambos os grupos estabelecerem uma população acima de 50% de células transfectadas, os grupos foram colocados em placas e submetidos um teste de infecção onde: tanto as células com vetor vazio quanto as com vetor modificado foram separadas em mais dois grupos, o grupo infectado com *T. cruzi* cepa Y e um grupo controle não infectado. No terceiro dia de infecção as células foram fixadas para leitura no microscópio de fluorescência ou descoladas dos poços para avaliação da emissão de fluorescência por citometria de fluxo.

Foi observado maioria das células transfectadas com o vetor modificado (5'UTR-EGFP-3'UTR) que apresentavam amastigotas em seu interior tinham fluorescência menor ou inexistente quando comparadas com células do mesmo grupo sem o parasita internalizado. Na mesma circunstância foi observado que as células com o vetor vazio continuaram a emitir fluorescência independentemente da presença ou quantidade de parasitas presentes em seu citoplasma (VIEIRA, 2017) (FIGURA 6 A e B respectivamente).

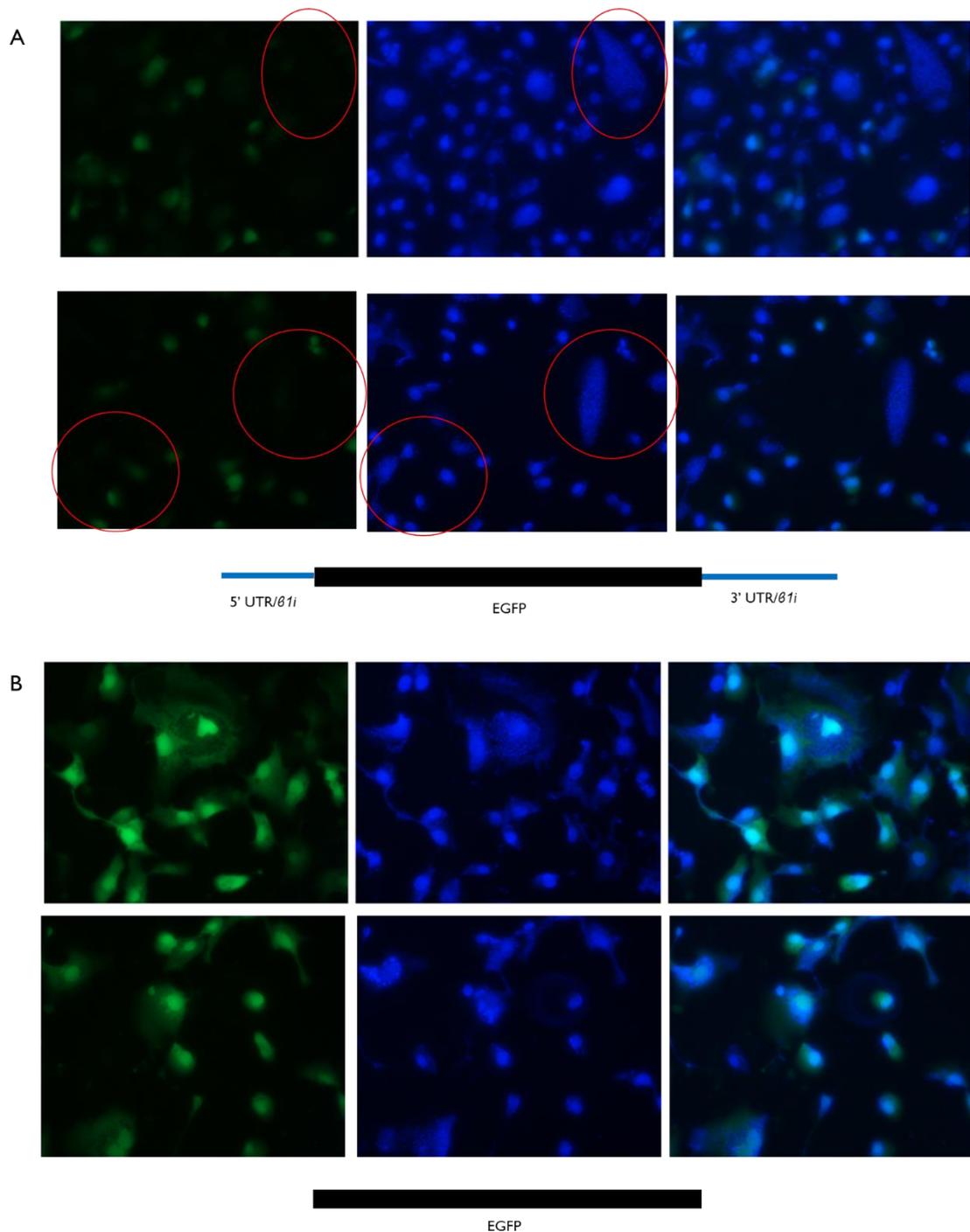


Figura 6. Expressão da EGFP em HeLa de transfecção estável do gene *EGFP* e infecção. (A) Células que apresentam a montagem 5'-*EGFP*-3' expostas ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens; (B) Células contendo apenas o gene *EGFP* expostas ao parasita, da esquerda para a direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens.

Os dados observados nos estudos descritos acima apontam para uma interferência na expressão de componentes específicos na via de apresentação de antígenos MHC I em

um nível pós-transcricional. Porém não se sabe em que momento exatamente esta interferência ocorre, qual UTR sofreria esta interferência ou que molécula (s) do parasita ou da própria célula hospedeira seriam os responsáveis por esta inibição. Por isso, novos estudos são necessários para que essas questões possam começar a ser elucidadas.

OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar o papel do parasita *Trypanosoma cruzi* na inibição da expressão em nível pós-transcricional da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano em células HeLa.

Para tal, os seguintes objetivos específicos são propostos:

- Construção de um plasmídeo portador das sequências 5' e 3' UTR da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano flanqueando a sequência do gene repórter *EGFP*;
- Avaliação se as regiões 5' e 3' não traduzidas do mRNA da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano estão envolvidas na inibição da expressão do gene durante a infecção pelo *T. cruzi* em sistema utilizando o gene para proteína verde (*EGFP*) como repórter em experimentos de transfecção e infecção;
- Estabelecimento de uma população de células HeLa de transfecção estável com o vetor pUTRs/ $\beta 1i$ /EGFP e uma com o vetor pEGFP para posterior infecção por *T. cruzi* para avaliação de uma possível interferência com as UTRs;
- Avaliação da capacidade de interferência do parasita com as sequências UTR da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano durante um experimento de transfecção transiente das células seguida de exposição ao parasita;
- Avaliação da capacidade de interferência do parasita *T. cruzi* com as sequências UTR da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano durante um experimento de exposição das células ao *T. cruzi* e posterior transfecção transiente.

MATERIAL E MÉTODO

1. Cultivo de células HeLa

Para esse trabalho, foram utilizadas células humanas advindas de tumor cervical denominadas HeLa (LUCEY et al., 2009). Para a obtenção de células viáveis para a execução do estudo proposto foi realizada a semeadura de $3,0 \times 10^6$ células em garrafas de 80 cm² com meio DMEM (Gibco, LifeTechnologies) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

Após o crescimento por um período de 24 a 48 h, as células foram desaderidas da garrafa com Verseno-Tripsina (0,1%), a ação da enzima foi interrompida ao acrescentar o meio DMEM. Após a ressuspensão, as células foram contadas câmara de Neubauer e em seguida transferidas para os poços das placas de cultura de células (24 ou 96 poços) na quantidade desejada por poço para a realização dos testes.

2. Cultivo do parasita *Trypanosoma cruzi* cepa Y

Para as infecções, foram utilizadas células de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) na forma tripomastigota (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953). Os tripomastigotas utilizados no estudo foram obtidos a partir da infecção de culturas de células HeLa na concentração de $3,0 \times 10^6$ células por garrafa de cultura de 80 cm² com tripomastigotas na proporção de 40 parasitas para cada célula, seguida da incubação das células a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂.

A eclosão dos primeiros tripomastigotas a partir de 72 horas após a infecção inicial e os parasitas obtidos foram utilizados nos testes.

3. Clonagem dos fragmentos 5' e 3' UTR da subunidade β 1i do imunoproteassoma humano no vetor pEGFP-N3 (Clontech)

Os fragmentos gênicos das sequências 5' e 3' UTR da subunidade β 1i do imunoproteassoma humano foram clonados a partir do genoma de células HeLa e L6 provenientes do acervo do laboratório por meio de PCR utilizando os primers 570, 571, 574 e 575 (Tabela 1), os primers foram desenvolvidos tendo como base a sequência disponível no genbank sob a identificação NM_002800.5; o gene EGFP foi clonado a partir do vetor pEGFP-N3 (Clontech) com os primers 572 e 573 (Tabela 1 – material suplementar) tendo como base a sequência disponibilizada pelo fabricante. Os fragmentos foram clonados nos vetores pGEM-T e pGEM-T easy (Promega) e depois

transferidos para o vetor pEGFP -N3 (Clontech) de acordo com o esquema apresentado na Figura 7.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Descrição	Sequência 5' - 3'	TM
PR570	Hsβ1i primer 5' do 5'UTR + NheI	GTAGCTAGCGCGCTTGTGCGCTGTC	58°C
PR571	Hsβ1i primer 3' do 5'UTR + BamHI	CTTGGATCCCCCTGCAAGGCACCGCT	58°C
PR572	EGFP primer 5' + BamHI	TTGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG	58°C
PR573	EGFP primer 3' + HindIII	GTCTAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCA	58°C
PR574	Hsβ1i primer 5' do 3'UTR + HindIII	TATTAAGCTTACCTTCCCCAGACTTCTCT	58°C
PR575	Hsβ1i primer 3' do 3'UTR + NotI	GCTGCGGCCGCTTGCGGCCTCATCATCATG	58°C
PR627	M13 R 22mer	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	64°C
PR628	M13 F 24mer	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	78°C
PR634	BGH poli A Primer 3' + Dra I II	GCTGCGGCCGCTTGCGGCCTCATCATCATG	58°C

4. Transfecção em células HeLa

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e simultaneamente com o vetor pUTRs/β1i/EGPF e com o vetor pEGFP-N3 (p-EGFP). Também foram estabelecidos grupos de controle (GC) da transfecção (transfectados mas não infectados) em todos os testes realizados.

Células HeLa foram transfectadas com o kit Lipofectamine 3000 (Thermofisher) e transfecções estáveis foram estabelecidas de acordo com o protocolo do fabricante (seleção com G418 [] 400µg/µL). Dois grupos foram estabelecido: um grupo transfectado com o vetor pUTRs/β1i/EGPF, que contém o gene *EGFP* flanqueado pelas UTRs 5' e 3' da subunidade β1i do imunoproteossoma humano e um segundo grupo transfectado com o vetor vazio (pEGFP-N3).

As células transfectadas com o vetor pUTRs/β1i/EGPF e células controle transfectadas com o vetor p-EGFP foram transferidas para placas de 24 poços em uma concentração de 0,3 x 10⁵ células/poço contendo lamínulas de 13 mm para posterior

microscopia. Após um período de 1 h para a fixação das células HeLa foram acrescentados tripomastigotas nos poços, sendo mantida a proporção de 50 parasitas por célula.

A infecção foi acompanhada por meio de microscopia ótica, após 72h as mesmas foram retiradas dos poços e levadas para citometria. Os poços para microscopia foram lavados com PBS 1x e em seguida fixados com paraformaldeído 4% por 30 min. Após a fixação, as lamínulas foram retiradas dos poços e colocadas em lâminas limpas e marcadas com ProLong Gold antifade reagent com DAPI (Invitrogen).

Outros testes de transfecção e infecção foram realizados com células de transfecção transiente onde: 2×10^2 HeLas foram transferidas para placas de 96 poços e após estarem fixadas foram expostas ao parasita sob uma concentração de aproximadamente $4,0 \times 10^4$ parasitas por poço. 20h depois, os parasitas foram retirados e as células foram transfectadas. Os testes foram interrompidos 68h após a infecção, quando os amastigotas estavam bem evidentes no citoplasma das células. Os poços foram fixados, marcadas com DAPI e levadas para microscopia de fluorescência.

Um terceiro teste foi realizado onde 2×10^2 HeLas foram transferidas para placas de 96 poços e transfectadas, após 20h as células foram expostas ao parasita sob uma concentração de $4,0 \times 10^4$ parasitas por poço para assegurar uma maior taxa de infecção das células. Após 68h de infecção, as células foram fixadas, marcadas com DAPI e levadas para microscopia de fluorescência

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e simultaneamente com o vetor pUTRs/ β 1i/EGFP e com o pEGFP. Também foram estabelecidos grupos de controle da transfecção (GC) (transfectados mas não infectados) em todos os testes realizados.

5. Citometria de fluxo

As células foram desaderidas do fundo dos poços com a solução verseno-tripsina e transferidas para tubos de 1,5 mL e ressuspensas em 1 mL PBS 1x.

A análise por citometria de fluxo foi realizada no equipamento FACS Verse (BD Biosciences) e os dados gerados foram analisados no programa FACS Suite (BD Biosciences). Os gráficos foram gerados por meio do programa GraphPad Prism (Scientific Software). A expressão de EGFP foi avaliada pela intensidade de fluorescência (MFI) emitida pelas células.

6. Microscopia de fluorescência

As células utilizadas nos experimentos de transfecção foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti expostas aos lasers para observação das fluorescências DAPI (excitação máxima = 358 nm; emissão máxima = 461) e EGFP (excitação máxima = 488 nm; emissão máxima = 507). A análise e as fotografias foram realizadas com lentes objetivas 10x e 20x sob exposição de 200 ms.

7. Determinação da taxa de emissão de fluorescência

Para obtermos um valor mensurável a quantidade de fluorescência emitida por cada uma das células utilizamos o programa ImageJ. Cada célula foi marcada individualmente e os dados obtidos foram então lançados na fórmula onde:

Fluorescência correta total da célula (FCTC) = densidade integrada – (Área selecionada da célula x média de fluorescência das leituras de background).

