

**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular**

**Expressão de imunoproteassoma em células infectadas com  
*Trypanosoma cruzi***

**Liliam de Oliveira Faria Maçaneiro**

**Orientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima**

**Brasília**

**2008**



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular**

**Expressão de imunoproteassoma em células infectadas com  
*Trypanosoma cruzi***

**Liliam de Oliveira Faria Maçaneiro**

**Orientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Beatriz Dolabela de Lima**

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

**Brasília**

**2008**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de  
Biologia do Gene da Universidade de Brasília,  
sob as orientações dos Professores Dr. Cezar  
Martins de Sá e Dra. Beatriz Dolabela de Lima.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos”.

Albert Einstein

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

À minha mãe Valda, minha primeira “professora”, que com seu exemplo de vida inculcou em mim valores essenciais como o amor, a justiça e a fé.

À minhas queridas irmãs Jack e Cris, que mesmo na ausência sempre me apoiaram e se orgulharam de minhas conquistas.

Ao meu esposo Aloisio, por tudo que representa para mim luz do meu caminho e cúmplice de felicidades, tristezas, sonhos.

Ao meu filho Arthur, verdadeiro presente de Deus, por me lembrar a beleza e a simplicidade de sermos sempre crianças.

À minha querida prima e amiga Lígia (*in memoriam*), pelo exemplo de fé, determinação, coragem e resignação, na incessante luta pelo dom de viver.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos às pessoas que tornaram este trabalho possível. Não somente aos amigos acadêmicos, mas também àqueles que, durante esta longa trajetória, contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal. As pessoas que figuram nestas páginas são aquelas que, por razões misteriosas, eu me recordo no momento. Mas foram tantas as pessoas que me ajudaram que talvez algumas passem despercebidas nos porões da minha memória...

Ao Prof. Doutor Cezar Martins de Sá, orientador deste projeto, pela oportunidade oferecida.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz D. de Lima, co-orientadora desta tese. A ela devo a dedicação, o empenho e o interesse que colocou neste trabalho, por não me deixar abater com as dificuldades e por tirar ensinamentos até com os resultados negativos. A minha sincera gratidão, pois sem o seu apoio seria muito difícil chegar até aqui.

Aos Prof. de Microbiologia Alex, Andréa, Beatriz, Cynthia, Janice, Lenise, Loreny e Marlene que ao longo destes cinco anos me proporcionaram todas as facilidades para a execução desta tese. Agradeço pela enorme paciência e compreensão que vocês tiveram toda vez que esqueci ou realizei o meu trabalho errado e que souberam me perdoar. Obrigada.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Loreny G. Giugliano, pelo grande incentivo que vem dado para que eu avance em meus conhecimentos científicos e também como pessoa. Obrigada pela generosidade na escuta e atenção interessada sempre, obrigada também por fazer parte desta minha conquista. O seu inestimável apoio em todas as etapas foi imprescindível para eu finalizar com sucesso esta tese. Sua competência, justiça e sensatez sempre foram de minha estima. Obrigada.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Cynthia M. Kyaw, pela atenção, carinho e amizade depositados em mim ao longo destes anos de convivência. Obrigada pela sua alegria e presença sempre.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Ildinete S. Pereira, exemplo de competência e dedicação, por estar sempre disposta a me apoiar e ajudar a encontrar respostas indispensáveis ao alcance e êxito deste doutorado. A minha sincera gratidão e respeito.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Andréa Q. Maranhão, pela amizade e bom humor em todas as situações e também pelo apoio, incentivo e disponibilidade que me serviram como exemplo de uma pesquisadora incansável e plenamente empenhada em seu trabalho.

Ao Prof. Dr. Bergmann M. Ribeiro, exemplo de competência e dedicação. Pelo empenho em garantir um curso de excelente infra-estrutura e qualidade e pela compreensão das necessidades de cada pessoa, mesmo que não faça parte de sua equipe.

Ao Prof. Dr. Carlos André O. Ricart, pelas informações e as facilidades concedidas no uso da infra-estrutura do laboratório de Bioquímica. Muito obrigada pela sua simpatia e profissionalismo.

Ao querido Alex, por toda ajuda que dispensou a este trabalho: nas análises estatísticas, nas fotos, no texto. As brincadeiras e alegrias em nosso convívio serviram sempre de alento e força nos momentos adversos. Obrigada por ser meu irmão de coração. Irmãos às vezes brigam, mas se amam para sempre. Quando eu crescer, quero ser como você. Te admiro muito.

À Heide, por ser amiga. De verdade. Nas horas boas e nas não tão boas assim. A sua presença e conselhos são fundamentais para o meu crescimento.

À Gláucia, minha grande amiga, pelo seu ombro onde chorei muitas vezes e pelas palavras de consolo e incentivo que continuará fazendo parte da minha história. Obrigada de coração...

Ao Yuri, pelas risadas, pelas conversas e pelas discussões (às vezes nem um pouco científicas...)! Obrigada pela enorme ajuda nesse trabalho, e não menos importante, pela grande amizade que se formou.

À Inaiara, por ter sempre um conselho certo na hora certa. Obrigada pela agradável e longa convivência.

À Débora, pelas palavras de carinho e incentivo que muitas vezes me ajudaram a seguir em frente.

Aos amigos do Labiogene: Alessandra (Lelê), Aline (Lindinha), Celso, Daniella (Dani), Débora, Gabriel (Gabi), Gabriela, Gustavo (Jubé), Larissa (Lalá), Luciana (Lú), Rachel, Renata, Ricardo (Ricky), Rosana (Rô), Tarcianne (Tatá), Tiago (Ti) e Yuri por vocês transformarem nosso local de trabalho em uma grande casa repleta de alegrias e esperanças. Obrigada por todos os minutos de convivência. Obrigada a todos, que mesmo sem saber, ajudaram muito nessa caminhada.

À Adriana, pela disponibilidade, dedicação fundamental à realização de todas as análises dos géis 2D. Sem a sua ajuda preciosa, seria impossível obter a quantificação destes géis. Muito obrigada.

À Lorena pelas contribuições feitas durante o meu aprendizado na quantificação dos resultados obtidos nas PCRs, fornecendo o programa *Scion Image*.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra (Biofísica) pelas palavras amigas, de incentivo e pelas sugestões feitas para o aprimoramento das análises protéicas e na utilização do programa *Photo-CaptMw*.

Aos amigos da Microbiologia: Breno, Bruna, Graziella, Tiago, Rosane, Márcio, Marina, Elisa, Gustavo e Held pelo ótimo ambiente de trabalho que proporcionaram e também pelas horas de descontração.

À Ana pela sua disponibilidade, apoio constante e amizade em todos os momentos. Deixo aqui o meu reconhecimento pelas atenções com que mais uma vez me presentearam. Obrigada pela presteza nos trâmites regimentais inerentes à Pós-Graduação e pela solicitude de sempre.

À Sandra que sempre respondia prontamente a todas as minhas requisições para resolver questões burocráticas. Obrigada pelo apoio.

Às meninas, Poliana e Marinez, por serem esses anjos na minha vida. A minha vitória não seria a mesma sem vocês. Muito obrigada por fazerem meu dia-a-dia beeeeeeeeeem mais fácil.

Aos meus amigos, cujas presenças, contribuições e palavras são o que nos mantém com coragem, nos fazendo caminhar em busca dos nossos objetivos. Especialmente Regina (Ecologia), Cezar (Fito), Marta (Neuro), Camila (Fito) e Ornil (Genética).

Aos professores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas, em especial ao Carlos pela prontidão em resolver as minhas dificuldades e ao Fausto pela presteza e disposição em ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, meu agradecimento pelas oportunidades e minhas sinceras desculpas pelos incômodos e pela demora.

Quero expressar aqui os meus agradecimentos a meus familiares que, nos últimos cinco anos foram privados de um convívio qualitativamente melhor, em razão da dedicação na construção da tese. Ao Aloísio, minha gratidão eterna por, mesmo nos momentos mais difíceis, ter me reconfortado com o seu amor, carinho e dedicação. Ao meu filho Arthur, pela sua existência e pelo seu sorriso. À minha mãe Valda e minhas irmãs Jack e Cris que são a razão, o apoio e o amor sempre.

E por último (apenas para dar destaque) quero agradecer a DEUS, dono de todo o conhecimento, por permitir que minha vida seja essa maravilha, esse verdadeiro mar de rosas, onde eu não conheço o sentido da palavra solidão. Por colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho...

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| Lista de figuras.....  | 1         |
| Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.....                                      | 3         |
| Resumo.....  | 4         |
| Abstract.....  | 5         |
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>6</b>  |
| 1. Doença de Chagas.....   | 6         |
| 1.1. Ciclo Evolutivo.....  | 9         |
| 1.2. Sinais e Sintomas.....  | 11        |
| 1.3. Interação célula-Parasita.....  | 11        |
| 1.4. Invasão da célula hospedeira pelo <i>T. cruzi</i> .....                         | 12        |
| 1.5. Resposta imune na doença de Chagas.....   | 14        |
| 1.6. Autoimunidade.....  | 17        |
| 1.7. Ativação de macrófagos e morte dos parasitas.....                               | 18        |
| 1.8. Modulação da resposta imune em camundongos infectados com <i>T. cruzi</i> ..... | 20        |
| 2. Proteassoma.....  | 22        |
| 2.1. Proteassoma 20S.....  | 22        |
| 2.2. Imunoproteassoma.....   | 27        |
| 2.3. Complexos regulatórios.....   | 30        |
| 2.4. Funções do Proteassoma.....   | 36        |
| <b>OBJETIVO.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>41</b> |

|  |    |
|--|----|
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 55 |
| 1. Perfil de Proteassomas em células HeLa e L6 infectadas com <i>T. cruzi</i> .....  | 55 |
| 1.1. Infecção de células HeLa e L6 com <i>T. cruzi</i> .....   | 55 |
| 1.2. Análise comparativa dos níveis de mRNAs proteassomais de células HeLa infectadas com <i>T. cruzi</i> .....  | 57 |
| 1.3. Análise comparativa dos níveis de mRNAs proteassomais de células HeLa e células L6 infectadas com <i>T. cruzi</i> .....   | 57 |
| 1.4. Infecção com <i>T. cruzi</i> e tratamento com IFN- $\gamma$ não altera a composição de subunidades proteassomais de células HeLa.....   | 60 |
| 1.5. Efeito da infecção de com <i>T. cruzi</i> na atividade proteolítica do proteassoma 20S.....   | 60 |
| 2. Perfil de imunoproteassomas de células HeLa e L6 tratadas com IFN- $\gamma$ .....   | 64 |
| 2.1. O tratamento com IFN- $\gamma$ reduz a taxa de infecção com <i>T. cruzi</i> em células HeLa.....  | 64 |
| 2.2. Tratamento com IFN- $\gamma$ e infecção posterior com <i>T. cruzi</i> não altera o nível de mRNA e a composição de subunidades proteassomais.....   | 66 |
| 2.3. Infecção de células HeLa com <i>T. cruzi</i> e tratamento com IFN- $\gamma$ .....   | 71 |
| 2.4. Análise comparativa dos níveis de mRNAs proteassomais de células HeLa infectadas com <i>T. cruzi</i> e tratadas com IFN- $\gamma$ .....   | 71 |
| 2.5. Análise comparativa da síntese protéica das subunidades $\alpha$ 1, $\alpha$ 6, $\beta$ 1i e $\beta$ 2i de células HeLa controle, infectadas com <i>T. cruzi</i> e tratadas com IFN- $\gamma$ ..... | 76 |
| <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 78 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 82 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 10 |
| <b>Figura 2.</b> Formação do imunoproteassoma.....  | 29 |
| <b>Figura 3.</b> Composição do proteassoma 26S.....   | 32 |
| <b>Figura 4.</b> Processamento de antígenos via MHC classe I.....   | 39 |
| <b>Figura 5.</b> Infecção de células HeLa com <i>T. cruzi</i> coradas DAPI.....   | 56 |
| <b>Figura 6.</b> Análise comparativa da expressão dos genes $\alpha 1$ , $\beta 1$ , $\beta 1i$ , $\beta 2i$ e $\beta 5i$ , de células HeLa controle e infectadas por diferentes tempos com <i>T. cruzi</i> .....                           | 58 |
| <b>Figura 7.</b> Análise comparativa dos níveis de mRNA das subunidades $\alpha$ e $\beta$ do proteassoma de células HeLa e L6 infectadas com <i>T. cruzi</i> .....   | 59 |
| <b>Figura 8.</b> Anticorpos monoclonais anti-proteassomas humanos não reconhecem proteassomas de <i>T. cruzi</i> .....  | 61 |
| <b>Figura 9.</b> Eletroforese bidimensional de proteassomas de células HeLa marcados e analisados por fluorografia.....   | 62 |
| <b>Figura 10.</b> Efeito da infecção de com <i>T. cruzi</i> na atividade proteolítica do proteassoma 20S.....   | 63 |
| <b>Figura 11.</b> Redução da infecção com <i>T. cruzi</i> mediante o tratamento com IFN- $\gamma$ .....   | 65 |
| <b>Figura 12.</b> Análise comparativa da expressão dos genes $\alpha 1$ , $\alpha 6$ , $\beta 1$ , $\beta 2$ , $\beta 5$ , $\beta 1i$ , $\beta 2i$ , e $\beta 5i$ de células L6.....  | 68 |
| <b>Figura 13.</b> Composição das subunidades de proteassoma é modulada mediante o tratamento com INF- $\gamma$ e infecção por <i>T. cruzi</i> .....   | 69 |
| <b>Figura 14.</b> Análise comparativa dos níveis de síntese protéica de proteassoma de células HeLa utilizando-se o programa <i>Image Master</i> .....  | 70 |
| <b>Figura 15.</b> Infecção células HeLa com <i>T. cruzi</i> , tratadas IFN- $\gamma$ e coradas DAPI.....  | 72 |
| <b>Figura 16.</b> Análise comparativa expressão dos genes $\alpha 1$ , $\beta 1$ , $\beta 1i$ , $\beta 2i$ e $\beta 5i$ , de células HeLa controle, infectadas por diferentes tempos com <i>T. cruzi</i> e tratadas com IFN- $\gamma$ ..... | 74 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 17.</b> Análise comparativa da expressão dos genes $\alpha 1$ , $\alpha 6$ , $\beta 1$ , $\beta 2$ , $\beta 5$ , $\beta 1i$ , $\beta 2i$ e $\beta 5i$ de células HeLa.....                       | 75 |
| <b>Figura 18.</b> Análise comparativa da síntese protéica das subunidades $\alpha 1$ , $\alpha 6$ e $\beta 2i$ de células HeLa controle, infectadas com <i>T. cruzi</i> e tratadas com IFN- $\gamma$ ..... | 77 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|               |   |
|---------------|---|
| APS           | - Persulfato de amônio ( <i>Ammonium persulfate</i> )   |
| DMEM          | - Meio Eagle modificado por Dulbecco's ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )                                    |
| DMSO          | - Dimetilsulfóxido ( <i>Dimethyl sulfoxide</i> )  |
| EDTA          | - Ácido etileno-diamino-tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )                                      |
| HEPES         | - Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etano-sulfônico ( <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> ) |
| IFN- $\gamma$ | - Interferon gama ( <i>gamma Interferon</i> )   |
| LIT           | - Infusão de fígado e triptose ( <i>Liver Infusion Tryptose</i> )   |
| MOPS          | - 3-(N-morpholino) ácido propanesulfônico ( <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> )                             |
| NP-40         | - Nonidet P-40  |
| PBS           | - Tampão salina fosfato ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )  |
| PMSF          | - Fluoreto de fenilmetanosulfonil ( <i>Phenylmethanesulphonylfluoride</i> )   |
| PSG           | - Tampão salina fosfato glicosado ( <i>Phosphate Saline Glucose</i> )   |
| Sarcosil      | - N-lauroil-Sarcosino ( <i>N-lauroylsarcosine</i> )   |
| SDS           | - Dodecilsulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )   |
| TCA           | - Ácido tricloroacético ( <i>Trichloroacetic acid</i> )   |
| TEMED         | - N, N, N', N', -Tetrametiletenodiamina ( <i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i> )                               |
| TLCK          | - N-p-tosil-L-lisil-clorometil cetona ( <i>N-Tosyl Lysyl Chloromethyl Ketone</i> )                                    |
| TPCK          | - N-p-tosil-L-fenilalanil-clorometil cetona ( <i>Tosyl Phenylalanyl Chloromethyl Ketone</i> )                         |
| Tris          | - Tri (hidroximetil) aminometano ( <i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane</i> )   |

## **RESUMO**

*Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, pode persistir por muitos anos no hospedeiro mamífero, sugerindo que este parasita escapa do sistema imunológico através da regulação negativa nas vias de processamento de antígenos. Dentro da via de apresentação de antígenos intracelulares MHC classe I, a grande maioria de peptídeos antigênicos é gerada pelo proteassoma, um complexo multicatalítico responsável pela degradação intracelular de proteínas. Em vertebrados, três subunidades catalíticas  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , cuja expressão é induzida pela citocina interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), substituem três subunidades catalíticas constitutivas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  na partícula 20S do proteassoma, formando o imunoproteassoma. Neste trabalho, nós analisamos se a composição ou a expressão de proteassomas 20S e imunoproteassomas foi alterada em células HeLa e L6 infectadas pelo *T. cruzi*. Experimentos de RT-PCR e de eletroforese bidimensional comparando células controle e infectadas, com e sem tratamento com IFN- $\gamma$  não apresentaram diferença na composição do imunoproteassoma ou na expressão de suas subunidades em ambos os tipos celulares. No entanto, as atividades símile tripsina e símile quimotripsina do proteassoma foram 2,5 e 3,6 vezes maiores nas células infectadas com *T. cruzi*, do que nas células não infectadas. Entretanto, o nível de expressão protéica das subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$  do imunoproteassoma foi reduzido quase pela metade em células HeLa infectadas com *T. cruzi* e tratadas posteriormente com IFN- $\gamma$  por 24 h. Este resultado sugere que a formação do imunoproteassoma é inibida em células infectadas pelo *T. cruzi* com posterior tratamento com IFN- $\gamma$ , por um mecanismo de regulação traducional das subunidades induzidas.

## **ABSTRACT**

*Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, may persist for many years in its mammalian host, suggesting that this parasite escape from the immune surveillance by down regulating antigen processing pathway. In the MHC class I pathway, the vast majority of antigenic peptides are generated by the proteasome, a multicatalytic complex responsible for the degradation of intracellular proteins. In vertebrates, three catalytic subunits  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  and  $\beta 5i$ , whose expression is induced by the cytokine gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), replace the three constitutive catalytic subunits  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 5$  in the core 20S proteasome, generating the immunoproteasome. Here, we analysed whether proteasome subunit composition or expression of the proteasome 20S and immunoproteasome were altered upon infection of HeLa and L6 cells by *T. cruzi*. RT-PCR and two-dimensional gel electrophoresis experiments comparing non-infected or infected cells, untreated or treated cells with IFN- $\gamma$  did not show differences between the immunoproteasome and expression of its mRNA subunits. However, the proteasome's trypsin-like and chymotrypsin-like activities were 2.5 and 3.6 times higher in infected cells than in non-infected cells. On the other hand, in infected HeLa cells followed by treatment with IFN- $\gamma$  for 24 h, expression of the immunoproteasome  $\beta 1i$  and  $\beta 2i$  subunits was reduced. This result indicates that the generation of immunoproteasomes is inhibited in *T. cruzi*-infected cells followed treating with IFN- $\gamma$  by a posttranslational mechanism of the inducible subunits.

## INTRODUÇÃO

Toda espécie animal está sujeita à infecção por parasitas e esta relação parasita/hospedeiro originou-se do resultado de um longo desenvolvimento evolucionário. Parasitas causam muitas doenças infecciosas graves no homem e nos animais. As conseqüências deste parasitismo em termos de mortalidade, doenças crônicas e perdas econômicas são incalculáveis e, sem dúvida, as maiores causas limitantes do desenvolvimento social e econômico de muitos países subdesenvolvidos e em desenvolvimentos.

Parasitas evoluem de modo a explorar o organismo hospedeiro enquanto que o hospedeiro desenvolve estratégias para controlar a infecção. Este tipo de co-evolução tem sido objeto fascinante de pesquisa da Biologia Moderna, tentando explorar e compreender os mecanismos pelo quais o sistema imunológico opera e como os parasitas escapam deste sistema.

### **1. Doença de Chagas**

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana é uma doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida. O *T. cruzi* tem como hospedeiro invertebrado triatomíneos e como hospedeiro vertebrado mamíferos, onde induz um quadro clínico com características e conseqüências variadas. Descoberta por Carlos Chagas (1909), a doença se disseminou tornando-se endêmica em muitas regiões, como conseqüência das precárias condições de habitação e socioculturais em que vive a população exposta. Outro fator contribuinte para esse quadro são as constantes migrações de indivíduos chagásicos para regiões onde existem vetores, completando o ciclo.

A distribuição geográfica da doença de Chagas ocorre em todas as áreas onde há triatomíneos, do México ao Sul da Argentina (COURA, 2003). A doença afeta aproximadamente 13 milhões de pessoas na América Latina, deixando sobre risco de contraí-la cerca de 90 milhões (WHO, 2005). O quadro clínico da doença pode assumir gravidade e levar à morte, como demonstrado pelas estatísticas que indicam que aproximadamente 21.000 pessoas morrem por ano em conseqüência dessa enfermidade (URBINA; DOCAMPO, 2003).

A doença de Chagas é transmitida ao homem basicamente através do contato de indivíduos com as fezes de triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*. No entanto, mecanismos alternativos de transmissão são observados, destacando-se a transmissão transfusional, a congênita (mãe a filho, durante a gestação), a acidental (contaminação em laboratório), transplante de órgãos (quando o doador é chagásico) e as que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados.

A transmissão transfusional da doença de Chagas tornou-se então a segunda via mais importante de propagação nos centros urbanos, sendo considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (Canadá, Espanha, EUA) e em países latino-americanos que estejam em processo de erradicação do vetor. Sete casos associados à transmissão transfusional foram documentados nos últimos 20 anos no Canadá e Estados Unidos, todos ocorrendo em receptores imunodeprimidos (SMITH; WRIGHT-KANUTH, 2003; MMWR, 2007). Hoje, os riscos de transmissão da doença de Chagas transfusional no Brasil são mínimos, tendo sido estimados entre três e vinte ocorrências no contexto de mais de 4 milhões de transfusões anuais (DIAS, 2006a).

No atual estágio de controle vetorial e transfusional, a transmissão vertical passa a ser o principal mecanismo de transmissão do *T. cruzi* no Brasil. A transmissão vertical deve ser considerada em crianças nascidas de mães com sorologia positiva para *T. cruzi*. Para confirmação desses casos é necessário identificar os parasitas no sangue do recém-nascido e/ou anticorpos de origem não materna (após 6 a 9 meses de idade), desde que excluídos outros mecanismos de transmissão. A taxa de transmissão vertical por *T. cruzi* tem variações regionais de 1% no Brasil e de 4 a 12 % em países do Cone Sul. Em trabalhos realizados no Brasil, Argentina, Chile e Paraguai, foram demonstrados que 60 a 90% das crianças com infecção congênita são assintomáticas. Apesar de não existir um marcador clínico específico da doença congênita, são descritos: prematuridade, baixo peso, e febre (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A transmissão oral, comum entre animais no ciclo silvestre, é esporádica e circunstancial em humanos e ocorre pela ingestão de alimentos contendo triatomíneos ou suas dejeções. Os surtos aparecem de forma súbita, atingindo um número pequeno de pessoas (3 a 16 pessoas). A transmissão oral é realizada por diferentes tipos de alimento, como comida caseira, suco de cana ou açaí, sopas e caldos, carne de caça semicruda, leite etc, quase sempre se registrando a presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento (DIAS, 2006b). A via oral ganhou maior destaque em 2005, devido ao surto da doença na região litorânea de Santa Catarina. Nesse episódio, segundo dados do Ministério da Saúde,

foram identificadas 25 pessoas atingidas pela Doença de Chagas aguda relacionados à ingestão de caldo de cana, sendo que três pacientes evoluíram para óbito (STEINDEL et al., 2005).

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

A doença de Chagas, inicialmente uma enzootia, passou a se constituir em problema de saúde pública, após a domiciliação dos vetores, provocada pela desagregação ambiental. Deve ser considerado o mecanismo primário de difusão da doença, pois dele dependem as outras formas de transmissão. Entre as mais de 112 espécies de insetos vetores no continente americano, cerca de 12 espécies são as mais importantes para a infecção humana, pela sua capacidade de invadirem e procriarem dentro das casas. Dentre elas, o *Triatoma infestans* ao sul e o *Rhodnius prolixus* em parte da América Central (SILVEIRA, 2000).

Nos últimos anos, muitos progressos têm sido feitos em relação à profilaxia da doença de Chagas, principalmente no combate ao vetor (DIAS et al., 2002). No Brasil, a partir de 1975, foram realizadas diversas medidas para controlar a transmissão da doença, que se intensificaram com a Iniciativa de Controle nos países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) a partir de 1991, realizando combate ao vetor e ampla triagem nos bancos de sangue. Apesar da redução da transmissão, o Brasil ainda é considerado endêmico para doença de Chagas, existindo cerca de 3 milhões de chagásicos. Além disso, há constante risco de estabelecer novos focos devido à presença de outras espécies vetoras, tais como os animais silvestres, aptas a participar do ciclo de transmissão domiciliar do *T. cruzi* em diversas regiões do país (DIAS et al., 2002).

Clinicamente, a infecção pode levar ao desenvolvimento de complicações cardíacas e digestivas, sobretudo na fase crônica, que muitas vezes culmina com a morte do indivíduo. O tratamento da doença de Chagas conta hoje com apenas dois medicamentos, um disponível no Brasil, o benznidazol, e outro na América Latina, o nifurtimox. Entretanto, nenhum destes compostos é ideal porque: (i) não são ativos durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais, (ii) requerem administração por longos períodos de tempo sob

supervisão médica, (iii) há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasita a ação destas drogas, e (iv) apresentam alto custo (STEINDEL et al., 2005).

### **1.1. Ciclo de Vida**

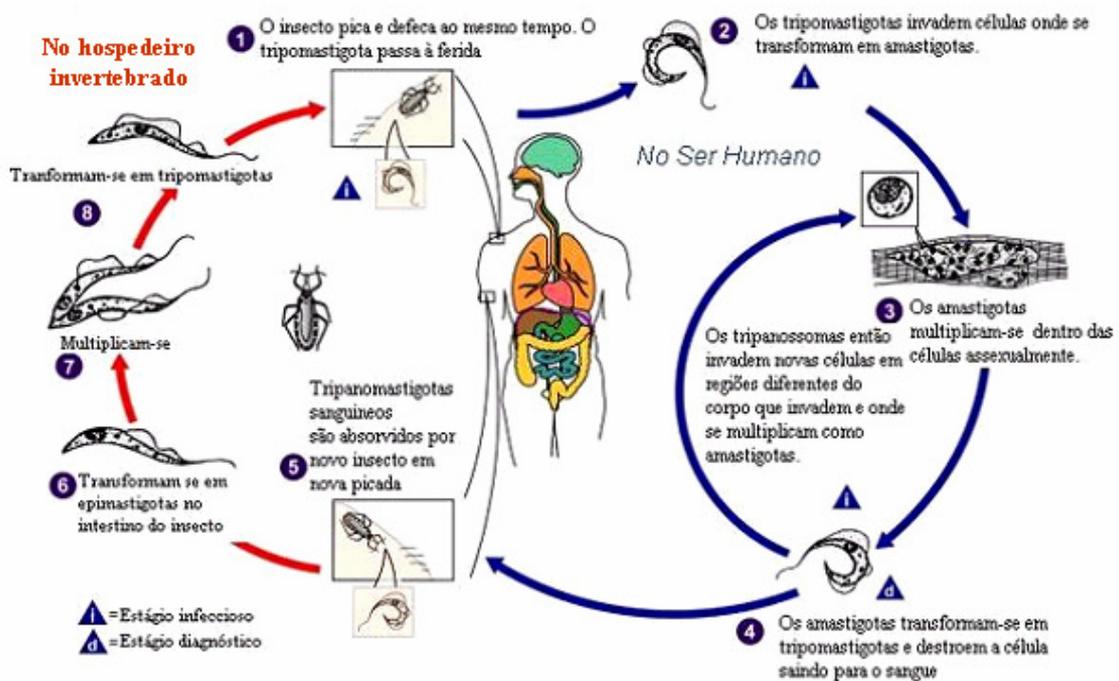
Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta basicamente três formas distintas, dependendo do hospedeiro no qual se encontre. No hospedeiro vertebrado são observadas as formas amastigotas (intracelulares) e tripomastigotas sanguíneas, enquanto nos hospedeiros invertebrados são vistos as formas epimastigotas, que posteriormente diferenciarão em tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas, com aproximadamente 25 µm de comprimento, são caracterizados pelo cinetoplasto (mitocondria modificada rica em DNA) localizado entre o núcleo e a porção posterior e o flagelo que atravessa toda a extensão do corpo do parasita e que se externaliza com um pequeno segmento de membrana ondulante. As amastigotas, com aproximadamente 4 µm de diâmetro, são caracterizadas pelo formato arredondado, cinetoplasto visível, corpo achatado com flagelo interno e ausência de membrana ondulante. Os epimastigotas, com 20 a 40 µm de comprimento, têm forma de fuso, cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido. A forma tripomastigota é o estágio infectante, encontrado na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e na porção final do aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota é o estágio intracelular do parasita no organismo do hospedeiro vertebrado, enquanto a forma epimastigota é o estágio não infectante, encontrada no hospedeiro invertebrado (SIQUEIRA-BATISTA et al., 1996).

O ciclo biológico do *T. cruzi* (Figura 1) envolve o hospedeiro invertebrado, que se infecta por meio da ingestão de sangue de animais ou de humanos contendo tripomastigotas. Essas formas passam por transformações no tubo digestivo dos triatomíneos e são diferenciadas em epimastigotas, as quais se dividem repetidamente por divisão binária no intestino do inseto para, posteriormente, retornarem à forma de tripomastigotas metacíclicos. Estes são transmitidos ao hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) por intermédio da defecação que os insetos realizam logo após a alimentação, onde são eliminadas as formas metacíclicas que penetram em células do hospedeiro vertebrado, por meio da mucosa ou abrasões na pele.

No organismo do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas penetram as células onde se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam (ocorre em torno de nove divisões), fazendo com que as células fiquem repletas de parasitas. Depois, as amastigotas diferenciam-

se em tripomastigotas que são liberados na corrente sangüínea e podem ser ingeridos por barbeiros, perpetuando o ciclo (BRENER, 1973; TANOWITZ et al., 1992; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

**Doença de Chagas: ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***



**Figura 1. Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (Modificado de CDC, 2006).**

## **1.2. Sinais e Sintomas**

Os tripomastigotas são capazes de parasitar diferentes tipos celulares, porém, células gliais, fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas são mais frequentemente parasitadas (BRENER, 1973). Após a invasão, a patogênese da doença de Chagas pode ser classificada em fases aguda e crônica, de acordo com o tempo da infecção.

A fase aguda se prolonga por cerca de 30 a 90 dias, sendo caracterizada no geral por um grande número de tripanossomas presentes na circulação. Em alguns casos, observam-se febre e manifestações clínicas nos locais de entrada como o sinal de Romana e o chagoma de inoculação. Este estágio da doença é pouco compreendido em humanos devido à curta duração dessa fase e à presença de uma sintomatologia tão fugaz que pode passar totalmente despercebida, sem manifestações clínicas (STEINDEL et al., 2005).

A fase crônica é caracterizada pela parasitemia baixa e pelo elevado número de anticorpos circulantes. As manifestações observadas nesta fase são decorrentes do curso intracelular do parasitismo. Ela pode ser dividida em diferentes formas clínicas denominadas de: cardíaca, digestiva ou mista. Entre as fases aguda e a crônica, existe a fase intermediária da doença, na qual o indivíduo é assintomático, apesar de possuir sorologia positiva para *T. cruzi* e de serem encontrados poucos parasitas na circulação (CARVALHO et al., 1995).

A fase crônica sintomática é classificada de acordo com o quadro clínico apresentado pela pessoa chagásica. Na forma cardíaca, ocorre principalmente miocardite crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração (megacárdio). Os pacientes com a forma digestiva apresentam alterações hipertróficas no esôfago (megaesôfago) e colón intestinal (megacolón). A forma mista é caracterizada pelo comprometimento cardíaco e digestivo concomitantemente (STEINDEL et al., 2005).

A duração destas fases pode ser diferente entre os indivíduos, mas em geral o que se observa é um período de aproximadamente dois meses para a fase aguda, de 10 a 15 anos para fase crônica indeterminada e um período muito variável para fase crônica sintomática, dependente da forma clínica e gravidade do quadro desenvolvido pelo paciente (COURA, 2003).

## **1.3. Interação Célula hospedeira-Parasita**

O processo de adesão envolve interações fundamentais entre a membrana plasmática da célula hospedeira e do parasita, onde diferentes moléculas estágio-específicas parecem

estar envolvidas no reconhecimento e na invasão da célula hospedeira. Assim, nas formas metacíclicas, um anticorpo monoclonal contra uma glicoproteína de 90 kDa (gp90) inibe parcialmente a invasão de células em cultura (YOSHIDA et al., 1993). Outra glicoproteína de 82 kDa (gp82) com receptores específicos nas células Vero também participa na interação e internalização do *T. cruzi* (RAMIREZ et al., 1993).