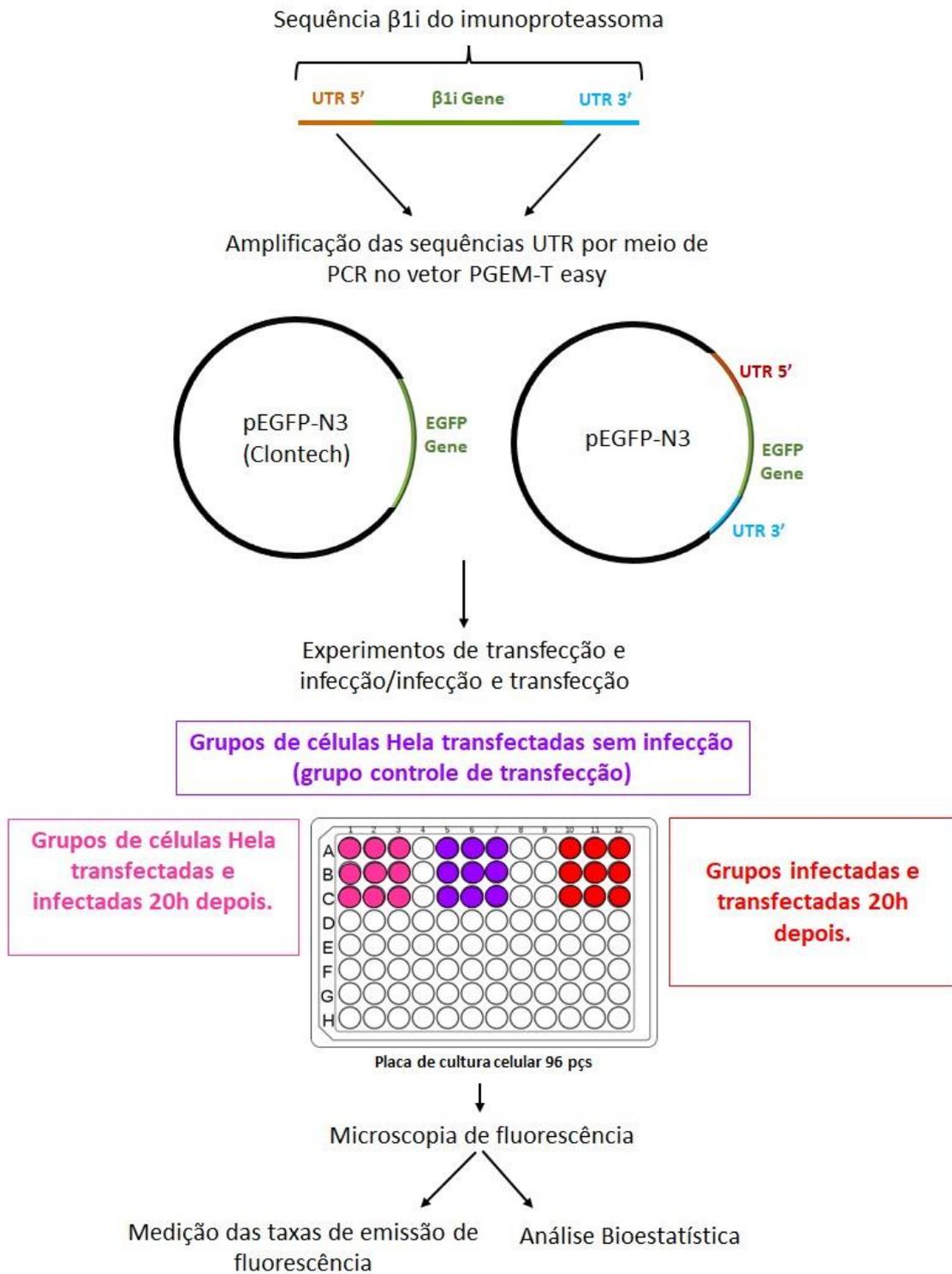


Figura 7. Desenho experimental para avaliação da possível interação do parasita *Trypanosoma cruzi* com as UTRs da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano.

RESULTADOS

A interferência pós-transcricional de *Trypanosoma cruzi* na expressão da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano foi avaliada por meio dos seguintes experimentos:

- Quantificação de fluorescência emitida por células HeLa estavelmente transfectadas com pEGFP ou com pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF e posteriormente expostas ao parasita;
- Quantificação de fluorescência emitida por células HeLa expostas ao parasita e posteriormente transfectadas (transiente) com pEGFP ou com pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF;
- Quantificação de fluorescência emitida por células HeLa transfectadas (transiente) com pEGFP ou pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF e posteriormente expostas ao parasita.

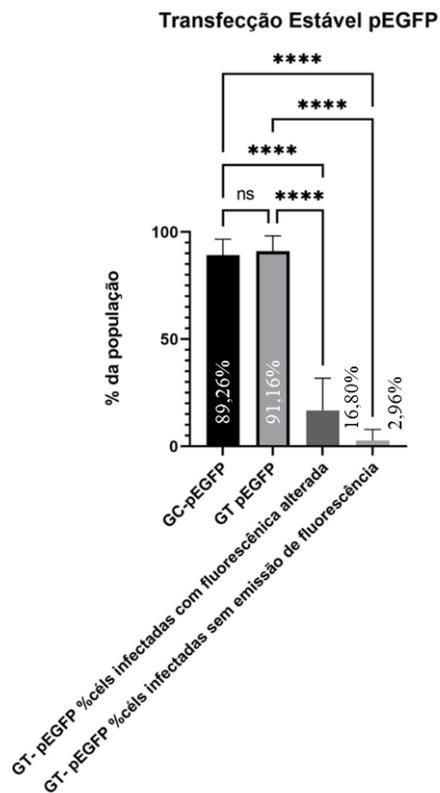
Para fim de descrição dos resultados observados, as populações celulares foram identificadas como descrito a seguir:

- **GC-pEGFP:** Células não expostas ao parasita portadoras do plasmídeo pEGFP (Figura 7);
- **GT- pEGFP:** Células expostas ao parasita portadoras do plasmídeo pEGFP;
- **GC-pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF:** Células não expostas ao parasita portadoras do plasmídeo pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF (Figura 7);
- **GT-pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF:** Células expostas ao parasita portadoras do plasmídeo pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF

1. A infecção por *Trypanosoma cruzi* diminui a expressão de fluorescência em células HeLa estavelmente transfetadas por pUTRs/ β 1i/EGPF e não interfere na intensidade de fluorescência emitidas por células HeLa estavelmente transfetadas por pEGFP

A contagem de populações de células HeLa por meio de microscopia de fluorescência, demonstrou que as células transfetadas com o vetor pEGFP (expostas ou não ao parasita) não apresentaram alteração significativa na emissão de fluorescência quando expostas a *T. cruzi* (Figura 8). A população celular transfetada com o vetor pUTR/ β 1i/EGPF também não sofreu perda de fluorescência na população celular total (infectadas e não infectadas) (Figura 8B). Porém, ao correlacionarmos a emissão ou não de fluorescência com a presença do parasita no interior da célula, foi possível observar que aproximadamente 16,79% das células infectadas do grupo testado com o vetor pEGFP apresentaram alteração na expressão da EGFP (Figura 8A). Entre o grupo de células HeLa GT-pUTRs/ β 1i/EGPF a população de células infectadas que apresentou alguma alteração negativa na expressão do EGFP foi de 95,02% (Figura 8B). Assim, a população celular pUTRs/ β 1i/EGPF infectada (GT) apresentou redução de fluorescência significativa (Figura 8B), diferentemente do observado no grupo celular pEGFP infectado (GT) (Figura 8A). Os dados obtidos por meio da microscopia de fluorescência foram corroborados pela citometria de fluxo (Figuras 12 e 13).

A



B

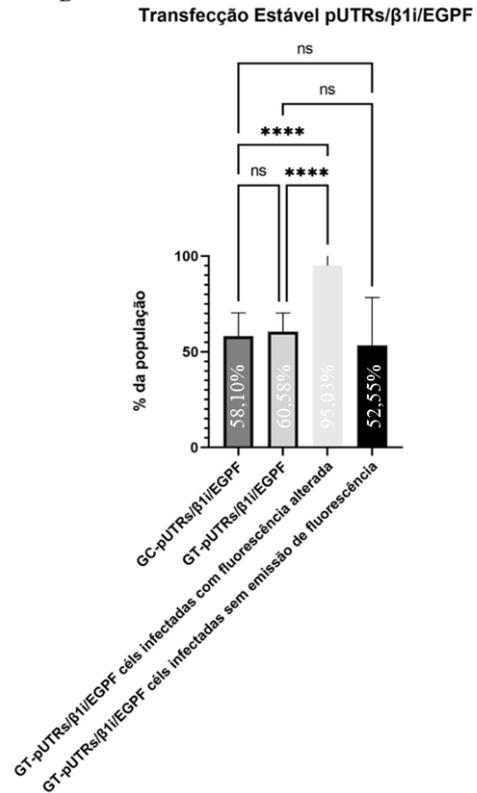


Figura 8. Análise das populações de células HeLa de transfecção estável: (A) comparação do grupo GC-pEGFP e GT-pEGFP em relação a população emitindo fluorescência quando expostos ou não a *T. cruzi*; (B) comparação do grupo GC-pUTRs/ β 1i/EGPF e GT-pUTRs/ β 1i/EGPF em relação a população emitindo fluorescência quando expostos ou não ao *T. cruzi*. Gráficos obtidos a partir de análise estatística (ANOVA) comparando os grupos celulares de HeLa portadores de pEGFP ou pUTRs/ β 1i/EGPF (expresso em porcentagem de células)

A emissão de fluorescência dos 4 grupos celulares (GC-pEGFP, GT-pEGFP; GC-pUTRs/ β 1i/EGPF e GT-pUTRs/ β 1i/EGPF) também foi quantificada por citometria de fluxo (Figuras 12 e 13). Ao compararmos a emissão de fluorescência dos grupos GC-pEGFP, GT-pEGFP (Figuras 12A e 13A), observamos que a presença do parasita no interior das células não inibiu a expressão do gene EGFP, uma vez que foi possível visualizar que em ambos os grupos a intensidade de fluorescência estava elevada. Por outro lado, a análise comparativa de emissão de fluorescência entre os grupos GC-pUTRs/ β 1i/EGPF e GT-pUTRs/ β 1i/EGPF indica que GT-pUTRs/ β 1i/EGPF apresentou redução de intensidade de fluorescência quando comparado a CG-pUTRs/ β 1i/EGPF (Figura 9B e 10B).

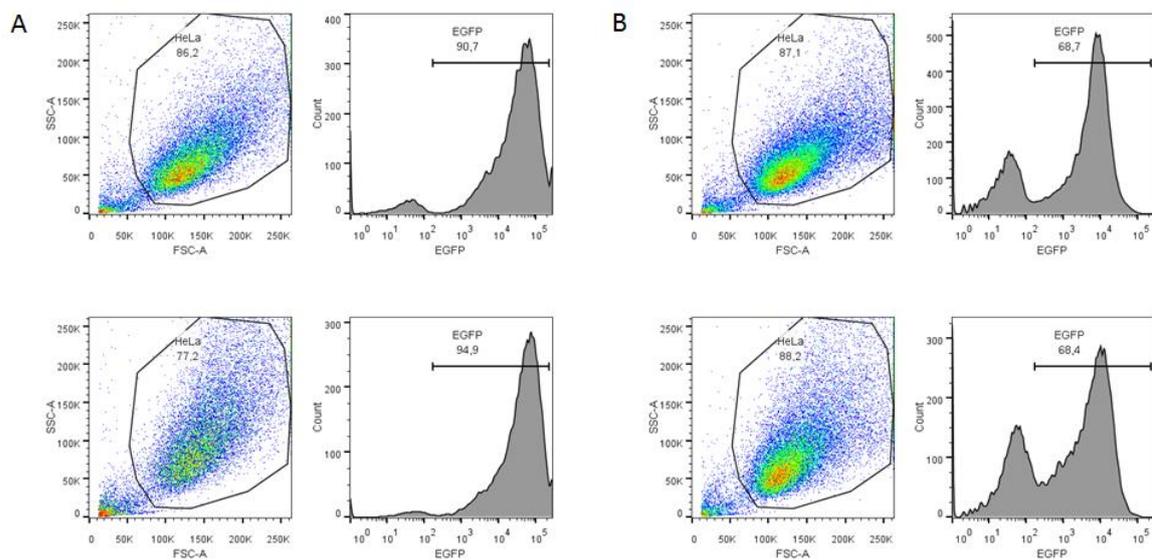


Figura 9. Análise da emissão de fluorescência por células transfectadas com os vetores pEGFP ou pUTRs/ β 1i/EGPF por citometria de fluxo FACS Verse (BD Biosciences). (A) Células transfectadas com o vetor pEGFP. O gráfico na parte superior representa as células não expostas aos parasitas (GC-pEGFP), enquanto os gráficos da parte inferior representam as células expostas ao *T. cruzi* (GT-pEGFP). (B) Células transfectadas com o vetor pUTRs/ β 1i/EGPF. O gráfico na parte superior representa as células não expostas aos parasitas (CG-pUTRs/ β 1i/EGPF), enquanto os gráficos da parte inferior representam as células expostas ao *T. cruzi* (CT-pUTRs/ β 1i/EGPF).

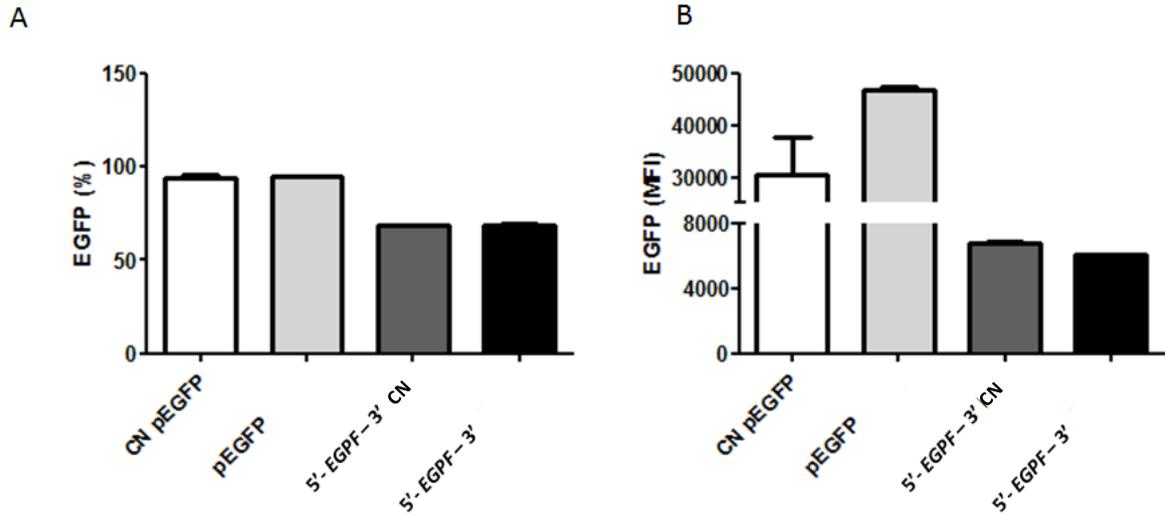


Figura 10. Avaliação quantitativa da expressão da EGFP por citometria de fluxo. (A) Porcentagem de emissão de fluorescência de cada uma das populações de estudo; (B) Intensidade de fluorescência emitida por cada população testada. CN pEGFP= grupo controle do EGFP; pEGFP= grupo teste EGFP; pUTRs/ β 1i/EGPF CN= grupo controle do pUTRs/ β 1i/EGPF; pUTRs/ β 1i/EGPF = grupo teste 5'-EGFP-3' (células infectadas com *T. cruzi*). (VIEIRA, 2017)

2. A emissão de fluorescência por células HeLa previamente expostas ao *Trypanosoma cruzi* não é alterada após a transfecção com pEGFP ou por pUTRs/ β 1i/EGPF (gene EGFP flanqueado com as regiões 5' e 3' das UTRs da subunidade β 1i do imunoproteassoma humano)

No grupo de células pUTRs/ β 1i/EGPF a emissão de fluorescência foi observada em 39,62% das células de GC, enquanto em GT 36% das células apresentaram emissão de fluorescência (Figura 13), diferença sem relevância estatística (Figura 16A). Em GT, foi observado que 51,95% das células infectadas não apresentaram emissão de fluorescência (Tabela 1 Anexo). Além disto, GT apresentou uma taxa de emissão de fluorescência de $1,34 \times 10^6$, diferentemente a observada em GC que foi de $1,9 \times 10^7$. Desta forma, é possível observar que GC apresentou um perfil de emissão de fluorescência superior ao GT (Figura 1 Anexo). Porém, ao observar os grupos em microscopia de fluorescência observamos que aparentemente a presença do parasita no interior da célula não foi fator relevante para expressão ou não do EGFP, uma vez que praticamente metade das células infectadas (média 48,5%) foram facilmente visualizadas (Figura 11B).

Para as células transfectadas com pEGFP, o grupo não exposto ao parasita (GC) apresentou comportamento semelhante ao grupo exposto a *T. cruzi* (GT). Em GT-pEGFP, 40,56% da população apresentou emissão de fluorescência e em GC este valor foi de 49,56% (Figura 16), diferença que não apresentou relevância estatística (Figura 16B). GT apresentou uma taxa de emissão um pouco abaixo da observada em seu GC (3×10^7 para $4,6 \times 10^7$ GC). Além disso, GT-pEGFP manteve um perfil de dispersão semelhante em relação à taxa de emissão de GC-pEGFP (Figura 2 Anexo A e B) (Tabela 3). Esse perfil pode ser observado nas imagens de microscopia de fluorescência, onde a presença do parasita aparentemente não interfere de forma negativa na expressão do EGFP (Figura 12) Portanto, assim como o observado para pUTRs/ β 1i/EGPF, os grupos pEGFP não apresentaram diferenças estatísticas entre si (Figura 16B)

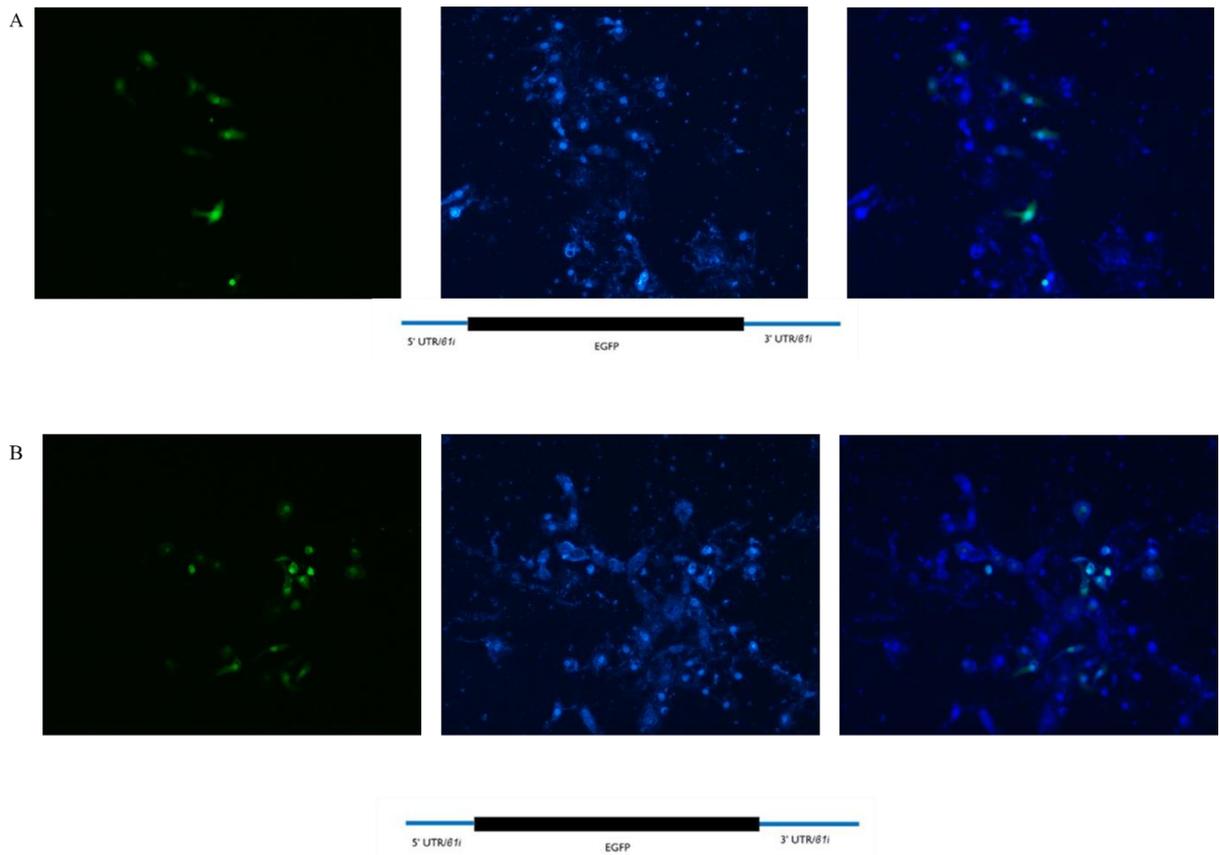


Figura 11. Microscopia de fluorescência das células HeLa infectadas com *Trypanosoma cruzi* e posteriormente transfectadas com o vetor pUTRs/β1i/EGPF. (A) grupo controle (GC) não exposto ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens; (B) grupo teste (GT) exposto ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens.

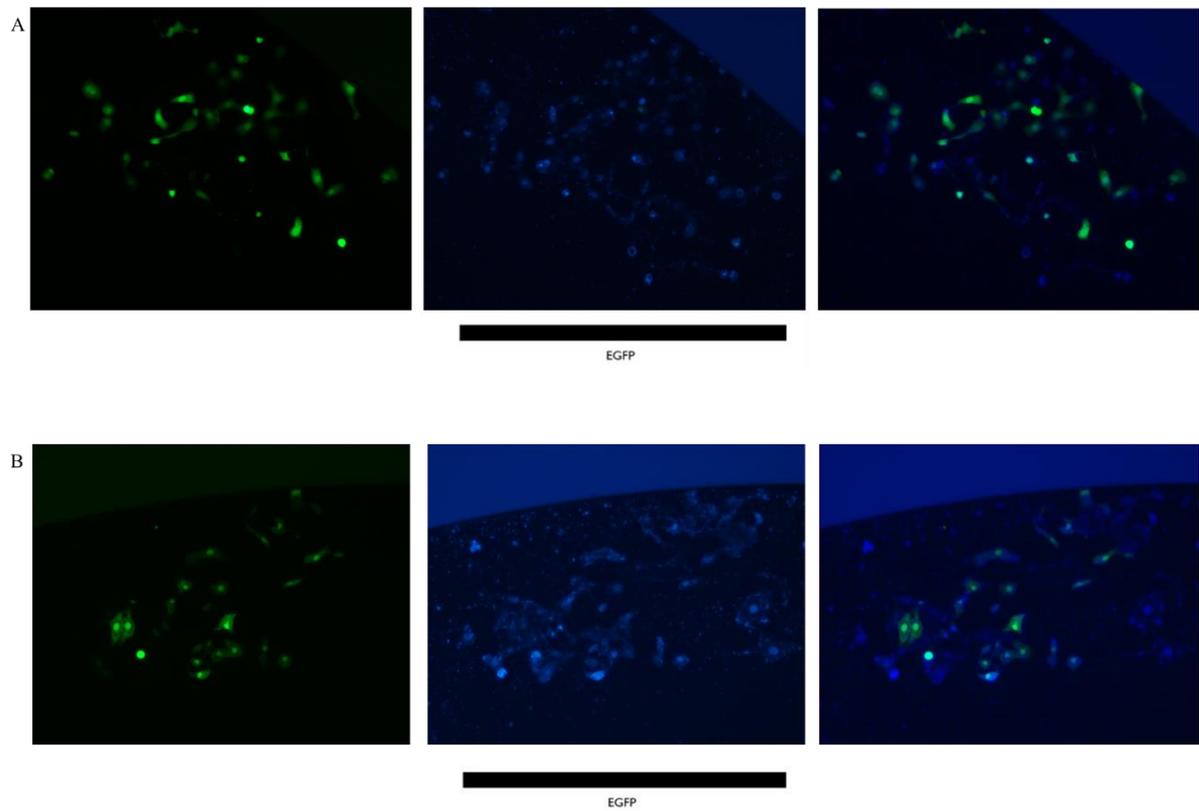


Figura 12. Microscopia de fluorescência das células HeLa infectadas com *Trypanosoma cruzi* e posteriormente transfectadas com o vetor pEGFP. (A) grupo controle não exposto ao parasita (GC-pEGFP), da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGFP; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens; (B) grupo teste exposto ao parasita (GT-EGFP), da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGFP; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens.

3. A infecção por *Trypanosoma cruzi* interfere negativamente na emissão de fluorescência de células HeLa portadoras de EGFP flanqueado com as regiões 5' e 3' das UTRs da subunidade β 1i do imunoproteassoma humano (transfectadas com pUTRs/ β 1i/EGPF)

Apesar dos grupos GC e GT portadores de pUTRs/ β 1i/EGPF terem apresentado uma baixa quantidade de células emitindo fluorescência (Figura 19), foi possível observar que em GT apenas 25% da população infectada emitiu fluorescência (Tabela 4) semelhantemente ao verificado nos experimentos de infecção de células com transfecção estável (Figura 8). Diferente do experimento anterior (infecção seguida de transfecção – item 2), as diferenças observadas entre as células infectadas não emitindo fluorescência com o GT geral (infectadas e não infectadas) e GC são significativas estatisticamente (Figura 16A direita). Células GT-pUTRs/ β 1i/EGPF apresentaram a taxa de fluorescência mais elevada que GC-pUTRs/ β 1i/EGPF ($3,9 \times 10^7$ GT para $2,4 \times 10^7$ em GC) (Figura 3 Anexo). Contudo, isto foi observado predominantemente em células de GT-pUTRs/ β 1i/EGPF não infectadas (Figura 13B).

O grupo GT-pEGFP apresentou uma pequena diferença percentual da população emitindo fluorescência em relação ao GC-pEGFP, mas sem relevância estatística (Figuras 23 e 27B). Este perfil de emissão de fluorescência para estes grupos também foi observado nos testes de transfecção estável (Figura 8A). A taxa de emissão de fluorescência de GT-pEGFP foi maior do que o observado em GC-pEGFP ($4,19 \times 10^7$ e 6×10^6 respectivamente) (Figura 4 Anexo). Nos grupos pEGFP as células não infectadas e as infectadas dentro do GT apresentaram emissão elevada de fluorescência (Figura 14). 67,32% da população GT-pEGFP apresentaram emissão fluorescência e apenas 25% no GT-pUTRs/ β 1i/EGPF 5'3' (Tabela 4 e 5). Assim como no experimento de infecção seguido de transfecção (item 2), as diferenças observadas dentro dos grupos pEGFP não foram relevantes estatisticamente (Figura 16B direita).

Com base nos dados apresentados, podemos inferir que a presença do parasita exerce uma repressão na expressão de EGFP por meio de interações com as UTRs inseridas no vetor, uma vez que foi observado que a presença do parasita em células contendo o vetor pEGFP (sem as UTRs) não interferiu de forma negativa na expressão da proteína.