Também foram identificadas glicoproteínas de membrana em tripomastigotas sanguíneos capazes de intermediar o parasitismo. Desta forma, anticorpos contra uma glicoproteína de superfície de 85 kDa (TC-85) mostraram inibir a internalização do *T. cruzi* em células não fagocíticas de mamíferos (ALVES et al., 1986). Penetrina, uma proteína de 60 kDa presente na superfície da membrana dos tripomastigotas, promove a adesão destes estágios infectivos à células (ORTEGA-BARRIA; PEREIRA, 1991).

O ácido siálico é reconhecido como um fator importante na adesão e na invasão do parasita na célula hospedeira. O *T. cruzi* não é capaz de sintetizar o ácido siálico, mas apresenta este em sua superfície, sendo adquirido por meio da trans-sialidase, enzima de superfície da membrana do parasita (LEGUIZAMÓN et al., 1994). A trans-sialidase transfere especificamente moléculas de ácido siálico das células hospedeiras para a superfície do parasita, ocorrendo assim a formação de um epítipo específico da forma tripomastigota - o Ssp-3. A utilização de anticorpos monoclonais anti Ssp-3 bloqueia os processos de adesão e invasão. Portanto, a ausência de resíduos de ácido siálico na superfície da membrana da célula hospedeira reduz a invasão dos parasitas (VERMELHO; MEIRELLES, 1994; LEGUIZAMÓN et al., 1994; ANDREWS, 1995; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

#### **1.4. Invasão da célula hospedeira pelo *T. cruzi*.**

Estudos demonstraram que a invasão das células pelo *T. cruzi* é realizada por um mecanismo distinto de fagocitose, uma vez que a infecção de células HeLa ocorre na presença de altas concentrações de citocalasina D, potente inibidor de polimerização de filamentos de actina (ANDREWS, 1995; BURLEIGH; ANDREWS, 1995). Isto sugere a participação do citoesqueleto na invasão destes parasitas (BARBOSA; MEIRELLES, 1995). Experimentos de imunofluorescência mostraram a quebra miofibrilar e a destruição de vários filamentos no citoesqueleto de células do músculo do coração de camundongos infectados com *T. cruzi* (PEREIRA et al., 1993). Com a utilização de anticorpos monoclonais anti-vimentina e anti-actina, foi demonstrado a disrupção do citoesqueleto nestes filamentos em células de fibroblasto infectadas por *T. cruzi* (LOW et al., 1992). Além disso, houve uma mudança na

taxa de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante o progresso da infecção, sugerindo que o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser o agente mediador na disrupção dos filamentos do citoesqueleto durante a infecção das células por *T. cruzi* (LOW et al., 1992; PEREIRA et al., 1993).

Utilizando-se estudos de microscopia eletrônica foi possível relatar a ocorrência de recrutamento de lisossomos próximo à região de contato dos tripomastigotas, sendo que este evento ocorre antes do início da internalização dos parasitas. Estas descobertas são consistentes com a hipótese de que a fusão dos lisossomos é necessária para que o *T. cruzi* entre em células não fagocíticas e sendo que os lisossomos são uma fonte de membranas, contribuindo para a formação do vacúolo parasitóforo (ANDREWS, 1995; BURLEIGH; ANDREWS, 1995). A fusão com os lisossomos deve ocorrer somente após a remoção dos filamentos de actina em volta do fagossomo. Deste modo, a necessidade da remoção destes filamentos antes da fusão do lisossomo com a membrana pode explicar o efeito estimulatório da citocalasina D em células infectadas por *T. cruzi*, pois a remoção do citoesqueleto pode facilitar o acesso dos lisossomos à membrana plasmática (ANDREWS, 1995; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

Segundo ANDREWS (1995), a elevação dos níveis intracelulares de cálcio na célula hospedeira promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasita seguido por sua fusão com a membrana e formação do fagolisossomo (vacúolo parasitóforo), passando a apresentar um pH ácido. A exposição das formas tripomastigotas a este ambiente ácido é necessária à secreção e atividade da proteína TcTox, atuante na formação de poros na membrana vacuolar e, conseqüentemente, no escape para o citoplasma. O meio ácido parece, também, ter papel importante no início da diferenciação de tripomastigotas em amastigotas, forma intracelular proliferativa. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma (TANOWITZ et al., 1992; BURLEIGH; WOOLSEY, 2002).

O cálcio intracelular serve como fator de ligação ou como segundo mensageiro no controle de uma grande variedade de funções celulares incluindo secreção, contração, divisão e diferenciação celular (DOCAMPO; MORENO, 1996). A observação do recrutamento dos lisossomos até ao sítio de adesão do parasita indica a existência de uma sinalização entre o parasita e a célula hospedeira, sendo o  $\text{Ca}^{2+}$  um forte candidato neste evento, funcionando como segundo mensageiro (ANDREWS, 1995; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

Além disso, evidências indicam que o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está envolvido também durante a infecção do *T. cruzi*, uma vez que um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular foi detectado na interação entre tripomastigotas e macrófagos. Deste modo, o aumento deste íon parece ser necessário para que ocorra a invasão celular, pois, quando os macrófagos foram tratados com

quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , houve um decréscimo na infecção destas células (WILKOWSKY et al., 1996). A adição de formas epimastigotas em um homogeneizado intestinal de *T. infestans*, o qual causa a diferenciação em formas infectivas metacíclicas, induz um aumento repentino na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, indicando que este aumento é um dos fatores necessários para que ocorra a mudança na morfogênese do parasita (LAMMEL et al., 1996).

Então, um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e citosólico foi observado após a associação do *T. cruzi* à célula hospedeira. O tratamento das células com quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  resultou em uma inibição da invasão celular, e o pré-tratamento de tripomastigotas com os mesmos quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  resultou em um decréscimo na infectividade do parasita (ANDREWS, 1995; BURLEIGH; ANDREWS, 1995; DOCAMPO; MORENO, 1996; NAKAJIMA-SHIMADA et al., 1994). Posteriormente, BURLEIGH et al., (1997) demonstraram que uma serino endopeptidase citosólica (oligopeptidase B) de *T. cruzi* participa na geração de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  em células de mamíferos. Recentemente, FERNANDES et al. (2005) mostraram que tanto oligopeptidase B quanto catepsina B de *T. cruzi* apresentam funções importantes na interação com a célula hospedeira.

### **1.5. Resposta Imune na Doença de Chagas**

Muitas das manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se diretamente a resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasita. Em cada fase da infecção, existe uma resposta imune específica com um repertório de células e citocinas que reduzem a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo.

No início da infecção experimental são observados eventos desencadeados pela imunidade inata do hospedeiro e posteriormente uma resposta específica que requer um conjunto de mecanismos combinados, incluindo a participação de células T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$ , produção de anticorpos, indução de citocinas por várias populações de linfócitos e a ativação de macrófagos (GARG et al., 1997). Os mecanismos que controlam a replicação do parasita durante as fases aguda e crônica da infecção no camundongo resistente, e que mantêm formas tripomastigotas em número baixo, mas persistente durante a fase crônica, não são muito bem entendidos.

### **1.5.1. Imunidade Inata**

Componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas (DC), macrófagos e células Natural Killer (NK) parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi*. Além disso, diferentes moléculas de superfície do parasito têm sido identificadas como indutoras da imunidade inata, dentre elas destacam-se as âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), as GPI ligadas covalentemente às glicoproteínas semelhantes a mucinas, as GPI-mucinas, e a enzima trans-sialidase (TS) (GAZZINELLI; DENKERS, 2006).

No sistema imune inato, uma classe de receptores de reconhecimento de padrões (os PRRs) são expressos nas células apresentadoras de antígenos (APC), macrófagos e DC, que reconhecem estruturas denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (os PAMPs). Dentre os diversos PRRs, os receptores tipo Toll (TLR) são os mais bem estudados. Cada membro dessa família reconhece algum componente essencial dos mais diversos microorganismos e, atuando em conjunto, esses receptores reconheceriam a maioria dos patógenos (TARLETON, 2007).

A atividade de macrófagos na resposta à infecção também é crucial, visto que esta é uma das principais células-alvo do parasito e também exerce atividades de resistência à infecção, principalmente relacionadas à produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ) e componentes microbicidas (NO) (MAYA et al., 2007).

As células NK possuem papel fundamental no controle da infecção por ser fonte primária inicial de IFN- $\gamma$  na fase aguda de infecção. O IFN- $\gamma$  produzido aumenta a síntese de IL-12 por macrófagos, promovendo a ativação de células NK e a diferenciação de células T do tipo Th1 específicas para o parasito, assim como a inibição da expansão e da síntese de citocinas por linfócitos Th2. Foi demonstrado que a depleção das células NK resultou em parasitemia e mortalidade aumentadas em camundongos na fase aguda de infecção (CARDILLO et al., 1996).

### **1.5.2. Imunidade Humoral**

Anticorpos contra *T. cruzi* têm sido freqüentemente observados em pacientes e em animais que contraem a doença. Anticorpos específicos são produzidos rapidamente após a infecção, inicialmente na fase aguda como IgM e mais tarde como IgA e subclasses de IgG (BOUHDIDI et al., 1994). Existem muitas controvérsias a respeito do papel desses anticorpos na resistência à infecção pelo *T. cruzi*, pois a fase aguda da doença na maioria das vezes passa

despercebida, o que resulta em uma tarefa difícil a obtenção de dados sorológicos dos pacientes. Assim, enquanto alguns autores concluem que anticorpos específicos são capazes de induzir proteção em animais infectados, outros não conseguiram reproduzir estes resultados. Experimentos de transferência passiva em camundongos demonstraram que nem todas as classes de imunoglobulinas são efetivas na transferência da imunidade: IgM produzida no estágio inicial da infecção não é protetora; enquanto que os isotipos IgG2a e IgG2b produzidos mais tardiamente durante a infecção, mostraram-se mais efetivos e predominantes durante todo o curso da infecção crônica. Deste modo, a IgG2 é a imunoglobulina mais produzida e protege o hospedeiro da infecção pelo *T. cruzi* (CARVALHO et al., 1995).

### 1.5.3. Imunidade Celular

Na fase inicial da doença, a resposta celular é a mais importante no combate ao *T. cruzi*, correspondendo a uma resposta sistêmica que protege contra a replicação de amastigotas intracelulares. O papel da imunidade celular tem sido amplamente estudado, utilizando-se camundongos que carecem de células T (por timectomia neonatal, geneticamente desprovidos de timo ou com anticorpos monoclonais anti CD4 e anti CD8). Camundongos atímicos, infectados apresentam intensa parasitemia e 100% de mortalidade ainda na fase aguda, enquanto os controles, apesar de apresentarem parasitas circulantes, podem sobreviver à infecção (ROTTENBERG et al., 1993; COTTA DE ALMEIDA et al., 1997).

Quanto às subpopulações de linfócitos T, tem sido mostrado que ambas CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> participam como mediadores da proteção em camundongos infectados (TARLETON et al., 1996). A depleção de células T CD8<sup>+</sup> com anticorpos monoclonais anti-CD8 no início da infecção resulta numa incapacidade do animal resistente em controlar a infecção, promovendo desta forma um aumento de susceptibilidade (ROTTENBERG et al., 1993; NICKELL et al., 1993). Para comprovar a participação de células T CD8<sup>+</sup> na infecção por *T. cruzi*, foram utilizados camundongos deficientes em  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ -m), os quais não expressam moléculas de MHC classe I e, deste modo, são deficientes na resposta mediada por células T citotóxicas. Esses camundongos, quando infectados, desenvolvem alta parasitemia e mortalidade precoce e não apresentaram resposta inflamatória nos tecidos cardíacos (TARLETON et al., 1992). De forma semelhante, animais depletados de células T CD4<sup>+</sup> apresentaram um aumento de parasitemia e mortalidade e paralelamente, uma redução na

inflamação tecidual durante a fase aguda. Esses experimentos mostram que tanto linfócitos T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup> participam da resposta imune celular protetora, durante a fase aguda da infecção (ROTTENBERG et al., 1993; TARLETON et al., 1996).

Normalmente o antígeno do meio extracelular é captado, internalizado e processado por células apresentadoras de antígenos (CAA) em um compartimento endocítico e associado a moléculas MHC classe II, com indução preferencial de células T CD4<sup>+</sup>. No entanto, antígenos presentes no citoplasma (por exemplo, vírus, bactérias ou parasitas) são degradados e fragmentados em um compartimento citoplasmático e se associam às moléculas do MHC classe I, induzindo os linfócitos T CD8<sup>+</sup>. (NICKELL et al., 1993; CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1994; BURGERT, 1996; OJCIUS et al., 1996; ROCK, 1996; KRING; SPINDLER, 1996).

Garg et al. (1997) demonstraram que proteínas secretadas ou liberadas pelo *T. cruzi* em células infectadas são a maior fonte de peptídeos para a apresentação às moléculas MHC classe I e para a geração da resposta dos linfócitos T citotóxicos contra os parasitas.

## **1.6. Autoimunidade**

Algumas pesquisas indicam que apesar de auxiliar na proteção do organismo contra o parasitismo, a resposta imune do hospedeiro talvez possa assumir um caráter auto-imune e contribuir para o desenvolvimento de patologia. Gomes et al. (2003) relacionaram a resposta Th1 ao desenvolvimento de formas graves da doença de Chagas. O possível envolvimento do IFN- $\gamma$  foi sugerido devido aos altos níveis dessa citocina no sobrenadante de cultura de células sanguíneas de pacientes com a forma cardíaca da doença. Em contraponto, a IL-10 foi identificada como a citocina predominante nas culturas de células de pacientes com a forma indeterminada. Segundo hipótese dos autores, os níveis elevados de IFN- $\gamma$  favorecem a cura durante a fase aguda, mas podem influenciar no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica posteriormente.

Na fase aguda, a destruição das células do miocárdio pode se iniciar com a ruptura dos pseudocistos de formas amastigotas, liberando antígenos do parasita que podem aderir às células normais do miocárdio, transformando antigenicamente suas membranas. Assim, quando a resposta imune humoral e celular for elicitada, as células do miocárdio que não contêm os parasitas podem ser reconhecidas como alvo em uma reação auto-imune.

A escassez de parasitas nas lesões cardíacas de pacientes e de coelhos chagásicos crônicos (ROSSI; RAMOS, 1996) permite construir uma hipótese de trabalho sobre a participação de mecanismos auto-ímunes. Na infecção crônica por *T. cruzi*, verifica-se auto-

anticorpos e células T contra antígenos do hospedeiro, sendo observado que a transferência de células T procedentes de animais com infecção crônica para animais normais produziu lesões inflamatórias no tecido nervoso, parecidas com as lesões da doença de Chagas crônica (SAID et al., 1985 apud AL-SABBAGH et al., 1998). Isto indica a participação de células T na geração do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco. Verificou-se a predominância de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em lesões inflamatórias crônicas em camundongos e humanos, com um percentual baixo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (D'ÁVILA REIS et al., 1993). Os autores sugerem que as células T CD4<sup>+</sup> são necessárias para a ação das células T CD8<sup>+</sup> que seriam extensivamente recrutadas ao sítio inflamatório e classificadas então como citotóxicas. Posteriormente, foi demonstrado que várias linhagens celulares de camundongos expostas a parasitas vivos de *T. cruzi* aumentaram a expressão de moléculas MHC classe I e que este aumento na expressão destas moléculas foi detectado de 24 a 48 h após a infecção, sendo que o nível máximo de aumento foi em 48 h (STRYKER; NICKELL, 1995).

Em pacientes cardiopatas crônicos foi verificado a produção de anticorpos anti-miosina cardíaca. Esses anticorpos foram capazes de reagir predominantemente com um antígeno de *T. cruzi* denominado de proteína B13, cuja seqüência mostrou-se similar a um epítipo imunodominante da miosina cardíaca humana (CUNHA-NETO et al., 1995). A reação cruzada observada sugere que o reconhecimento de proteínas do coração e do antígeno parasita podem ser biologicamente significantes para a patogenia da cardiopatia chagásica crônica (CUNHA-NETO et al., 1996).

Entretanto, auto-imunidade em doença de chagas ainda é uma questão controversa, pois os dados de TARLETON et al. (1997) demonstram que corações transplantados em camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi* não exibem sinais de rejeição do tipo auto-imune ou uma resposta inflamatória significativa, indicando que a presença de parasitas nos tecidos do coração é necessária para a indução de danos neste órgão.

### **1.7. Ativação de Macrófagos e Morte dos Parasitas**

O IFN- $\gamma$  tem sido identificado como um fator responsável pela resistência à infecção por *T. cruzi* (DAVILA et al., 1996; HOFT et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1996), atuando como um potente fator ativador de macrófagos (CARDILLO et al., 1996; HUNTER et al., 1996; KEMP et al., 1996). A administração de IFN- $\gamma$  recombinante em camundongos aumenta sua resistência à infecção, levando à diminuição de parasitemia e aumento da

sobrevida (HOFT et al., 1996). Ao contrário, a neutralização do IFN- $\gamma$  *in vivo*, com anticorpos monoclonais, leva a um aumento da susceptibilidade à infecção (CARDILLO et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1996).

Ao aderir e invadir as células fagocíticas, a forma evolutiva infectante tripomastigota transforma-se na forma intracelular amastigota e a possibilidade de destruição intracelular do protozoário depende do estado de ativação dos macrófagos, ou seja, os macrófagos ativados são aqueles capazes de extinguirem os parasitas. Esta ativação é um evento que ocorre em duas etapas: (i) uma etapa preparatória, em que pelo menos uma citocina é considerada essencial, o IFN- $\gamma$ ; (ii) e uma segunda etapa de disparo ou efetora, na qual outros fatores (linfocinas) são necessários para a atuação macrofágica citotóxica.

O óxido nítrico (NO) foi identificado como o principal sistema antimicrobiano de macrófagos ativados (STERNBERG; MABBOTT, 1996). NO é um gás incolor que, na ausência de oxigênio, dissolve-se em água tornando-se estável. No ar, o NO reage rapidamente com o oxigênio para formar o dióxido de nitrogênio, um gás de coloração marrom capaz de induzir dano tecidual (JAMES, 1995). Na água, na urina e no plasma, o NO é rapidamente oxidado a nitrito, que é estável por várias horas, entretanto no sangue o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é rapidamente convertido a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (JAMES, 1995). Os NO são sintetizados por uma ampla variedade de tipos celulares a partir da L-arginina, sendo catalisados pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual apresenta três isoformas distintas: duas são constitutivas (NOSc) e uma induzida (NOSi) (VERDOT et al., 1996). A expressão da NOSi em macrófagos é induzida após o estímulo imunológico, e uma vez ativados, são capazes de sintetizar e liberar grandes quantidades de NO por longos períodos. Por outro lado, o NO pode ser produzido constitutivamente por outros tipos celulares pela NOSc, sendo liberados em pequenas quantidades (JAMES, 1995).

Um dos ativadores mais potentes de macrófagos é o IFN- $\gamma$ , citocina capaz de ativar a enzima NOS e, portanto levar a um aumento na produção de NO, que por sua vez, inibe a replicação de parasitas intracelulares, incluindo o *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995).

## **1.8. Modulação da Resposta Imune em Camundongos Infectados com *Trypanosoma cruzi*.**

O *T. cruzi* pode infectar várias células nucleadas, incluindo macrófagos não ativados. As formas tripomastigotas podem entrar nestas células por fagocitose ou por penetração ativa (ALIBERTI et al., 1996).

Com o aparecimento da resposta imune específica anti *T. cruzi*, há uma rápida diminuição dos parasitas circulantes. Acredita-se que a principal célula efetora da imunidade, que efetivamente leva à morte dos parasitas, é o macrófago ativado (CAULADA-BENEDETTI et al., 1998). Neste sentido, tem-se dedicado esforços a fim de entender os mecanismos que levam à ativação celular, com conseqüente morte ou sobrevivência dos parasitas, o que pode ser importante para a evolução clínica da infecção.

Como descrito anteriormente, o IFN- $\gamma$  desempenha um papel central na ativação de macrófagos, induzindo-os a produzir NO, que por sua vez desencadeia a morte dos parasitas (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995; VERDOT et al., 1996). Entretanto, camundongos infectados apresentam altos níveis de IFN- $\gamma$  circulante, também é observada grande quantidade de IFN- $\gamma$  em culturas de linfócitos. Esta observação indica aparentemente que a presença de IFN- $\gamma$  não está eliminando os parasitas. De fato, a administração de anticorpos anti-IFN- $\gamma$  em animais entre o sétimo e décimo dia de infecção, ou seja, durante o pico parasitêmico, não resulta em aumento das formas tripomastigotas circulantes, enquanto que o anti-IFN- $\gamma$  injetado, antes ou logo após a infecção, resulta em um aumento de parasitemia e mortalidade. Estes dados indicam que o IFN- $\gamma$  induz o controle da parasitemia quando presente logo após o inóculo dos parasitas e que deve ser produzido antes do desenvolvimento da resposta imune específica anti-*T. cruzi* (CARDILLO et al., 1996; DosREIS, 1997).

O IFN- $\gamma$  não é efetivo na fase aguda tardia da infecção, devido à produção aumentada de duas outras citocinas: IL-10 e TGF- $\beta$ . Estas citocinas bloqueiam a indução da NOS e, portanto, inibem completamente o efeito tripanomicida dos macrófagos na presença de IFN- $\gamma$ . Desta forma, conclui-se que o balanço das citocinas produzidas no início da infecção é importante para a determinação de resistência ou susceptibilidade dos animais. Esplenócitos de camundongos resistentes (C57BL/6) e susceptíveis (BALB/c) incubados com formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi*, produziram IFN- $\gamma$ . Além disso, esplenócitos provenientes de camundongos atímicos também foram capazes de produzir IFN- $\gamma$ , mostrando que as células NK são as responsáveis pela produção de IFN- $\gamma$ ; fato este que independe da presença de

células T (ALIBERTI et al., 1996). A confirmação da participação das células NK como responsáveis pela produção de IFN- $\gamma$  e pela proteção conferida no início da infecção surgiu com experimentos utilizando-se camundongos resistentes à infecção e tratados com anticorpos anti-NK. Células esplênicas provenientes de animais depletados de células NK não foram capazes de secretar IFN- $\gamma$  quando estimuladas *in vitro* com tripomastigotas vivos (CARDILLO et al., 1996). Além disso, a parasitemia e mortalidade também estavam significativamente aumentadas, demonstrando a participação destas células como mediadoras da resistência dos animais.

Macrófagos estimulados com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* produziram IL-12, sendo que IL-12 secretada pode estimular a produção de IFN- $\gamma$  por meio das células NK e as células T (HUNTER et al., 1996). A administração de IL-12 em ratos infectados com *T. cruzi*, levou a redução da parasitemia e prolongou a sobrevivência dos animais infectados em comparação com o grupo controle. Este efeito protetor foi correlacionado com o aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  no soro (HUNTER et al., 1996). Além disso, o papel da IL-12 no controle da infecção pelo *T. cruzi in vivo* foi determinada tratando ratos infectados com anticorpo anti-IL-12 e analisando tanto a parasitemia quanto a mortalidade durante a fase aguda da infecção. Os animais tratados com o anticorpo apresentaram uma alta parasitemia e uma mortalidade acelerada quando comparado com os ratos controle (SILVA et al., 1998). Verificou-se ainda que a síntese de IL-12 é modulada por IL-10, e TGF- $\beta$ . Assim, a adição de anticorpos monoclonais anti-IL-10 e anti-TGF- $\beta$ , nas culturas de macrófagos estimulados por tripomastigotas de *T. cruzi*, resultou em um aumento da síntese de IL-12 e IFN- $\gamma$  (HUNTER et al., 1996; ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1996). Com base nestes resultados, concluiu-se que macrófagos cultivados na presença de formas tripomastigotas produzem IL-12, o que leva à ativação de células NK, as quais secretam quantidades significativas de IFN- $\gamma$ , que por sua vez é responsável pela ativação de macrófagos com consequente inibição da replicação do *T. cruzi*, através da geração de NO (FROSCH et al., 1996; CARDILLO et al., 1996; ALIBERTI et al., 1998).

## 2. O Proteassoma

O proteassoma é descrito como um complexo protéico que apresenta atividade proteásica multicatalítica, extremamente importante na clivagem de proteínas e que está envolvido em várias funções celulares. Esta estrutura já recebeu dezenas de nomes diferentes, sendo que ARRIGO et al., (1988) propuseram o nome proteassoma para indicar sua natureza proteolítica e particulada e, desde então, este termo tem sido amplamente usado. O proteassoma é um componente essencial das células eucarióticas e procarióticas, sendo o responsável pela degradação proteolítica da maioria das proteínas celulares. Eles estão presentes tanto no núcleo quanto no citoplasma, podendo representar até 1% das proteínas totais da célula (COUX et al., 1996). Os proteassomas geralmente degradam as proteínas a pequenos peptídeos, realizando uma rápida degradação de muitas proteínas de vida curta, proteínas regulatórias, além de eliminar proteínas anormais resultantes de mutações ou proteínas danificadas.

### 2.1. O Proteassoma 20S

O proteassoma 20S recebe essa denominação, pois apresenta um coeficiente de sedimentação em torno de 20S com massa molecular de 700-750 kDa e múltiplas subunidades com tamanhos entre 19-36 kDa (Peters, 1994). É altamente conservado, encontrado em arqueias (RIVETT, 1993), bactérias (TAMURA et al., 1995), e em todas as células eucarióticas. Estudos de microscopia eletrônica de proteassomas 20S purificados de diferentes tecidos e espécies revelaram uma partícula de forma cilíndrica composta de quatro anéis sobrepostos.

O complexo 20S atua *in vitro* como uma protease ATP-independente capaz de degradar inespecificamente proteínas desnaturadas ou peptídeos, mas não proteínas nativas ou parcialmente desnaturadas, contendo pontes dissulfeto (LUPAS et al., 1993).

Estudos dos proteassomas da arqueia *Thermoplasma acidophilum* permitiram um enorme avanço no entendimento do complexo 20S (DAHLMANN, 1989). Nesse organismo, a partícula contém apenas duas subunidades diferentes compondo o complexo, denominadas de alfa e beta, com massa molecular de 25,8 e 22,3 kDa, respectivamente. As subunidades  $\alpha$  formam os dois anéis externos do complexo, enquanto que as subunidades do tipo  $\beta$  formam os dois anéis internos (GRZIWA et al., 1991). Além disso, cada anel é formado por sete subunidades protéicas, resultando em um arranjo  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  (PÜHLER et al., 1992). A

partícula apresenta ainda um canal central e três grandes compartimentos internos. Os dois compartimentos externos estão localizados entre os anéis  $\alpha$  e  $\beta$  e o terceiro formado pelos anéis  $\beta$  localiza-se no centro do complexo. Neste compartimento central encontram-se os sítios catalíticos (LUPAS et al., 1993; LÖWE et al., 1995; WEISSMAN et al., 1995; COUX et al., 1996).

Análises de cristalografia de Raios-X revelaram a estrutura tridimensional do complexo 20S de *T. acidophilum* (LÖWE et al., 1995). A partícula apresenta-se como uma estrutura cilíndrica de aproximadamente 148Å de altura por 113Å de diâmetro, possuindo externamente um poro de 13Å. Essa constrição externa, formada de cada lado do complexo pelos anéis externos  $\alpha$ , constitui-se na única via de acesso ao interior da partícula, o que limita o acesso de proteínas não desnaturadas e assegura um mecanismo de degradação progressiva, prevenindo a dissociação de polipeptídeos parcialmente digeridos.

Proteassomas de actinomicetos, como por exemplo, *Mycobacterium* e *Streptomyces*, são compostos também por uma única subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$  (NAGY et al., 1998), com exceção de *Rhodococcus erythropolis*, que possui duas subunidades de cada tipo (ZÜHL et al., 1997a). Já os proteassomas de eucariotos são mais complicados que o complexo em *Thermoplasma*, pois contém pelo menos 14 subunidades diferentes, sendo 7 subunidades  $\alpha$  e 7 subunidades  $\beta$  distintas (VOGES et al., 1999). Em mamíferos, a existência de três subunidades  $\beta$  adicionais, as quais são expressas e incorporadas no proteassoma 20S após o tratamento com interferon  $\gamma$ , proporciona o aumento na complexidade da composição do proteassoma. Apesar dessa maior complexidade, estudos de microscopia eletrônica revelaram que a estrutura do complexo é altamente conservada ao longo da evolução (PÜHLER et al., 1994). Além disso, as subunidades foram divididas em duas famílias, tipo  $\alpha$  e tipo  $\beta$ , de acordo com a alta similaridade em relação às subunidades  $\alpha$  ou  $\beta$ , de *Thermoplasma*, sendo que dentro de cada família, podem ser distinguidas 7 subfamílias (COUX et al. 1994). Acredita-se que os membros de cada uma dessas famílias estejam presentes em cada complexo e que a posição de cada subunidade na partícula seja fixa (COUX et al., 1996).

### **2.1.1. Estrutura e função das subunidades $\alpha$ e $\beta$**

As subunidades do tipo  $\alpha$  apresentam na porção N-terminal um motivo de aproximadamente 35 resíduos de aminoácidos bem conservado, sendo essencial para a

montagem do complexo (ZWICKL et al., 1994). Devido à conservação dos resíduos e a posição assumida, acredita-se que essa seja uma possível região de contato com os complexos regulatórios 19S e PA28 (LUPAS et al., 1995). Estes complexos regulatórios serão abordados no item 2.3 desta introdução.

Atribui-se aos anéis externos do complexo as seguintes funções: (i) controle do acesso de proteínas celulares ao compartimento interno proteolítico, uma vez que formam os poros externos, por meio dos quais apenas proteínas desnaturadas são capazes de passar; (ii) interação com complexos regulatórios; (iii) participação na montagem do complexo e ativação das subunidades tipo  $\beta$ .

As subunidades  $\beta$  estão diretamente envolvidas na atividade proteolítica da partícula, sendo que das 7 subunidades  $\beta$  que compõem o anel, apenas três são cataliticamente ativas:  $\beta 1$  (Y),  $\beta 2$  (Z) e  $\beta 5$  (X) (GRIFFIN et al., 1998). As subunidades  $\beta$  apresentam ainda na região N-terminal uma pró-seqüência, cuja composição dos resíduos é altamente variável e o tamanho oscila entre 4 a 70 resíduos de aminoácidos. Estas subunidades  $\beta$  são sintetizadas como pró-proteínas inativas, sendo processadas durante a incorporação no proteassoma e, portanto tornando-as cataliticamente ativas (ZWICKL et al., 1992). As pró-seqüências das subunidades catalíticas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  são removidas por um mecanismo autocatalítico, ou seja, são auto processadas durante a montagem do complexo (SEEMÜLLER et al., 1995), enquanto que as pró-seqüências das subunidades inativas são clivadas por suas subunidades vizinhas ativas (HEINEMEYER et al., 1997).

Portanto, as características estruturais do proteassoma, como o isolamento dos sítios proteolíticos dentro das câmaras internas e a pequena abertura dos anéis  $\alpha$ , claramente contribuem para a regulação da proteólise e reduz as possibilidades de uma degradação não específica das proteínas alvo. Além disso, na ausência de complexos regulatórios a porção N-terminal das subunidades  $\alpha$  projeta-se para dentro do canal, bloqueando a entrada do substrato à cavidade catalítica (KLOETZEL, 2001).

### **2.1.2. Processamento e montagem do complexo 20S**

O proteassoma 20S de *Rhodococcus erythropolis* é o modelo de estudo empregado para decifrar a montagem do complexo. Os dois tipos de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  reúnem-se em um proteassoma ativo, quando uma única subunidade  $\alpha$  e uma única subunidade  $\beta$  são co-expressas em qualquer uma das quatro combinações possíveis (ZÜHL et al., 1997a). As duas

subunidades  $\beta$  são trazidas como precursores com um pró-peptídeo de 59 a 65 resíduos. Quando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são expressas individualmente, elas permanecem monoméricas e os precursores do tipo  $\beta$  não são processados, entretanto, quando juntas, elas reúnem-se imediatamente. Com isso, há a formação de um complexo heterodímero, composto por um anel de subunidades  $\alpha$  e um anel de subunidades  $\beta$  precursoras. Estes heterodímeros denominados de meio-proteassoma (*half-proteasome*), permanecem inativos até que a pró-sequência das subunidades  $\beta$  seja retirada, indicando que a formação dos sítios ativos acontece apenas após a união de dois meio-proteassomas. As pró-sequências das subunidades  $\beta$  não são essenciais para a montagem do complexo, mas a sua ausência retarda a formação do proteassoma (ZÜHL et al., 1997b).