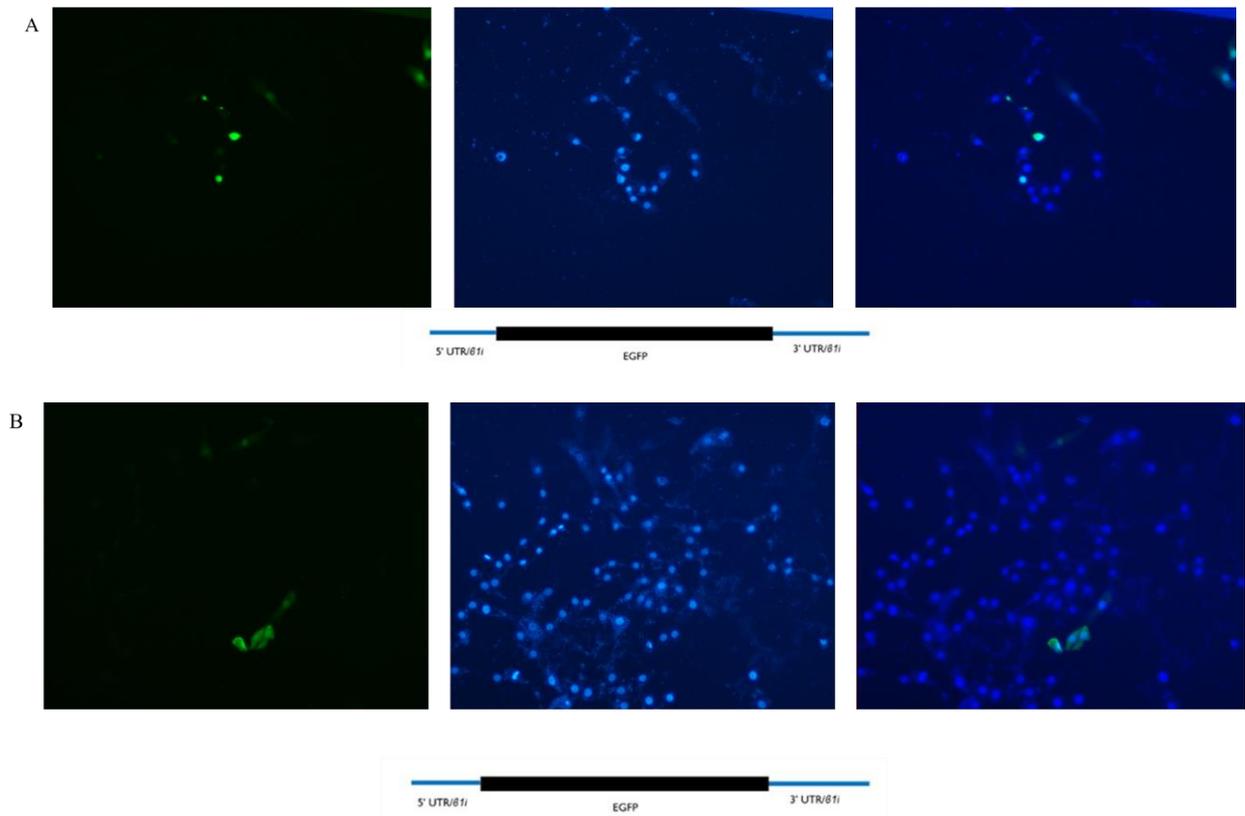


Figura 13. Microscopia de fluorescência das células HeLa transfetadas com o vetor pUTRs/β1i/EGPF e posteriormente infectadas com *Trypanosoma cruzi*. (A) grupo controle (GC) não exposto ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens; (B) grupo teste (GT) exposto ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens.

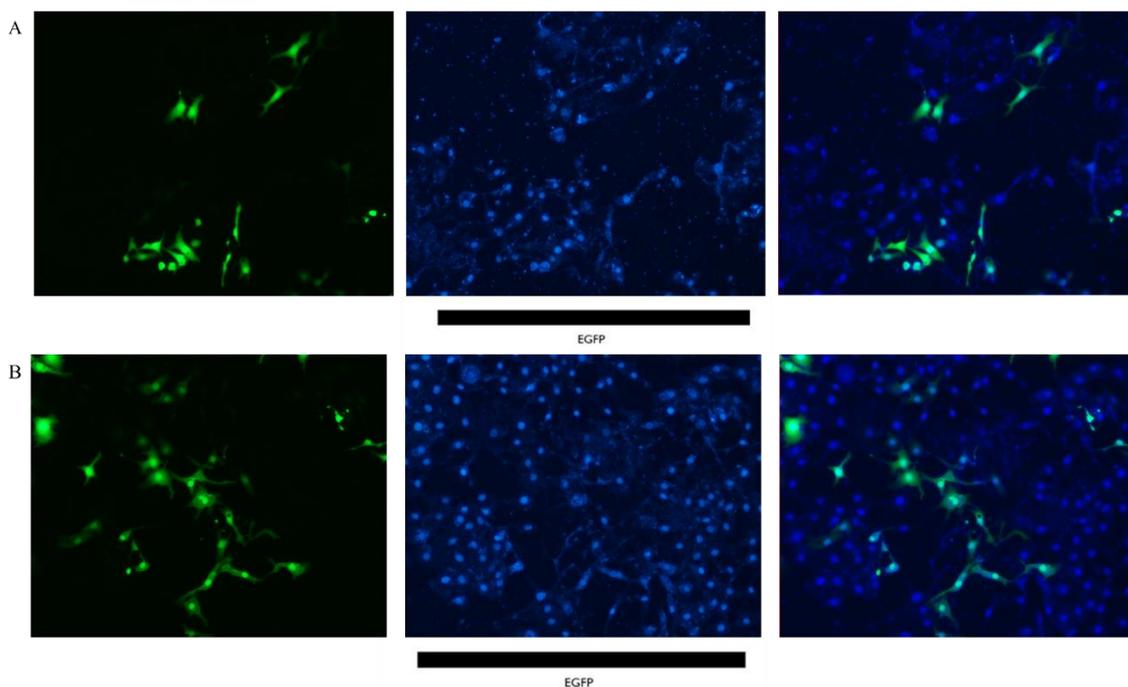


Figura 14. Microscopia de fluorescência das células HeLa transfetadas com o vetor pEGPF e posteriormente infectadas com *Trypanosoma cruzi*. (A) grupo controle (GC) não exposto ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens; (B) grupo teste (GT) exposto ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens.

Finalmente, a estatística comparativa por ANOVA entre os 4 grupos celulares (GC-pUTRs/ β 1i/EGPF; GC-pUTRs/ β 1i/EGPF; CG-pEGFP e CT GC-pEGFP) expostos ao parasita antes ou após a transfecção, confirmou as observações realizadas por meio de microscopia de fluorescência:

- Há interferência do parasita na expressão da proteína EGPF;
- As UTRs de gene β 1i são alvos de interação com *T. cruzi*;
- A interferência na expressão de EGFP ocorre nas primeiras horas de interação do parasita com a célula (provavelmente nas primeiras 12h), quando o parasita está mais susceptível a ação do imunoproteossoma, caso ele seja formado.

Ademais, a análise demonstra que não há uma diferença relevante nas populações fluorescentes em todos os casos: quando a população exposta é comparada com seu controle, exceto a população já transfetada com pUTRs/ β 1i/EGPF e posteriormente exposta ao parasita (Figura 13 e Figura 16A).

O grupo de células pUTRs/ β 1i/EGPF exposto ao parasita antes do processo de transfecção apresentou uma porcentagem maior de células infectadas emitindo fluorescência (48,05%) quando comparada com o grupo que foi exposto ao parasita após as células serem transfetadas (25%) (Figura 15).

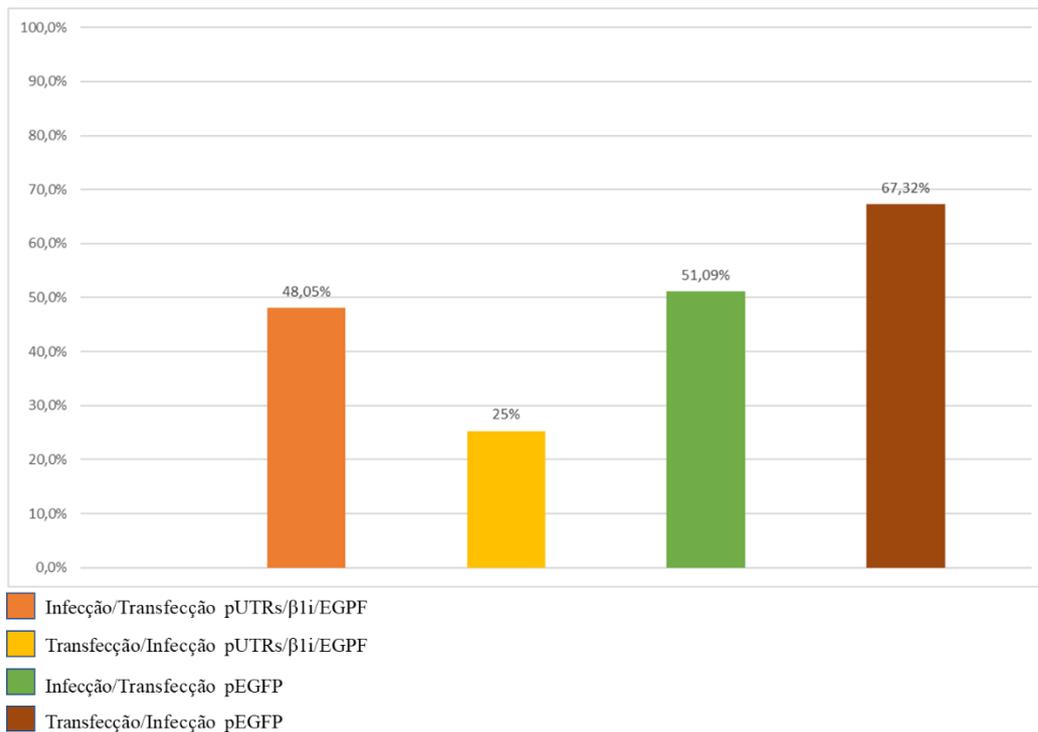


Figura 15. Porcentagem da média de células HeLa com emissão de fluorescência das populações infectadas transfectadas com pEGFP ou pUTRs/ β 1i/EGPF nas duas situações avaliadas: vetor transfectado após a infecção e vetor transfectado antes da infecção. Mediana: 50%, 21,62%, 50%, 100% respectivamente; Desvio Padrão: 1.8, 1.9, 2.1 e 4.5 respectivamente

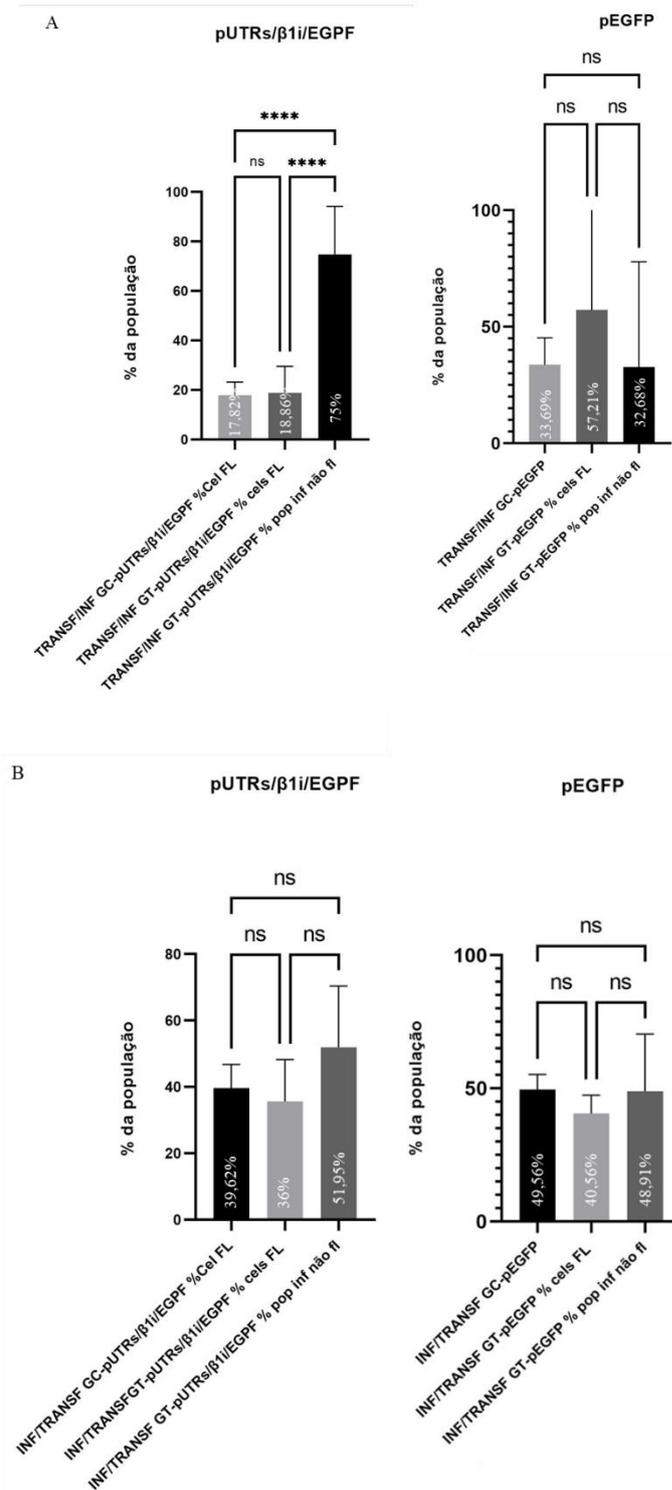


Figura 16. Gráficos comparativos dos grupos de transfecção transiente. (A) o teste mostra que há uma diferença significativa na população infectada não fluorescente quando comparada com seu controle e a população geral exposta ao parasita no teste transfectado com pUTRs/ β 1i/EGPF e posteriormente exposto ao parasita, o que não foi observado quando as células foram transfectadas com o vetor pEGFP em mesma situação; (B) não foi observada diferença relevante em qualquer dos testes realizados nos grupos expostos ao parasita e posteriormente transfectados com pUTRs/ β 1i/EGPF ou pEGFP. Gráfico obtido por meio de análise ANOVA não pareado.

DISCUSSÃO

A doença de Chagas, provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, está entre as principais doenças tropicais negligenciadas no mundo. Atualmente, de acordo com a OMS entre 6 e 7 milhões de pessoas ao redor do planeta estão infectadas com o parasita. Dentro do grupo de infectados, de 30 a 40% dos indivíduos desenvolvem alguma complicação de saúde anos após a infecção devido às lesões dos tecidos afetados. Durante seu ciclo no hospedeiro vertebrado, o parasita invade a célula e na forma amastigota, se replica para posteriormente assumir a forma tripomastigota e romper a célula hospedeira, ação que contribui para destruição do tecido hospedeiro (TYLER; ENGMAN, 2001; SOUZA et al., 2010; CRUZ-SAAVEDRA et al., 2020). Estudos indicam que o parasita possui meios de evasão imunitária que o possibilitam colonizar o hospedeiro por muitos anos. Diversos mecanismos de imunoevasão já foram descritos, contudo o ainda há muito sobre esta interação complexa entre parasita e hospedeiro a ser pesquisado e elucidado (FERREIRA et al., 2004; DOYLE et al., 2011; CESTARI et al., 2012; NARDY et al., 2015; CARDOSO et al., 2016).

O objetivo do presente trabalho foi validar as observações realizadas previamente onde foram avaliados os efeitos da interação de *T. cruzi* com células HeLa portadoras de um plasmídeo contendo o gene EGFP flanqueado com as UTRs do gene da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano (VIEIRA, 2017). Células HeLa foram submetidas à transfecção estável onde foram obtidos dois grupos celulares: (i) transfectado com o plasmídeo contendo o gene EGFP e (ii) transfectado com o plasmídeo contendo o gene EGFP flanqueado as UTRs do gene $\beta 1i$. Na época, foi observada a inibição da expressão de EGFP (por meio da redução de fluorescência), quando células portadoras das UTRs de $\beta 1i$ foram expostas a *T. cruzi*. Como alterações na emissão de fluorescência não foram observadas em células HeLa contendo apenas EGFP, foi proposta a hipótese de que o parasita interage com as UTRs de $\beta 1i$ inibindo sua expressão e utilizando este mecanismo como forma de escape de uma resposta efetora desencadeada pela via MHC I (Figura 6) (VIEIRA, 2017).

Com a finalidade de confirmar estas observações, utilizamos os vetores pUTRs/ $\beta 1i$ /EGFP e pEGFP em transfecção transiente de células HeLa para comparar os efeitos da exposição destas células com *T. cruzi* na expressão de EGFP das seguintes maneiras: (i) células previamente transfectadas e posteriormente expostas ao *T. cruzi* e

(ii) células primeiramente expostas ao parasita e posteriormente transfectadas com pUTRs/ β 1i/EGPF ou pEGFP. Após as etapas de transfecção e exposição ao parasita, a emissão de fluorescência pelas células foi quantificada em microscopia onde a ausência ou alteração (especificamente redução) de emissão de fluorescência foi utilizada como indicador de inibição da expressão de EGFP pelas células transfectadas.

Nos testes realizados no presente trabalho, observamos que dentro do grupo de HeLa transfectado com o vetor pUTRs/ β 1i/EGPF e, posteriormente, exposto ao *T. cruzi* (GT- pUTRs/ β 1i/EGPF), células portadoras de amastigotas apresentaram uma queda significativa na emissão de fluorescência quando comparadas à emissão exibida por células de GT- pUTRs/ β 1i/EGPF sem amastigotas e por seu grupo controle (não exposto ao parasita) (Figura 13B). Estas observações estão de acordo ao descrito em células de transfecção estável (Figura 6). Por outro lado, este comportamento não foi observado nas mesmas situações em células transfectadas com o vetor pEGFP tampouco naquelas que foram transfectadas após a exposição ao parasita (com pUTRs/ β 1i/EGPF ou pEGFP) (Figuras 18 e 24). Estes dados sugerem que o parasita interage com as UTRs do gene da subunidade β 1i do imunoproteassoma inibindo sua expressão. Consequentemente, a configuração final do imunoproteassoma é comprometida assim como a capacidade das células do hospedeiro em apresentar antígenos via MHC-I.

Microrganismos como fungos, bactérias e protozoários produzem moléculas bioativas que modulam a interação parasita-hospedeiro, possibilitando que o patógeno sobreviva e se multiplique no interior do hospedeiro (BAYER-SANTOS et al, 2013). Protozoários parasitas liberam vesículas no meio extracelular e essas vesículas podem carregar biomoléculas, proteínas, mRNAs, miRNA que são capazes de modificar o fenótipo e o funcionamento da célula hospedeira permitindo a sobrevivência do patógeno (EVANS-OSSES et al., 2015).

Shin et al. (2015) realizaram testes onde eles infectaram células monocíticas THP 1 com *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Por meio de PCR em tempo real quantitativo, os autores demonstraram que as infecções alteraram a expressão de 21 genes onde alguns se relacionam com a resposta do sistema imune. Além disso, foi observado que alguns genes foram hiper-expressos como CD14, CCL4 e 5 CXCL9 e 10 (que tem ligação com a resposta imune) e outros tiveram sua expressão reduzida. Durante a infecção por *Toxoplasma gondii* foi observada o aumento da síntese dos componentes do imunoproteassoma (mRNA e proteínas) nos cérebros de camundongos infectados, em micróglias, astrócitos e neurônios, após estímulo das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ ,

IL-1 β , TNF- α , and IL-6 estimuladas pela presença do protozoário no organismo (ZHANG et al., 2021). Estes dados podem ser indicativos da importância da modulação do sistema imune e do próprio imunoproteossoma no mecanismo patogênico para estabelecer e desenvolver a infecção e resposta inflamatória no organismo hospedeiro.

Os vírus são outros agentes infecciosos que também desenvolveram formas de evadir o sistema imune das células hospedeiras, como demonstrado por Hu et al. (1999), que demonstrou que o vírus da hepatite B produz uma proteína denominada X que interage com a subunidade $\alpha 7$ do proteossoma, inibindo suas atividades proteolíticas. Existem outros estudos que demonstraram a redução nos níveis de proteína TAP1, TAP2, $\beta 1i$ e $\beta 5i$ em células infectadas com os vírus HPV tipo 18 E7 e o adenovírus tipo 12E1A (ROTEM-YEHUDAR et al., 1996; PROFFIT; BLAIR, 1997; GEORGOPOULOS et al., 2000). Em contrapartida, existem vírus como o human papillomavirus (HPV) que induzem um aumento na atividade do proteossoma para sua permanência na célula hospedeira (BEREZUTSKAYA; BAGCHI, 1997). O vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína inibe a expressão induzida por IFN- γ das subunidades catalíticas do imunoproteossoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$) nos níveis de mRNA e proteína em macrófagos alveolares infectados (LIU et al., 2020).

Em análise do transcriptoma de pacientes com COVID-19, foi observado que, no pulmão dos pacientes infectados com SARS-CoV-2, havia uma intensidade no processamento e apresentação de antígenos via MHC I proporcional ao nível da detecção viral. Também foi levantada a hipótese de componentes do imunoproteossoma serem ativados de forma dependente da carga viral do SARS-CoV-2. Além disto, em análise de células bronco-alveolares foi detectada a ativação do imunoproteossoma em macrófagos M1 em casos menos graves da doença (DESTERKE et al., 2021).

A capacidade do *T. cruzi* em modular o comportamento da célula hospedeira já foi descrita em vários estudos. O estudo realizado por Torrecilhas e colaboradores (2009) demonstrou a importância das vesículas liberadas pelo *T. cruzi* na instalação e desenvolvimento da doença. No estudo citado foi observada elevação considerável da taxa de mortalidade e lesões no tecido cardíaco de camundongos expostos às vesículas do parasita antes que a infecção ocorresse. A presença prévia das vesículas também foi associada a elevação de uma resposta inflamatória do hospedeiro, onde foi observada a elevação de IL-4 e IL-10. Também foi possível observar a interação de vesículas liberadas pelo parasita com macrófagos e outras culturas de células de mamíferos em uma janela de 5 a 15 minutos após a adição delas ao meio.

A capacidade de imunomodulação provocada pelo parasita também é observada em estudo realizado por Garcia-Silva e colaboradores (2014) que demonstrou experimentalmente que vesículas liberadas por *T. cruzi* contendo pequenos tRNAs e a proteína Tc-PIWI secretadas pelo parasita atuam como veículo para a transferência dessas moléculas para outros parasitas e para células hospedeiras. Essas vesículas também desempenham um papel importante na mudança da morfologia de epimastigota para tripomastigota e atua na suscetibilidade das células hospedeiras à invasão do parasita.

Lentini e colaboradores (2018) apresentaram trabalho onde indicam um relacionamento de *T. cruzi* na forma amastigota com as mitocôndrias da célula. Em estudo mais recente, foi demonstrada a capacidade do *T. cruzi* de alterar a estrutura nuclear da célula hospedeira, que o parasita pode interferir com proteínas hospedeiras com funções ligadas ao processamento de RNA provocando a redução de proteínas hospedeiras relacionadas ao processo de transcrição do mRNA, processamento e maquinário de transporte em uma janela de 11 a 12 horas após a infecção (GACHET-CASTRO et al, 2021).

Em 2008, Bergeron e colaboradores avaliaram a modulação do imunoproteassoma por *T. cruzi* em macrófagos de camundongos, sendo induzido ou não por IFN- γ . Os autores observaram que há uma inibição na síntese do imunoproteassoma induzida por IFN- γ assim como para o mRNA do MHC I e sua expressão na superfície celular. Porém o mesmo efeito não foi observado quando as células infectadas não receberam estímulo pelo IFN- γ e os níveis de mRNA e proteína se mantiveram semelhantes ao grupo não infectado. Posteriormente, este resultado não foi corroborado no estudo de Camargo e colaboradores (2014) que observaram a redução nos níveis de proteína das subunidades catalíticas do imunoproteassoma, MHC I e PA28 α na presença do parasita sem estímulo de síntese com IFN- γ . Cada estudo foi desenvolvido com células diferentes (macrófagos e HeLa respectivamente), porém não é possível dizer se essas divergências nos resultados podem ser especificamente devido ao tipo celular testado. Enquanto Bergeron e colaboradores (2008) atribuiu a inibição à ativação da via SAPK/JNK, Camargo e colaboradores (2014) não apontou um mecanismo molecular responsável pelo observado.

Com base nos achados do presente estudo pudemos observar que de fato há uma interferência com as UTRs do gene β 1i do imunoproteassoma quando as células transfectadas com o vetor pUTRs/ β 1i/EGPF são posteriormente expostas ao parasita. Contudo, isto não é observado quando o vetor foi transfectado após exposição das células ao *T. cruzi*. Estas observações apontam para a interferência na expressão de β 1i por *T.*

cruzi durante um período específico da infecção, quando o sistema ubiquitina/imunoproteassoma oferece de fato um risco de alertar o sistema imune sobre sua presença, e assim impede uma resposta efetiva das células T CD8+.

Estudos realizados anteriormente (MAÇANEIRO, et al., 2009; CAMARGO, et al., 2014) demonstraram que, durante a infecção por *T. cruzi*, algumas subunidades catalíticas de imunoproteassoma não são expressas, porém o mRNA destas subunidades estavam presentes na célula (Figuras 4, 5 e 6). Com base nestes trabalhos, levantamos a hipótese de as UTRs terem o potencial de serem alvos neste processo de modulação da expressão destas proteínas. A partir disto, vetores foram desenvolvidos no laboratório onde gene repórter EGFP foi flanqueado pelas sequencias UTR da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano e experimentos de transfecção estável em células HeLa e posterior exposição ao *T. cruzi* foram realizados (Figura 8). Os resultados obtidos sugeriam que havia de fato uma redução na expressão da proteína fluorescente no grupo exposto ao parasita quando comparado com seus controles (VIEIRA, 2017). O trabalho atual se propôs a aprofundar o que já havia sido observado nestas pesquisas e utilizamos o vetor pUTRs/ $\beta 1i$ /EGPF para validar o observado nos experimentos de transfecção estável. Para isso, os experimentos foram adaptados para testes com transfecção transiente em dois cenários distintos: i) as células HeLa foram transfectadas e após 20h expostas ao parasita; ii) as células HeLa foram expostas ao parasita e após 20h foram transfectadas. Ao avaliarmos estatisticamente os dados obtidos por meio de microscopia de fluorescência e calcular as taxas de emissão chegamos à conclusão de que: 1) a presença do parasita pode interferir de forma negativa na expressão da subunidade estudada agindo sobre as UTRs; 2) esta interferência não ocorre em momento aleatório, mas nas primeiras horas de contato do parasita com a célula hospedeira. Estes trabalhos em conjunto apontam para uma interferência do parasita no controle pós-transcricional de sequências de componentes da via de apresentação de antígenos MHC I e que esta interferência pode ocorrer nas regiões UTRs destes mRNAs.

Contudo, não sabemos ainda qual ou quais biomoléculas do parasita estão envolvidas nesta supressão, seu mecanismo de ação, se elas atuam de forma direta sobre esses mRNAs ou induz a célula a fazer sua captura e se este mesmo mecanismo atua nas demais subunidades do imunoproteassoma e da via MHC I que tem uma redução de expressão durante a infecção, sendo necessários mais estudos para elucidar os detalhes deste mecanismo de evasão.