A montagem do proteassoma de eucariotos não é totalmente conhecida, mas sabe-se que requer um processo bastante regulado para garantir o posicionamento correto de cada uma das 14 subunidades diferentes. O processo de montagem dos proteassomas de eucariotos é similar ao descrito em *Rhodococcus*. Em humanos, o primeiro precursor do proteassoma 20S caracterizado consiste em um anel  $\alpha$  completo e um grupo de três subunidades  $\beta$  ( $\beta_2$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$ ) não processadas, denominado de forma 13S. A incorporação das outras subunidades  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  e  $\beta_7$ ) neste precursor leva a formação de um outro complexo intermediário de 15-16S, denominados meio-proteassoma (*half-proteasome*), o qual é proteoliticamente inativo (NANDI et al., 1997). Nesta etapa, cada subunidade  $\alpha$  parece ocupar uma posição particular no anel, direcionando a associação das subunidades  $\beta$  ainda não processadas. Posteriormente, dois anéis  $\alpha/\beta$  idênticos, meio-proteassoma, se ligam de modo irreversível para formar o complexo 20S. Imediatamente antes ou durante esta etapa, a pró-sequência das subunidades  $\beta$  é clivada, o que permite a formação dos centros catalíticos. Portanto, a remoção das pró-sequências ocorre por um mecanismo de duas etapas: primeiramente, o sítio ativo vizinho cliva no meio da sequência do pró-peptídeo e depois, autocataliticamente, há a geração da treonina ativa no sítio catalítico (CHEN; HOCHSTRASSER, 1996). Além de auxiliar na montagem e na maturação do proteassoma 20S, as pró-sequências impedem também a acetilação da porção N-terminal dos resíduos de treonina dos sítios catalíticos, a qual poderia resultar na inibição das subunidades catalíticas (ARENDDT; HOCHSTRASSER, 1999). Assim, o processamento das subunidades  $\beta$  tardiamente impede a degradação indiscriminada de proteínas durante a montagem do complexo, já que os sítios catalíticos só se tornam ativos quando confinados na câmara central, onde apenas proteínas desnaturadas têm acesso (LUPAS et al. 1995).

Uma proteína chaperona envolvida na montagem dos dois meio-proteassomas foi identificada recentemente em *Saccharomyces cerevisiae* (RAMOS et al., 1998). Esta proteína, denominada de Ump1 (*Ubiquitin-Mediated Proteolysis*) é associada com o complexo intermediário 15-16S e coordena a maturação correta do complexo 20S funcional (BURRI et al., 2000). Após a formação da partícula 20S, a partir de dois desses complexos intermediários associados na posição correta, a Ump1 localizada no interior da partícula auxilia no processamento das subunidades  $\beta$  com atividade catalítica. Uma vez formados os centros proteolíticos, a chaperona Ump1 é degradada, tornando-se o primeiro substrato do recém formado proteassoma (RAMOS et al., 1998). Em humanos, foram identificadas duas proteínas homólogas a Ump1: POMP - *Proteasome Maturation Protein* (WITT et al., 2000) e Proteasemblina (GRIFFIN et al., 2000). Assim como nas leveduras, estas proteínas foram detectadas somente nas frações que continham as formas intermediárias do proteassoma 20S, sendo completamente ausentes nas frações que continham os complexos maduros (WITT et al., 2000; GRIFFIN et al., 2000).

### **2.1.3. Mecanismo catalítico e atividade proteolítica**

O proteassoma 20S tem sido chamado de protease multicatalítica, devido à presença de três subunidades proteolíticas ativas para sítios diferentes em um único anel  $\beta$ . Estes sítios atuam juntos na degradação de polipeptídeos, com diferentes especificidades na seqüência de aminoácidos (BOCHTLER et al., 1999). As três atividades proteásicas majoritárias detectadas no complexo são: tipo tripsina que cliva preferencialmente após resíduos de aminoácidos básicos, tipo quimotripsina que cliva após resíduos hidrofóbicos e tipo peptidil-glutamil hidrolase (conhecida também de *caspase - like*), clivando peptídeos após resíduos de aminoácidos ácidos (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002). Baseando-se na análise de difração de raios-X, a subunidade  $\beta 1$  é responsável pela atividade de peptidil-glutamil hidrolase, a  $\beta 2$  é responsável pela atividade de tripsina e a subunidade  $\beta 5$  pela atividade de quimotripsina (ORLOWSKI; WILK, 2000; GROLL; HUBER, 2003). Em proteassoma de humano, estudos com inibidores sugeriram a presença de mais duas atividades adicionais: uma clivando preferencialmente após aminoácidos de cadeia ramificada (atividade BrAAP – *Branched Chain Amino Acid preferring*) e outra clivando após pequenos aminoácidos neutros (atividade SNAAP – *Small Neutral Amino Acid preferring*) (ORLOWSKI et al., 1993).

Entretanto, a base bioquímica dessas duas atividades não é clara, inclusive gerando controvérsias.

Já o proteassoma de *T. acidophilum* que possui as 14 subunidades  $\beta$  proteoliticamente ativas (ORLOWSKI; WILK, 2000), apresenta apenas a atividade do tipo quimotripsina, embora já tenha sido demonstrado que o complexo hidrolisa qualquer ligação peptídica em substratos desnaturados (WENZEL; BAUMEISTER, 1993).

Estudos realizados por Seemüller et al. (1995) demonstraram um novo mecanismo proteolítico, onde o sítio ativo é o grupo hidroxil da treonina presente no amino-terminal das subunidades  $\beta$ . Inibidores competitivos associados a essa treonina e mutagênese desse resíduo para alanina, produziram complexos maduros, mas inteiramente inativos, indicando que a treonina 1 das subunidades  $\beta$  processadas é essencial para a atividade do complexo. Por apresentar esse tipo de mecanismo catalítico e a falta de identidade com outras proteases já descritas levaram Seemüller et al. (1995) a propor que o proteassoma representa um novo tipo de protease caracterizado como treonina-protease.

## 2.2. Imunoproteassoma

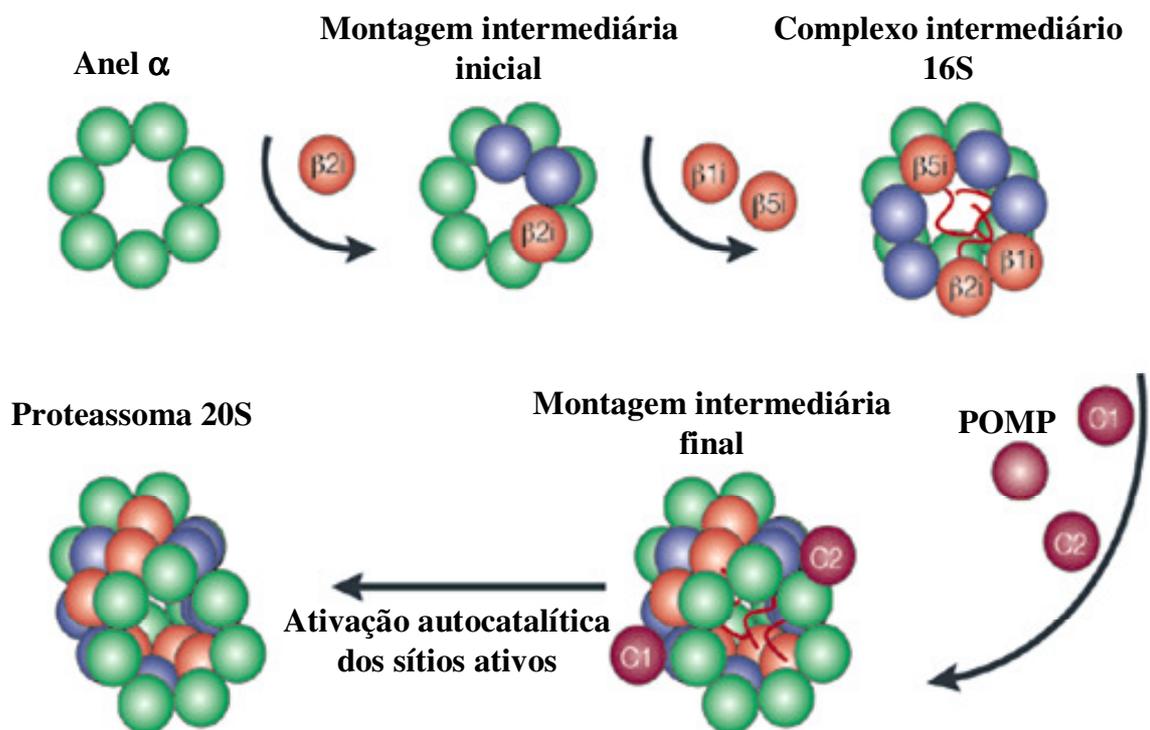
A participação do proteassoma na apresentação de antígenos intracelulares tem sido extremamente documentada. Estudos demonstraram que interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), uma citocina que estimula a apresentação de antígenos, altera a composição das subunidades e a atividade funcional do proteassoma 20S (YANG et al., 1992). A expressão das subunidades  $\beta$ 1i (LMP2 - *Low Molecular Mass Polypeptides*) e  $\beta$ 5i (LMP7), cujos genes estão localizados dentro do locus do MHC classe II próximos aos genes Tap1 e Tap2 (*Transporter of Antigenic Peptides*), é induzida por essa citocina (FRÜH et al., 1994). Em células expostas ao IFN- $\gamma$ , a expressão destas subunidades aumenta em sincronia com o aumento da expressão celular de moléculas induzidas por IFN- $\gamma$ , MHC classe I e das TAPs. Posteriormente, uma terceira subunidade  $\beta$ 2i (MECL-1, *Multicatalytic-Endopeptidase-Complex like-1*), apresentou sua expressão também estimulada pelo IFN- $\gamma$  (HISAMATSU et al., 1996; GROETTRUP et al., 1996a; NANDI et al., 1996). Portanto, sob o estímulo de IFN- $\gamma$ , estas três novas subunidades são incorporadas em partículas recém-sintetizadas chamadas de imunoproteassomas (FRÜH et al., 1999), no lugar de três subunidades constitutivas, sendo que as subunidades catalíticas  $\beta$ 5 (X),  $\beta$ 1 (Y) e  $\beta$ 2 (Z) são substituídas pelas subunidades também catalíticas  $\beta$ 5i (LMP7),  $\beta$ 1i (LMP2) e  $\beta$ 2i (MECL-1), respectivamente (HISAMATSU et al., 1996). Assim, o IFN- $\gamma$  induz o

aparecimento de algumas subunidades e o desaparecimento de outras no complexo proteassomal (FRÜH, et al., 1994), sem, contudo alterar o número de subunidades, permanecendo o mesmo com a incorporação das subunidades induzidas (YANG et al., 1995).

Durante a montagem do imunoproteassoma, a subunidade  $\beta 2i$  é incorporada apenas com a presença de  $\beta 1i$ , enquanto que a incorporação de  $\beta 1i$  é independente de  $\beta 2i$ . Já a subunidade  $\beta 5i$  parece influenciar a cinética de formação do imunoproteassoma (KLOETZEL, 2001).

Embora a incorporação das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  não seja um pré-requisito essencial para a geração de peptídeos antigênicos (YEWDELL et al., 1994), a atividade enzimática dos complexos proteassomais são alteradas, clivando os substratos protéicos em peptídeos ideais para o transporte e reconhecimento pelas moléculas MHC classe I (YANG et al., 1995). Os peptídeos de 8 a 9 resíduos de aminoácidos que se ligam às moléculas de MHC classe I possuem geralmente extremidades hidrofóbicas ou com carga positiva (RAMMENSEE et al., 1993; GACZYNSKA et al., 1993a). Portanto, o padrão de extremidades destes peptídeos sugere que a inclusão das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  nos proteassomas recém sintetizados clivam peptídeos após resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou básicos, conferindo ao imunoproteassoma a capacidade de gerar fragmentos reconhecidos pelas moléculas MHC classe I (GACZYNSKA et al., 1993b), enquanto, que a degradação de peptídeos com extremidades ácidas é reprimida (BOES et al., 1994).

Para definir o papel bioquímico das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , o cDNA destes genes foram transfectados em linfoblastos humanos mutantes, os quais não expressavam as subunidades citadas. A transfecção da subunidade  $\beta 5i$  clivou especificamente após os resíduos hidrofóbicos, a transfecção da subunidade  $\beta 2i$  clivou especificamente após os resíduos básicos, enquanto que a transfecção com a subunidade  $\beta 1i$  reprimiu seletivamente a clivagem após os resíduos ácidos e aumentou a clivagem após resíduos hidrofóbicos (GACZYNSKA et al., 1993b; GACZYNSKA et al., 1994, ORLOWSKI et al., 2000; GROETTRUP et al., 2001; BOSE et al., 2001). A Figura 2 mostra a formação do imunoproteassoma.



**Figura 2. Formação do imunoproteassoma.** A formação do Proteassoma é caracterizada pela formação cooperativa inicial do anel  $\alpha$  que fornece a localização para um grupo de subunidades  $\beta$  ( $\beta_{2i}$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$ ) não processadas. A incorporação das outras subunidades  $\beta$  ( $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{5i}$ ,  $\beta_6$  e  $\beta_7$ ) neste complexo precursor leva a formação do complexo intermediário 16S. As pró-seqüências das subunidades  $\beta$  (caudas vermelhas) têm funções específicas durante este processo e são removidas por autocatálise. Este último passo na maturação do proteassoma provavelmente ocorre quando a partícula está completamente montada concomitantemente com a ativação final do proteassoma 20S (C, *chaperone-like proteins*; POMP, *proteasome maturation protein*) (adaptado de KLOETZEL, 2001).

### 2.3. Complexos Regulatórios

Quatro tipos diferentes de complexos regulatórios descritos até o momento podem se ligar aos anéis externos do cilindro do proteassoma 20S: os complexos regulatórios 19S, PA28 $\alpha\beta$ , PA28 $\gamma$  e PA200.

#### 2.3.1. Proteassoma 26S

O proteassoma 20S quando se associa aos complexos 19S formam o proteassoma 26S. Ao contrário do complexo 20S, o proteassoma 26S só foi encontrado em sistema eucariótico. Entretanto, a descoberta de proteassoma 20S e ubiquitina em *Thermoplasma* e em eubactérias sugere que o complexo 26S possa apresentar uma distribuição universal (LUPAS et al., 1995). O 26S é uma protease multicatalítica, dependente de ATP, apresentando uma massa molecular estimada em 2,0 MDa, com coeficiente de sedimentação entre 26-30S (LUPAS et al., 1993). Ele se encontra principalmente no citoplasma, sendo que uma pequena fração foi detectada no núcleo de células de mamíferos (YANG et al., 1995). Esse complexo 26S desempenha um papel fundamental na principal via de degradação extra lisossomal de proteínas conhecida como via da ubiquitina, a qual é responsável pela degradação de uma grande variedade de proteínas regulatórias.

A ubiquitina (Ub) é uma proteína de 76 resíduos de aminoácidos, altamente conservada, que se liga covalentemente a substratos protéicos destinados à degradação de uma maneira dependente de ATP (PETERS, 1994). A degradação protéica via ubiquitina-proteassoma envolve dois passos sucessivos: (i) conjugação de múltiplas moléculas de Ub ao substrato e (ii) degradação das proteínas alvo pelo complexo proteassoma 26S (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

Este processo de poli-ubiquitinação ocorre por meio de reações catalisadas por várias enzimas: a Ub é inicialmente ativada em uma reação dependente de ATP pela enzima E1 (enzima ativadora de Ub), a qual então transfere a Ub para uma das enzimas E2 (enzimas conjugadoras/carreadoras de Ub), e finalmente as E3 (enzimas ligases de Ub-substrato) ligam a primeira molécula de Ub ao substrato protéico (ATTAIX et al., 2001). Este ciclo se repete até a obtenção de substratos poliubiquitinados, sendo necessárias quatro ou mais moléculas de ubiquitina para que haja um sinal adequado para o reconhecimento e degradação da proteína pelo proteassoma 26S (CIECHANOVER, 1994; WEISSMAN, 2001). Existe uma hierarquia estrutural das enzimas envolvidas no processo de ubiquitinação identificadas em leveduras e

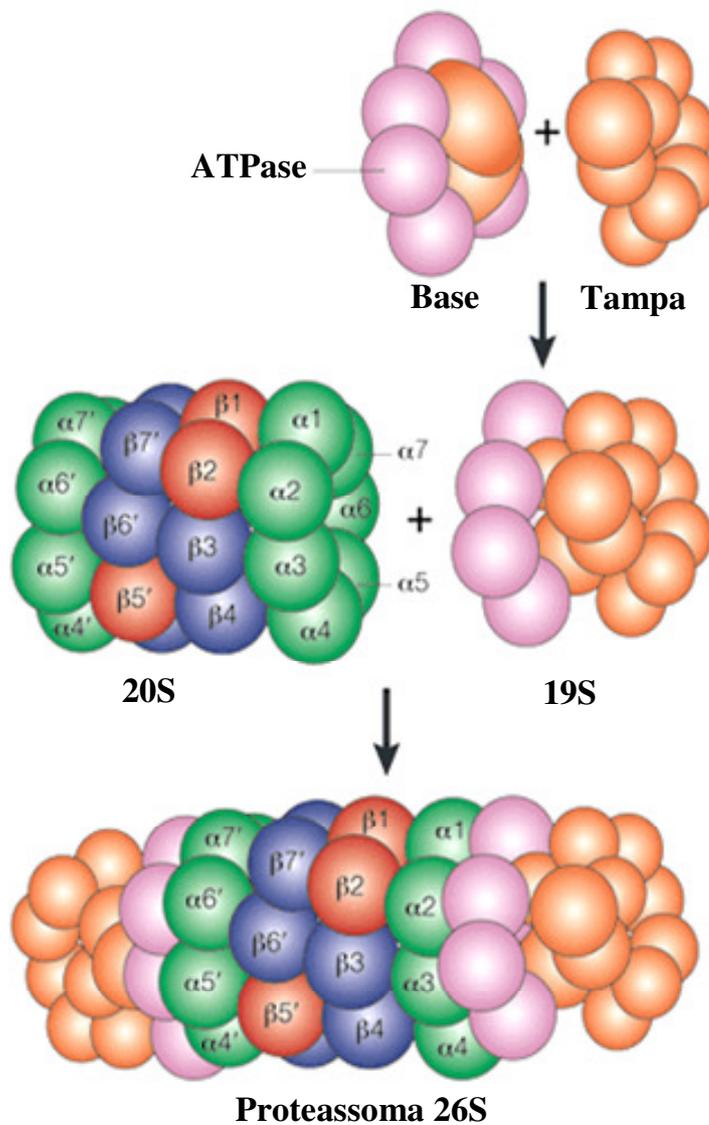
mamíferos, onde se conhece apenas uma E1, algumas E2 (em torno de 20) e centenas de E3, a qual confere uma interação altamente específica do substrato destinado a ubiquitinação (ADAMS, 2003).

Por outro lado, o processo de remoção da Ub é catalisada por proteases, genericamente denominadas de enzimas **DesUB**iquitinadoras (DUBs). As DUBs podem atuar em vários níveis da via de ubiquitinação: (i) manutenção dos níveis de Ubs livres, (ii) correção da ubiquitinação (deubiquitinação de substratos erroneamente alvos de degradação) e (iii) manter o proteassoma 26S livre das cadeias de poli-Ub que podem interferir com a ligação a um outro substrato alvo (ATTAIX et al., 2001).

Em eucariotos, a necessidade de ubiquitinação dos substratos e a presença do complexo 19S certificam que a entrada do polipeptídeo seja altamente seletiva, evitando assim a degradação inespecífica (KLOETZEL, 2001).

O complexo 19S é formado por pelo menos 20 proteínas diferentes de massa molecular variando entre 25-110 kDa que se associam às extremidades do complexo 20S em orientação oposta, de forma reversível e dependente de ATP (TANAKA; CHIBA, 1998). Estudos bioquímicos, genéticos e análises por microscopia eletrônica do proteassoma 26S de levedura mostraram que este complexo é formado por dois sub-complexos denominados tampa e base. O sub-complexo base é composto de seis subunidades ATPases (Rpt 1-6) pertencentes a família AAA (*ATPases Associated Activities*) e duas subunidades maiores não ATPases (Rpn 2/S1, Rpn 1/S2). O sub-complexo tampa apresenta uma massa molecular de 400 kDa e é composto de 8 subunidades não ATPases (Rpn 3/S3, 5/S5a, 6/S9, 7/S10a, 8/S12, 9/S11, 11/S13 e 12/S14) (FERRELL et al., 2000). A base está em contato com as subunidades  $\alpha$  do proteassoma 20S promovendo a abertura do canal central. Além disso, as subunidades ATPases da base apresentam uma atividade de chaperonina e podem estar envolvidas no desenovelamento dos substratos, proporcionando assim o transporte e a translocação destes substratos até a região central do 20S onde será degradado (KLOETZEL, 2001).

A subunidade S5a (Rpn10) do complexo 19S está localizada na interfase dos sub-complexos base e tampa e é capaz de se ligar a cadeias de poliubiquitina (SAEKI et al., 2002). Com isso tem sido proposto que a S5a pode ser o componente reconhecedor de conjugados ubiquitinados do complexo 19S (VOGES et al., 1999). Recentemente, LAM et al., (2002) demonstrou que a subunidade ATPase S6 (também conhecida com Rpt5) interage com cadeias poliubiquitinadas, funcionando como um sinal para a degradação pelo proteassoma 26S em eucariotos. A Figura 3 mostra a composição do proteassoma 26S.



**Figura 3. Composição do Proteassoma 26S.** O proteassoma 26S é formado através da união dos dois complexos: proteassoma 20S e complexo regulatório 19S, sendo este último composto de dois sub-complexos (base e tampa) (adaptado de KLOETZEL, 2001).

### 2.3.2. Proteassoma 20S-PA28 $\alpha\beta$

O efeito de citocinas liberadas durante a resposta imune também afeta a associação do proteassoma 20S com complexos regulatórios específicos. O tratamento com IFN- $\gamma$ , além de induzir a adição das três subunidades  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i e  $\beta$ 5i, os transportadores de peptídeos (TAP-1 e TAP-2) e as moléculas MHC classe I também induz o complexo ativador PA28 (*Proteasome Activator*) ou 11S ou REG (*Regulator*).

O PA28 $\alpha\beta$  foi inicialmente descrito em células de sangue de mamíferos (DUBIEL et al., 1992 apud LUPAS et al., 1995) e posteriormente foi identificado em uma variedade de espécies de mamíferos incluindo humanos, camundongos e ratos (KUEHN; DAHLMANN, 1997). Este ativador é um complexo citoplasmático de aproximadamente 200 kDa e 10 nm de diâmetro. É formado por duas subunidades similares, mas não idênticas designadas de PA28 $\alpha$  e PA28 $\beta$  (MOTT et al., 1994; KANIA et al., 1996), as quais apresentam massas moleculares de 28,7 e 27,2 kDa, respectivamente (AHN et al., 1996; MOTT et al., 1994). Estas subunidades são produtos gênicos distintos, porém homólogos, sendo que apresentam aproximadamente 50% de identidade nas subunidades de humanos (GROETTRUP et al., 1996b). Além disso, ambas as subunidades são altamente conservadas, apresentando aproximadamente 90% de identidade entre as subunidades de humanos e ratos (GROETTRUP et al., 1995). As subunidades se agrupam em forma de disco formando um heterohexâmero ( $\alpha$ 3 $\beta$ 3) alternando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , ou formando um heteroheptâmero ( $\alpha$ 3 $\beta$ 4 ou uma mistura de  $\alpha$ 3 $\beta$ 4 e  $\alpha$ 4 $\beta$ 3), sendo que se associam reversivelmente de forma independente de ATP à uma ou às duas extremidades do complexo 20S (MURATA et al., 1999).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a maior parte do complexo PA28 $\alpha\beta$  está associado com o proteassoma 20S (AHN et al., 1996; KUEHN; DAHLMANN, 1996), sem contudo interferir com a formação do proteassoma 26S (YANG et al., 1995). *In vitro*, as subunidades do PA28 $\alpha$  isoladas são capazes de formar  $\alpha$ -homomultímeros, os quais estimulam em níveis moderados a atividade peptidásica do proteassoma 20S. Em contraste, as subunidades do PA28 $\beta$  isoladas não se associam e não apresentam nenhum efeito estimulatório sobre o complexo 20S. Apenas heteromultímeros contendo subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são capazes de estimular o proteassoma 20S em níveis semelhantes àqueles do complexo nativo PA28 $\alpha\beta$ -20S, sugerindo que este ativador funcional possui a estrutura de heteromultímeros  $\alpha$  e  $\beta$  (KUEHN; DAHLMANN, 1996).

A interação entre os dois complexos parece ser dependente da integridade da porção C-terminal das subunidades do complexo PA28 $\alpha\beta$ , uma vez que a remoção de poucos resíduos nessa região é suficiente para impedir a formação do complexo PA28 $\alpha\beta$ -20S (MA et al., 1993 apud LUPAS et al., 1995).

A ligação do PA28 $\alpha\beta$  ao proteassoma 20S causa um movimento da cauda N-terminal das subunidades  $\alpha$  para cima, dentro da cavidade do complexo PA28 $\alpha\beta$ , abrindo a entrada do canal e favorecendo a entrada do substrato para a degradação pelo proteassoma 20S (KLOETZEL, 2001). Este complexo estimula ainda as múltiplas atividades peptidásicas do complexo 20S, favorecendo assim a hidrólise de pequenos peptídeos. Entretanto, o proteassoma 20S-PA28 $\alpha\beta$  não possui a capacidade de degradar substratos protéicos grandes (KANIA et al., 1996), sugerindo que o PA28 $\alpha\beta$  deve cooperar com o proteassoma 26S em vias proteolíticas sequenciais (MURATA et al., 1999). Entretanto, recentemente foi proposta a existência de um complexo híbrido, com o PA28 $\alpha\beta$  associado a uma terminação do proteassoma 20S e o complexo 19S na outra terminação (HENDIL et al., 1998). A descoberta deste tipo de complexo levou os autores a propor a participação do proteassoma híbrido na degradação de proteínas intactas, ou seja, função similar desempenhada pelo proteassoma 26S.

Quando associado ao imunoproteassoma, o complexo PA28 $\alpha\beta$  estimula atividades peptidásicas distintas deste complexo, resultando na clivagem de resíduos hidrofóbicos e básicos, o que indica que este ativador, junto com as subunidades  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i e  $\beta$ 5i, altera a especificidade da partícula 20S aos peptídeos substratos (USTRELL et al., 1995). A ação do PA28 $\alpha\beta$  sobre o imunoproteassoma induz modificações conformacionais de tal forma que favorece a geração de peptídeos com 8 ou 9 resíduos de aminoácidos, demonstrando assim o papel que este regulador desempenha no processamento de antígenos (KUEHN; DAHLMANN, 1996). Além disso, foi demonstrado que a superexpressão da subunidade PA28 $\alpha$  em fibroblasto de camundongo resultou num aumento na apresentação de antígenos, verificando-se assim uma alteração no mecanismo de clivagem de peptídeos virais pelo proteassoma 20S mediante interação com PA28, aumentando a produção de peptídeos imunogênicos (USTRELL et al., 1995; KUEHN; DAHLMANN, 1996).

### 2.3.3. Proteassoma 20S – PA28 $\gamma$

A clonagem dos cDNAs de PA28 $\alpha$  e PA28 $\beta$  revelou que estas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são estruturalmente similar a uma proteína nuclear denominada antígeno ki, inicialmente identificada juntamente com auto-anticorpos encontrados em soro de pacientes com lúpus eritematoso (NIKAIDO et al., 1990 apud WILK et al., 2000). Posteriormente, foi relatado que em gradientes de glicerol o antígeno ki co-immunoprecipita com o proteassoma 20S e associa-se reversivelmente com a partícula 20S. Então, este terceiro membro da família de proteínas do PA28 foi renomeado para PA28 $\gamma$  (também conhecido como REG- $\gamma$ ) (TANAHASHI et al., 1997 apud WILK et al., 2000).

O PA28 $\gamma$  apresenta uma massa molecular de aproximadamente 31 kDa e parece formar um homopolímero, com seis (PA28( $\gamma$ )<sub>6</sub>) ou sete (PA28( $\gamma$ )<sub>7</sub>) subunidades indicando que a formação de heptâmeros é uma propriedade intrínseca da família de proteínas de PA28 (TANAHASHI et al., 1997 apud MURATA et al., 1999). A distribuição celular do PA28 $\gamma$  é distinta do PA28 $\alpha\beta$ . Ele encontra-se basicamente no núcleo das células, não havendo relatos de sua localização no nucléolo. A ativação das atividades proteolíticas do proteassoma 20S pelo PA28 $\gamma$  tem gerado controvérsia. Vários grupos relataram que o PA28 $\gamma$  ativa somente a atividade tipo tripsina (LI; RECHSTEINER, 2001; MASSON et al., 2001). Entretanto, Wilk et al. (2000) demonstraram que um PA28 $\gamma$  recombinante foi capaz de ativar as três atividades proteolíticas relacionadas às subunidades  $\beta$  do proteassoma 20S. Para resolver esta discrepância, Gao et al. (2004) relataram que a ativação das propriedades proteolíticas do proteassoma 20S pelo complexo PA28 $\gamma$  depende dos procedimentos de purificação do referido ativador. Antes da precipitação do complexo PA-28 $\gamma$  com sulfato de amônio, ele é capaz de estimular somente a atividade proteolítica tipo tripsina do proteassoma 20S, sendo que, após a precipitação, ele ativa todas as três principais atividades proteolíticas do 20S.

Para investigar a função do PA28 $\gamma$  *in vivo*, foram produzidos camundongos deficientes neste complexo. Os camundongos mutantes nasceram sem anormalidades aparentes em todos os tecidos examinados, mas o crescimento destes foi retardado quando comparado com os camundongos selvagens, indicando que PA28 $\gamma$  não é essencial para o desenvolvimento dos camundongos, mas a sua ausência afeta o crescimento. Culturas de fibroblastos embrionários mutados no gene do PA28 $\gamma$  apresentaram divisão celular alterada sendo impedido de entrar na fase S do ciclo celular, havendo assim o retardamento da proliferação celular (MURATA et al., 1999).

Até o presente momento, não foi descrito o envolvimento do PA28 $\gamma$  no sistema imunológico das células de mamíferos. Ao contrário das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do complexo PA28, que aumentam seus níveis protéicos sob a estimulação com IFN- $\gamma$ , o PA-28 $\gamma$  permanece com seus níveis protéicos estáveis ou são fracamente diminuídos sob o estímulo desta citocina, e, além disso, a sua localização nuclear faz-lhe um improvável candidato para ajudar na apresentação de antígenos via MHC classe I (MASSON et al., 2001).

#### **2.3.4. Proteassoma 20S – PA200**

Ustrell et al. (2002) identificaram o mais recente ativador do proteassoma 20S, o PA200, propuseram que este ativador do proteassoma pode estar envolvido no reparo do DNA. Este complexo apresenta massa molecular de 200 kDa e foi purificado de testículo bovino, onde mostrou-se bastante abundante. Assim como os outros ativadores do proteassoma 20S, PA28 $\alpha\beta$  e PA28 $\gamma$ , o PA200 estimula a hidrólise de pequenos peptídeos, mas não ativa a hidrólise de proteínas intactas. Até o presente momento sabe-se que o PA200 associa-se nas terminações do proteassoma 20S, mas a importância fisiológica desta associação ainda não é clara (RECHSTEINER; HILL, 2005).

#### **2.4. Funções do proteassoma**

A principal função dos proteassomas é catalisar a degradação das proteínas a pequenos peptídeos, sendo que a maioria são então rapidamente degradados a aminoácidos. Portanto, os proteassomas desempenham funções essenciais na degradação seletiva de proteínas anormais, tanto de vida curta quanto de vida longa, e muitas proteínas regulatórias. Deste modo é extremamente grande a lista de processos fisiológicos dependentes das atividades proteolíticas do proteassoma, sendo envolvido no controle do ciclo celular (GHISIAN et al., 1993), apresentação de antígenos (ROCK et al., 1994), processos oncogênicos (SCHEFFNER et al., 1992), regulação da transcrição e tradução (PALOMBELLA et al., 1994), apoptose (ELLIS et al., 1991) entre outros. Entretanto, o presente trabalho irá descrever a atuação deste complexo proteolítico somente em uma função: a geração de peptídeos antigênicos.

### 2.4.1. Apresentação de antígenos

Os animais são constantemente confrontados com substâncias e organismos que os agredem. Os invasores podem se localizar no fluído extracelular, tais como toxinas e bactérias ou estarem presentes dentro das próprias células como vírus, protozoários e bactérias. Esta distinção é importante para as células do sistema imune, especificamente os linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ), os quais reconhecem os antígenos dentro de contextos diferentes quando estes se associam as moléculas de MHC e são expressos conjuntamente na membrana plasmática da célula infectada ou apresentadora de antígenos (macrófago) (ENGELHARD, 1994).

O MHC codifica para duas classes de proteínas de superfície que atuam como receptoras de antígenos: (i) MHC classe I ocorre em todos os tipos celulares e consiste de uma glicoproteína integral de membrana ligada covalentemente à  $\beta_2$ -microglobulina, e (ii) MHC classe II é encontrado preferencialmente em células do sistema imune (macrófagos e linfócitos B) e é composto por duas cadeias não-covalentemente ligadas de glicoproteínas integrais de membrana (BENHAM; NEEFJES, 1995).

O reconhecimento do MHC classe I e II divide os linfócitos T em duas classes: os linfócitos T citotóxicos (CTL) e os linfócitos T auxiliares (HTL). Os linfócitos T citotóxicos erradicam patógenos intracelulares e tumores pela lise direta das células ou pela secreção de citocinas como o interferon- $\gamma$  (MONACO; NANDI, 1995). Já os linfócitos T auxiliares ajudam a erradicar antígenos extracelulares por meio da ativação da resposta imune humoral, mediada pelos anticorpos, pela secreção de citocinas que estimulam a proliferação dos linfócitos B e outros tipos de linfócitos T. Desta forma, a apresentação de antígenos são derivados de duas grandes vias proteolíticas intracelulares distintas: uma é a via endocítica (ou exógena), que é responsável pela apresentação de antígenos extracelulares ligados ao MHC classe II, e a outra é a via citoplasmática (ou endógena), que está envolvida na apresentação de antígenos intracelulares associados ao MHC classe I (HAHN et al., 1996).

O processamento de antígenos da via endocítica dá-se por meio da endocitose de antígenos extracelulares, os quais são degradados nos lisossomos por proteases ácidas (GOLDBERG; ROCK, 1992). Estas enzimas degradam os antígenos em oligopeptídeos de 13 a 18 resíduos de aminoácidos e alguns destes se ligam as moléculas de MHC classe II e são apresentados na superfície da membrana plasmática, iniciando a produção de anticorpos e resposta a processos inflamatórios por meio de células  $CD4^+$  (ENGELHARD, 1994).

A ligação dos proteassomas com a apresentação de antígenos está relacionada especificamente com a via de processamento de antígenos da via citoplasmática, a qual pode ser definida como o processo pelo qual os antígenos protéicos são modificados estruturalmente de modo que os determinantes antigênicos reconhecidos pelos linfócitos T interajam com as moléculas de MHC classe I. Caso o peptídeo antigênico não seja tolerante, a célula é destruída pelos linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (AKI et al., 1994).

O processamento dos antígenos da via citoplasmática (intracelular) é realizado pelo imunoproteassoma, o qual favorece a geração de peptídeos de 8 a 9 resíduos de aminoácidos (HOWARD, 1995). Os peptídeos são transportados para o lúmen do retículo endoplasmático por meio de um sistema transportador dependente de ATP, composto por duas proteínas TAP1 e TAP2 (ROELSE et al., 1994; NEISIG et al., 1995), cujos genes estão codificados no locus do MHC classe II (YANG et al., 1996). Os peptídeos transportados pelas TAPs se ligam às moléculas MHC classe I estabilizando a montagem da cadeia pesada classe I com a  $\beta^2$ -microglobulina (GROETTRUP et al., 1996b). Somente após a montagem, o complexo trimolecular é transportado para a membrana celular, para então serem apresentados (GOLDBERG; ROCK, 1992; HAHN et al., 1996).

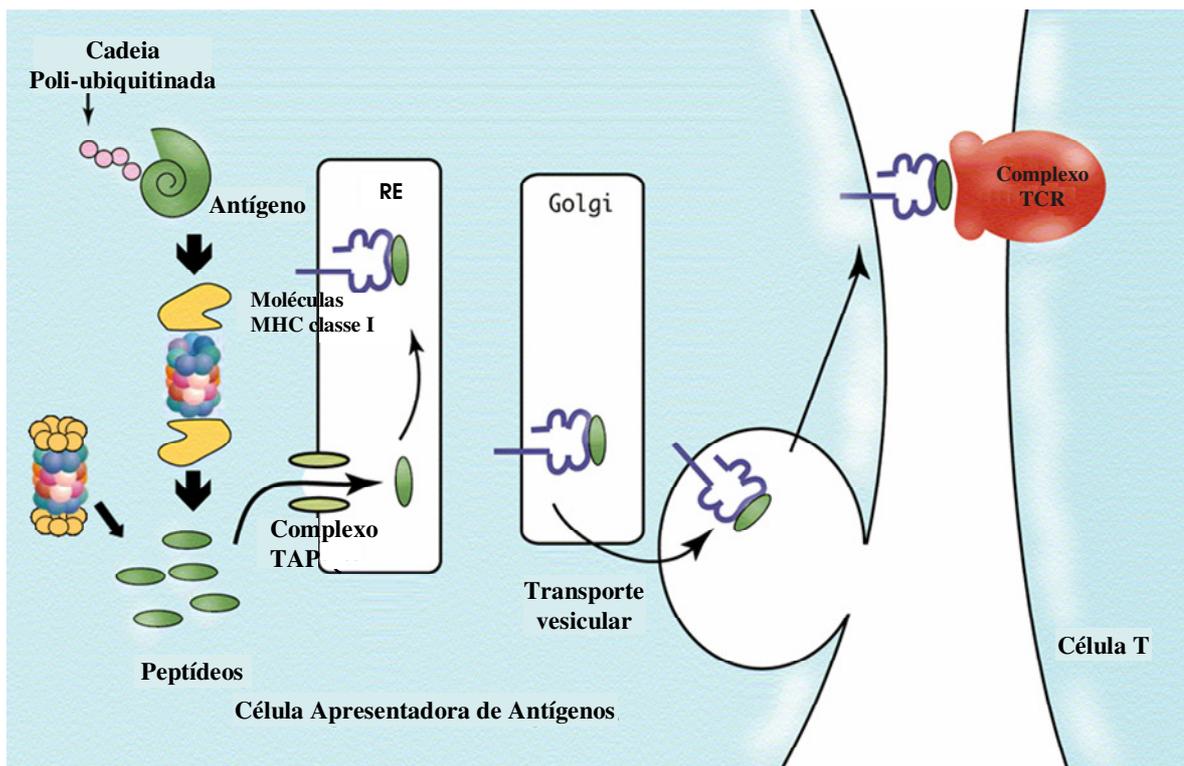
Em presença de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), um potente estimulador da resposta imune, três genes proteassomais humanos,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , as proteínas TAP1 e TAP2, as moléculas MHC e o complexo regulatório PA28 $\alpha\beta$  tem sua expressão induzida (YANG et al., 1992; AKIYAMA et al., 1994).

Sob o estímulo de IFN- $\gamma$  a incorporação das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  nos proteassomas recém sintetizados (imunoproteassomas) altera a atividade enzimática destes complexos, clivando os substratos protéicos em peptídeos ideais para o transporte e reconhecimento pelas moléculas MHC (YANG et al., 1995).

Proteassomas contendo as subunidades induzidas são encontrados no fígado e baço de camundongos normais, mas não são observados em músculo e cérebro, nos quais o conteúdo de moléculas de MHC classe I é muito baixo (COUX et al., 1996).

Portanto, a degradação de antígenos pode ocorrer em duas etapas: (i) degradação inicial dos antígenos em fragmentos de tamanhos intermediários pelo proteassoma 26S e, (ii) em seguida ocorre a degradação destes fragmentos pelos complexos 20S-PA28 produzindo peptídeos de 8 a 9 resíduos de aminoácidos (YANG et al., 1996). A Figura 4 mostra o papel do proteassoma na geração de peptídeos antigênicos.

Como o proteassoma é o complexo central na geração de peptídeos antigênicos, muitos microrganismos infecciosos desenvolveram estratégias que impedem a proteólise de antígenos via proteassoma, dificultando, portanto o reconhecimento destes patógenos pelo sistema imune. Por exemplo, a proteína X do vírus da Hepatite B interage com a subunidade  $\alpha 7$  proteassoma, inibindo as atividades do tipo quimotripsina e tripsina da partícula (HU et al., 1999). Além disso, outros estudos mostraram que tanto o Adenovirus tipo 12 E1A e o tipo HPV 18 E7 exibiram um decréscimo tanto nos níveis de mRNA quanto nos níveis protéicos de TAP1 e 2,  $\beta 1i$  e  $\beta 5i$  (ROTEM-YEHUDAR et al., 1996; PROFFITT; BLAIR, 1997; GEORGOPOULOS et al., 2000).



**Figura 4. Processamento de antígenos via MHC classe I.** As proteínas são degradadas no citoplasma pelo proteassoma 26S em peptídeos de tamanhos intermediários e em seguida em peptídeos de 8 a 9 resíduos de aminoácidos pelo imunoproteassoma. Estes peptídeos são transportados para o interior do retículo endoplasmático através do complexo TAP e se ligam às moléculas de MHC classe I. O complexo trimolecular é transportado através do Golgi para a superfície da membrana plasmática, para então serem apresentados aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (modificado de TSUKIHARA, 2006).

## **OBJETIVOS E HIPÓTESES DE TRABALHO**

O presente trabalho tem como objetivo estudar a expressão de genes de proteassomas e suas implicações durante a infecção de células em cultura pelo *T. cruzi*.

Dentro desse contexto, nós podemos formular as seguintes perguntas: (i) a infecção de células em cultura pelo *T. cruzi* afeta as atividades proteásicas de proteassomas humanos?; (ii) o que acontece com a expressão dos genes proteassomais induzíveis pelo IFN- $\gamma$  durante a infecção de células em cultura pelo *T. cruzi*?

# **MATERIAL E MÉTODOS**

## **1. MATERIAL**

### **1.1. Organismos e linhagens celulares utilizadas**

#### **1.1.1. *Trypanosoma cruzi***

Em todo o decorrer do trabalho experimental foram utilizadas as formas epimastigota e tripomastigota da cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

#### **1.1.2. Células HeLa**

As células HeLa utilizadas são do tipo epitelial, aneuploides e foram isoladas inicialmente de adenocarcinoma de útero em 1952.

#### **1.1.3. Células L6**

As células L6 utilizadas são do tipo mioblasto e foram isoladas originalmente por Yaffe (1968), de culturas primárias de músculo de rato (*Rattus norvegicus*).

### **1.2. Anticorpos**

Foram utilizados anticorpos monoclonais produzidos em camundongos contra as subunidades p23K, p25K, p33K e p27K, p29K, p31K de proteassomas de pato e de homem, respectivamente (GROSSI DE SÁ et al., 1988). Para as subunidades induzidas por IFN- $\gamma$  foram utilizados os anticorpos policlonais produzidos em coelho contra as subunidades  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i e  $\beta$ 5i (Affiniti - Biomol).

### **1.3. Oligonucleotídeos**

Os oligonucleotídeos utilizados para realizar os experimentos de RT-PCR estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na PCR**

| Gene                  | Oligos | Tamanho (mer) | Temp.* | Seqüência (5' - 3')    | Tamanho fragmento (pb) |
|-----------------------|--------|---------------|--------|------------------------|------------------------|
| <i>alfa1</i>          | PR167  | 19            | 54°    | GGCCTTACATCAGTAGCTG    | 562                    |
|                       | PR168  | 19            |        | CAACTGTCACTACTCCAAC    |                        |
| <i>alfa2</i>          | PR231  | 19            | 56°    | CAGTCAGGTGGTGTTCGTC    | 335                    |
|                       | PR232  | 21            |        | GCTATGGCAGCCAAGTAATCC  |                        |
| <i>alfa3</i>          | PR233  | 21            | 56°    | ATGTCTCGAAGATATGACTCC  | 432                    |
|                       | PR234  | 19            |        | GCCATAGTGCTTATCCCAG    |                        |
| <i>alfa4</i>          | PR235  | 18            | 56°    | CGCCATCACCGTCTTCTC     | 338                    |
|                       | PR236  | 19            |        | TAACGCTGCTTCAGACTGG    |                        |
| <i>alfa5</i>          | PR237  | 20            | 56°    | GGGCTAATTGCTGATGCTAA   | 371                    |
|                       | PR238  | 21            |        | TTGAGGATGATGAGTGAAGAC  |                        |
| <i>alfa6</i>          | PR239  | 19            | 56°    | GCAAGACCCAGATACCAAC    | 351                    |
|                       | PR240  | 21            |        | GAGACACATCATCATCATCAT  |                        |
| <i>alfa7</i>          | PR241  | 19            | 56°    | TGTTGGCAGATGCTCGTTC    | 514                    |
|                       | PR242  | 21            |        | TCATCTGATTCATCTTCTTCC  |                        |
| <i>beta1</i>          | PR217  | 19            | 56°    | GACTCCAGAACAACCACTG    | 399                    |
|                       | PR218  | 18            |        | CTTGGTCATGCCTTCCCG     |                        |
| <i>beta2</i>          | PR219  | 19            | 56°    | CTGAAGGGATGGTTGTTGC    | 558                    |
|                       | PR220  | 19            |        | CTTTCTCACACCTGTACCG    |                        |
| <i>beta3</i>          | PR221  | 18            | 56°    | GTCCAGACAGTTGCCAG      | 352                    |
|                       | PR222  | 19            |        | GGTCCACAGCATTGAGCAT    |                        |
| <i>beta4</i>          | PR223  | 22            | 56°    | CATGACAAGATGTTTAAGATGA | 323                    |
|                       | PR224  | 19            |        | GTCAGGAAGGCACCATAGC    |                        |
| <i>beta5</i>          | PR225  | 20            | 56°    | CCAAACTGCTTGCCAACATG   | 275                    |
|                       | PR226  | 19            |        | GAGTAGGCATCTCTGTAGG    |                        |
| <i>beta6</i>          | PR227  | 22            | 56°    | GTGAAGGGTTTTCAATTCATAC | 523                    |
|                       | PR228  | 19            |        | CTGATGCCCTCTTTGGTCA    |                        |
| <i>beta7</i>          | PR229  | 21            | 56°    | CAGTATTTGAAGCAAGTTCTC  | 355                    |
|                       | PR230  | 19            |        | GGTAGTACAGCACTCGCAT    |                        |
| <i>gapdh humana</i>   | PR243  | 20            | 50-58° | CCTTCATTGACCTCAACTAC   | 869                    |
|                       | PR244  | 19            |        | CACCACCCTGTTGCTGTAG    |                        |
| <i>gapdh T. cruzi</i> | PR196  | 21            | 60°    | GACGACGATCCACTCGTACAC  | 376                    |
|                       | PR197  | 21            |        | ATCTACGACTCCAAGGCGACG  |                        |
| <i>beta1i</i>         | PR125  | 18            | 54°    | CTACTGTGCACTCTCTGG     | 313                    |
|                       | PR126  | 18            |        | GCCTGGCTTATATGCTGC     |                        |
| <i>beta1i (rato)</i>  | PR203  | 17            | 50°    | GCCGCCTACCAGCTGGA      | 423                    |
|                       | PR33   | 19            |        | CTCATCATAGAATTTTGGC    |                        |
| <i>beta2i</i>         | PR122  | 18            | 54°    | GAAGATCCACTTCATCGC     | 571                    |
|                       | PR124  | 19            |        | CTCCAGGGTTAGTGGCTTC    |                        |
| <i>beta2i (rato)</i>  | PR122  | 18            | 54°    | GAAGATCCACTTCATCGC     | 607                    |
|                       | PR31   | 19            |        | CTCCACCTCCATAGCCTGC    |                        |
| <i>beta5i</i>         | PR127  | 18            | 52°    | GGAGAAAGGAACGTTTCAG    | 648                    |
|                       | PR35   | 19            |        | TTGATTGGCTTCCCGGTAC    |                        |
| <i>beta5i (rato)</i>  | PR201  | 18            | 58°    | TGGCCAAGGAATGCAGGC     | 339                    |
|                       | PR202  | 20            |        | CTCCAGAATAGCTGTCTCTG   |                        |

\* Temperatura utilizada na etapa de anelamento da PCR.

## 1.4. Meios de Cultura

### 1.4.1. Meios de Cultura para *Trypanosoma cruzi*

#### 1.4.1.1. Meio LIT (CAMARGO, 1964)

NaCl 0,4 %; KCl 0,04 %; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8 %; Glicose 0,2 %; Triptose 0,5 %; Infuso de Fígado 0,5 %; Hemina 0,0025 %; Soro Fetal Bovino 10 %

O extrato de fígado foi previamente dissolvido em água destilada, aquecido a 60°C em placa aquecedora sob agitação durante 1 h e filtrado em papel Whatman nº1. A hemina foi adicionada ao meio a partir de uma solução estoque de 2 mg/mL. O pH do meio foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e este foi esterilizado por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm. Após a esterilização do meio foram adicionados o soro fetal bovino já inativado e esterilizado (Gibco - BRL) e a ampicilina (100 µg/mL) esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm.

#### 1.4.1.2. Meio TAU - *Triatomine Artificial Urine* (CONTRERAS, 1985a e b)

NaCl 190 mM; KCl 17 mM; CaCl<sub>2</sub> 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; Tampão Fosfato (pH 6,8) 8 mM

O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min e depois de frio adicionou-se assepticamente o CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> previamente esterilizados por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm. Em seguida o meio foi distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

#### 1.4.1.3. Meio TAU3AAG (GOLDENBERG et al., 1987 apud CONTRERAS et al., 1994)

NaCl 190 mM; KCl 17 mM; CaCl<sub>2</sub> 2 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; Tampão Fosfato (pH 6,8) 8 mM; L-Prolina 10 mM; L-Glutamato 50 mM; L-Aspartato 2 mM; Glicose 10 mM

O meio foi esterilizado por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm, distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

### 1.4.2. Meios de cultura para células HeLa e L6

Toda a vidraria utilizada para o cultivo de células HeLa e L6 foi submetida a uma solução de 1 % de detergente neutro (Extran, Merck) por pelo menos 12 h, lavada exaustivamente em água de torneira, seguido de água destilada, seca em estufa a 60°C e esterilizada em estufa a 180°C por 4 h.

#### 1.4.2.1. Solução de Antibióticos

Penicilina G 50.000 U/mL; Estreptomicina 37.750 U/mL

A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm, distribuída assepticamente em alíquotas de 0,5 mL e armazenada a -20°C.

#### 1.4.2.2. Meio DMEM

Meio DMEM (Gibco BRL) 13,4 g; Piruvato de sódio 0,11 g; Bicarbonato de Sódio 3,7 g; Água destilada qsp. 900 mL

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e o meio foi esterilizado por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm. Após a esterilização do meio, o soro fetal bovino (Gibco BRL) e a solução de antibióticos (1.4.2.1) foram adicionados. Em seguida, o meio foi distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

## 1.5. Soluções e Tampões

### 1.5.1. Tampão PSG (1 X)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 95 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 5 mM; NaCl 72 mM; Glicose 55,5 mM

A esterilização foi feita por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm e o tampão foi armazenado a 4°C.

### 1.5.2. PBS (1 X)

NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM

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

### 1.5.3. Verseno (EDTA)

Verseno - EDTA (pH 7,0) 2 mM; PBS 1 X

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

### 1.5.4. Tripsina

Tripsina 5 %; PBS 1 X

O pH foi ajustado para 7,8 a 8,0. A solução foi armazenada a 4°C durante a noite para decantação. No dia seguinte, o pH foi checado novamente e ajustado se necessário. A solução foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm, distribuída em alíquotas de 0,5 mL e armazenada a -20°C.

### 1.5.5. Solução Giemsa

Giemsa 1 g; Glicerina 66 mL; Metanol 66 mL

O corante Giemsa foi adicionado à glicerina a 55°C e a mistura foi agitada durante 30 min. Após este período, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e em seguida o metanol foi adicionado. A solução foi filtrada em papel Whatman nº1, armazenada em frascos escuros à temperatura ambiente e utilizada somente 72 h após o preparo. Para o uso desta solução foi realizada uma diluição de 1:30 em tampão fosfato 0,02 M (pH 6,8).

### 1.5.6. Preparo da resina

A resina de troca iônica DE-52 celulose (Whatman) foi hidratada em água destilada até a sua uniformização e esterilizada em autoclave por 20 min a 120°C. Após a esterilização, a resina foi adicionada e empacotada em uma seringa de vidro de 50 mL e em seguida equilibrada com tampão PSG 1 X (item 1.5.1). Para a purificação das formas tripomastigotas metacíclicos foi utilizada uma proporção de 15 mL de resina para 100 mL de cultura de *T. cruzi* com aproximadamente  $6 \times 10^7$  células/mL.

## 1.5.7. Soluções para eletroforese em géis de Poliacrilamida

### 1.5.7.1. Tampão de amostra SDS-PAGE (1 X)

Tris HCl (pH 6,8) 0,08 M; Sacarose 12 %; SDS 2 %; β-Mercaptoetanol 2 %; Azul de Bromofenol 0,05 %

O tampão foi alíquotado em tubos de 1,5 mL e armazenados a -20°C

### 1.5.7.2. Tampão de corrida SDS-PAGE (1 X)

Trizma base 0,0375 M; Glicina 0,3 M; SDS 0,1 %

O pH do tampão foi ajustado para 8,3 e então armazenado em frasco âmbar à temperatura ambiente.

### **1.5.7.3. Gel separador SDS-PAGE**

Tris HCl (pH 8.8) 0,375 M; SDS 0,1 %; Acrilamida/bisacrilamida (39:1 p/p) 13 %; APS 0,045 %; TEMED 0,075 %

### **1.5.7.4. Gel concentrador SDS-PAGE**

Tris HCl (pH 6.8) 0,125 M; SDS 0,1 %; Acrilamida/bisacrilamida (39:1 p/p) 4 %; APS 0,072 %; TEMED 0,12 %

### **1.5.7.5. Gel para eletrofocalização por Isotacoforese (O'FARREL et al., 1977)**

Uréia 14,35 M; Acrilamida/bisacrilamida (28,2:1,8 p/p) 6,72 %; NP-40 3,4 %; Anfolinas (pH 3,5-10) 3,4 %; APS 0,025 %; TEMED 0,17 %

### **1.5.7.6. Tampão de ressuspensão de amostra de géis bidimensional (*Lysis buffer*)**

Uréia 9,5 M; NP-40 2 %; Anfolinas (pH 5-7) 1,6 %; Anfolinas (pH 3,5-10) 0,4 %;  $\beta$ -Mercaptoetanol 5 %

### **1.5.7.7. Tampão de cobertura de géis bidimensionais (*Overlay buffer*)**

Uréia 8 M; Anfolinas (pH 5-7) 0,8 %; Anfolinas (pH 3,5-10) 0,2 %; NP-40 1 %; Verde de Metila 0,025 %

### **1.5.7.8. Tampão de equilíbrio das amostras de géis bidimensionais**

Tris HCl (pH 6,8) 0,08 M; SDS 2 %;  $\beta$ -Mercaptoetanol 2 %; Azul de Bromofenol 0,05 %

### **1.5.7.9. Solução fixadora**

Metanol 50 %; Ácido acético 10 %

### **1.5.7.10. Tampão de transferência para *Western blot***

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

## **1.5.8. Soluções para eletroforese em géis de agarose**

### **1.5.8.1. TBE (5X)**

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

O pH do tampão foi ajustado para 8,3 e este foi armazenado em frasco âmbar à temperatura ambiente.

### **1.5.8.2. Tampão de amostra (10 X)**

TBE 10 X; Glicerol 50 %; Azul de bromofenol 0,01 %; Xileno cianol 0,01 %

### **1.5.8.3. Tampão MOPS/EDTA (10 X)**

MOPS 0,2 M; Acetato de Sódio 50 mM; EDTA (pH 8,0) 10 mM

O pH do tampão foi ajustado para 7,0 com NaOH (livre de RNase) e então armazenado em frasco âmbar a 4°C.

### **1.5.8.4. Tampão de Amostra para eletroforese desnaturante**

Formamida 0,75 mL; MOPS/EDTA 10 X 0,15 mL; Formaldeído 0,24 mL; Glicerol 100 % 0,10 mL; Azul de bromofenol 10 % 0,08 mL; Água Milli Q 0,10 mL

### **1.5.8.5. Brometo de Etídeo**

Solução estoque: 10 mg/mL em água Milli Q

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Manutenção das culturas

#### 2.1.1. *Trypanosoma cruzi*

As culturas de epimastigota de *T. cruzi* foram mantidas em 5 mL de meio LIT (item 1.4.1.1) a 28°C, sendo que os repiques foram realizados semanalmente com um inóculo de 10 %. As culturas de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* foram mantidas em cultura de células HeLa ou células L6, e foram recolhidos diariamente, centrifugados e congelados em soro fetal bovino contendo 10 % de DMSO a -80°C.

#### 2.1.2. Células HeLa e L6

As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (item 1.4.2.2) e antibióticos (item 1.4.2.1) a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub>. A manutenção foi realizada com repiques semanais, como descrito a seguir: o meio DMEM suplementado utilizado para a multiplicação foi retirado e descartado, 2 mL de solução de verseno (item 1.5.3) contendo 1 % de tripsina (item 1.5.4) foram adicionados às garrafas e as células foram mantidas nesta solução à temperatura ambiente por aproximadamente 30 seg. Após este período, a solução de verseno foi retirada e descartada e as células incubadas a 37°C por 10 min para que descolassem da garrafa.

Posteriormente, 2 mL de meio DMEM suplementado foram adicionados em cada cultura para homogeneização das células e 500 µL da suspensão de células foram inoculadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) contendo 5 mL de meio DMEM suplementado. As células foram incubadas a 37°C por uma semana, quando foi realizado um novo repique. O meio das células L6 foi trocado aproximadamente três vezes por semana, para evitar que houvesse a diferenciação destas células.

### 2.2. Culturas

#### 2.2.1. Cultura de epimastigotas de *T. cruzi*

Epimastigotas da cepa Y foram crescidos em meio LIT (item 1.4.1.1), de modo a que o volume ocupado pelas culturas fosse de aproximadamente 25 % da capacidade total do frasco. Os inóculos foram iniciados com aproximadamente  $2 \times 10^7$  células/mL e crescidos durante 48 a 72 h a 28°C.

#### 2.2.2. Cultura de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*

As formas tripomastigotas metacíclicos da linhagem Y foram obtidas segundo o método descrito por Goldenberg et al. (1987) apud Contreras et al. (1994). As culturas de epimastigotas da fase exponencial tardia ( $6 \times 10^7$  células/mL) mantidas em meio LIT a 28°C foram centrifugadas a 6000 g (Rotor R14A 29, Hitachi) por 10 min, lavadas em meio TAU (item 1.4.1.2), ressuspendidas neste mesmo meio em uma densidade populacional de  $5 \times 10^8$  células/mL e incubadas por 2 h a 28°C. Após este período, os parasitas foram inoculados em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> contendo 10 mL de meio TAU3AAG a uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células/mL e incubados a 28°C por 96 h. Após 4 dias de incubação da cepa Y no meio TAU3AAG, as culturas continham  $2 \times 10^7$  células/mL com aproximadamente 10 a 30 % de formas tripomastigotas metacíclicos. Os parasitas foram recolhidos, purificados em coluna de troca iônica, centrifugados em microcentrífuga a 3000 rpm por 10 min e congelados em soro fetal bovino contendo 10 % de DMSO a -80°C. Este

processo foi realizado até a obtenção do número total de parasitas necessários para iniciar a infecção das culturas de células HeLa e das células L6.

### **2.2.3. Cultura de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi***

Os tripomastigotas metacíclicos purificados foram utilizados para infectar tanto células HeLa quanto células L6. Esta infecção inicial foi de 24 a 48 h, sendo que ao término deste período as monocamadas foram lavadas duas vezes com PBS 1 X esterilizado e incubadas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino a 37°C. Após aproximadamente 7 dias de incubação, os primeiros tripomastigotas de cultura começavam a sair e estes eram recolhidos diariamente das monocamadas, centrifugados em microcentrífuga a 3000 rpm por 10 min e congelados em soro fetal bovino contendo 10 % de DMSO a -80°C. Este processo foi realizado até a obtenção do número total de parasitas necessários para a execução dos experimentos.

### **2.2.4. Cultivo de células HeLa e L6 para a infecção com *T. cruzi***

As monocamadas de células HeLa e L6 foram obtidas através do plaqueamento de  $4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em garrafas de 80 cm<sup>2</sup> (NUNC) contendo 10 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Após 48 h de incubação em estufa a 37°C foi obtido aproximadamente  $8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (ANDREWS; COLLI, 1982).

## **2.3. Purificação das culturas de tripomastigotas metacíclicos em coluna de troca iônica**

As culturas da cepa Y de *T. cruzi* contendo aproximadamente 30 a 60 % de tripomastigotas foram centrifugadas a 6000 g (Rotor R14A 29, Hitachi) por 10 min e ressuspensas em tampão PSG 1 X (item 1.5.1) (LANHAM, 1968; LANHAM; GODFREY, 1970; SOUZA, 1983). A suspensão de células foi aplicada em uma coluna de DE-52 celulose de troca iônica (Whatman), preparada como descrito no item 1.5.6, previamente equilibrada no mesmo tampão. As células foram concentradas por centrifugação em microcentrífuga a 3.000 rpm por 2 min, em seguida foram ressuspensas em meio para cultura de células e então inoculadas nas monocamadas de células HeLa e ou nas células L6 para efetuar o início da infecção.

## **2.4. Infecção com *T. cruzi***

### **2.4.1. Infecção com *T. cruzi* das monocamadas de células HeLa e de células L6**

#### **2.4.1.1. Em lamínulas**

As células HeLa foram crescidas em placas de 24 orifícios contendo lamínulas de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>. Após o período de incubação de 48 h, as células foram expostas à suspensão de parasitas (forma tripomastigota sanguíneo de *T. cruzi*) na proporção de 40 parasitas para cada célula hospedeira durante 1, 3, 6, 12 e 24 h ou somente 24 h em estufa a 37°C (ANDREWS; COLLI, 1982). Após cada período de tempo, os parasitas foram retirados com pipeta, descartados e as lamínulas foram lavadas 5 vezes com PBS 1 X esterilizado, a fim de eliminar os parasitas extracelulares. Nas células tratadas com IFN- $\gamma$ , adicionou 2 mL de meio DMEM suplementado em cada orifício e estas foram novamente incubadas a 37°C durante mais 24 h. Como controle, foram utilizadas lamínulas com uma monocamada de mesma densidade celular não exposta à suspensão de parasitas. Após cada período de tempo, as células foram então fixadas por 20 min com paraformaldeído 4 % em PBS 1 X e impermeabilizadas com 0,25 % Triton X-100 por 10 min. Após lavagem rápida em PBS, as lamínulas foram coradas com ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen). Pelo menos 200 células por lamínula foram examinadas a um aumento de 400 vezes usando

microscópio Leica e as imagens foram capturadas usando o programa de computador IM50 *Image Master*.

As células HeLa infectadas por 24 h foram fixadas em metanol durante 5 min e coradas durante 55 min com solução Giemsa (item 1.5.5). A seguir, estas lamínulas foram lavadas em água destilada, retiradas dos orifícios com uma pinça, secas à temperatura ambiente e montadas sobre lâminas. As lamínulas foram observadas ao microscópio óptico (Nikon) com aumento de 1.000 vezes.

#### **2.4.1.2. Em garrafas**

As células HeLa e células L6 foram cultivadas em garrafas de 80 cm<sup>2</sup>. Após o período de incubação de 48 h, as células foram expostas a uma suspensão de parasitas (formas tripomastigota metacíclicos ou sanguíneos de *T. cruzi*), na proporção de 40 parasitas para cada célula HeLa e 10 parasitas para cada célula L6 (8x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>). As células HeLa e as células L6 foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 h. Como controle, foi utilizado garrafas com uma monocamada de mesma densidade celular e mesmo meio, não expostas à suspensão de parasitas.

### **2.5. Adição de interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) nas culturas de células HeLa e células L6**

Para verificar o efeito do interferon- $\gamma$  (Boehringer) sobre a taxa de infecção por *T. cruzi*, as monocamadas de células HeLa e de células L6 cultivadas em lamínulas e/ou garrafas de 80 cm<sup>2</sup> (item 2.2.3) foram tratadas com 500 U de hrIFN- $\gamma$  (HeLa) ou mrIFN- $\gamma$  (L6) por mL de meio durante 48 h. Após 24h de tratamento, foi adicionado a suspensão de parasitas (formas tripomastigotas metacíclicos ou sanguíneos de *T. cruzi*), na proporção de 40 ou 10 parasitas para cada célula hospedeira (8x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>). Em seguida, as células HeLa e células L6 foram incubadas novamente em estufa a 37°C durante 24 h. O contrário também foi realizado, ou seja: primeiramente foi efetuada a infecção por períodos de tempos variáveis (1, 3, 6, 12 e 24 h) ou somente 24 h e após cada período de tempo efetuou-se o tratamento com IFN- $\gamma$  por 24 h. Como controles, foram utilizadas garrafas com uma monocamada de mesma densidade celular, mesmo meio, não expostas à suspensão de parasitas e sem a adição de interferon- $\gamma$ , como controle positivo utilizou-se uma monocamada somente com *T. cruzi* e como controle negativo uma monocamada com interferon- $\gamma$ .

### **2.6. Incorporação de metionina marcada com [<sup>35</sup>S] em culturas de células HeLa infectadas com *T. cruzi***

Foram adicionados, nas 3 h finais de infecção, 100  $\mu$ Ci de metionina marcada com [<sup>35</sup>S] por mL de meio às culturas de células HeLa infectadas com a forma tripomastigota metacíclicos ou sanguíneos de *T. cruzi* (item 2.4.1.2 e item 2.5) contendo meio RPMI deficiente em metionina (Sigma). Após o término do tempo de marcação (3 h) o meio contendo os parasitas foi descartado, as células lavadas cinco vezes em PBS 1 X (item 1.5.2) e lisadas com 1 % de Triton X-100 em PBS 1 X, contendo uma mistura de inibidores (1  $\mu$ g/mL Leupeptina, 1  $\mu$ g/mL Pepstatina, 1  $\mu$ g/mL Aprotinina, 50  $\mu$ g/mL TLCK, 50  $\mu$ g/mL TPCK, 1 mM PMSF). O lisado celular foi submetido a uma centrifugação em microcentrífuga a 10.000 rpm por 10 min, para remoção dos restos celulares. As garrafas controles, sem exposição de parasitas, sem a adição de interferon- $\gamma$  e sem a presença de ambos receberam este mesmo tratamento.