CONCLUSÃO

Tendo como base os estudos anteriores e os dados obtidos no presente trabalho, concluímos que há uma interação entre o parasita e as UTRs da subunidade $\beta 1i$ do imunoproteassoma humano e que esta interação, em uma janela específica de tempo, faz uma regulação negativa na expressão da subunidade.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou mais uma forma de interação do *T. cruzi* com seu hospedeiro que possibilita ao parasita evadir o sistema imune. Apesar disto, questionamentos à cerca do tema permanecem em aberto que foram apresentadas ao final da discussão deste trabalho.

Outros pontos que ficam em aberto e são relevantes: é importante que seja definido se esta interferência observada ocorre em apenas uma das UTRs (5' ou 3') ou em ambas. Durante o presente trabalho tentamos responder este questionamento com os mesmos experimentos, mas com vetores que apresentavam apenas uma das UTRs juntamente com o gene EGFP. Porém, ficamos hesitantes com relação à estabilidade da molécula que apresentaria apenas uma UTR e se assumir este risco nos levaria à um resultado condizente com a realidade.

É importante especular se componentes das vesículas do parasita não transportam componentes que podem provocar a inibição do imunoproteassoma antes mesmo da internalização do parasita ocorrer, uma vez que no presente trabalho não houve uma separação destas vesículas dos parasitas no processo de exposição às HeLas. Uma abordagem que iniciamos e acreditamos que é interessante dar continuidade é avaliar se a proteína Tc-PIWI-tryp - argonauta presente na vesícula liberada pelo parasita - teria participação no processo de inibição pós-transcricional observado.

REFEÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AHN, JY, TANAHASHI, N, AKIYAMA, K, HISAMATSU, H, NODA, C, TANAKA, K, CHUNG, CH, SHIBMARA, N, WILLY, P J, MOTT, J D, SLAUGHTER, CA and DEMARTINO, GN** (1995) Primary structures of two homologous subunits of PA28, a γ -interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Letters*. 366, 1, 37–42. doi: 10.1016/0014-5793(95)00492-R.
- ALVAREZ, MG, POSTAN, M, WEATHERLY, DB, ALBAREDA, MC, SIDNEY, J, SETTE, A, OLIVERA, C, ARMENTI, AH, TARLENTON, RL and LAUCELLA, SA** (2008) HLA class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2(9):e288. doi: 10.1371/journal.pntd.0000288.
- ANDREWS, NW, HONG, KS, ROBBINS, ES and NUSSENZWEIG, V** (1987) Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 64, 474-484. doi: 10.1016/0014-4894(87)90062-2.
- ANDREWS, NW and WHITLOW, MB** (1989) Secretion of *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33, 3, 249–256. doi: 10.1016/0166-6851(89)90086-8.
- ANDREWS, NW, ABRAMS, CK, SLATIN, SL and GRIFFITHS, G** (1990) A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore forming activity at low pH. *Cell*, 61, 7, 1277–1287. doi: 10.1016/0092-8674(90)90692-8.
- BARRIAS, ES, CARVALHO, TMU and SOUZA, W** (2013) *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology*. 4, 186. doi: 10.3389/fimmu.2013.00186.
- BARTHOLOMEU, DC, PAIVA, RMC, MENDES, TAO, DAROCHA, WD and TEIXEIRA, SMR** (2014) Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. *PLOS Pathogens*, 10, 12. doi: 10.1371/journal.ppat.1004399.
- BAYER-SANTOS, E, AGUILAR-BONAVIDES, C, RODRIGUES, SP, CORDERO, EM, MARQUES, AF, VARELA-RAMIREZ, A, CHOI, HG, YOSHIDA, N, DA SILVEIRA, JF AND ALMEIDA, IC** (2013) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*, 12, 2, 883–897, doi: 10.1021/pr300947g
- BEREZUTSKAYA, E and BAGCHI, S** (1997) The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Functionally Interacts with the S4 Subunit of the 26 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48):30135-40, doi: 10.1074/jbc.272.48.30135
- BERGERON, M, BLANCHETE, J, ROULEAU, P and OLIVIER, M** (2008) Abnormal IFN- γ -dependent immunoproteasome modulation by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Parasite Immunology*, 30: 280–292, doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01022.x

- BERN, C** (2015) Chagas' Disease. *The New England Journal Of Medicine*, 373;5. doi: 10.1056/NEJMra1410150.
- BOCHTLER, M** (1999) The Proteasome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 295-317. doi: 10.1146/annurev.biophys.28.1.295.
- BONALDO, MC, SOUTO-PADRON, T, DE SOUZA, W and GOLDENBERG, S** (1988) Cell±substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Journal of Cell Biology*, 106, 1349-1358. doi: 10.1083/jcb.106.4.1349.
- BOSE, S, BROOKS, P, MASON, GG and RIVETT, A J** (2001) g-Interferon decreases the level of 26S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation, *Biochemical Journal*, 353, 291-297. doi: 10.1042/0264-6021:3530291.
- CAMARGO, R, FARIA, OL, KLOSS, A, FAVALI, CBF, KUCKELKORN, U, KLOETZEL, PM, DE SÁ, CM and LIMA, BD** (2014) *Trypanosoma cruzi* Infection Down-Modulates the Immunoproteasome Biosynthesis and the MHC ClassI Cell Surface Expression in HeLa Cells. *PLOS ONE*, 9, 4, e95977. doi: 10.1371/journal.pone.0095977.
- CARDILLO, F, POSTOL, E, NIHEI, J, AROEIRA, LS, NOMIZO, A and MENGEL, J** (2007) B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 122(4):584–95. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02677.x.
- CARDOSO, MS, REIS-CUNHA, JL and BARTHOLOMEU, DC** (2016) Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Frontiers in Immunology*, 6: 659, doi: 10.3389/fimmu.2015.00659.
- CESTARI, I, ANSA-ADDO, E, DEOLINDO, P, INAL, JM and RAMIREZ, MI** (2012) *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. *The Journal of Immunology*, 188:1942-1952, doi: 10.4049/jimmunol.1102053
- CHATELAIN, E** (2017) Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 98–103. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.002.
- CHEMALI, M, RADTKE, K, DESJARDINS, M and ENGLISH, L** (2011) Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68,1533–1541. doi: 10.1007/s00018-011-0660-3.
- CONTRERAS, VT, SALLES, JM, THOMAS, N, MOREL, CM and GOLDENBERG, S** (1985) In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(3):315–327. doi: 10.1016/0166-6851(85)90073-8.
- COURA, JR and BORGES-PEREIRA, J** (2012) Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(3), 286-296.

- CRUZ-SAAVEDRA, L, VALLEJO, GA, GUHL, F and RAMÍREZ, JD** (2020) Transcriptomic changes across the life cycle of *Trypanosoma cruzi* II. *PeerJ* 8: e8947. doi: 10.7717/peerj.8947.
- CUCUNUBÁ, ZM, OKUWOGA, O, BASÁÑEZ, MG and NOUVELLET, P** (2016) Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors*, 9:42. doi: 10.1186/s13071-016-1315-x.
- DESTERKE, C, TURHAN, AG, BENNACEUR-GRISCELLI, A and GRISCELLI, F** (2021) HLA-dependent heterogeneity and macrophage immunoproteasome activation during lung COVID-19 disease. *Journal of Translational Medicine*, 19:290, doi:10.1186/s12967-021-02965-5.
- DHIMAN, M and GARG, NJ** (2011) NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *Journal of Pathology*, 225, 583–596. doi: 10.1002/path.2975.
- DIAS, JCP, AMATO NETO, V and LUNA, EJA** (2011) Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(3),375-379. doi: 10.1590/S0037-86822011005000032.
- DOYLE, PS, ZHOU, YM, HSIEH, I, GREENBAUM, DC, MCKERROW, JH and ENGEL, JC** (2011) The *Trypanosoma cruzi* Protease Cruzain Mediates Immune Evasion. *PLOS Pathogens*, v7(9):e1002139, doi: 10.1371/journal.ppat.1002139
- DUTRA, WO, MENEZES, CAS, VILLANI, FNA, DA COSTA, GC, DA SILVEIRA, ABM, REIS, DA and GOLLOB, KJ** (2009) Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl. I), 208-218. doi: 10.1590/S0074-02762009000900027.
- ESKANDARI, S, SEELEN, MA, LIN, G and AZZI, JR** (2017) The immunoproteasome: An old player with a novel and emerging role in alloimmunity. *American Journal of Transplantation*, 17(12):3033-39. doi: 10.1111/ajt.14435.
- EVANS-OSES, I, REICHEMBACH, LH and RAMIREZ, MI** (2015) Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. *Parasitology Research*, 114, 3567-3575, doi: 10.1007/s00436-015-4659-9
- FERNANDES, MC and ANDREWS, NW** (2012) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Review*, 36,734–747. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.
- FERREIRA, V, VALCK, C, SÁNCHEZ, G, GINGRAS, A, TZIMA, S, MOLINA, MC, SIM, R, SCHWAEBLE, W and FERREIRA, A** (2004) The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 172:3042-3050, doi: 10.4049/jimmunol.172.5.3042

- FIGUEIREDO, RC, ROSA, DS and SOARES, MJ** (2000) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *Journal of Parasitology*, 86(6):1213–1218. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[1213:DOTCEM]2.0.CO;2.
- GACHET-CASTRO, C, FREITAS-CASTRO, F, GONZÁLES-CÓRDOVA, RA, DA FONSECA, CK, GOMES, MD, ISHIKAWA-ANKERHOLD, HC AND BAQUI, MMA** (2021) Modulation of the Host Nuclear Compartment by *Trypanosoma cruzi* Uncovers Effects on Host Transcription and Splicing Machinery. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 718028, doi: 10.3389/fcimb.2021.718028
- GACZYNSKA, M, ROCK, KL and GOLDBERG, AL** (1993) g-Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*, 365, 264-267. doi: 10.1038/365264a0.
- GACZYNSKA, M, ROCK, KL, SPIES, T and GOLDBERG, AL** (1994) Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 91, 9213-9217. doi: 10.1073/pnas.91.20.9213.
- GARCIA, ES and AZAMBUJA, P** (1991) Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, 7:240–4. doi: 10.1016/0169-4758(91)90237-i.
- GARCIA-SILVA, MR, CABRERA-CABRERA, F, DAS NEVES, RFC, SOUTO-PADRÓN, T, DE SOUZA, W and CAYOTA, A** (2014) Gene Expression Changes Induced by *Trypanosoma cruzi* Shed Microvesicles in Mammalian Host Cells: Relevance of tRNA-Derived Halves. *BioMed Research International*, 2014: 305239, doi: 10.1155/2014/305239
- GARCIA-SILVA, M., R.; DAS NEVES, R., F., C.; CABRERA-CABRERA, F.; SANGUINETTI, J.; MEDEIROS, L. C.; ROBELLO, C, NAYA, H, FERNANDEZ-CALERO, T, SOUTO-PADRON, T, SOUZA, W AND CAYOTA, A** (2014) Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, 113:285–304, doi: 10.1007/s00436-013-3655-1
- GEBAUER, F, PREISS, T and HENTZE, MW** (2012) From Cis-Regulatory Elements to Complex RNPs and Back. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*, 4:a012245, doi: 10.1101/cshperspect.a012245
- GEORGOPOULOS, NT, PROFFITT, JL and 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(42):4930-5, doi: 10.1038/sj.onc.1203860

- GLICKMAN, MH and CIECHANOVER, A** (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 82, 373-428. doi: 10.1152/physrev.00027.2001.
- GONÇALVES, CS, ÁVILA, AR, DE SOUZA, W, MOTTA, MCM and CAVALCANTI, DP** (2018) Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & Vectors*, 11:83. doi: 10.1186/s13071-018-2664-4.
- GOLDBERG, AL** (2007) Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochemical Society Transactions*, 35(1):12-17. doi: 10.1042/BST0350012.
- GOLDENBERG, S and AVILA, AR** (2011) Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation. *Advances in Parasitology*, 75:285–305. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00013-7.
- GROETTRUP, M, KHAN, S, SCHWARZ, K and SCHMIDTKE, G** (2001) Interferon- γ inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: Why? *Biochimie*, 83, 367-372. doi: 10.1016/s0300-9084(01)01251-2.
- GROLL, M and POTTS, BC** (2011) Proteasome Structure, Function, and Lessons Learned from Beta-Lactone Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 2850-2878. doi: 10.2174/156802611798281320.
- HEINK, S, LUDWIG, D, KLOETZEL, PM and KRÜGER, E** (2005) IFN- γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *PNAS*, 102:9241 - 9246. doi: 10.1073/pnas.0501711102.
- HERSHEY, WBJ; SONENBERG, N and MATHEWS, MB** (2012) Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, 4: a011528. doi: 10.1101/cshperspect.a011528.
- HOWARD, EJ, XIONG, X, CARLIER, Y, SOSA-ESTANI, S and BUEKENS, P** (2014) Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*, 121: 22–33. doi: 10.1111/1471-0528.12396.
- HU, Z, ZHANG, Z, DOO, E, COUX O, GOLDBERG, AL and LIANG, TJ** (1999) Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *Journal of Virology*, 73(9):7231–7240, doi: 10.1128/jvi.73.9.7231-7240.1999
- HUTCHINSON, S, SIMS, S, O'HARA, G, SILK, J, GILEADI, U, CERUNDOLO, C and KLENERMAN, P** (2011) A Dominant Role for the Immunoproteasome in CD8+ TCell Responses to Murine Cytomegalovirus, *PLOS ONE*, 6, 2, e14646. doi: 10.1371/journal.pone.0014646.
- IVANOV, P and ANDERSON, P** (2013) Post-transcriptional regulatory networks in immunity. *Immunological Reviews*, 253, 253-72. doi: 10.1111/imr.12051.

- JACKSON, Y, PINTO, A and PETT, S** (2014) Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Tropical Medicine & International Health*, 19:212–8. doi: 10.1111/tmi.12235.
- JUNQUEIRA, C, CAETANO, B, BARTHOLOMEU, DC, MELO, MB, ROPERT, C, RODRIGUES, MM and GAZZINELLI, RT** (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12:e29. doi: 10.1017/S1462399410001560.
- KALIM, KW, BASLER, M, KIRK, CJ and GROETTRUP, M** (2012) Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. *The Journal of Immunology*, 189, 4182–4193. doi: 10.4049/jimmunol.1201183.
- KIMURA, H, CATUREGLI, P, TAKAHASHI, M and SUZUKI, K** (2015) New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *Journal of Immunology Research*, Article ID 541984. doi: 10.1155/2015/541984.
- KINCAID, EZ, CHE, JW, YORK, I, ESCOBAR, H, REYES-VARGAS, E, DELGADO, JC, WELSH, RM, KAROW, LM, MURPHY, AJ, VALENZUELA, DM, YANCOPOULOS, GD and ROCK, KL** (2012) Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nature Immunology*, 13, 129–135. doi: 10.1038/ni.2203.
- KISSELEV, AF, VAN DER LINDEN, WA and OVERKLEEF, HS** (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chemistry & Biology*, 19:99–115. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.01.003.
- KLEFFMANN, T, SCHMIDT, J and SCHAUB, GA** (1998) Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45, 548-555. doi: 10.1111/j.1550-7408.1998.tb05115.x.
- KLEIN, N, HURWITZ, I and URVASULA, R** (2012) Review Article: Globalization of Chagas Disease: A Growing Concern in Nonendemic Countries. *Epidemiology Research International*, v 2012. doi:10.1155/2012/136793
- LEE, W and KIM, KB** (2011) The Immunoproteasome: An Emerging Therapeutic Target. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 2923-2930. doi: 10.2174/156802611798281348.
- LENTINI, G, PACHECO, NS and BURLEIGH, BA** (2017) Targeting host mitochondria: A role for the *Trypanosoma cruzi* amastigote flagellum. *Cellular Microbiology*, 20:e12807, doi: doi.org/10.1111/cmi.12807
- LEY, V, ANDREWS, NW, ROBBINS, ES and NUSSENZWEIG, V** (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, 168, 649-659. doi: 10.1084/jem.168.2.649.

- LEY, V, ROBBINS, ES, NUSSENZWEIG, V and ANDREWS, NW** (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *Journal of Experimental Medicine*, 171, 2, 401–413. doi: 10.1084/jem.171.2.401
- LIU, Q, YU, YY, WANG, HY, WANG, JF and HE, XJ** (2020) The IFN- γ -induced immunoproteasome is suppressed in highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 226:110069, doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110069.
- LOVO-MARTINS, MI, MALVEZI, AD, ZANLUQUI, NG, LUCCHETTI, BFC, TATAKIHARA, VLH, MÖRKING, PA, OLIVEIRA, AG, GOLDENBERG, S, WOWK, PF and PINGE-FILHO, P** (2018) Extracellular Vesicles Shed By *Trypanosoma cruzi* Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9, 896. doi: 10.3389/fimmu.2018.00896.
- LUQUETTI, AO, TAVARES, SBDN, SIRIANO, LDR, OLIVEIRA, RA, CAMPOS, DE, MORAIS, CA and OLIVEIRA, EC** (2015) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 369–76. doi: 10.1590/0074-02760140410.
- MAÇANEIRO, LOF** (2009) Expressão de imunoproteassomas em células infectadas com *Trypanosoma cruzi*. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular, *Repositório Institucional Da Unb*, <https://repositorio.unb.br/handle/10482/3802>
- MARTIN, DL, WEATHERLY, DB, LAUCELLA, SA, CABINIAN, MA, CRIM, MT, SULLIVAN, S, HEIGES, M, CRAVEN, SH, ROSENBERG, CS, COLLINS, MH, SETTE, A, POSTAN, M and TARLETON, RL** (2006) CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathogens*, 2(8):e77. doi: 10.1371/journal.ppat.0020077.
- MARTINS-MELO, FR, RAMOS, JRAN, ALENCAR, CH and HEUKELBACH, J** (2012) Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 6:817–24. doi: 10.3855/jidc.2459.
- MATOUJKOVA, E, MICHALOVA, E, VOJTESEK, B and HRSTKA, R** (2012) The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biology*, 9:5, 563-576, doi: 10.4161/rna.20231
- MIGNONE, F, GISSI, C, LIUNI, S and PESOLE, G** (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology*, 3, 3. doi: 10.1186/gb-2002-3-3-reviews0004
- MOEBIUS, J, VAN DEN BROEK, M, GROETTRUP, M and BASLER, M** (2010) Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice. *European Journal of Immunology*, 40:3439–3449. doi: 10.1002/eji.201040620.

- MOREL, S, LEVY, F, BURLET-SCHILTZ, S, BRASSEUR, F, PROBST-KEPPER, ML, PEITREQUIN, AL, MONSARRAT, B, VAN VELTHOVEN, R, CEROTTINI, JC, BOON, T, GAIRIN, JE and VAN DEN EYNDE, BJ** (2000) Processing of Some Antigens by the Standard Proteasome but Not by the Immunoproteasome Results in Poor Presentation by Dendritic Cells. *Immunity*, 12, 107–117. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80163-6.
- MUCHAMUEL, T, BASLER, M, AUJAY, MA, SUZUKI, E, KALIM, KW, LAUER, C, SYLVAIN, C, RING, ER, SHIELDS, J, JIANG, J, SHWONEK, P, PARLATI, F, DEMO, SD, BENNETT, MK, KIRK, CJ and GROETTRUP, M** (2009) A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nature Medicine*, 15, 781–787. doi: 10.1038/nm.1978.
- MURATA, S, TAKAHAMA, Y, KASAHARA, M and TANAKA, K** (2018) The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease. *Nature Immunology*, 19, 923–931. doi: 10.1038/s41590-018-0186-z.
- NARDY, AF, FREIRE-DE-LIMA, CG and MORROT, ANARDY** (2015) Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology Research*, Article ID 178947, doi: 10.1155/2015/178947
- NUNES, MCP, DONES, W, MORILLO, CA, ENCINA, JJ and RIBEIRO, AL** (2013) Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology JACC*, 62, 9, 767 -776, 2013. doi: 10.1016/j.jacc.05.046.
- OGOREVC, E, SCHIFFRER, ES, SOSIČ, I and GOBEC, S** (2018) A patent review of immunoproteasome inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, ISSN:1354-3776. doi: 10.1080/13543776.2018.1484904.
- ORLOWSKI, M and WILK, S** (2000) Catalytic Activities of the 20S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(1): 1-16. doi: 10.1006/abbi.2000.2036.
- PADILLA, AM, BUSTAMANTE, JM and TARLETON, RL** (2009) CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Current Opinion in Immunology*, 21,385–390. doi: 10.1016/j.coi.2009.07.006.
- PÉREZ-MOLINA, JA. and MOLINA, I** (2018) Chagas Disease. *Lancet*, 391: 82–94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- POVEDA, C, FRESNO, M, GIRONÈS, M, MARTINS-FILHO, OA, RAMÍREZ, JD, SANTI-ROCCA, J, MARIN-NETO, JA, MORILLO, CA, ROSAS, F and GUHL, F** (2014) Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). *PLOS ONE*, 9, 3, e91154. doi: 10.1371/journal.pone.0091154.

- PROFFITT, JA and BLAIR, GE** (1997) The MHC-encoded TAP1/LMP2 bidirectional promoter is down-regulated in highly oncogenic adenovirus type 12 transformed cells. *FEBS Letters*, 400:141–144, doi: 10.1016/S0014-5793(96)01375-0.
- RASSI, A JR, RASSI A and MARIN-NETO, JA** (2010) Chagas disease. *Lancet*, 375:1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- RASSI, Jr, A, RASSI, A and REZENDE, JM** (2012) American Trypanosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, 275–291. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.002.
- ROCK, KL and GOLDBERG, AL** (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annual Review of Immunology*, 17, 739–779. doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.739.
- RODRIGUES, MM, ALENCAR, BC, CLASER, C and TZELEPIS, F** (2008) Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(3):220–3. doi: 10.1590/S0100-879X2008005000054.
- ROTEM-YEHUDAR, R, GROETTRUP, M, SOZA, A, KLOETZEL, PM and 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. *Journal of Experimental Medicine*, 183(2):499–514, doi: 10.1084/jem.183.2.499
- ROUX, PP, TOPISIROVIC, I** (2012) Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4:a012252. doi: 10.1101/cshperspect.a012252
- SANDBERG R, NEILSON JR, SARMA A, SHARP, PA and BURGE, CB** (2008) Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science*, 320:1643-7. doi: 10.1126/science.1155390.
- SCHMUNIS, GA and YADON, ZE** (2010) Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115, 1–2, 14-21. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003
- SHIN, MK, SHIN, SW, JUNG, M, PARK, H, PARK, HE and YOO, HS** (2015) Host gene expression for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in human THP-1 macrophages. *Pathogens and Disease*, 73(5), doi: 10.1093/femspd/ftv031
- SMITH, DM, CHANG, SC, PARK, S, FINLEY, D, CHENG, Y and GOLDBERG, A** (2007) Docking of the proteasomal ATPases' C-termini in the 20S proteasomes alpha ring opens the gate for substrate entry. *Molecular Cell*, 27:731 - 744. doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.033.

- SOUZA, W, CARVALHO, TMU and BARRIAS, ES** (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, Article ID 295394. doi: 10.1155/2010/295394
- SOUZA, W and BARRIAS, E** (2017) Exosomes in the Pathogenic Protozoan *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Pathology and Clinical Research*, 3, 1. doi: 10.23937/2469-5807/1510054.
- TARLETON, RL** (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*, 19, 430–434. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.003.
- TARLETON, RL** (2015) CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in Immunopathology*, 37, 233–238. doi: 10.1007/s00281-015-0481-9.
- TEIXEIRA, DE, BENCHIMOL, M, CREPALDI, PH and DE SOUZA, W** (2012) Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of chagas disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6(8): e1749. doi: 10.1371/journal.pntd.0001749.
- TOMKO, RJ and HOCHSTRASSER, M** (2013) Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual Review of Biochemistry* 82:415–445. doi: 10.1146/annurev-biochem-060410-150257.
- TORRECILHAS, ACT, TONELLI, RR, PAVANELLI, WR, SILVA, JS, SCHUMACHER, RI, SOUZA, W, SILVA, NCE, ABRAHAMSOHN, IA, COLLI, W AND ALVES, MJM** (2009) *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, 11(1):29-39, doi: 10.1016/j.micinf.2008.10.003
- TYLER, KM and ENGMAN, DM** (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31, 472-481. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00153-9.
- VIEIRA, JFN** (2017) Interação *Trypanosoma cruzi* e hospedeiro: influência do parasita na expressão da subunidade β 1i do imunoproteassoma. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, *Repositório Institucional Da Unb*, <https://repositorio.unb.br/handle/10482/23518>
- ZAISS, DMW, DE GRAAF, N and SIJTS, AJAM** (2008) The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *American Society for Microbiology – Infection and Immunity*, 76, 1207–1213. doi: 10.1128/IAI.01134-07.
- ZHANG, Y, HU, W, LIU, Q, MA, Z, HU, SP, ZHANG, Z, JIA, HL and HE, XJ** (2021) Expression of immunoproteasome subunits in the brains of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Experimental and Molecular Pathology*, 123:104684, doi: 10.1016/j.yexmp.2021.104684.
- WATANABE COSTA, R, SILVEIRA, JF and BAHIA, D** (2016) Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. *Frontiers in Microbiology*, 7, A 388. doi: 10.3389/fmicb.2016.00388.

WINTER, MB, GRECA, FL, ARASTU-KAPUR, S, CAIAZZA, F, CIMERMANCIC, P, BUCHHOLZ, TJ, ANDERL, JL, RAVALIN, M, BOHN, MF, SALI, A, O'DONOGHUE, AJ and CRAIK, CS (2017) Immunoproteasome functions explained by divergence in cleavage specificity and regulation. *eLIFE*, 6:e27364. doi: 10.7554/eLife.27364.001

WORLD HEALTH ORGANISATION (2021). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis), news-room, fact-sheets, detail. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

ANEXOS

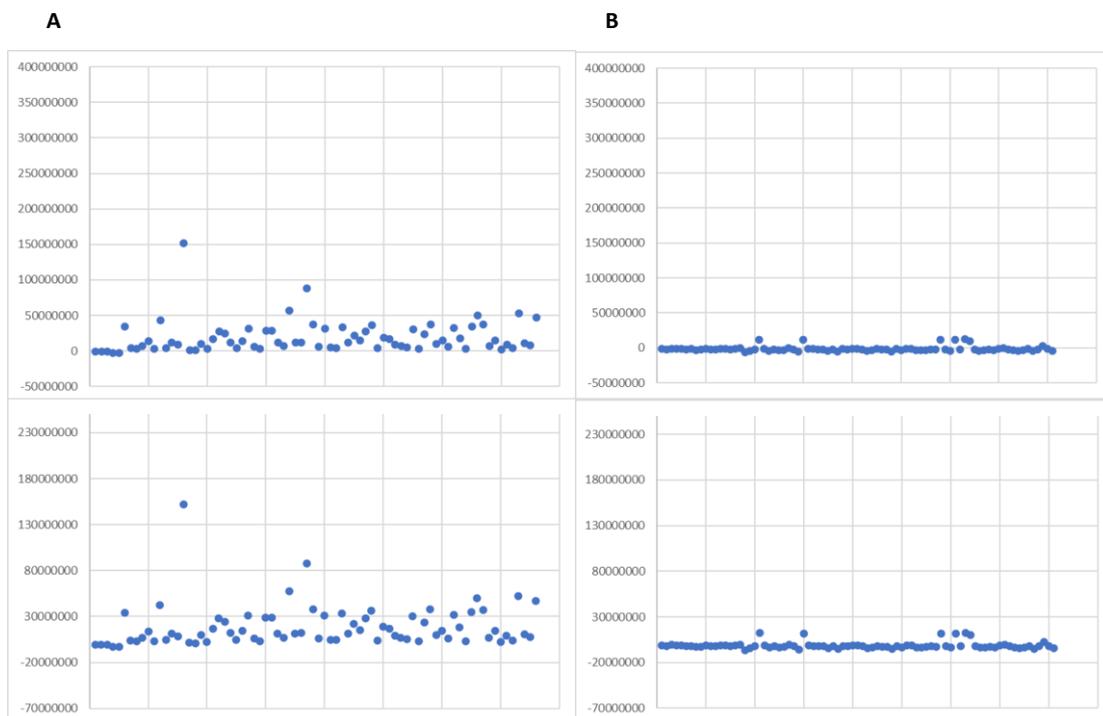


Figura 1. Gráfico de dispersão de valores de fluorescência emitidos por populações de (A) células HeLA transfectadas com vetor pUTRs/β1i/EGPF não expostas ao parasita (GC); (B) células expostas ao parasita e posteriormente transfectadas com vetor pUTRs/β1i/EGPF (GT).