#### **2.6.1. Determinação da taxa de radioatividade incorporada**

Para a determinação da radioatividade incorporada, 1  $\mu$ l dos lisados totais de células infectadas e não infectadas foram aplicados em papéis de filtro Whatman n<sup>o</sup>1 de

aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e tratados como descrito a seguir. Primeiramente, os discos foram incubados em 10 mL de TCA a 10 %, por 10 min no gelo, transferidos para 5 mL de TCA a 5 % e fervidos por 5 min nesta solução. Após este período, os discos foram novamente submetidos à incubação no gelo por 5 min em 5 mL de TCA a 5 %, lavados em 10 mL de metanol a 100 % por 2 min e em 10 mL de acetona por 2 min. Os papéis foram secos à temperatura ambiente e transferidos para frascos de cintilação contendo 1 a 2 mL de solução cintiladora. A contagem foi realizada em cintilador Beckman LS 7000. Foi obtida, em média, uma taxa de incorporação de radioatividade de 0,2 a 0,6x10<sup>6</sup> cpm/μl de lisado. Como controle, a determinação da radioatividade total foi feita em 1 μl dos lisados totais de células infectadas e não infectadas, sem os tratamentos com TCA.

### **2.7. Imunoprecipitação (JACKSON et al., 1990)**

O lisado total foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo que após a quantificação utilizou-se 100 μg de proteína total para a imunoprecipitação. Seguiu-se o procedimento de Jackson et al. (1990), onde ao lisado celular foi adicionado 0,2 % de sarcosil e incubado por 5 min no gelo. Em seguida, foram adicionados 4 μl dos anticorpos monoclonais contra as subunidades p23K, p25K e p33K de humano e p27K, p29K, p31K de pato (GROSSI DE SÁ et al., 1988). O sistema foi incubado durante 4 h sob agitação branda à temperatura ambiente. Em seguida, 20 μl proteína G *sepharose* 4B (Zymed) foi adicionada ao sistema e procedeu-se à incubação por mais 1 h sob agitação branda à temperatura ambiente. Após este período, foi feita uma centrifugação em microcentrífuga a 3.000 rpm durante 3 min e o sedimento foi lavado cinco vezes com PBS 1 X (item 1.5.2) contendo 1 % de Triton X-100. Ao final da última centrifugação, o sedimento formado foi ressuspensionado em 30 μl de tampão de ressuspensão de amostra de géis bidimensionais (item 1.5.7.6).

## **2.8. Eletroforeses**

### **2.8.1. Eletroforese unidimensional em gel desnaturante (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970)**

Tanto as proteínas extraídas quanto os géis da primeira dimensão foram analisados em géis desnaturantes de poli(acrilamida) segundo Laemmli (1970). Para a confecção dos géis foram utilizadas as soluções do gel separador 13 % (1.5.7.3) e do gel concentrador 4 % (1.5.7.4). Após a polimerização, o gel foi transferido para a cuba apropriada preenchida com tampão de corrida 1 X (1.5.7.2). Às amostras de proteínas foi adicionado o tampão de amostra (1.5.7.1) e após a incubação das amostras a 100°C por 5 min, estas foram aplicadas no gel. As eletroforeses foram realizadas com uma amperagem constante de 25 mA à temperatura ambiente. Geralmente, esta corrente correspondia a voltagem inicial de 100 a 120 V e final de 280 a 300 V. Após a eletroforese, os géis foram incubados na solução fixadora (item 1.5.7.9) durante 30 min sob agitação branda à temperatura ambiente. Posteriormente, os géis foram incubados em solução amplificadora (*Amplify* - Amersham) por 30 min sob agitação branda à temperatura ambiente. Os géis foram secos em *Gel-Dryer* (BIO-RAD) durante 2 h a 80°C sob vácuo e expostos a filmes de Raios X à temperatura ambiente, com tempo de exposição por aproximadamente quatro dias, dependendo da intensidade do sinal radioativo.

### **2.8.2. Eletroforese bidimensional em gel de poli(acrilamida)**

#### **2.8.2.1. Eletrofocalização (Isotacoforese)**

Para a realização dos géis bidimensionais seguiu-se o procedimento de O'Farrell et al. (1977). As soluções foram preparadas e filtradas. Foram utilizados tubos de vidro de 15 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno previamente tratados como descrito a seguir:

incubados em solução sulfocrômica por 24 h, lavados abundantemente com água destilada, secos e mantidos em estufa a 180°C por 4 h. Uma das extremidades foi vedada com parafilme e os tubos foram preenchidos com a solução do gel polimerizador (item 1.5.7.5) até a altura de 11 cm. Para polimerização, os géis foram cobertos com 50 µl de solução uréica a 7 M. Após polimerização, a solução de uréia e o parafilme foram retirados dos tubos e estes foram montados numa cuba para tubos verticais (Buchler, Alemanha). A parte inferior da cuba foi preenchida com NaOH a 0,05 M e em seguida, o volume total das amostras imunoprecipitadas foram aplicados nos tubos evitando-se a formação de bolhas e sobre estas foram adicionados 50 µl de tampão de cobertura (item 1.5.7.7). O restante do tubo foi preenchido cuidadosamente com o tampão da cuba superior (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,03 M).

A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, com voltagem constante de 400 V por 5 h. O sentido da corrente foi realizado do polo positivo ligado a cuba superior para o polo negativo ligado a cuba inferior. O valor inicial da corrente foi dependente do número de tubos montados na cuba, variando de 5 a 8 mA, e o final foi sempre de 0,3 a 0,5 mA.

Após o término da eletroforese, os géis foram retirados do interior dos capilares, imersos em água destilada por 1 a 2 min e incubados em tampão de equilíbrio (item 1.5.7.8) por 30 min sob agitação à temperatura ambiente, sendo submetidos à segunda dimensão ou armazenados a -20°C.

Os géis da primeira dimensão (item 1.5.7.5) equilibrados foram aplicados individualmente sobre a superfície do gel concentrador e cobertos com agarose a 1 % em tampão de equilíbrio. A seguir a segunda dimensão foi procedida como descrito anteriormente (item 2.8.1).

Para a determinação do gradiente de pH, um tubo controle (sem amostra) foi aplicado somente os tampões de ressuspensão (item 1.5.7.6) e de cobertura (item 1.5.7.7). Após a eletroforese, estes géis foram imediatamente retirados dos tubos, cortados em fragmentos de 1 cm e imersos individualmente em tubos Eppendorf contendo 1 mL de água Milli Q. O sistema foi incubado durante 24 h à temperatura ambiente para difusão e posterior determinação da curva padrão de pH daquele ensaio.

#### **2.8.2.2. Análises dos Géis 2D**

As imagens das fluoroformas obtidas através dos géis bidimensionais foram capturadas usando *scanner* (SHARP JX-330) a uma resolução de 300 dpi e as análises das imagens digitalizadas foram realizadas usando o programa de computador *Image Master Platinum 5.0* (GE Healthcare).

#### **2.8.3. Eletroforese de agarose**

O gel de agarose na concentração desejada foi feito em tampão TBE (item 1.5.8.1) 0,5 X, sendo empregado o corante brometo de etídeo na concentração final de 0,22 µg/mL. As amostras a serem analisadas foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (item 1.5.8.2) para uma concentração final de 1 X. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5 X utilizando-se uma voltagem de aproximadamente 5 V/cm. A visualização dos ácidos nucléicos foi realizada por meio de transluminador de luz ultravioleta (UV).

#### **2.8.4. Eletroforese Desnaturante de agarose**

Os géis de agarose para análise das amostras de RNA foram realizados na concentração de 1 % em tampão MOPS (item 1.5.8.3) diluído para 1X e formaldeído 2 %. O volume das amostras foi ajustado para 5 µL e de tampão de amostra 25 µL (item 1.5.8.4) foram adicionados. Após incubação a 65°C por 15 min, 1 µL de uma solução de brometo de etídeo 1

mg/mL foi adicionado às amostras e estas aplicadas no gel. Após a corrida, 40 V constantes, o gel foi analisado em transluminador de UV.

## 2.9. Extração de RNA Total

As células foram crescidas como descrito anteriormente (itens 2.2.1 e 2.2.4). As culturas utilizadas apresentavam-se em fase exponencial de crescimento, com densidade de aproximadamente  $10^7$  células/mL de cultura. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas três vezes com PBS 1 X gelado (livre de RNase) e ressuspensas em TRIzol® (Invitrogen). Em seguida, a extração do RNA total foi realizada conforme especificações do fabricante: às amostras adicionou-se clorofórmio misturando-se vigorosamente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (10.000 g/ 15 min/ 4°C) e a fase aquosa resultante foi transferida para um tubo novo. Adicionou-se isopropanol e, após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a amostra foi novamente centrifugada (10.000 g/ 10 min/ 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70 % (7.000 g/ 5 min/ 4°C). Em seguida deixou-se o sedimento secando à temperatura ambiente e, posteriormente, o mesmo foi ressuspensado em 40 µL de água Milli Q. As amostras de RNA total obtidas, foram quantificadas por espectrofotometria (*GeneQuant* – Pharmacia) e analisadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante (item 2.8.4).

## 2.10. RT-PCR semi-quantitativa

A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total das células HeLa, L6 e *T. cruzi* (epimastigota) cultivadas de acordo com as condições especificadas nos itens 2.2.1 e 2.2.4. A essa quantidade de RNA total foi adicionado 0,5 µg de oligo (dT)15 iniciador (Promega), sendo a mistura incubada a 70°C/10 min, e imediatamente colocada no gelo. Em seguida, para um volume final de 25 µL, os seguintes reagentes foram adicionados (para as concentrações finais indicadas): tampão da transcriptase reversa 1 X; DTT 10 mM, dNTPs 2,5 mM e 32,6 U de RNAGuard (Pharmacia). Após incubação a 42°C por 2 min, 200 U da enzima transcriptase reversa Moloney Murine Leukemia (M-MLV - Promega) foram adicionadas para cada sistema, seguido de incubação a 42°C por 1 h. Finalmente, 40 ng de RNase A foi adicionado à reação e incubado a 37°C por 15 min. Para todos os sistemas, foi realizado controle da RT-PCR omitindo-se a enzima transcriptase reversa, para verificar uma possível contaminação por DNA genômico.

## 2.11. PCR

Primeiramente as condições de PCR a serem utilizadas foram otimizadas utilizando pares de oligonucleotídeos específicos e 100 ng de DNA genômico tanto de células HeLa e L6 quanto de *T. cruzi* foram usados como molde da reação. Além disso, para posterior análise quantitativa dos níveis de expressão dos genes em estudo, determinou-se o número de ciclos correspondentes à fase exponencial de amplificação e a concentração dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do gene *gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) usado como controle interno da PCR, assim foram feitas PCRs variando-se o número de ciclos (25, 27, 30 e 35 ciclos) e a concentração dos oligonucleotídeos do gene *gapdh* (0,08, 0,1, 0,15, 0,25 e 0,3 µM). Na tabela 1 consta a lista de oligonucleotídeos e seus produtos específicos de amplificação esperados.

Uma alíquota correspondente a 2 µL da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em um volume final de 30 µL contendo: tampão *Taq* DNA polimerase 1 X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTPs, 0,3 µM (genes proteossomais) e 0,1 µM (gene *gapdh*) de cada oligonucleotídeo (sendo utilizado na mesma reação um par de oligonucleotídeos específico para os genes de proteossoma e um par de oligonucleotídeo referente ao controle interno do gene da GAPDH), 1,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase pht

(Phoneutria). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, corados com 0,22 µg/mL de brometo de etídeo. As reações de PCR para amplificação dos genes de interesse foram realizadas em triplicata.

Os parâmetros de amplificação adotados foram:

- 1) Desnaturação inicial: 94°C/1 minuto.
- 2) Desnaturação: 94°C/30 segundos.
- 3) Anelamento: temperatura de cada par de oligonucleotídeo (tabela 1)/30 segundos.
- 4) Extensão: 72°C/40 segundos.
- 5) Repetição das etapas de 2 a 4 por 30 vezes.
- 6) Extensão final: 72° C/1 minuto.

### **2.12. Quantificação dos níveis de expressão gênica obtidos na PCR**

A análise dos resultados obtidos visando a quantificação dos níveis de expressão dos genes de interesse foi realizada por densitometria, utilizando-se o programa *Scion Image*, disponível no endereço da internet <http://www.scioncorp.com>. Os níveis de expressão do gene constitutivo *gapdh* permitiram a normalização dos resultados. A partir dos valores obtidos por densitometria, referentes a cada fragmento de DNA amplificado, foi determinada a razão entre o nível de expressão dos genes proteassomais em relação à expressão do gene controle (*gapdh*), para cada uma das condições empregadas. Compararam-se os valores das razões obtidas (gene de interesse / *gapdh*) a partir da condição experimental (tratamento com IFN-γ, ou infecção com *T. cruzi* ou ambos) com aquelas obtidas para a condição controle de cultivo.

### **2.13. Análise estatística dos resultados obtidos na PCR**

As análises foram realizadas com o auxílio do programa de computador *GraphPad QuickCalcs free Statistical Calculators* e do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 13.0. Os dados estão apresentados como médias +/- SEM (erro padrão da média). Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste t de *Student*, considerando a variância da amostra (Teste de Levene's). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

### **2.14. Western Blot (TOWBIN et al., 1979)**

#### **2.14.1. Obtenção do Lisado Total e Eletroforese**

As células foram crescidas como descrito anteriormente (itens 2.2.1 e 2.2.4), assim as culturas utilizadas apresentavam-se em fase exponencial de crescimento, com densidade de aproximadamente  $10^7$  células/mL de cultura. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas cinco vezes com PBS 1 X gelado e lisadas em 500 µL de tampão de lise (1 % de Triton X-100 em PBS 1 X, contendo uma mistura de inibidores - 1 µg/mL Leupeptina, 1 µg/mL Pepstatina, 1 µg/mL Aprotinina, 50 µg/mL TLCK, 50 µg/mL TPCK, 1 mM PMSF). O lisado celular foi submetido a uma centrifugação em microcentrífuga a 10.000 rpm por 10 min, para remoção dos restos celulares e em seguida o lisado total foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo que após a quantificação utilizou-se 30 µg de proteína total para a realização da eletroforese. Os volumes dos lisados correspondentes a 30 µg foram precipitados com 9 V de acetona gelada e incubados a -20°C durante a noite. Após este período, os lisados foram centrifugados em microcentrífuga a 12.000 rpm por 30 min a 4°C, secos a temperatura ambiente e ressuspensos em 20 µL de tampão de amostra 1 X (1.5.7.1). As garrafas controles, sem exposição de parasitas, sem a adição de interferon-γ e sem a presença de ambos receberam este mesmo tratamento. A eletroforese em gel desnaturante foi realizada como descrito no item 2.8.1.

#### **2.14.2. Transferência para membrana**

A técnica de transferência semi-seca foi realizada utilizando o sistema *Semi – Dry Transfer Cell* (BIO-RAD), com membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra membrane 0,45 µm - Amersham). Neste sistema foi colocada uma pilha de seis papéis de filtro, previamente saturados com tampão de transferência (item 1.5.7.10) sobre o eletrodo catiônico. Sobre esta primeira pilha de papéis de filtro, foi colocada a membrana também previamente imersa em tampão de transferência; sobre esta, foi colocado o gel, e sobre este, mais 6 papéis de filtro, também saturados em tampão de transferência. O eletrodo aniônico foi então colocado sobre a pilha de papéis e a transferência foi então realizada com uma amperagem constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de membrana por aproximadamente 1 h.

#### **2.14.3. Incubação com os anticorpos**

Imediatamente após a transferência, a membrana foi saturada com uma solução de leite desnatado (p/v) a 5 % (Nestlé) em PBS 1 X (item 1.5.2) a 4°C durante a noite sob agitação branda. Após três lavagens em PBS 1 X por 5 min sob agitação branda, a membrana foi seca rapidamente em papel de filtro, cortada em 8 tiras de 1 cm e, em seguida, cada tira foi incubada em PBS 1 X contendo leite desnatado (p/v) a 1 % e o primeiro anticorpo contra proteossomas de pato p23K, p25K ou p33K, de homem p27K, p29K ou p31K, ou anti proteossoma de *T. cruzi*. A diluição de uso destes anticorpos foi de 1:1000. Foi também realizada a incubação de uma das tiras de membrana com uma mistura dos anticorpos monoclonais. Para as subunidades induzidas por IFN-γ foram utilizados os anticorpos policlonais produzidos em coelho contra as subunidades β1i, β2i e β5i a uma diluição de 1:1000.

As membranas de nitrocelulose foram incubadas por no mínimo 4 h sob agitação branda à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes em tampão APB (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl) (15 min para cada lavagem) sob agitação branda e posteriormente incubadas com o segundo anticorpo (IgG de camundongo conjugados a peroxidase e/ou fosfatase alcalina e IgG de coelho acoplado fosfatase alcalina), na diluição de 1:3.000 em tampão PBS 1 X contendo leite desnatado (p/v) a 1 %. A incubação foi procedida durante 2 h sob agitação branda à temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas três vezes em tampão APB (15 min para cada lavagem) antes de ser submetida à revelação conforme descrito a seguir.

#### **2.14.4. Revelação**

Em câmara escura, foi preparado o volume das soluções A e B do sistema ECL (Amersham) suficientes para cobrir as membranas que usaram como segundo anticorpo a peroxidase, posicionadas sobre um filme transparente de PVC (Magipack). Após 1 min, as membranas foram secas rapidamente em papel de filtro Whatman nº1, recobertas com o filme de PVC, e colocadas em cassete contendo um filme de Raios-X sendo que a exposição teve tempos variáveis, começando por 1 min. Após este período, os filmes foram revelados de acordo com as especificações do fabricante.

Para as membranas que utilizaram anticorpos conjugados a fosfatase alcalina utilizou-se para revelação os reagentes BCIP/NBT *Color Development Solution* (BIO-RAD), de acordo com as especificações do fabricante.

#### **2.15. Ensaio de atividade proteolítica**

A atividade enzimática do proteossoma foi realizada usando substratos fluorogênicos adquiridos da Affiniti (Exeter, UK). Número igual de células HeLa (6x10<sup>6</sup> células) controle e infectadas com *T. cruzi* foram coletadas e lisadas em tampão TeNM2 com 0,5% de NP-40. O lisado celular (500 µL) foi imunoprecipitado com 1 µL de anticorpo anti proteossoma 20S e a

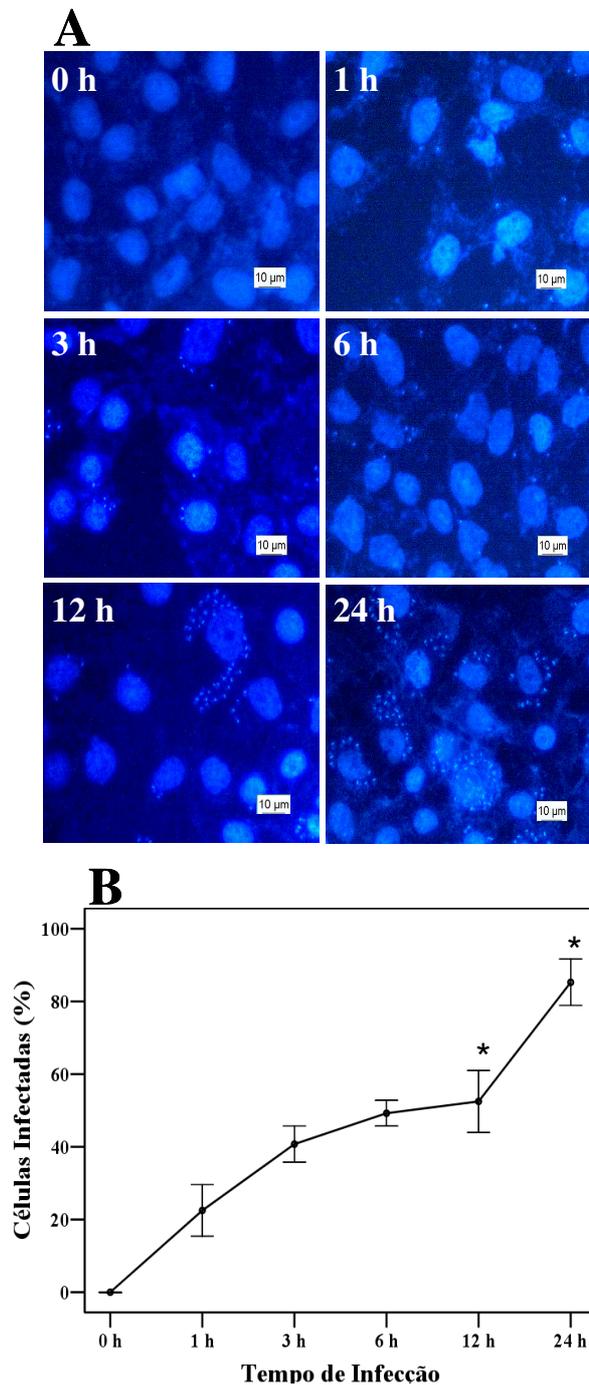
proteína-G-sepharose ressuspensa diretamente no tampão de ensaio de acordo com as instruções do fabricante (BioMol): os imunoprecipitados obtidos foram ressuspensos em tampão de ensaio (AB – 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Os proteassomas obtidos foram testados para as atividades peptidásicas usando três substratos fluorogênicos diferentes: Z-Leu-Leu-Glu-βNA, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC e Boc-Leu-Arg-Arg-AMC (Affiniti) que correspondem às atividades do tipo peptidil-glutamil-hidrolase, tipo quimotripsina e tipo tripsina, respectivamente. Os peptídeos foram preparados em DMSO (soluções estoque de 5 mg/mL) e diluídos em tampão AB a uma concentração final de 62,5 µg/mL. Os ensaios foram realizados a 37°C por 30 min em placas de 96 orifícios, após este período de tempo a reação foi parada adicionando 100 µL de solução de parada (100 mM de cloacetato de sódio). As amostras controle (sem a adição de imunoprecipitado) foram realizadas concomitantemente com as amostras experimentais e três ou seis replicatas. A fluorescência foi determinada com espectrofluorômetro (Spectra Max M2 – Molecular Devices). Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste t de *Student*, considerando a variância da amostra (Teste de Levene's). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

## **RESULTADOS**

### **1. Perfil de Proteassomas em células HeLa e L6 infectadas com *Trypanosoma cruzi***

#### **1.1. Infecção de células HeLa e L6 com *T. cruzi***

Com o objetivo de verificar a eficiência de infecção do *T. cruzi* nas células HeLa e L6 procedeu-se a infecção destas células crescidas previamente em lamínulas (item 2.4.1.1). Utilizamos em todos os experimentos a cepa Y de *T. cruzi*, cujos tripomastigotas foram obtidos por meio de infecção em cultura de células HeLa e/ou L6 como descrito no item 2.2.3 da metodologia. Após aproximadamente sete dias de infecção, verificamos que mais de 90 % das células HeLa apresentaram células repletas de amastigotas, sendo que menos de 10 % destas células estavam no processo de lise celular. Entretanto, nas células L6 foi observado que praticamente todas as células já iniciavam o processo de lise celular após este período de tempo (resultados não mostrados). Estes dados confirmam que células L6 são mais susceptíveis à infecção do *T. cruzi* do que as células HeLa. Em todos os experimentos a seguir, utilizamos estes parâmetros para a produção de tripomastigotas em cultura de células. Em seguida, as células HeLa foram expostas às formas tripomastigotas a uma relação de 40 parasitas/célula hospedeira por diferentes tempos (1, 3, 6, 12, e 24 h) e marcadas com DAPI para detectar os parasitas intracelulares e obter a porcentagem de células infectadas em cada período de tempo (Figura 5A). A exposição das células HeLa aos tripomastigotas por 1 h causou aproximadamente 20 % de infecção e o número de células infectadas após a exposição aos parasitas foi, como esperado, proporcional a duração do período de exposição aos parasitas. Aproximadamente 85 % das células HeLa foram infectadas após 24 h de exposição às formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Figura 5B).



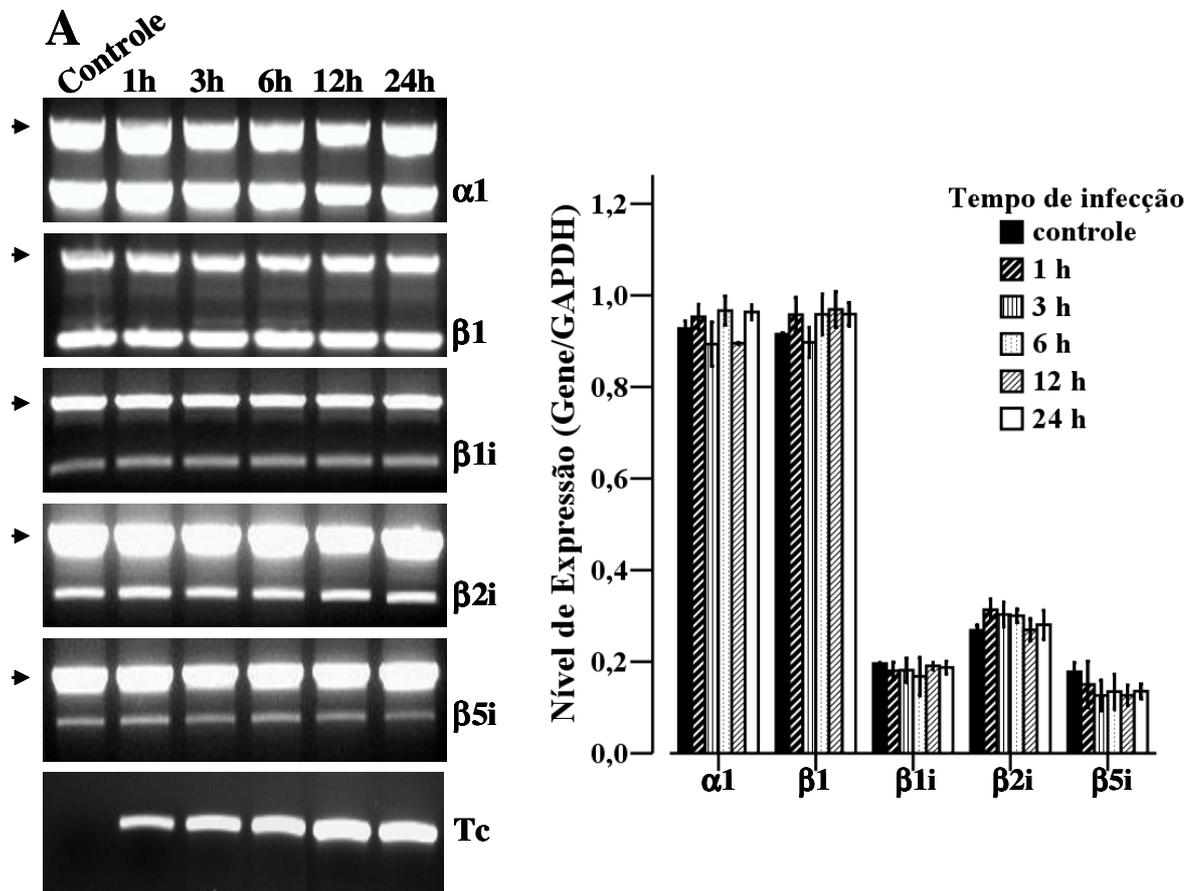
**Figura 5. Infecção de células HeLa com *T. cruzi* coradas com DAPI.** Monocamadas de células HeLa foram crescidas em meio DMEM por 48 h a 37°C e posteriormente expostas a uma suspensão de tripomastigotas a uma taxa de parasitas-célula hospedeira de 40:1 por períodos de tempo variáveis (1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h). Após a infecção, as células foram lavadas cinco vezes com PBS antes de serem fixadas e então coradas com DAPI. A porcentagem de células que foram infectadas com *T. cruzi* é indicada no gráfico **B**. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada período de tempo. Os valores indicam a média de dois experimentos e as barras representam o erro padrão da média da duplicata (\* $p < 0,05$ ).

## **1.2. Análise comparativa dos níveis de mRNAs proteassomais de células HeLa infectadas com *T. cruzi***

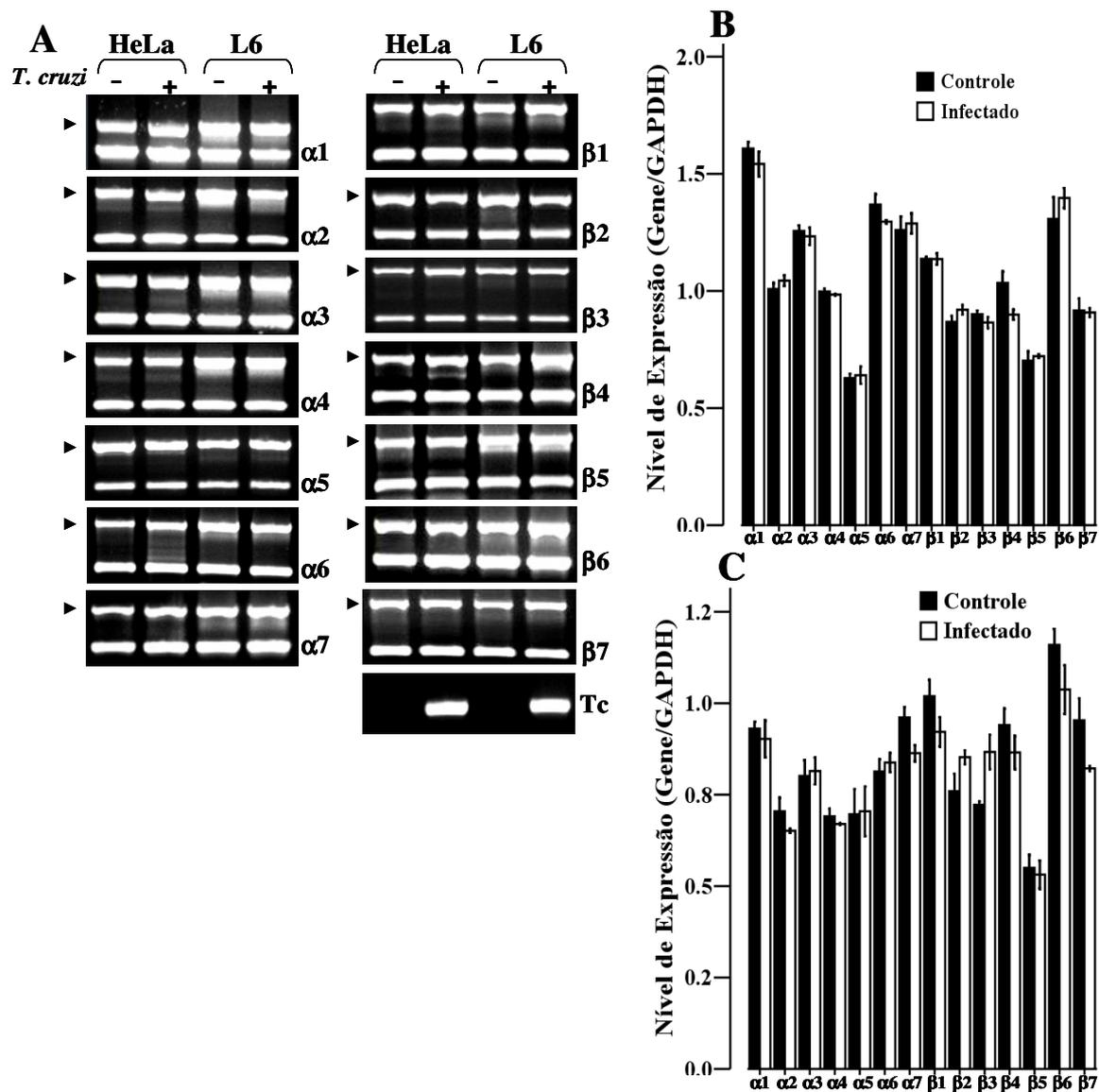
Em seguida, nós investigamos se a infecção com *T. cruzi*, afeta os níveis de mRNA proteassomais de células HeLa. RNA total de células controle e infectadas por 1, 3, 6, 12 e 24 h foram utilizados em experimentos de RT-PCR. Os resultados mostrados na Figura 6 ilustram a expressão dos mRNAs das subunidades proteassomais constitutivas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e das induzidas  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  nos diferentes tempos de infecção pelo *T. cruzi*. As figuras 6A e 6B mostram que não houve variação na quantidade de amplificação dos fragmentos obtidos nos diferentes tempos de infecção pelo *T. cruzi* em nenhuma das subunidades testadas. Assim, a expressão dos mRNAs das subunidades constitutivas do proteassoma  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  e as subunidades induzidas por IFN- $\gamma$   $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  não foi afetada pela infecção com *T. cruzi*. As subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  são descritas como serem induzidas pelo IFN- $\gamma$ , entretanto, os mRNAs correspondentes foram detectados a uma quantidade cinco vezes menor quando comparados com os das subunidades constitutivas  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , sugerindo portanto, que estas subunidades induzidas apresentam uma expressão basal em células HeLa e as quais não foram afetadas com a infecção (Figuras 6A e 6B).