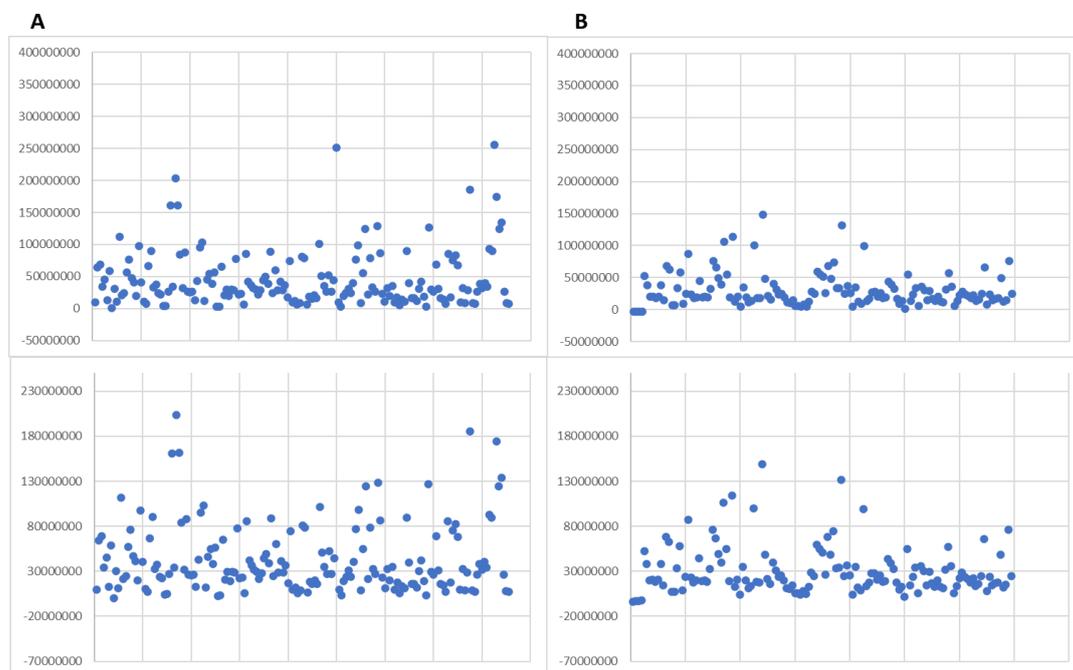


Figura 2. Gráfico de dispersão de valores de fluorescência emitidos por populações de (A) células HeLA transfectadas com vetor pEGFP não expostas ao parasita (GC); (B) células expostas ao parasita e posteriormente transfectadas com vetor pEGFP (GT).

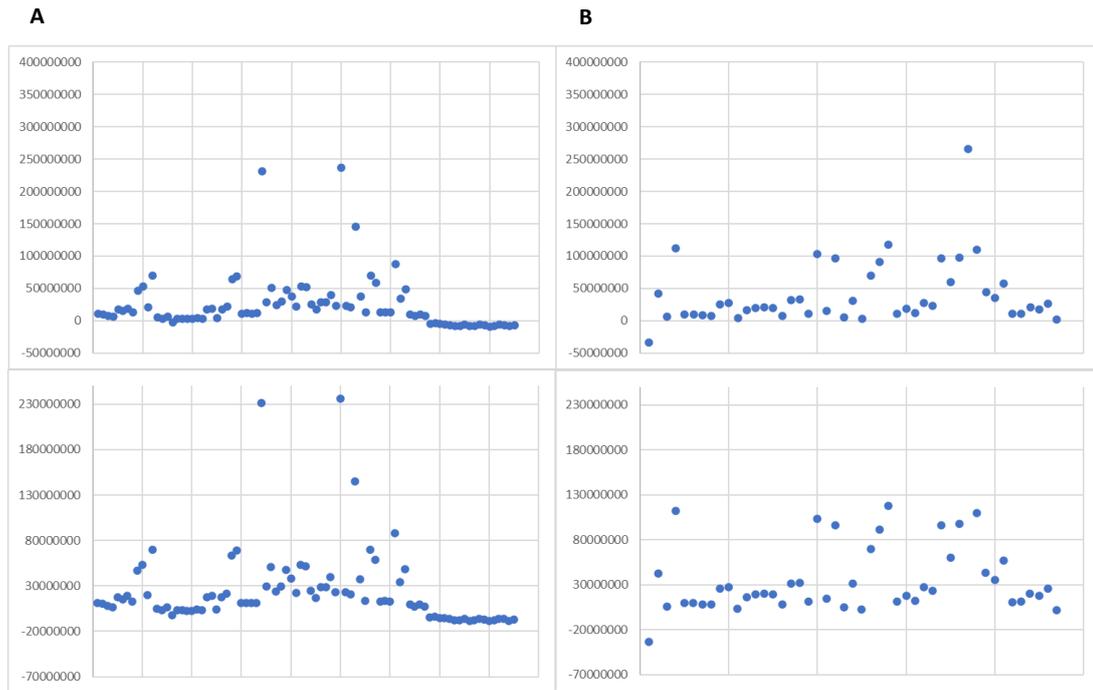


Figura 3. Gráfico de dispersão de emissão de fluorescência da população de células HeLa (A) transfectadas com pUTRs/ β 1i/EGPF (CG) e (B) transfectadas com pUTRs/ β 1i/EGPF e posteriormente expostas ao *T. cruzi* (GT).

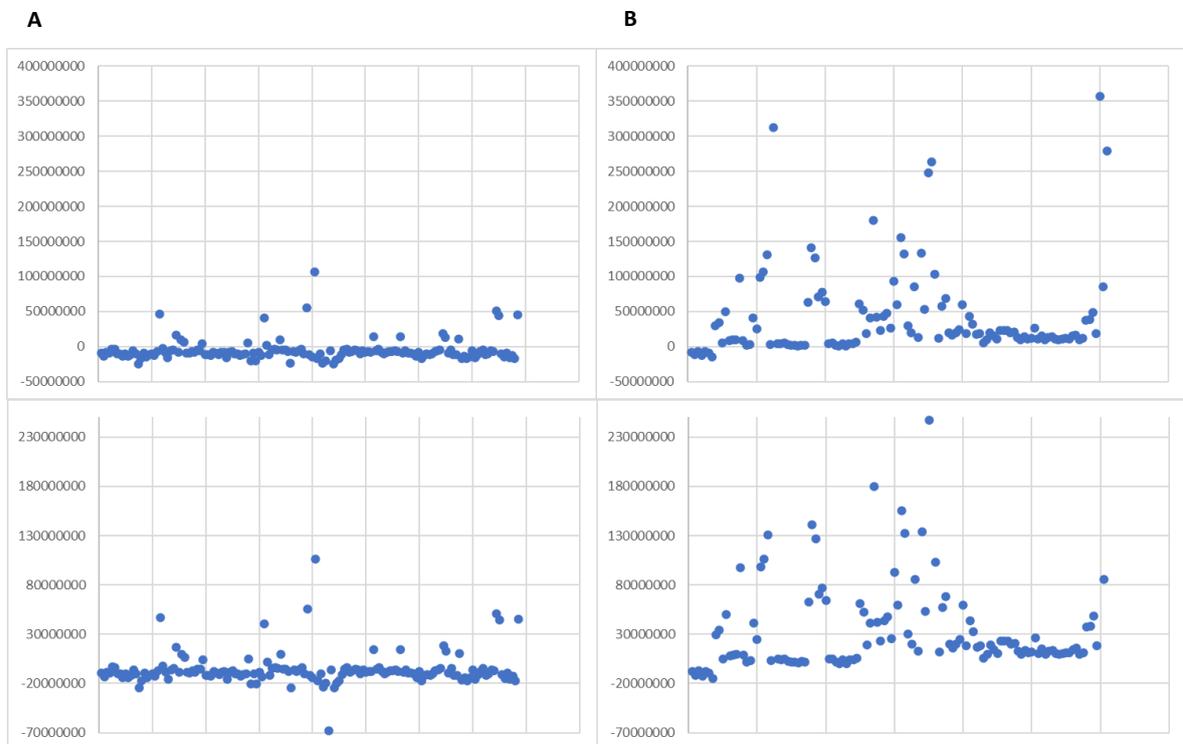


Figura 4. Gráfico de dispersão de emissão de fluorescência da população de células HeLa (A) transfectadas com pEGFP (CG) e (B) transfectadas com pEGFP e posteriormente expostas ao *T. cruzi* (GT).

Tabela 1. Dados obtidos por meio da avaliação das imagens de microscopia de fluorescência de todos os grupos de transfecção transiente (teste de infecção-transfecção e transfecção-infecção) observados no trabalho. % cels FL (GC): porcentagem de células fluorescentes grupo controle; % cels FL (GT): porcentagem de células fluorescentes grupo teste; % Cels INF: porcentagem de células infectadas; % pop Inf-FL: porcentagem de células infectadas emitindo fluorescência; %pop inf não fl: porcentagem da população infectada não fluorescente.

Infecção-Transfecção		GC-pUTRs/β11/EGFP		GT-pUTRs/β11/EGFP				
	Imagem	% cels FL		Imagem	% cels FL	%Cels INF	% pop Inf-FL	% pop inf não fl
	P1F4	31,25%	P1F6		45%	55%	63,63%	36,37%
	P1F5	35,29%	P2F1		40,62%	56,25%	44,44%	55,56%
	P2F1	39,13%	P2F5		14,28%	57,14%	18,75%	81,25%
	P3F1	50%	P3F1		34,21%	52,63%	50%	50%
	P3F5	42,42%	P3F4		43,90%	50%	63,41%	36,59%
	MÉDIA	39,62%	MÉDIA		36%	54%	48,05%	51,95%
	MEDIANA	39,13%	MEDIANA		40,62%	55,00%	50,00%	50,00%
	DP	0,07152452	DP		0,126384817	0,028978837	0,183983051	0,183983051
Infecção-Transfecção		GC-pEGFP		GT-pEGFP				
	Imagem	% cels FL		Imagem	% cels FL	%Cels INF	% pop Inf-FL	% pop inf não fl
	P1F7	49,50%	P2F2		49,12%	59,65%	64,70%	35,30%
	P2F7	52,50%	P2F3		37,31%	46,27%	48,39%	51,61%
	P2F9	40%	P2F6		46%	49,42%	74,42%	25,58%
	P2F8	54,72%	P3F2		32,14%	46,43%	17,95%	82,05%
	P3F10	51,09%	P3F3		38,23%	76,47%	50%	50%
	MÉDIA	49,56%	MÉDIA		40,56%	55,65%	51,09%	48,91%
	MEDIANA	51,09%	MEDIANA		38,23%	49,42%	50,00%	50,00%
	DP	0,056790686	DP		0,068875794	0,128576639	0,214257945	0,214257945
Transfecção-Infecção		GC-pUTRs/β11/EGFP		GT-pUTRs/β11/EGFP				
	Imagem	% cels FL		Imagem	% cels FL	%Cels INF	% pop Inf-FL	% pop inf não fl
	P1F2	15,38%	P1F1		23,25%	46,51%	45%	55%
	P1F4	25,67%	P1F6		5%	35%	8,16%	91,84%
	P2F2	12,26%	P2F5		19,56%	80,43%	21,62%	78,38%
	P3F1	15,05%	P3F4		33,33%	39,40%	46,15%	53,85%
	P3F5	20,73%	P3F6		13,16%	47,37%	5,55%	94,45%
	MÉDIA	17,82%	MÉDIA		18,86%	49,74%	25%	75%
	MEDIANA	15,38%	MEDIANA		19,56%	46,51%	21,62%	78,38%
	DP	0,053532859	DP		0,106505	0,179032754	0,194948514	0,194948514
Transfecção-Infecção		GC-pEGFP		GT-pEGFP				
	Imagem	% cels FL		Imagem	% cels FL	%Cels INF	% pop Inf-FL	% pop inf não fl
	P2F1	25,20%	P1F5		10,45%	26,86%	27,77%	72,23%
	P2F3	46,57%	P2F1		96,55%	20,69%	100%	0%
	P2F6	32,72%	P2F2		92,85%	35,71%	100%	0%
	P3F2	44,09%	P3F2		8,80%	37,36%	8,82%	91,18%
	P3F3	19,85%	P3F3		77,42%	30,64%	100%	0%
	MÉDIA	33,69%	MÉDIA		57,21%	30,25%	67,32%	32,68%
	MEDIANA	32,72%	MEDIANA		77,42%	30,64%	100,00%	0,00%
	DP	0,11604104	DP		0,440349717	0,067712901	0,452504135	0,452504135