## **1.3. Análise comparativa dos níveis de mRNAs proteassomais constitutivos de células HeLa e células L6 infectadas com *T. cruzi***

*T. cruzi* é capaz de invadir e multiplicar em diferentes tipos celulares e espécies, mas apresenta um tropismo por miócitos. Portanto, os níveis de infecção *in vitro* nas células derivadas de músculo (como a célula L6) é mais que o dobro em relação a outros tipos celulares testados (HALL et al., 2000). Tendo em vista estes resultados e para uma melhor comparação da expressão dos genes proteassomais, nós utilizamos também as células L6 em nossos experimentos. Nós analisamos os níveis de expressão dos mRNAs de todas as subunidades proteassomais constitutivas em células HeLa e L6 infectadas com *T. cruzi*. Como mostrado nas Figuras 7A, B e C, nós não observamos alteração nos níveis de mRNA destas subunidades quando ambas células foram infectadas pelo *T. cruzi*, sugerindo que este parasita não afeta a transcrição destes genes em células HeLa e L6, após 24 h de infecção.



**Figura 6. Análise comparativa da expressão dos genes  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , de células HeLa controle e infectadas por diferentes tempos com *T. cruzi*. RNA total foi extraído das células HeLa infectadas com *T. cruzi* (a uma taxa de parasitas-célula hospedeira de 40:1) a 37°C por 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Uma alíquota de 2  $\mu$ L da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento dos genes de interesse e do gene constitutivo *gapdh* empregado como controle interno da reação. Um terço da reação de PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados das subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  do proteassoma e o produto específico de amplificação por PCR do gene *gapdh* de *T. cruzi* (Tc) usado como controle da infecção são mostrados no painel A. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos referidos genes foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Scion Image*. O gráfico B mostra a média das razões entre o nível de expressão dos genes de interesse de células HeLa e o controle interno *gapdh*. Um experimento representativo de dois é mostrado; as barras representam o erro padrão da média da duplicata. Cabeça de seta: produto de amplificação do gene *gapdh* humano. Tc: produto de amplificação do gene de *gapdh* de *T. cruzi*.**



**Figura 7.** Análise comparativa dos níveis de mRNA das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do proteassoma de células HeLa e L6 infectadas com *T. cruzi*. RNA total foi extraído das células HeLa e L6 infectadas com *T. cruzi* (com uma relação de parasitas-célula hospedeira de 40:1 e 10:1, respectivamente) a 37°C por 24 h. Uma alíquota de 2  $\mu$ L da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento dos genes de interesse e do gene constitutivo *gapdh* empregado como controle interno da reação. Um terço da reação de PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados de todas as subunidades constitutivas do proteassoma e o produto específico de amplificação por PCR do gene *gapdh* de *T. cruzi* (Tc) usado como controle da infecção são mostrados no painel A. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos referidos genes foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Scion Image*. Os gráficos B e C mostram, respectivamente, a média das razões entre o nível de expressão dos genes de interesse de células HeLa e L6 e o controle interno *gapdh*. Um experimento representativo de três é mostrado; as barras representam o erro padrão da média da triplicata. Cabeça de seta: produto de amplificação do gene *gapdh* humano e de rato. Tc: produto de amplificação do gene de *gapdh* de *T. cruzi*.

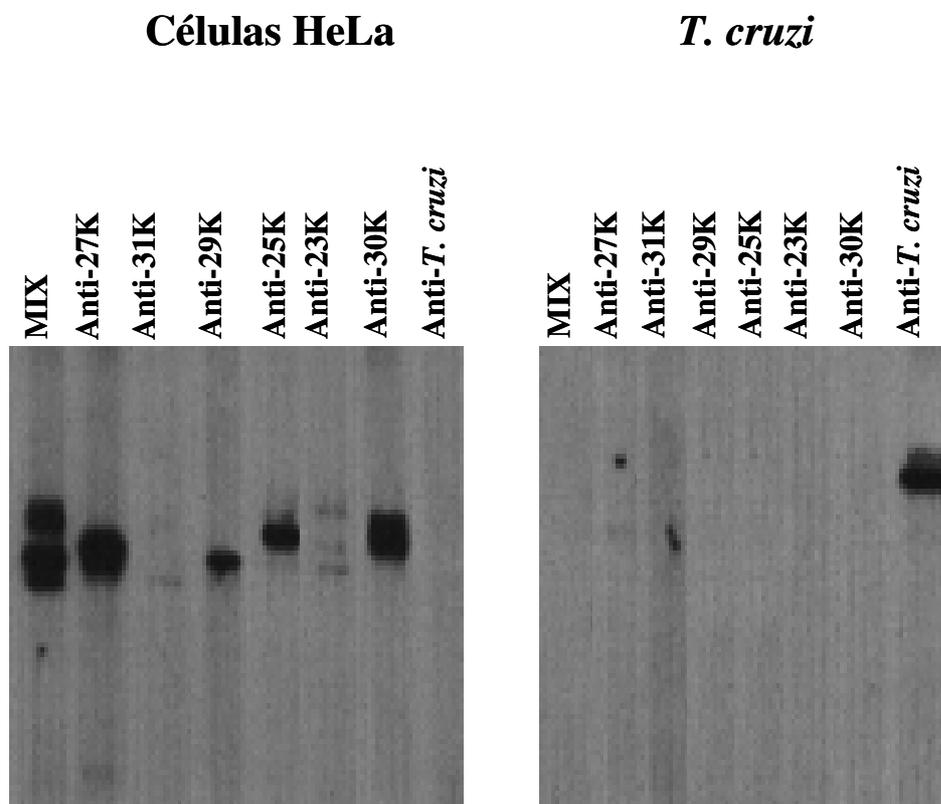
#### **1.4. Infecção com *T. cruzi* não altera a composição das subunidades proteassomais em células HeLa**

Para verificar se existe alguma mudança na expressão das subunidades protéicas proteassomais, nós analisamos também se a infecção pelo *T. cruzi* pode modular a composição das subunidades proteassomais. Como dois proteassomas co-existem dentro de uma célula infectada - proteassomas do parasita e do hospedeiro - nós testamos a especificidade dos anticorpos monoclonais anti-proteassomas humanos e sua capacidade de apresentar reação cruzada com os proteassomas de *T. cruzi*. Os resultados mostrados na Figura 8 indicam que os anticorpos humanos não reconhecem o proteassoma de *T. cruzi* e que reconhecem especificamente seus epítomos humanos correspondentes.

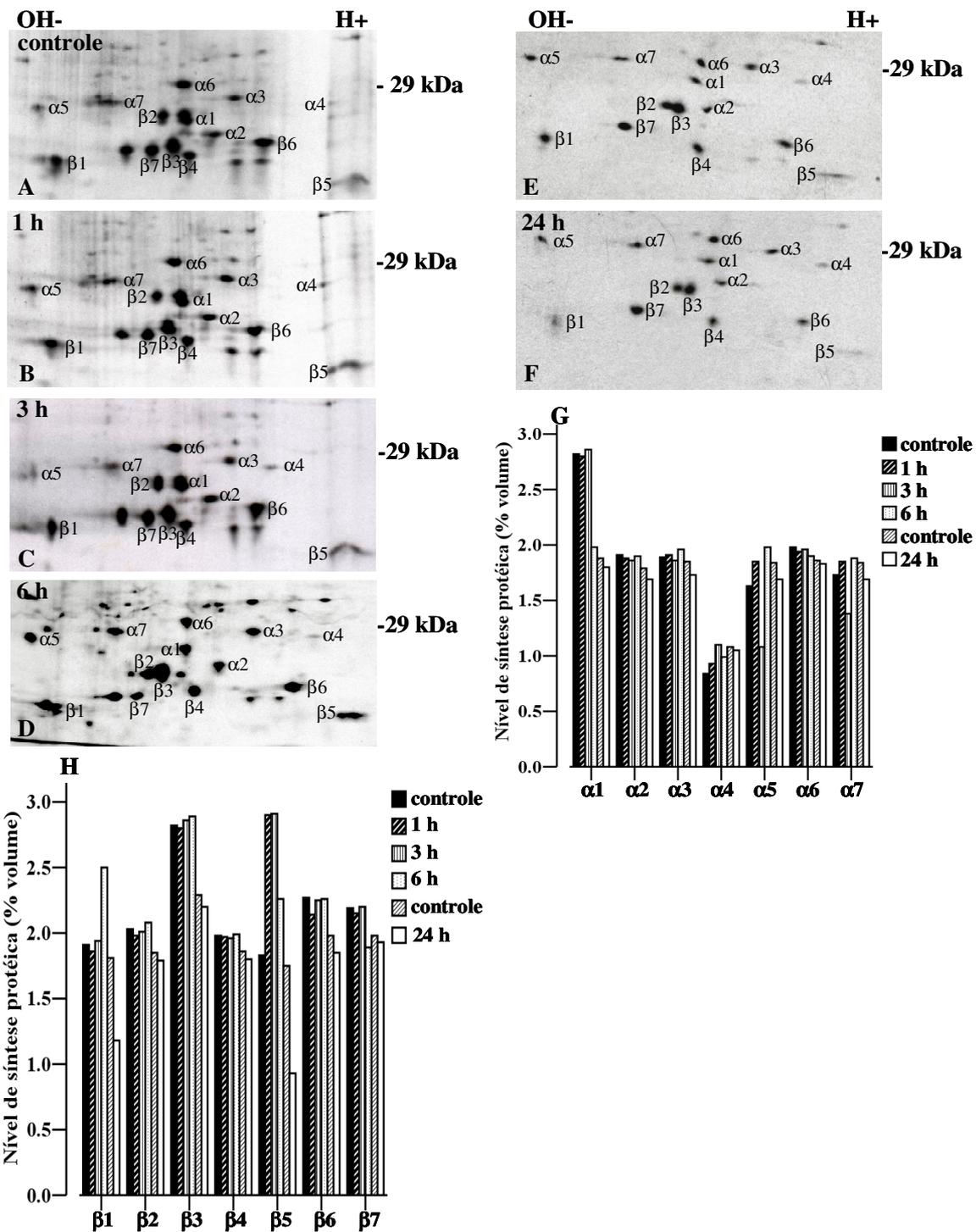
Imunoprecipitações utilizando a mistura de anticorpos (material e métodos item 1.2), de proteassomas de células HeLa controles e infectadas marcados com metionina [<sup>35</sup>S] foram realizadas e analisadas por meio de géis bidimensionais. Autorradiogramas típicos são mostrados na Figura 9. A identificação dos *spots* foi realizada usando um mapa referência de eletroforese bidimensional do proteassoma 20S humano, purificado de eritrócito e descrito por Claverol et al. (2002). O padrão de subunidades proteassomais obtido após a infecção (Figuras 9B, C, D e F) das células HeLa foi praticamente idêntico ao padrão proteassomal observado nas células controles não infectadas (Figuras 9A e E), sugerindo que não houve modificação no perfil protéico das subunidades do proteassoma, sendo observado que somente as subunidades  $\beta 1$  e  $\beta 5$  apresentaram nível reduzido quando as células HeLa foram infectadas com *T. cruzi* por 24 h (Figura 9F).

#### **1.5. Efeito da infecção com *T. cruzi* na atividade proteolítica do proteassoma 20S**

Para verificarmos se ocorrem mudanças nas atividades proteolíticas do proteassoma em células infectadas com *T. cruzi*, nós utilizamos ensaios enzimáticos para a determinação da atividade do proteassoma 20S de células controle e infectadas. O proteassoma 20S apresenta três atividades peptidásicas distintas que são capazes de clivar peptídeos após resíduos hidrofóbicos, básicos e ácidos. Estas atividades são chamadas de tipo quimotripsina, tipo tripsina e tipo peptidil-glutamil-hidrolase, as quais podem ser analisadas utilizando os substratos fluorogênicos Suc-LLVY-AMC, Boc-LRR-AMC e LLE- $\beta$ NA, respectivamente.



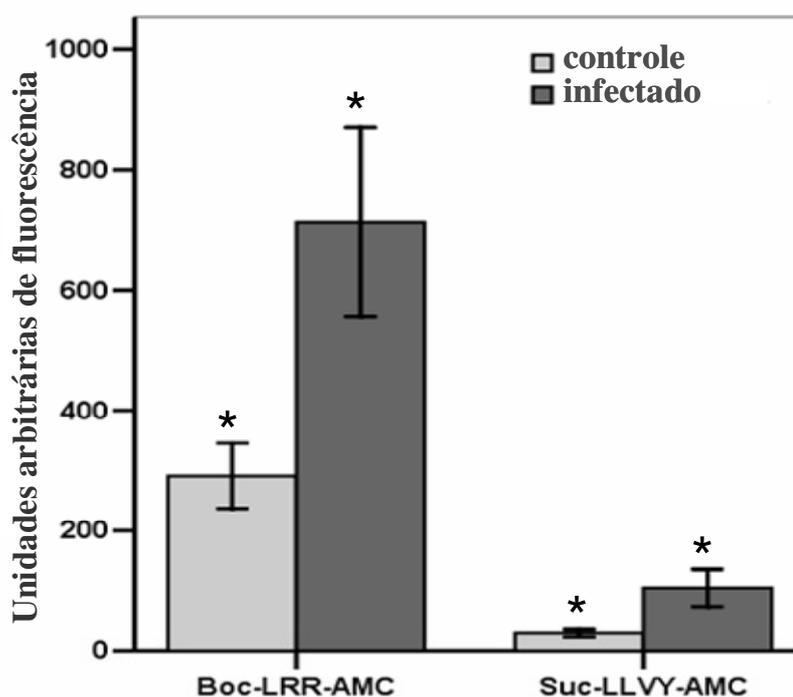
**Figura 8. Anticorpos monoclonais anti-proteassomas humanos não reconhecem proteassomas de *T. cruzi*.** Proteassomas semi-purificados de *T. cruzi* e de células HeLa foram separados por SDS-PAGE 13 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. As reações de *Western blots* foram realizadas com os seis anticorpos monoclonais anti-proteassomas humano (denominados no topo da figura) e um soro policlonal anti-proteassomas de *T. cruzi* (anti-*T. cruzi*). Mix significa a mistura dos anticorpos monoclonais (material e métodos item 1.2). Painel da esquerda proteassomas humanos e da direita proteassomas de *T. cruzi*.



**Figura 9. Eletroforese bidimensional de proteassomas de células HeLa marcados e analisados por fluorografia.** Proteassomas 20S de células HeLa não infectadas (A e E) ou infectadas com *T. cruzi* por 1 h (B), 3 h (C), 6 h (D) e 24 h (F) foram marcados metabolicamente com [<sup>35</sup>S] metionina por 3 h. Os lisados (100 µg) foram imunoprecipitados com anticorpos anti-proteassomas humanos e analisados por géis bidimensionais usando pH de 3,5 – 10 na primeira dimensão seguido por gel SDS-PAGE 13 % na segunda dimensão. A identificação das proteínas foi realizada usando um mapa bidimensional referência do proteassoma 20S. Os resultados referentes aos níveis protéicos das subunidades  $\alpha$  (gráfico G) e  $\beta$  (gráfico H) do complexo proteassoma foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Image Master* (Amersham – GE Healthcare).

A atividade peptidil-glutamil-hidrolase do complexo proteassoma imunoprecipitado das células controle e infectadas com *T. cruzi* utilizando o substrato LLE- $\beta$ NA não foi detectado (resultados não mostrados). Uma vez que utilizamos ensaios padrão, provavelmente esta atividade foi de alguma forma abolida nas amostras imunoprecipitadas.

A atividade do tipo tripsina determinada pela hidrólise do substrato Boc-LRR-AMC e a atividade do tipo quimotripsina pelo substrato Suc-LLVY-AMC foram 2,5 e 3,6 vezes, respectivamente, mais alta nas células infectadas com *T. cruzi* do que as células controle (sem infecção) (Figura 10). Estes resultados sugerem alterações significativas pelo menos nas atividades proteolíticas do tipo quimotripsina e tripsina do proteassoma 20S em células infectadas com *T. cruzi*.

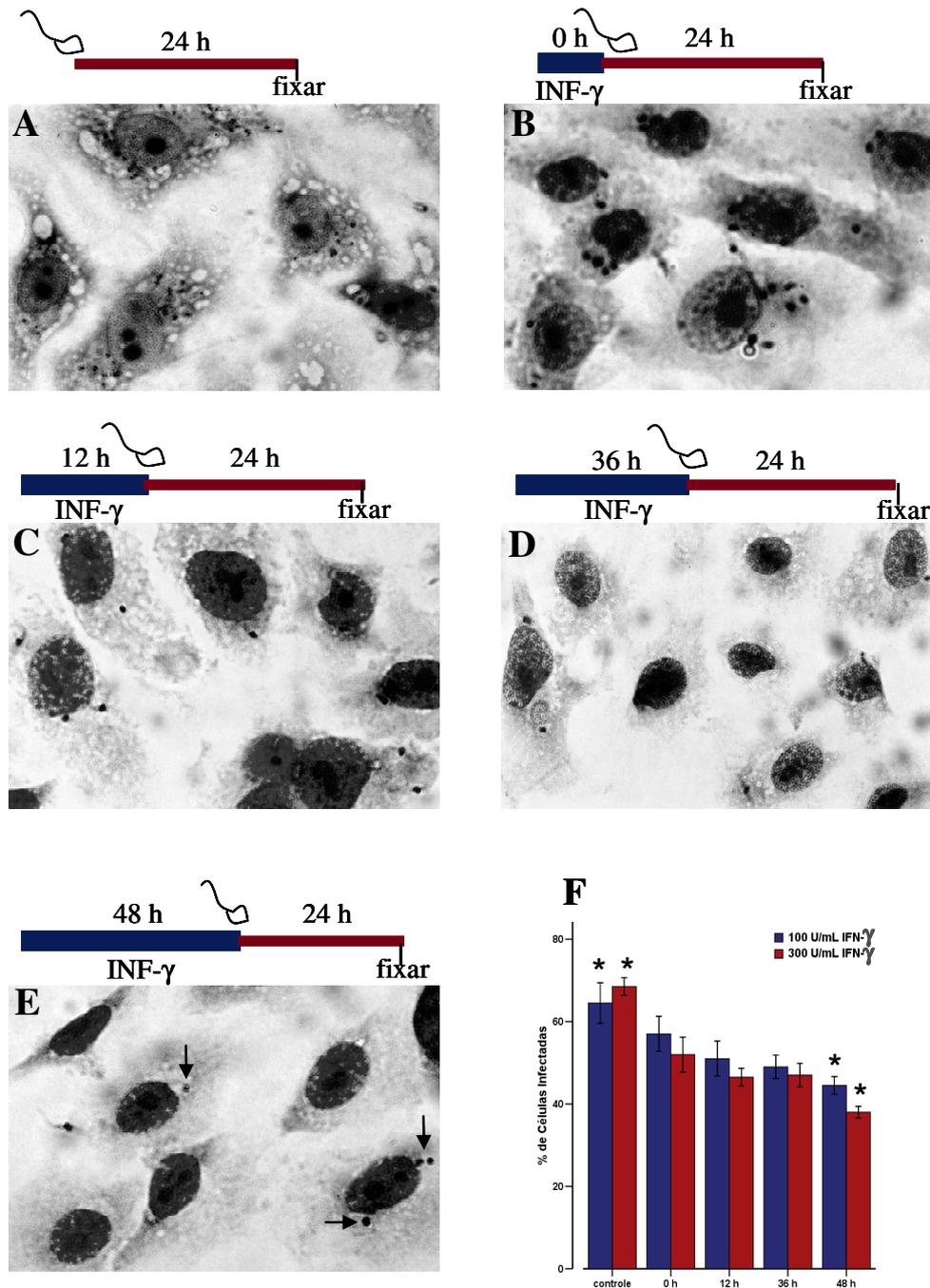


**Figura 10. Efeito da infecção com *T. cruzi* na atividade proteolítica do proteassoma 20S.** A hidrólise dos peptídeos fluorogênicos Boc-LRR-AMC e Suc-LLVY-AMC mediu as atividades do tipo quimotripsina e tripsina, respectivamente. A atividade proteolítica de proteassomas 20S imunoprecipitados de células HeLa controle e infectadas com *T. cruzi* foi realizada usando os substratos fluorogênicos a uma concentração final de 62,5  $\mu$ g/mL. Os valores indicam a média de seis experimentos e as barras representam o erro padrão da média (\* $p < 0,05$ ).

## **2. Perfil de imunoproteassomas de células HeLa e L6 tratadas com IFN- $\gamma$ e infectadas com *T. cruzi***

### **2.1. O tratamento com IFN- $\gamma$ reduz a taxa de infecção com *T. cruzi* em células HeLa**

O IFN- $\gamma$  é uma citocina que desempenha um papel essencial tanto na regulação da replicação de parasitas como na resposta imune em animais infectados. Uma vez que o IFN- $\gamma$  tem ação pleiotrópica *in vivo*, torna-se difícil identificar os circuitos regulatórios envolvidos diretamente neste processo. Com o objetivo de verificar a influência do IFN- $\gamma$  na infecção por *T. cruzi*, nós tratamos células HeLa com 100 ou 300 U/mL de IFN- $\gamma$  nos intervalos de 0 h, 12 h, 36 h e 48 h. Posteriormente, essas células tratadas com a citocina foram infectadas com *T. cruzi* durante 24 h. As células HeLa tratadas com 100 e 300 U/mL de IFN- $\gamma$  durante 48 h apresentaram uma redução de aproximadamente 45 % no número de células infectadas por *T. cruzi* em relação às células controle (sem o tratamento com IFN- $\gamma$ ; Figura 11A) (Figuras 11E e 11F). Além disso, observamos uma quantidade menor de parasitas intracelulares podendo-se visualizar tripomastigotas associados às células hospedeiras e poucas amastigotas intracelulares (Figura 11E, setas). Porém, este efeito observado não se pode dizer que é dose dependente, pois as análises estatísticas revelaram que não houve redução significativa no número de células infectadas quando comparamos os tratamentos com diferentes concentrações de IFN- $\gamma$  entre si (Figura 11F).



**Figura 11. Redução da infecção com *T. cruzi* mediante o tratamento com IFN- $\gamma$ .** Monocamadas de células HeLa não tratadas (A) e tratadas com 100 ou 300 U/mL de IFN- $\gamma$  durante os intervalos de tempo de (B) 0 h, (C) 12 h, (D) 36 h e (E) 48 h. Posteriormente, as células foram expostas por 24 h a tripomastigotas da linhagem Y, com uma taxa de 40 parasitas/célula. Após os intervalos de tempo, as lamínulas contendo as células foram lavadas cinco vezes com PBS, fixadas e coradas com Giemsa. A porcentagem de células que foram infectadas com *T. cruzi* é indicada no gráfico F. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada período de tempo. Os valores indicam a média de dois experimentos e as barras representam o erro padrão da média da duplicata (\* $p < 0,05$ ). As setas indicam as formas amastigotas (intracelulares). Aumento de 1000X.

## **2.2. Tratamento com IFN- $\gamma$ e infecção posterior com *T. cruzi* não altera o nível de mRNA e a composição de subunidades proteassomais**

### **2.2.1. Análise comparativa dos níveis de mRNAs proteassomais de células L6**

Para verificarmos os níveis de mRNA proteassomal das células L6 em diferentes condições de cultivo, nós utilizamos células controles (sem infecção e sem tratamento), células tratadas com IFN- $\gamma$  por 48 h, células infectadas com *T. cruzi* por 24 h e células tratadas com IFN- $\gamma$  por 24 h e posteriormente infectadas com *T. cruzi* por 24 h. Após o cultivo das células nas condições descritas acima, procedemos à amplificação dos transcritos dos genes proteassomais a partir de RNA total purificado utilizado em experimentos de RT-PCR.

Quando comparamos o perfil de expressão dos genes proteassomais em células L6 controle com a expressão dos mesmos genes em células L6 infectadas com *T. cruzi* (Figura 12) notamos que não houve uma alteração significativa na expressão dos genes proteassomais testados. Os genes induzidos pelo IFN- $\gamma$  praticamente não apresentaram níveis de expressão basais nas células controle, sendo que, nas células tratadas, esses genes apresentaram um aumento na expressão de aproximadamente duas vezes para o gene  $\beta$ 1i e oito vezes para  $\beta$ 2i e  $\beta$ 5i (Figuras 12A e C). Nas células tratadas com IFN- $\gamma$  e infectadas com *T. cruzi*, observamos que os genes das subunidades  $\beta$  induzíveis e das subunidades constitutivas  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 5 apresentaram os níveis de expressão equivalentes a aqueles apresentados quando estas células foram somente tratadas com a citocina (Figuras 12A, B e C). Portanto, nenhuma alteração significativa foi observada na expressão dos genes proteassomais das células L6 tratadas, infectadas ou tratadas e infectadas.

### **2.2.2. A composição das subunidades de proteassoma é modulada mediante o tratamento com IFN- $\gamma$**

A mistura de anticorpos foi utilizada para imunoprecipitar proteassomas de células HeLa que foram marcados com [<sup>35</sup>S] metionina nas células induzidas, infectadas e induzidas/infectadas. Cada amostra obtida foi analisada em géis bidimensionais e o perfil protéico resultante foi bastante similar ao descrito na literatura (NANDI et al., 1996; AKI et al., 1994; CLAVEROL et al., 2002), além do perfil teórico (Figura 12E). Nestes experimentos a mesma quantidade de proteínas totais (100  $\mu$ g) foi usada na imunoprecipitação e os géis da primeira dimensão foram todos realizados concomitantemente. Desta forma, nossos resultados

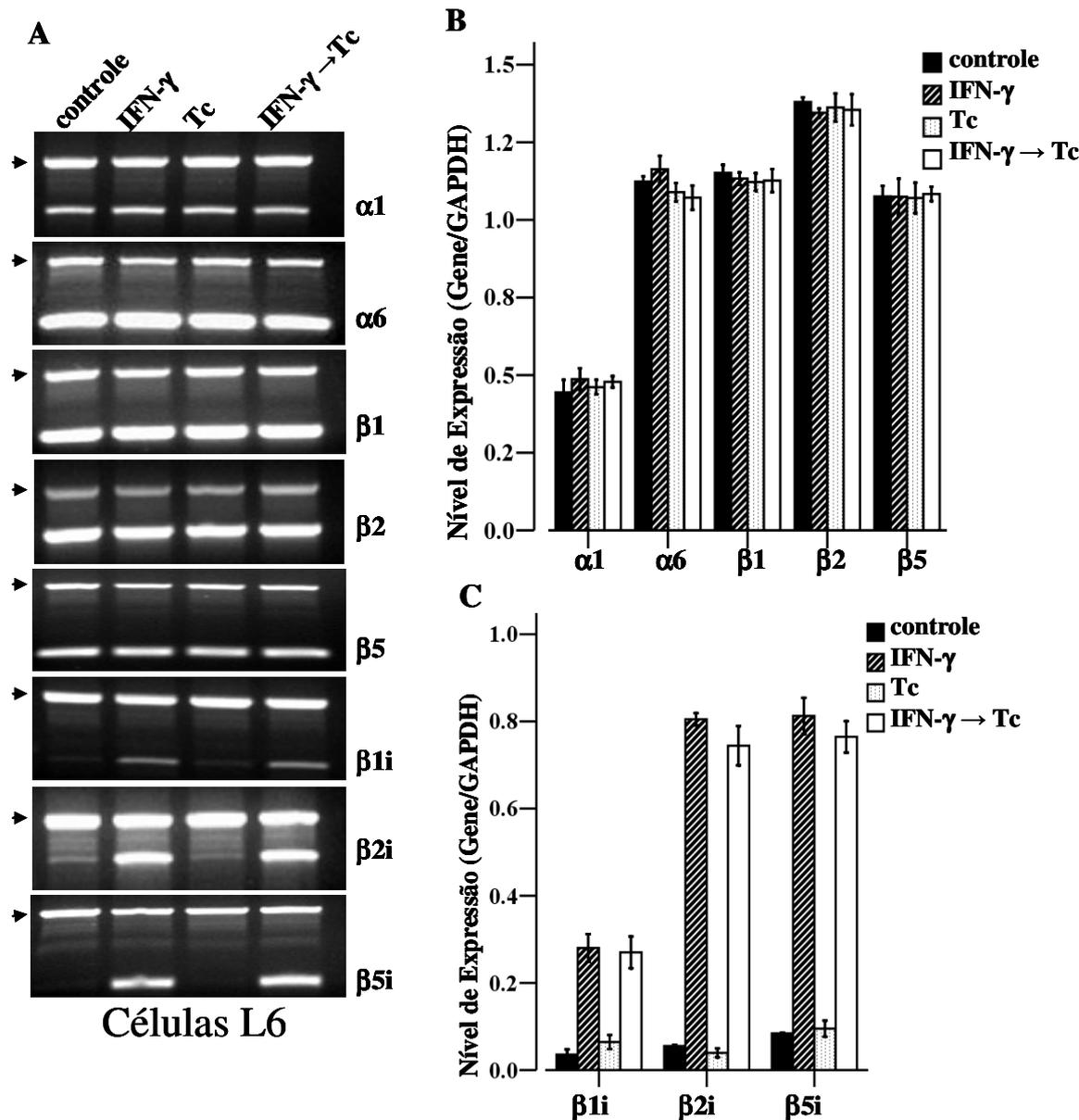
mostrados na Figura 13 nos permitiram identificar as subunidades do proteossoma 20S, principalmente aquelas subunidades moduladas pela ação do IFN- $\gamma$  (Figuras 13A, B, C e D).

Ao comparamos o perfil das subunidades imunoprecipitadas do controle - apenas células HeLa - (Figura 13A) com o perfil de proteassomas de células infectadas com *T. cruzi* (Figura 13C), verificamos que a infecção não provoca modificação significativa das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do proteossoma 20S (Figuras 13A e B).

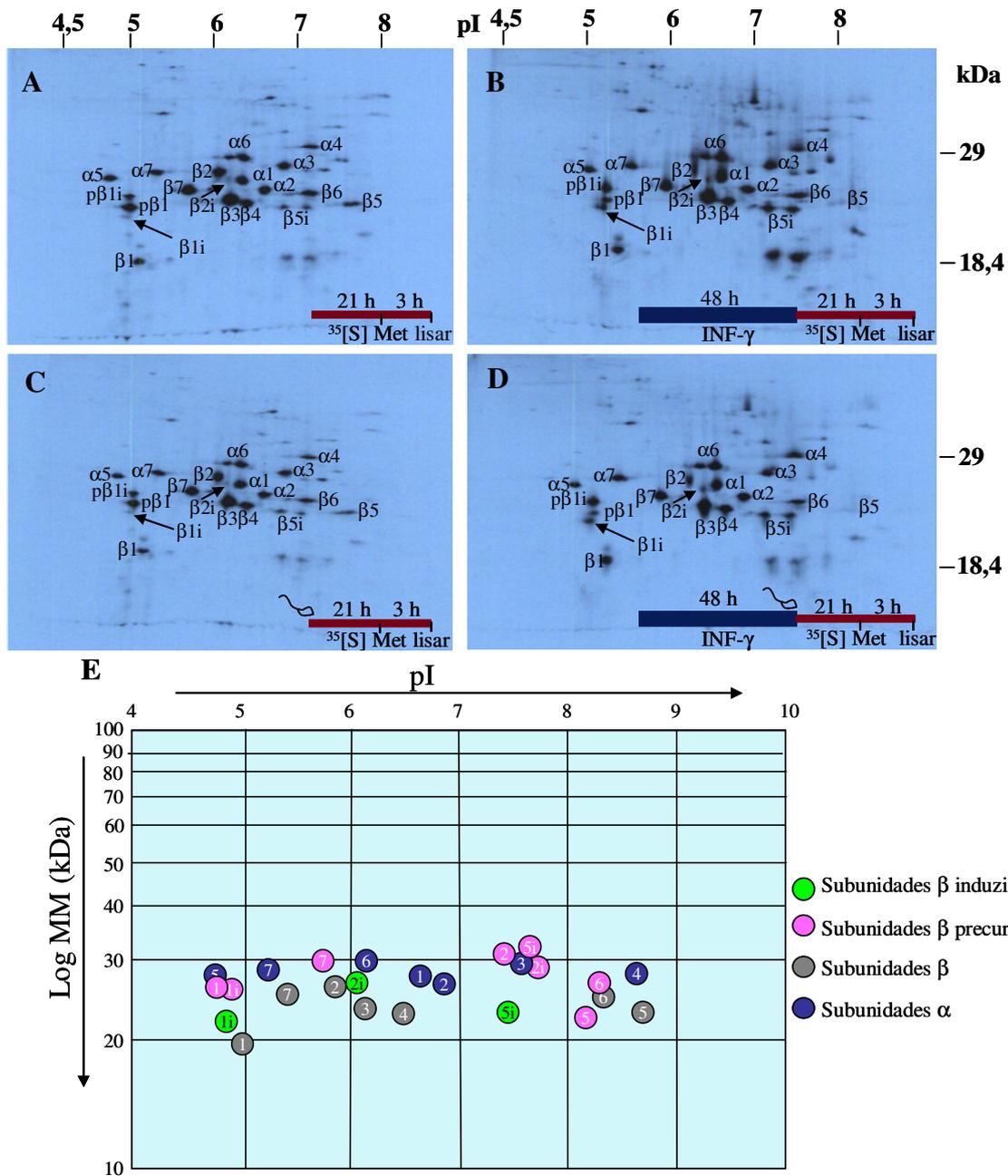
As subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , induzíveis pelo IFN- $\gamma$  (Figura 13B) foram detectadas em nossos experimentos. Como descrito por Hisamatsu et al. (1996), essas subunidades são incorporadas em proteassomas recém-sintetizados, substituindo as subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  respectivamente. Como mostrado nas Figuras 13B e 14B, as subunidades constitutivas  $\beta 2$  e  $\beta 5$ , consistente com a literatura, apresentaram sua síntese diminuída quando as células foram tratadas com IFN- $\gamma$ . Entretanto, a subunidade  $\beta 1$  não teve o mesmo comportamento das outras duas subunidades induzidas, mas a sua subunidade precursora,  $p\beta 1$ , apresentou uma redução significativa na sua síntese quando as células foram tratadas com IFN- $\gamma$ . Observamos também que as subunidades  $p\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ , foram reprimidas significativamente nos experimentos onde as células foram tratadas com IFN- $\gamma$  e posteriormente infectadas com *T. cruzi* (Figuras 13D e 14B).

A subunidade  $\beta 1i$  e a sua precursora  $p\beta 1i$  foram nitidamente induzidas por IFN- $\gamma$  (Figuras 13B e 14C). Curiosamente, a subunidade  $\beta 1$  não teve a sua síntese significativamente reduzida durante o tratamento com a citocina (Figuras 13B e 14B). As subunidades  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  foram claramente induzidas por IFN- $\gamma$  e as subunidades constitutivas  $\beta 2$  e  $\beta 5$  foram reprimidas nas células HeLa tratadas com a citocina, como esperado (Figuras 13B e 14B).

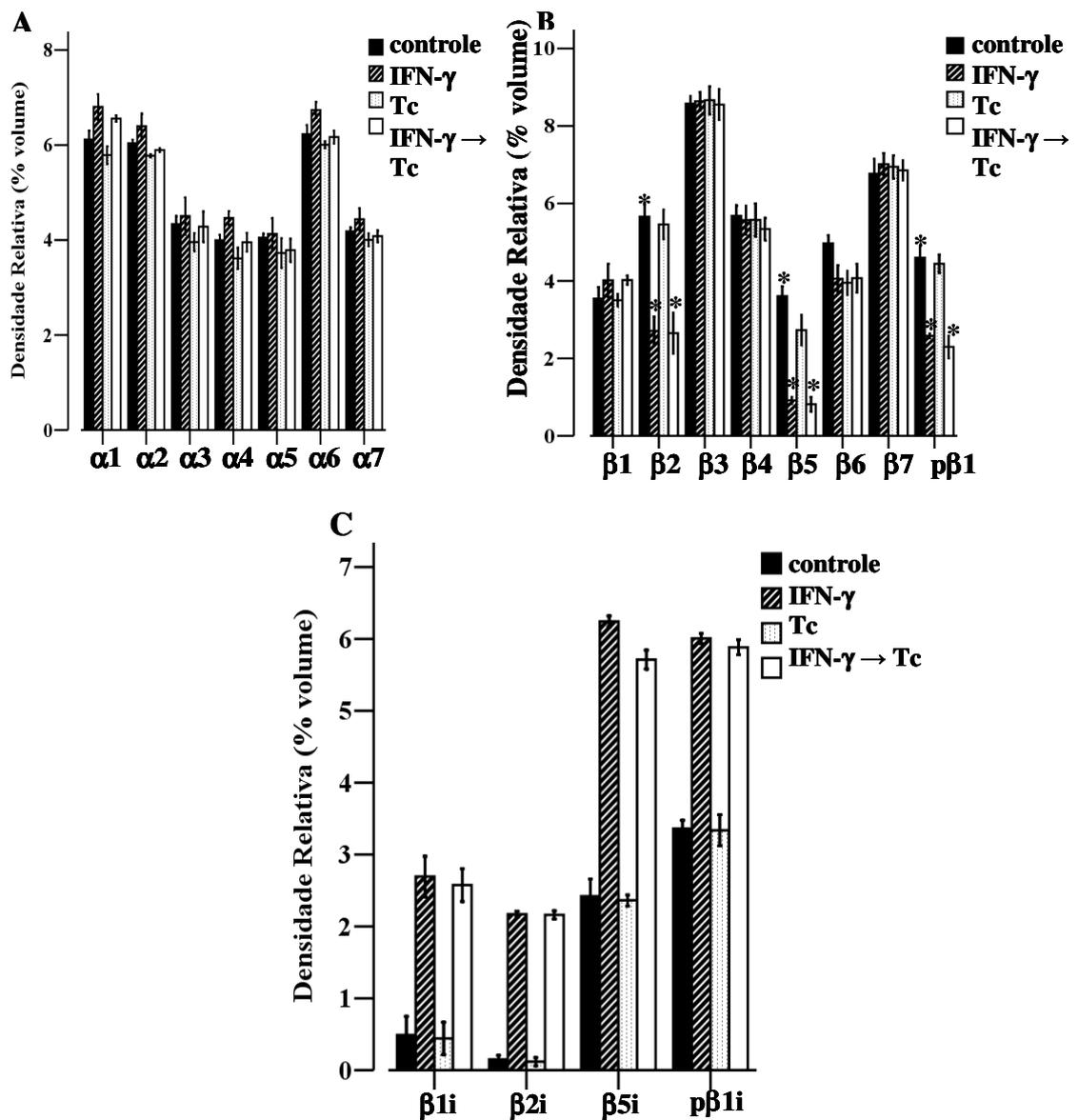
Quando comparamos as subunidades  $p\beta 1i$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  de células tratadas com IFN- $\gamma$  (Figura 13B) com as células tratadas com IFN- $\gamma$  e infectadas com *T. cruzi* (Figura 14D), observamos que seus níveis se mantêm praticamente constantes (Figuras 13D e 14C).



**Figura 12. Análise comparativa da expressão dos genes  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5,  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i, e  $\beta$ 5i de células L6.** A verificação dos níveis de transcrição gênica foi realizada em triplicata por meio de RT-PCR semiquantitativa. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2  $\mu$ g de RNA total extraído de células L6, após o cultivo em diferentes condições. Uma alíquota de 2  $\mu$ L da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento dos genes de interesse e do gene constitutivo *gapdh* empregado como controle interno da reação. Um terço da reação de PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados das subunidades  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i e  $\beta$ 5i do proteassoma são mostrados no painel A. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos referidos genes foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Scion Image*. Os gráficos B e C mostram, respectivamente, a média das razões entre o nível de expressão dos genes constitutivos e induzidos de células L6, em relação ao controle interno *gapdh*. Um experimento representativo de três é mostrado; as barras representam o erro padrão da média da duplicata. Cabeça de seta: produto de amplificação do gene da *gapdh* de rato.



**Figura 13.** A composição das subunidades de proteassoma é modulada mediante o tratamento com IFN- $\gamma$ . Monocamadas de células HeLa foram tratadas com 500 U/mL de IFN- $\gamma$  durante os intervalos de tempo de 48 h. Posteriormente, as células foram expostas por 24 h a 40 tripomastigotas/célula da linhagem Y de *T. cruzi*. [ $^{35}$ S] metionina (100  $\mu$ Ci/mL) foi sempre adicionado nas 3 h finais da infecção. Após este período de tempo, as monocamadas foram lavadas com PBS e lisadas com 1 % Triton X-100. A imunoprecipitação foi realizada como descrito na metodologia. Proteassomas de células HeLa foram imunoprecipitados usando anticorpos monoclonais anti-proteassoma humano e analisados por géis bidimensionais. (A) Células não tratadas com IFN- $\gamma$  e não infectadas; (B) células somente tratadas com IFN- $\gamma$ ; (C) células somente infectadas por *T. cruzi*; (D) células tratadas com IFN- $\gamma$  e infectadas por *T. cruzi*; (E) Proteoma teórico do proteassoma 20S humano. As subunidades do complexo proteassoma são identificadas com seus respectivos nomes, sendo que a identificação das proteínas foi realizada usando um mapa bidimensional referência do proteassoma 20S.



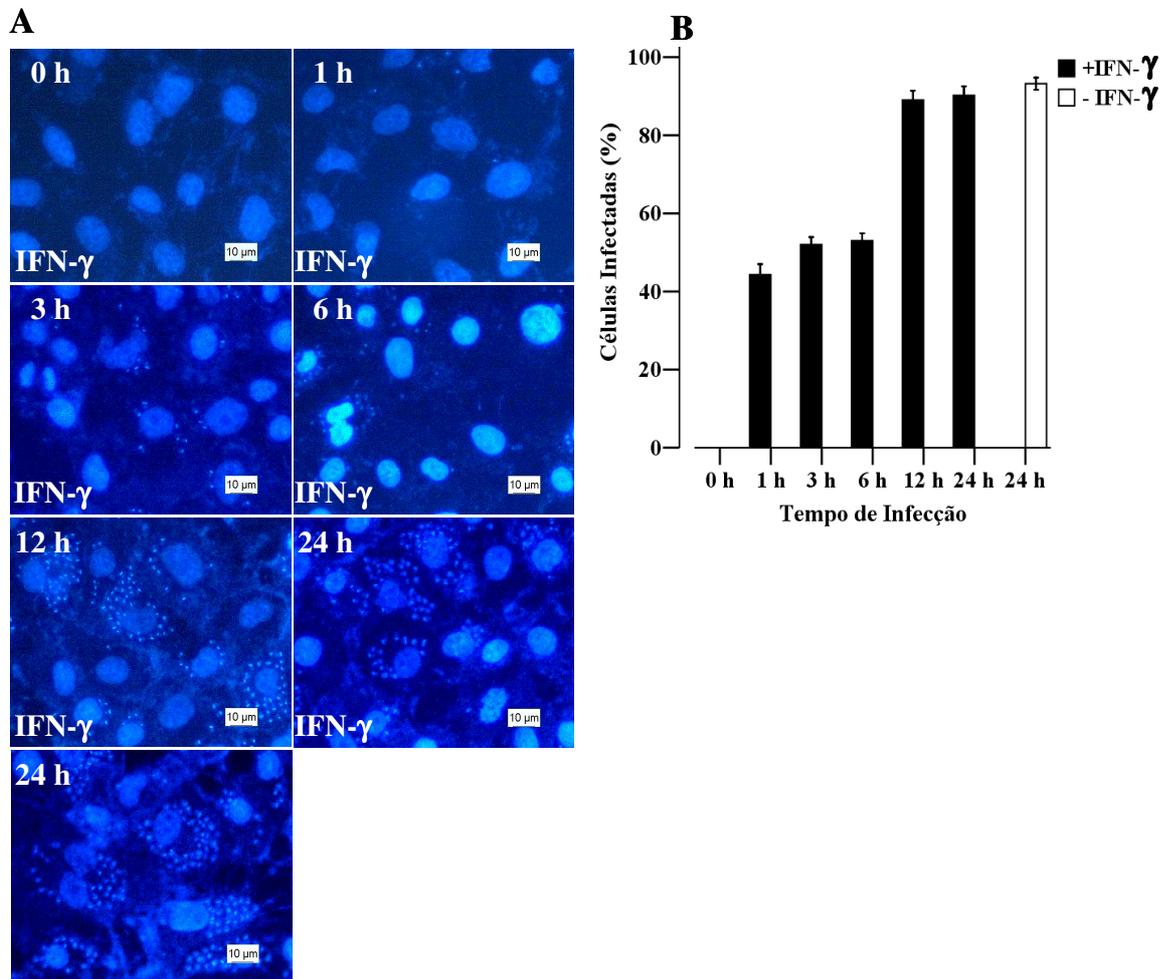
**Figura 14. Análise comparativa dos níveis de síntese protéica de proteassoma de células HeLa utilizando-se o programa Image Master.** Os resultados referentes aos níveis protéicos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do complexo proteassoma foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa Image Master (Amersham – GE Healthcare). Os gráficos **A** (subunidades  $\alpha$ ), **B** (subunidades  $\beta$ ) e **C** (subunidades induzidas) mostram os níveis de síntese protéica das referidas subunidades. Um experimento representativo de dois é mostrado; as barras representam o erro padrão da média da duplicata (\* $p < 0,05$ ).

### **2.3. Infecção de células HeLa com *T. cruzi* e posterior tratamento com IFN- $\gamma$**

Como não verificamos alteração nos níveis de mRNA e proteína em células tratadas com IFN- $\gamma$  e infectadas posteriormente com *T. cruzi*, decidimos verificar a taxa de infecção em células infectadas com *T. cruzi* e em seguida tratadas com IFN- $\gamma$ . As células HeLa foram expostas às formas tripomastigotas a uma taxa de 40 parasitas/célula hospedeira por diferentes tempos (1, 3, 6, 12, e 24 h) e após cada período de tempo estas foram tratadas com IFN- $\gamma$  por 24 h. As células então foram marcadas com DAPI para detectar os parasitas intracelulares e obter a porcentagem de células infectadas em cada período de tempo (Figura 15A). Após 1 h de infecção, foi observado aproximadamente 45 % de infecção, sendo que a porcentagem de células infectadas foi proporcional a duração do período de exposição aos parasitas. Aproximadamente 90 % das células HeLa foram infectadas após 24 h de exposição e cerca de aproximadamente 93 % das células foram infectadas após 24 h de infecção e sem tratamento (controle) (Figura 15B). Portanto, as células infectadas e tratadas não apresentaram redução significativa no número de células infectadas ou parasitas intracelulares em comparação às células controle.

### **2.4. Análise comparativa dos níveis de mRNAs proteassomais de células HeLa infectadas com *T. cruzi* e posteriormente tratadas com IFN- $\gamma$**

A fim de verificarmos os níveis de mRNA proteassomais das células HeLa infectadas com *T. cruzi* e posteriormente tratadas com IFN- $\gamma$ , realizamos o mesmo experimento descrito anteriormente (item 2.3), sendo que ao final de cada tempo de infecção as células HeLa foram tratadas com 500 U/mL de IFN- $\gamma$  por 24 h. RNA total das células controle (sem infecção e com tratamento); infectadas por diferentes tempos (1, 3, 6, 12, e 24 h) e tratadas e das células somente infectadas com *T. cruzi* por 24 h foram utilizadas em experimentos de RT-PCR. Os resultados mostrados na Figura 16 ilustram a expressão dos mRNAs das subunidades proteassomais  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  nos diferentes tempos de infecção pelo *T. cruzi* e tratadas com IFN- $\gamma$ . Nós observamos que a expressão das subunidades constitutivas do proteassoma  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  não foi afetada pela infecção com *T. cruzi*. Além disso, os níveis de mRNAs destas subunidades constitutivas não apresentaram nenhuma alteração com o tratamento com o IFN- $\gamma$ , sugerindo que a expressão destas subunidades não é dependente do tratamento com o IFN- $\gamma$  (Figuras 16A e B). Os níveis de mRNAs das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  das células HeLa

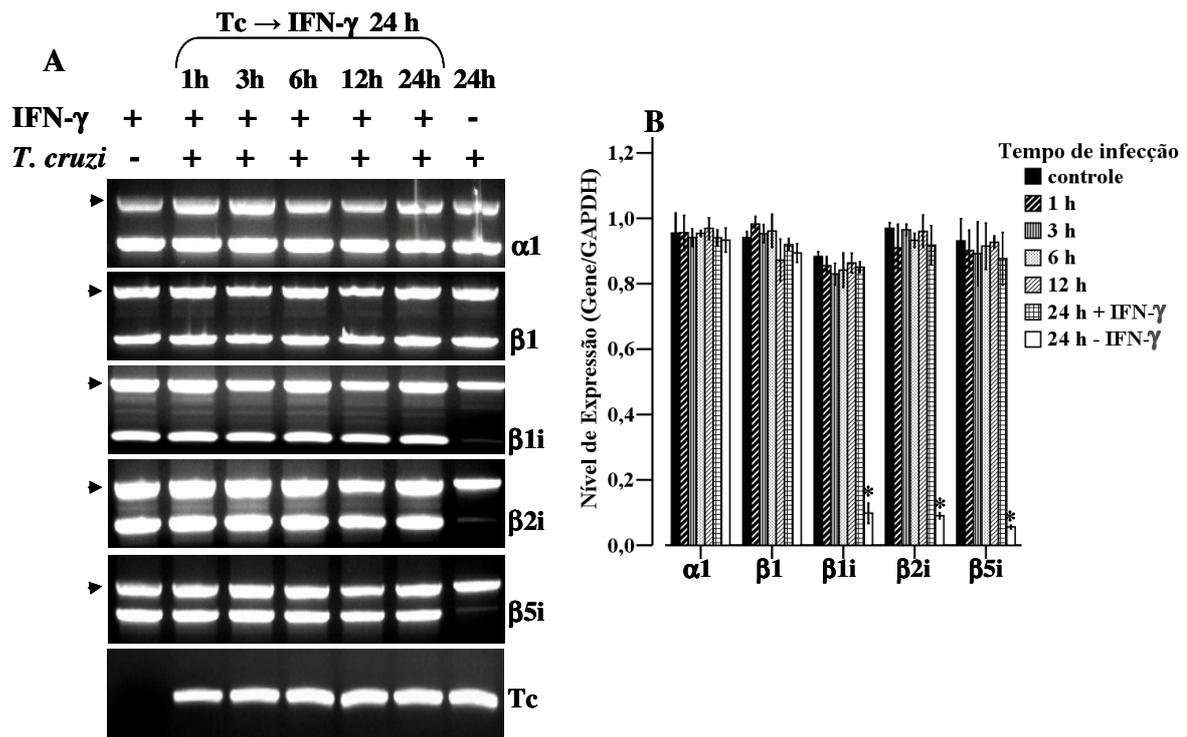


**Figura 15. Infecção de células HeLa com *T. cruzi*, tratadas com IFN- $\gamma$  e coradas com DAPI.** Monocamadas de células HeLa foram crescidas em meio DMEM por 48 h a 37°C e posteriormente expostas a uma suspensão de tripomastigotas a uma taxa de parasitas-célula hospedeira de 40:1 por períodos de tempo variáveis (1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h). Após a infecção, as células foram tratadas com 500 U/mL de IFN- $\gamma$  por um período de tempo de 24 h. Após este período, as lamínulas foram lavadas cinco vezes com PBS antes de serem fixadas e então coradas com DAPI. A porcentagem de células que foram infectadas com *T. cruzi* é indicada no gráfico **B**. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada período de tempo. Os valores indicam a média de dois experimentos e as barras representam o erro padrão da média da duplicata.

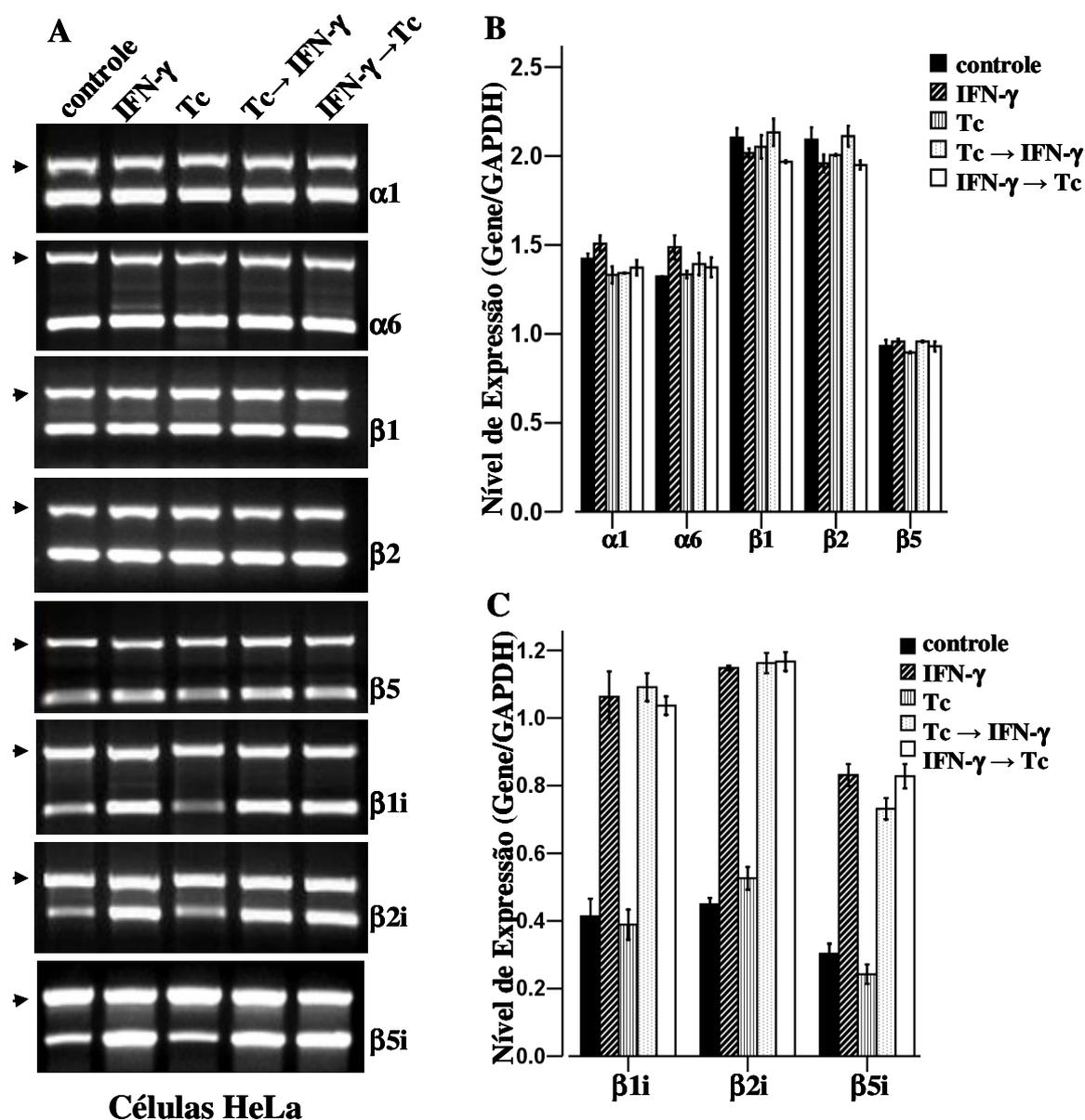
tratadas com IFN- $\gamma$  apresentaram um aumento de aproximadamente dez vezes mais na sua expressão comparando com as células sem tratamento, corroborando assim com os dados da literatura que relatam que estas subunidades são induzidas por esta citocina. Entretanto, os níveis de mRNAs destas subunidades induzidas não foram afetados com a infecção de *T. cruzi*, mantendo-se praticamente os mesmos apresentados nas células somente tratadas (Figuras 16A e B).

Além disso, verificamos ainda os níveis de mRNA proteassomais das células HeLa em diferentes condições de cultivo. Utilizamos células controles (sem infecção e sem tratamento), células tratadas com IFN- $\gamma$ , células infectadas com *T. cruzi* por 24 h, células tratadas com IFN- $\gamma$  e infectadas com *T. cruzi* e realizamos ainda, células infectadas com *T. cruzi* por 24 h e tratadas com IFN- $\gamma$  por 24 h. Após o cultivo destas células nas condições descritas acima, procedemos à amplificação dos transcritos dos genes proteassomais a partir de RNA total purificado utilizado em experimentos de RT-PCR.

Quando comparamos o perfil de expressão dos genes proteassomais em células HeLa controle com a expressão dos mesmos genes em células HeLa infectadas com *T. cruzi* (Figura 17) notamos que não houve alteração significativa na expressão dos genes proteassomais testados. Os três genes induzidos por IFN- $\gamma$  apresentaram um nível de expressão basal nas células controle e como esperado, os níveis de expressão aumentou aproximadamente três vezes para os genes  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$  e cerca de duas vezes para o gene  $\beta 5i$  (Figuras 17A e C). Nas células tratadas com IFN- $\gamma$  e infectadas posteriormente com *T. cruzi* observamos que os genes das subunidades  $\beta$  induzíveis e das subunidades constitutivas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  apresentaram os níveis de expressão equivalente aqueles apresentados quando estas células foram somente tratadas com a citocina (Figuras 17A, B e C). Nas células onde efetuamos a infecção por 24 h e em seguida o tratamento com IFN- $\gamma$  por 24 h, também não observamos alteração significativa na expressão dos genes proteassomais testados.



**Figura 16.** Análise comparativa da expressão dos genes  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , de células HeLa controle, infectadas por diferentes tempos com *T. cruzi* e tratadas com IFN- $\gamma$ . RNA total foi extraído das células HeLa infectadas com *T. cruzi* (a uma taxa de parasitas-célula hospedeira de 40:1) a 37°C por 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Após a infecção as células foram tratadas com 500 U/mL de IFN- $\gamma$  por um período de tempo de 24 h. Uma alíquota de 2  $\mu$ L da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento dos genes de interesse e do gene constitutivo *gapdh* empregado como controle interno da reação. Um terço da reação de PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados das subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , do proteassoma e o produto específico de PCR do gene *gapdh* de *T. cruzi* que foi usado como controle da infecção são mostrados no painel A. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos referidos genes foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Scion Image*. O gráfico B mostra a média das razões entre o nível de expressão dos genes de interesse de células HeLa e o controle interno da GAPDH. Um experimento representativo de dois é mostrado; as barras representam o erro padrão da média da duplicata. Cabeça de seta: produto de amplificação do gene da *gapdh* humana. Tc: produto de amplificação do gene de *gapdh* de *T. cruzi*.



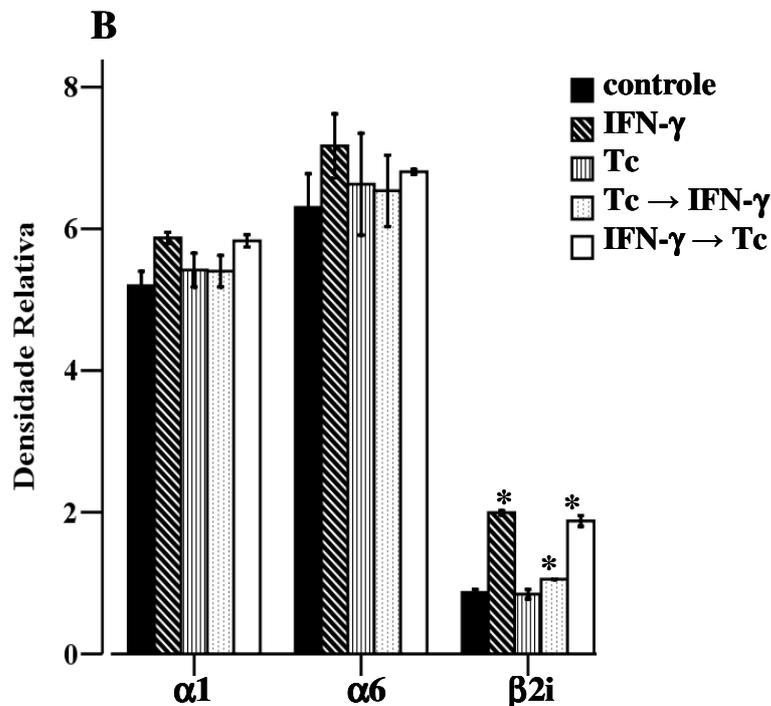
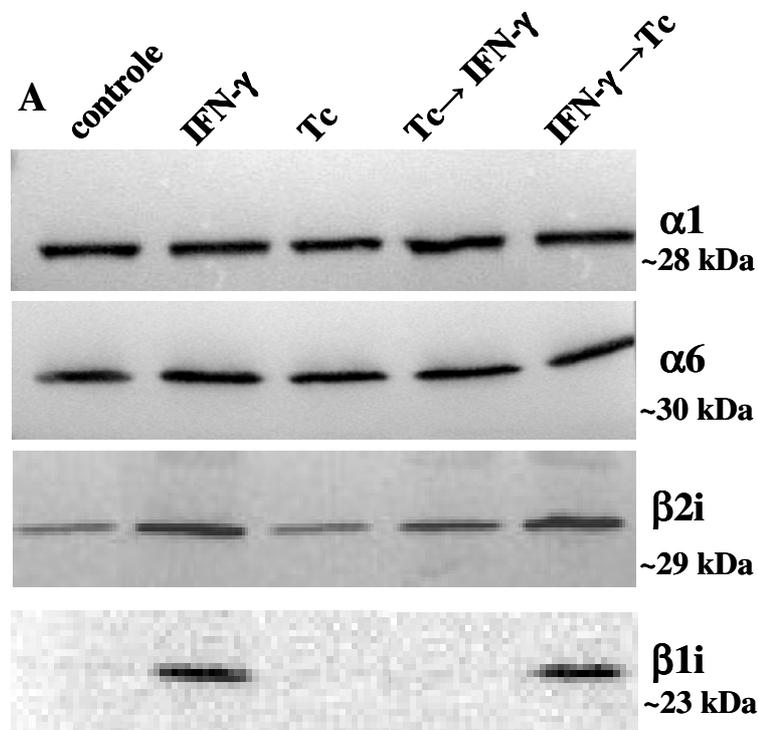
**Figura 17. Análise comparativa da expressão dos genes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  de células HeLa.** A verificação dos níveis de expressão gênica foi realizada em triplicata por meio de RT-PCR semiquantitativa. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2  $\mu\text{g}$  de RNA total extraído de células HeLa, após o cultivo em diferentes condições. Uma alíquota de 2  $\mu\text{L}$  da reação de síntese de cDNA foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse e do gene constitutivo da *gapdh* empregado como controle interno da reação. Um terço da PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídeo. Os produtos amplificados das subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , do proteassoma são mostrados no painel A. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos referidos genes foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Scion Image*. Os gráficos B e C mostram, respectivamente, a média das razões entre o nível de expressão dos genes constitutivos e induzidos de células HeLa, em relação ao controle interno GAPDH. Um experimento representativo de três é mostrado; as barras representam o erro padrão da média da triplicata.

## **2.5. Análise comparativa da síntese protéica das subunidades $\alpha 1$ , $\alpha 6$ , $\beta 1i$ e $\beta 2i$ de células HeLa controle, infectadas com *T. cruzi* e tratadas com IFN- $\gamma$**

Para verificarmos se a infecção altera os níveis de síntese protéica das subunidades induzidas do imunoproteassoma, análises de *Western blot* foram realizadas utilizando anticorpos específicos para cada subunidade. Como mostrado na Figura 18, o conteúdo relativo das subunidades constitutivas  $\alpha 1$  e  $\alpha 6$  permaneceu o mesmo em todos os tratamentos realizados, portanto não apresentando nenhuma alteração significativa em seus conteúdos relativos (Figura 18A e B).

Ao contrário da subunidade  $\beta 2i$ , a subunidade induzida do imunoproteassoma,  $\beta 1i$  não apresentou níveis de expressão protéica basal nas células controle e nas células infectadas. Sob a estimulação das células HeLa com IFN- $\gamma$  por 48 h, os níveis protéicos das subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$ , induzidas por esta citocina, praticamente dobraram e esses mesmos níveis permaneceram quando as células foram tratadas com a citocina e posteriormente infectadas com *T. cruzi* por 24 h. Entretanto, nas células HeLa que foram infectadas com *T. cruzi* por 24 h e posteriormente tratadas com IFN- $\gamma$  também por 24 h, houve uma redução significativa dos níveis protéicos da subunidade  $\beta 2i$  de aproximadamente 50 % e uma dramática redução de  $\beta 1i$  (Figura 18A e B).

Esses resultados sugerem que a formação do imunoproteassoma foi inibida nas células HeLa onde efetuamos a infecção com *T. cruzi* e com posterior tratamento de IFN- $\gamma$ , sendo que este efeito pode ser devido ao decréscimo da síntese das subunidades do imunoproteassoma ou pela inibição da incorporação das subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$  na montagem do complexo imunoproteassoma.



**Figura 18.** Análise comparativa da síntese protéica das subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$  de células HeLa controle, infectadas com *T. cruzi* e tratadas com IFN- $\gamma$ . Lisado total foi extraído das células HeLa infectadas com *T. cruzi* (a uma taxa de parasitas-célula hospedeira de 40:1) a 37°C por 24 h. Após a infecção as células foram tratadas com 500 U/mL de IFN- $\gamma$  por um período de tempo de 24 h. Os lisados (100  $\mu$ g) foram analisados em gel SDS-PAGE 13 % e transferidos para membrana de nitrocelulose. As reações de *Western blots* foram realizadas com anticorpos específicos contra as subunidades constitutivas  $\alpha 1$  e  $\alpha 6$  e contra as subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$  do imunoproteossoma. Os resultados referentes aos níveis de síntese protéica das referidas subunidades foram quantificados por densitometria e ferramentas do programa *Scion Image*. O gráfico B mostra a média dos níveis de síntese de cada subunidade do proteossoma. Um experimento representativo de dois é mostrado: as barras representam o erro padrão da média da duplicata (\* $p < 0,05$ ).  $\beta 1i$  é resultado de um experimento.

## DISCUSSÃO

*Trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular obrigatório que causa a doença de Chagas, uma doença responsável pela infecção de milhões de indivíduos na América Latina a cada ano. Este parasita permanece livre no citoplasma das células hospedeiras e os mecanismos que controlam a replicação do parasita durante as fases aguda e crônica da infecção, mantendo as formas tripomastigotas em número baixo porém persistentes durante a fase crônica, não são muito bem entendidos.

Dentro da via de apresentação de antígenos intracelulares MHC classe I, a grande maioria de peptídeos antigênicos é gerada pelo proteassoma, um complexo multicatalítico responsável pela degradação intracelular de proteínas. Portanto, como o proteassoma é o complexo central na geração de peptídeos antigênicos, muitos microrganismos infecciosos desenvolveram estratégias que impedem a proteólise de antígenos via proteassoma, dificultando assim o reconhecimento destes patógenos pelo sistema imune.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a expressão de genes de proteassomas e suas implicações durante a infecção de células em cultura pelo *T. cruzi*. Deste modo, nós especificamente perguntamos se a infecção com *T. cruzi* pode influenciar na expressão de mRNA ou o perfil protéico do imunoproteassoma.

Nossos resultados obtidos por RT-PCR e eletroforese bidimensional (Figuras 6, 7 e 9) mostraram que a infecção *in vitro* de células HeLa e L6 com *T. cruzi* não afeta a expressão das subunidades do proteassoma, uma vez que o perfil de expressão das subunidades proteassomais obtido nestes experimentos foi praticamente o mesmo. Estudos realizados com macrófagos de camundongos infectados com *T. cruzi* e sem o tratamento com IFN- $\gamma$  revelaram que estes também não apresentaram efeito na expressão de mRNAs ou na síntese protéica das subunidades do imunoproteassoma (BERGERON et al., 2008). Em conjunto, estes dados sugerem que a simples presença do *T. cruzi* não é suficiente para a indução das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  do imunoproteassoma, ao contrário do que foi mostrado por Khan et al. (2001) que a infecção *in vivo* por LCMV (*Lymphocytic Choriomeningitis Vírus*) e *Listeria monocytogenes* levou à substituição completa das subunidades constitutivas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$  pelas subunidades induzidas  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ . Em nossos experimentos observamos que as células HeLa apresentaram um nível de expressão basal nas subunidades induzidas, tanto nas células controle quanto nas células infectadas, corroborando com dados da literatura que relata essa expressão basal em vários tipos celulares (FOSS et al., 1998).

Em contraste com os resultados obtidos na composição das subunidades proteassomais de células infectadas com *T. cruzi*, nós observamos um aumento nas atividades proteolíticas do tipo tripsina e quimotripsina do proteassoma em células infectadas com *T. cruzi* (Figura 10). Este aumento observado é divergente de outros estudos que mostram que a infecção com alguns vírus diminui a atividade proteolítica do proteassoma (HU et al., 1999; KHAN et al., 2001; HAORAH et al., 2004; KHU et al., 2004). Porém, outros estudos mostram que alguns vírus são dependentes da atividade do proteassoma para a sua permanência e a sua sobrevivência na célula hospedeira, como por exemplo, o vírus HPV (*Human papillomavirus*) afeta o proteassoma hospedeiro aumentando a sua atividade proteolítica (BEREZUTSKAYA; BAGCHI, 1997).

Nos experimentos envolvendo o tratamento prévio das células com a citocina IFN- $\gamma$  e a posterior infecção com *T. cruzi*, verificamos uma redução da taxa de células infectadas pelo *T. cruzi* durante o período de 24 horas de infecção (Figura 11). Assim, o tratamento prévio com o IFN- $\gamma$  apresentou um efeito inibitório na infecção pelo *T. cruzi*. Como o IFN- $\gamma$  é uma citocina envolvida na ativação de macrófagos e controle da infecção, a ação protetora das células contra a infecção deve ser devido ao seu efeito inibitório na multiplicação das formas amastigotas. Entretanto, não podemos distinguir se esse efeito se deve a indução de óxido nítrico (NO), um agente conhecidamente responsável pela morte de parasitas (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995) ou se devido à expressão alterada de subunidades proteassomais. Entretanto, nossos resultados obtidos por RT-PCR e eletroforese bidimensional mostraram que a infecção *in vitro* de células HeLa e L6 tratadas com IFN- $\gamma$  não afetou a expressão das subunidades do imunoproteassoma, uma vez que o perfil de expressão das subunidades proteassomais obtido nestes experimentos foi praticamente o mesmo (Figuras 12 e 13).

Uma vez que não observamos alteração nos níveis de mRNA e proteínas em células tratadas com IFN- $\gamma$  e infectadas posteriormente com *T. cruzi*, realizamos experimentos em que as células HeLa foram infectadas com *T. cruzi* e posteriormente tratadas com IFN- $\gamma$ . Os resultados apresentados na Figura 15 mostraram que 90 % das células HeLa foram infectadas após 24 h de exposição aos parasitas. Portanto, as células infectadas e posteriormente tratadas não apresentaram redução significativa no número de células infectadas ou parasitas intracelulares em comparação às células controle, como ocorrido no experimento sem tratamento com IFN- $\gamma$  (Figura 5). Esses resultados sugerem que de alguma forma o parasita está inibindo o efeito indutório do imunoproteassoma e de proteção da infecção pela citocina

e que a infecção ocorre nos mesmos níveis que com as células não tratadas. Surpreendentemente, nossos experimentos de RT-PCR (Figuras 16 e 17) não mostraram diferenças na expressão dos genes induzíveis do imunoproteassoma, porém os experimentos de *Western blot* mostraram que células Hela infectadas com *T. cruzi* por 24 h com posterior tratamento com IFN- $\gamma$  por 24 h (Figura 18) apresentaram uma redução significativa na síntese protéica das subunidades induzidas  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$  do imunoproteassoma. Como esperado, a expressão das subunidades constitutivas do proteassoma  $\alpha 1$  e  $\alpha 6$  não foi afetada pela infecção com *T. cruzi* e tratamento posterior com IFN- $\gamma$ . Esses resultados mostram que a infecção prévia do *T. cruzi* inibe a tradução dos mRNAs das subunidades induzíveis sugerindo então um mecanismo de regulação traducional. Bergeron et al. (2008) mostraram que a infecção de macrófagos com *T. cruzi* reduz os níveis dos mRNAs das três subunidades induzidas e sugere uma regulação transcricional. Essas diferenças dos nossos resultados com os de Bergeron et al. (2008) podem ser atribuídas a diferentes tipos celulares (macrófagos x HeLa), a cepas diferentes de *T. cruzi* (Ecu0 – *T. cruzi I* e Y – *T. cruzi II*) ou mesmo na diferença do número de parasitas utilizado na infecção (5:1 x 40:1), o que não invalida ambos resultados. Deste modo, este trabalho é a primeira indicação de que a infecção de células não imunes com *T. cruzi* e tratadas posteriormente com IFN- $\gamma$  afeta a síntese protéica das subunidades do imunoproteassoma.

Assim como observamos uma redução na síntese das subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 2i$  em células infectadas por *T. cruzi* e tratadas com IFN- $\gamma$ , outras pesquisas utilizando vírus mostraram que estes patógenos também afetam as subunidades induzidas do imunoproteassoma. Macrófagos infectados com HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus -1*) apresentaram repressão na incorporação das subunidades induzidas no imunoproteassoma e a diminuição de sua atividade (HAORAH et al., 2004). Estudos utilizando camundongos e fibroblastos humanos infectados com citomegalovírus mostraram que estas infecções também interferem com a incorporação das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  no imunoproteassoma (KHAN et al., 2004). A proteína NS3 do HCV (Vírus da Hepatite C) mostrou-se reprimindo *in vitro* a atividade peptidásica da subunidade  $\beta 5i$  (KHU et al., 2004), podendo então interferir com o processamento de antígenos virais e na apresentação destes às moléculas de MHC classe I e, portanto, proteger o HCV do mecanismo de vigilância do sistema imune, permitindo a infecção persistente deste vírus. A imunização de ratos infectados com *T. cruzi* com um epítipo de linfócitos T citotóxicos (CTL) provocou a diminuição na parasitemia e prolongou a vida dos animais. Porém, quando esta mesma imunização foi realizada em animais deficientes

nas subunidades  $\beta 1i$  e  $\beta 5i$  do imunoproteassoma, a imunidade protetora da vacina contra a infecção foi profundamente atenuada (CHOU et al., 2008), demonstrando que o proteassoma desempenha uma função crucial na proteção dos animais infectados.

Entretanto, outros estudos revelaram que a formação do imunoproteassoma é ativada *in vivo* durante a infecção com o LCMV e *Listeria monocytogenes* (KHAN et al., 2001) e também com *Histoplasma capsulatum* (BARTON et al., 2002). Nesses estudos, no entanto, a ativação do imunoproteassoma está correlacionada com a produção de IFN- $\gamma$  e, portanto, pode não refletir a habilidade destes patógenos em afetar diretamente o imunoproteassoma, mas sim na capacidade do sistema imunológico em responder às infecções ativando a síntese do imunoproteassoma. A infecção de células HeLa com *Salmonella typhimurium* levou a um aumento significativo na expressão dos mRNAs das subunidades induzidas  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  e na quantidade de proteína da subunidade  $\beta 2i$ , alterando assim o processamento de antígenos e conseqüentemente promovendo mudanças no perfil de peptídeos ligados a HLA-B27 (MAKSYMOWYCH et al., 1998). Porém, ao contrário das observações anteriores, Marcilla et al. (2007) mostraram que células linfóides infectadas com *S. typhimurium* não apresentaram alteração na formação ou na especificidade proteolítica do proteassoma 20S/imunoproteassoma.

Não podemos esquecer que os exemplos citados acima são de patógenos virais e bacterianos e que o *T. cruzi* é um parasita eucariótico que provoca uma infecção onde não são conhecidos os fatores, por exemplo, que levam 30 % dos indivíduos infectados a desenvolver a cardiomiopatia chagásica crônica, enquanto que os restantes 70 % permanecem na fase indeterminada, sem dano cardíaco aparente. Desde a descoberta da doença pelo médico sanitário Carlos Chagas, em 1909, até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de tratamento, sem obter, entretanto, um medicamento totalmente eficaz. Além disso, o tratamento com as drogas disponíveis não leva à eliminação completa do parasita de pacientes cronicamente infectados, assim, a cura parasitológica completa é difícil. Os dados disponíveis na literatura sugerem que as formas intracelulares do parasita desenvolveram mecanismos de escape, ou pelo menos de retardo, da destruição das células infectadas pelo sistema imune. A formação do imunoproteassoma é um bom alvo para isto, como mostrado neste trabalho, onde verificamos que a infecção com o *T. cruzi* impede a formação do imunoproteassoma em células não imunes. A identificação desses mecanismos regulatórios pode fornecer importantes alvos para o desenvolvimento de drogas anti-*T. cruzi* efetivas e capazes de curar a infecção crônica pelo parasita.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, 155: 3955-3963, 1995.
- \_\_\_\_\_; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, 84: 231-244, 1996.
- ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treat. Rev.**, 29: 3-9, 2003.
- AHN, K., et al. *In vivo* characterization of the proteasome regulator PA28. **J. Biol. Chem.**, 271(30): 18237-18242, 1996.
- AKI, M., et al. Interferon- $\gamma$  induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. **J. Biochem.**, 115: 257-269, 1994.
- AKIYAMA, K., et al. Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon- $\gamma$  for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. **FEBS Lett.**, 343: 85-88, 1994.
- ALIBERTI, J. C. S., et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, 64 (6): 1961-1967, 1996.
- \_\_\_\_\_, et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31(1): 111-115, 1998.
- ALVES, M.J.M., et al. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 21: 75-82, 1986.
- AL-SABBAGH, A., et al. Evidence for Cross-Reactivity between Antigen Derived from *Trypanosoma cruzi* and Myelin Basic Protein in Experimental Chagas Disease. **Exp. Parasitol.**, 89: 304-311, 1998.
- ANDREWS, N. W.; COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **J. Protozool.**, 29(2): 264-269, 1982.
- \_\_\_\_\_. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Trends Cell Biol.**, 5: 133-137, 1995.
- ARENDETT, C.S.; HOCHSTRASSER, M. Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. **EMBO J.**, 18: 3575-3585, 1999.
- ARRIGO, A.P., et al. Identity of the 19S "prosome" particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). **Nature**, 331: 192-194, 1988.
- ATTAIX, D., et al. Regulation of proteolysis. **Curr. Op. Clinic. Nutrition Metabolic Care**, 4: 45-49, 2001.
- BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.L. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Struct. Funct.**, 20: 275-284, 1995.

- BARTON, L.F., et al. Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. **J. Immunol.**, 169: 3046-3052, 2002.
- BENHAM, A.M.; NEEFJES, J.J. Antigen processing by the class I pathway. **Biochem. Society Transact.**, 23: 664-669, 1995.
- BEREZUTSKAYA, E.; BAGCHI, S. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Functionally Interacts with the S4 Subunit of the 26 S Proteasome. **J. Biol. Chem.**, 272: 30135-30140, 1997.
- BERGERON, M., et al. Abnormal IFN- $\gamma$ -dependent immunoproteasome modulation by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. **Parasite Immunol.**, 1-13, 2008.
- BOCHTLER, M., The Proteasome. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, 28: 295-317, 1999.
- BOES, B., et al. Interferon  $\gamma$  stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. **J. Exp. Med.**, 179: 901-909, 1994.
- BOSE, S., et al.  $\gamma$ -Interferon decreases the level of 26S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation. **Biochem. J.**, 353: 291-297, 2001.
- BOUHDIDI, A., et al. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. **Parasite Immunol.**, 16: 69-76, 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, 27: 347-382, 1973.
- BURGERT, H.-G. Subversion of the MHC class I antigen-presentation pathway by adenoviruses and herpes simplex viruses. **Trends Microbiol.**, 4(3): 107-112, 1996.
- BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.**, 49: 175-200, 1995.
- \_\_\_\_\_; CALER, E.V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. **J. Cell Biol.**, 134(3): 609-620, 1997.
- \_\_\_\_\_; WOOLSEY, A.M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell. Microbiol.**, 4(11): 701-711, 2002.
- BURRI, L., et al. Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97(19): 10348-10353, 2000.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosome in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 6: 93-100, 1964.
- CARDILLO, F., et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. **Infect. Immun.**, 64(1): 128-134, 1996.
- CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P.; JESUS, A.R. DE. Imunidade e infecção. **Medicina**, 28(3): 253-283, 1995.
- CAULADA-BENEDETTI, Z. Activation of CD4+ AND CD8+ parasite-specific T-cells by macrophages infected with live *T. cruzi* amastigotes. **Immunol. Lett.**, 63: 97-105, 1998.

- CDC (Centers for Disease Control & Prevention). Division of Parasitic Disease, Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, National Center for Infectious Diseases. DPDx Identification and Diagnosis of Parasites of Public Health Concern. Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em 13 maio 2006.
- CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1: 159-218, 1909.
- CHEN, P.; HOCHSTRASSER, M. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. **Cell**, 86: 961-972, 1996.
- CHOU, B., et al. Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. **Microbes Infect.**, 10(3): 241-250, 2008.
- CIECHANOVER, A. The ubiquitin – proteasome proteolytic pathway. **Cell**, 79: 13-21, 1994.
- CLAVEROL, S., et al. Mapping and structural dissection of human 20S proteasome using proteomic approaches. **Mol. Cell. Proteom.**, 1: 567-578, 2002.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F., et al. *Leishmania major* infection in mice primes for specific Major Histocompatibility Complex class I restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. **Eur. J. Immunol.**, 24: 2813-2817, 1994.
- CONTRERAS, V.T.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 14: 83-96, 1985a.
- \_\_\_\_\_; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 16: 315-327, 1985b.
- \_\_\_\_\_; ARAQUE, W.; DELGADO, V.S. *Trypanosoma cruzi*: Metacyclogenesis *in vitro* – I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89(2): 253-259, 1994.
- COTTA DE ALMEIDA, V., et al. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Clinic. Immunol. Immunopathol.**, 82(2): 125-132, 1997.
- COURA, J.R. Tripanosomose, Doença de Chagas. **Ciênc. Cult.**, 55(1): 1-7, 2003.
- COUX, O., et al. Phylogenic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. **Mol. Gen. Genet.**, 245: 769-780, 1994.
- \_\_\_\_\_; TANAKA, K.; GOLDBERG, A.L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annu. Rev. Biochem.**, 65: 801-847, 1996.
- CUNHA-NETO, E., et al. Autoimmunity in Chagas disease Cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 3451-3545, 1995.
- \_\_\_\_\_; COELHO, V.; GUILHERME, L FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' Disease. **J. Clin. Invest.**, 98 (8): 1709-1712, 1996.
- DAHLMANN, B., et al. The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. **FEBS Lett.**, 251(1-2): 125-131, 1989.

- DAVILA, H.O., et al. Protection of Young rats from acute *Trypanosoma cruzi* infection by interferon-gamma given to their mothers during pregnancy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 54(6): 660-664, 1996.
- D'ÁVILA REIS, D., et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: Presence of tumor necrosis factor- $\alpha$  cells and dominance of granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 48 (5): 637-644, 1993.
- DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97: 603-612, 2002.
- \_\_\_\_\_. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 28(2):81-87, 2006a.
- \_\_\_\_\_. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Ver. Soc. Brás. Med. Trop.**, 39(4):370-375, 2006b.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. The role of Ca<sup>2+</sup> in the processo f cell invasion by intracellular parasites. **Parasitol. Today**, 12(2): 61-65, 1996.
- DosREIS, G.A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Today**, 13(9): 335-342, 1997.
- ELLIS, R.E.; YUAN, J.; HORWITZ, H.R. Mechanisms and functions of cell death. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, 7: 663-698, 1991.
- ENGELHARD, V.H. How cells process antigens. **Sci. Am.**, 44-51, 1994.
- FERNANDES, L.C., et al. Specific human antibodies do not inhibit *Trypanosoma cruzi* oligopeptidase B and cathepsin B, and immunoglobulin G enhances the activity of trypomastigote-secreted oligopeptidase B. **Microbes Infect.**, 7: 375-384, 2005.
- FERRELL K., et al. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. **TIBS**, 25: 83-88, 2000.
- FOSS, G.S., et al. Constitutive and interferon- $\gamma$ -induced expression of the human proteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. **Biochem. Biophys. Acta**, 1402: 17-28, 1998.
- FROSCH, S.; KRAUS, S.; FLEISCHER, B. *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. **Med. Microbiol. Immunol.**, 185: 189-193, 1996.
- FRÜH, K., et al. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: A newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. **EMBO J.**, 13 (14): 3236-3244, 1994.
- \_\_\_\_\_; YANG, Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon  $\gamma$ . **Curr. Op. Immunol.**, 11: 76-81, 1999.
- GACZYNSKA, M.; ROCK, K.L.; GOLDBERG, A.L.  $\gamma$ -Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. **Nature**, 365: 264-267, 1993a.
- \_\_\_\_\_; ROCK, K.L.; GOLDBERG, A.L. Role of proteasomes in antigen presentation. **Enzyme Protein**, 47: 354-369, 1993b.
- \_\_\_\_\_; ROCK, K.L.; SPIES, T.; GOLDBERG, A.L. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91: 9213-9217, 1994.

- GAO, X., et al. Purification procedures determine the proteasome activation properties of REG $\gamma$  (PA28 $\gamma$ ). **Arch. Biochem. Biophys.**, 425: 158-164, 2004.
- GARG, N.; NUNES, M.P.; TARLETON, R.L. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. **J. Immunol.**, 158: 3293-3302, 1997.
- GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Rev. Immunol.**, 6: 895-906, 2006.
- GEORGOPOULOS, N.T.; PROFFITT, J.L.;BLAIR, G.E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene**, 19: 4930-4935, 2000.
- GHISIAIN, M.; UDVARDY, A.; MANN, C. *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. **Nature**, 366: 358-361, 1993.
- GLICKMAN, M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol. Rev.**, 82: 373-428, 2002.
- GOLDBERG, A.L.; ROCK, K.L. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. **Nature**, 357: 375-379, 1992.
- GOMES, J.A., et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect. Immun.**, 71: 1185-1193, 2003.
- GRIFFIN, T.A., et al. Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-inducible Subunits. **J. Exp. Med.**, 187(1): 97-104, 1998.
- \_\_\_\_\_; SLACK, J.P.; MCCLUSKEY, T.S.; MONACO, J.J.; COLBERT, R.A. Identification of Proteasembilin, a mammalian homologue of the yeast, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly. **Mol. Cell Biol. Res. Commun.**, 3: 212-217, 2000.
- GROETTRUP, M., et al. The interferon- $\gamma$ -inducible 11S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20S proteasome *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, 270(40): 23808-815, 1995.
- \_\_\_\_\_; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; STANDERA, S.; STOHWASSER, R.; KLOETZEL, P.-M. A third interferon- $\gamma$ -induced subunit exchange in 20S proteasome. **Eur. J. Immunol.**, 26: 863-869, 1996a.
- \_\_\_\_\_; SOZA, A.; KUCKLKORN, U.; KLOETZEL, P.-M. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. **Immunol. Today**, 17(9): 429-435, 1996b.
- \_\_\_\_\_; KHAN, S.; SCHWARZ, K.; SCHMIDTKE, G. Interferon- $\gamma$  inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: Why? **Biochimie**, 83: 367-372, 2001.
- GROLL M.; HUBER, R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. **Internat. J. Biochem.**, 35: 606-616, 2003.
- GROSSI DE SÁ, M.-F., et al. Cytolocalization of prosomes as a function of differentiation. **J. Cell Sci.**, 89: 151-165, 1988.
- GRZIWA, A., et al. Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. **FEBS Lett.**, 290(1-2): 186-190, 1991.

- HAHN, Y.S.; YANG, B.; BRACIALE, T.J. Regulation of antigen processing and presentation to class I MHC restricted CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. **Immunol. Rev.**, 151: 31-49, 1996.
- HALL, B.S., et al. Cell-specific activation of Nuclear Factor-κB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. **Mol. Biol. Cell**, 11:153-160, 2000.
- HAORAH, J., et al. Alcohol and HIV decrease proteasome and immunoproteasome function in macrophages: implications for impaired immune function during disease. **Cell. Immunol.**, 229: 139-148, 2004.
- HEINEMEYER, W., et al. The Active Sites of the Eukaryotic 20 S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing. **J. Biol. Chem.**, 272(40): 25200-25209, 1997.
- HENDIL, K.B.; KHAN, S.; TANAKA, K. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. **Biochem. J.**, 332: 749-754, 1998.
- HERWALDT, B.L. Laboratory-Acquired Parasitic Infections from Accidental Exposures. **Clinic. Microbiol. Rev.**, 14(4): 659-688, 2001.
- HISAMATSU, H., et al. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon-γ. **J. Exp. Med.**, 183: 1807-1816, 1996.
- HOFT, D.F., et al. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. **Infect. Immun.**, 64(9): 3800-3810, 1996.
- HOWARD, J.C. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. **Curr. Op. Immunol.**, 7: 69-76, 1995.
- HU, Z., et al. Hepatitis B Virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. **J. Virol.**, 73(9): 7231-7240, 1999.
- HUNTER, C. A.; SLIFER, T.; ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.**, 64(7): 2381-2386, 1996.
- JACKSON, M. R., NILSSON, T., PETERSON, P. A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. **EMBO J.**, 9(10), 3153-3162, 1990.
- JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, 59(4): 533-547, 1995.
- KANIA, M.A., et al. The proteasome subunit, C2, contains an important site for binding of the PA28 (11S) activator. **Eur. J. Biochem.**, 236: 510-516, 1996.
- KEMP, M.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. The contrasting roles of CD4<sup>+</sup> T cells in intracellular infections in humans: leishmaniasis as an example. **Immunol. Today**, 17(1): 13-16, 1996.
- KHAN, S., et al. Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. **J. Immunol.**, 167: 6859-6868, 2001.
- \_\_\_\_\_, et al. A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. **J. Virol.**, 78(4): 1831-1842, 2004.
- KHU, Y.-L., et al. Hepatitis C virus non-structural protein NS3 interacts with LMP7, a component of the immunoproteasome, and affects its proteasome activity. **Biochem. J.**, 384: 401-409. 2004.

- KLOETZEL, P.-M. Antigen processing by the proteasome. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 2: 179-187, 2001.
- KRING, S.C.; SPINDLER, K.R. Lack of effect of mouse adenovirus type 1 infection on cell surface expression of Major Histocompatibility Complex Class I antigens. **J. Virol.**, 70(8): 5495-5502, 1996.
- KUEHN, L.; DAHLMANN, B. Proteasome activator PA28 and its interaction with 20S proteasomes. **Arch. Biochem. Biophys.**, 329(1): 87-96, 1996.
- KUEHN, L.; DAHLMANN, B. Structural and functional properties of proteasome activator PA28. **Mol. Biol. Reports**, 24: 89-93, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LAM, Y.A., et al. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. **Nature**, 416: 763-765, 2002.
- LAMMEL, E.M., et al. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. **Exp. Parasitol.**, 83: 240-249, 1996.
- LANHAM, S.M. Separation of trypanosomes from the bloods of infected rats and mice by anion-exchangers. **Nature**, 218: 1273-1274, 1968.
- \_\_\_\_\_; GODFREY, D.G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. **Exp. Parasitol.**, 28: 521-534, 1970.
- LEGUIZAMÓN, M.S., et al. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of *trans*-Sialidase that inhibit its activity. **Infect. Immun.**, 62(8): 3441-3446, 1994.
- LI, J.; RECHSTEINER, M. Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators. **Biochimie**, 83: 373-383, 2001.
- LOW, H.P.; PAULIN, J.J.; KEITH, C.H. *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblast cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. **J. Protozool.**, 39(4): 463-470, 1992.
- LÖWE, J., et al. Crystal structure of the proteasome from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* at 3.4 Å resolution. **Science**, 268: 533-539, 1995.
- LUPAS, A.; KOSTER, A.J.; BAUMEISTER, W. Structural features of 26S and 20S proteasomes. **Enzyme Protein**, 47: 252-273, 1993.
- \_\_\_\_\_; ZWICKL, P. WENZEL, T.; SEEMÜLLER, E.; BAUMEISTER, W. Structure and function of the 20S proteasome and of its regulatory complexes. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, 60: 515-524, 1995.
- MAKSYMOWYCH, W.P., et al. Invasion by *Salmonella typhimurium* induces increased expression of the LMP, MECL, and PA28 proteasome genes and changes in the peptide repertoire of HLA-B27. **Infect. Immun.**, 66(10): 4624-4632, 1998.
- MARCILLA, M.; CASTRO, J.A.L.; CASTAÑO, J.G.; ALVAREZ, I. Infection with *Salmonella typhimurium* has no effect on the composition and cleavage specificity of the 20S proteasome in human lymphoid cells. **Immunology**, 122: 131-139, 2007.
- MASSON, P., et al. Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear proteasome regulator. **J. Biol. Chem.**, 276(2): 1383-1390, 2001.

- MAYA, J.D., et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp. Biochem. Physiol.**, 146: 601-620, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38(Supl. III): 1-29, 2005.
- MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report. Blood Donor Screening for Chagas Disease – United States, 2006-2007. **Centers for Disease Control and Prevention**, 56: 141-143, 2007.
- MONACO, J.J.; NANDI, D. The genetics of proteasomes and antigen processing. **Ann. Rev. Genetics**, 29: 729-754, 1995.
- MOTT, J.D., et al. PA28, an activator of the 20S proteasome, is composed of two nonidentical but homologous subunits. **J. Biol. Chem.**, 269(16): 31466-31471, 1994.
- MURATA, S., et al. Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28 $\gamma$ . **J. Biol. Chem.**, 274(53): 38211-38215, 1999.
- NAGY, I., et al. The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. **J. Bacteriol.**, 180: 5448-5453, 1998.
- NAKAJIMA-SHIMADA, J., et al. Determination of intracellular calcium concentration of individual host cells infected with *Trypanosoma cruzi* using microfluorimetry in conjunction with digital image processing. **Jpn. J. Parasitol.**, 43(2): 136-139, 1994.
- NANDI, D.; JIANG, H.; MONACO, J.J. Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN- $\gamma$ -inducible proteasome subunit. **J. Immunol.**, 156: 2361-2364, 1996.
- \_\_\_\_\_.; WOODWARD, E.; GINSBURG, D.B.; MONACO, J.J. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor  $\beta$  subunits. **EMBO J.**, 16, 5363-5375, 1997.
- NEISIG, A., et al. Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. **J. Immunol.**, 154: 1273-1279, 1995.
- NICKELL, S.P.; STRYKER, G.A.; AREVALO, C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8<sup>+</sup>, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.**, 150: 1446-1457, 1993.
- O'FARREL, P.Z.; GOODMAN, H.; O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, 12: 1133-1142, 1977.
- OJCIUS, D.M.; GACHELIN, G.; DAUTRY-VARSAT, A. Presentation of antigens derived from microorganisms residing in host-cell vacuoles. **Trends Microbiol.**, 4(2): 53-59, 1996.
- OLIVEIRA, L.C.B., et al. Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4<sup>+</sup> lymphocytes increase *in vivo* susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell. Immunol.**, 170: 41-53, 1996.
- ORLOWSKI, M.; CARDOZO, C.; MICHAED, C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. **Biochem.**, 32: 1563-1572, 1993.

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

ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M.E.A. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. **Cell**, 67: 411-421, 1991.

PALOMBELLA, V.J., et al. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. **Cell**, 78: 773-785, 1994.

PEREIRA, M.C.S., et al. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, 25(4): 559-569, 1993.

PETERS, J-M. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. **TIBS**, 19: 377-382, 1994.

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

PÜHLER, G., et al. Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. **EMBO J.**, 11(4): 1607-1616, 1992.

\_\_\_\_\_; PITZER, F.; ZWICKL, P; BAUMEISTER, W. Proteasomes: multisubunit proteinases common to *Thermoplasma* and eukaryotes. **System. Appl. Microbiol.**, 16: 734-741, 1994.

RAMIREZ, M.I., et al. Involvement of the stage-specific 82 kDa adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infect. Immun.**, 61(9): 3636-3641, 1993.

RAMMENSEE, H.G.; FALK, K.; ROTZSCHKE, O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. **Ann. Rev. Immunol.**, 11: 2130-2144, 1993.

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

RECHSTEINER, M.; HILL, C.P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. **TRENDS Cell Biol.**, 15(1): 27-33, 2005.

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

ROCK, K.L., et al. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell**, 78: 761-771.

\_\_\_\_\_. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. **Immunol. Today**, 17(3): 131-137, 1996.

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

ROSSI, M.A.; RAMOS, S.G. Pathogenesis of Chronic Chagas' Myocarditis: An Overview. **Cardiovasc. Pathol.**, 5(4): 197-202, 1996.

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

- ROTTENBERG, M.E., et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.**, 61(12): 5129-5133, 1993.
- SAEKI Y., et al. Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 293: 986-992, 2002.
- SCHEFFNER, M., et al. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7 - E6 fusion proteins. **EMBO J.**, 11(7): 2425-2431, 1992.
- SEEMÜLLER, E., et al. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A threonine protease. **Science**, 268: 579-582, 1995.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folia Clin. Biol.**, 20: 191-207, 1953.
- SILVA, J.S., et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31(1): 111-115, 1998.
- SILVEIRA, A.C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cad. Saúde Pública**, 16(Sup. 2): 35-42, 2000.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.; VAHIA-LOUREIRO, A.M. O *Trypanosoma cruzi*. In: SIQUEIRA-BATISTA, R.; CORRÊA, A.D.; HUGGINS, D.W. **Moléstia de Chagas**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 40-52, 1996.
- SMITH, L.A.; WRIGHT-KANUTH, M.S. Transfusion – Transmitted Parasites. Focus: Transfusion Risks. **Clin. Lab. Sci.**, 16(4):194-257, 2003.
- SOUZA, M.A. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 78(3): 317-333, 1983.
- STEINDEL, M.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A.J. Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, 37(217): 32-38, 2005.
- STERNBERG, J.M.; MABBOTT, N.A. Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during *Trypanosoma brucei* infection: soluble trypanosome products and interferon- $\gamma$  are synergistic inducers of nitric oxide synthase. **Eur. J. Immunol.**, 26: 539-543, 1996.
- STRYKER, G.A.; NICKEL, S.P. *Trypanosoma cruzi*: exposure of murine cells to live parasites *in vitro* leads to enhanced surface class I MHC expression which is type I interferon-dependent. **Exp. Parasitol.**, 81: 564-573, 1995.
- TANAKA, K.; CHIBA, T. The proteasome: a protein-destroying machine. **Genes Cell**, 3: 499-510, 1998.
- TAMURA, T., et al. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. **Curr. Biol.**, 5: 766-774, 1995.
- TANOWITZ, H.B., et al. Chagas disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, 5(4): 400-419, 1992.
- TARLETON, R.L., et al. Susceptibility of  $\beta$ 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, 356: 338-340, 1992.
- \_\_\_\_\_, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int. Immunol.**, 8(1): 13-22, 1996.

\_\_\_\_\_; ZHANG, L.; DOWNS, M.O. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 3932-3937, 1997.

\_\_\_\_\_. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Op. Immunol.**, 19: 430-434, 2007.

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

TSUKIHARA, T. Laboratory of protein crystallography. Institute for protein research. Osaka University. Disponível em: <<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/crystallography>>. Acesso em 13 maio 2006.

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

USTRELL, V., et al. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. **EMBO J.**, 21(13): 3516-3525, 2002.

\_\_\_\_\_; REALINI, C.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. Human lymphoblast and erythrocyte multicatalytic proteases: differential peptidase activities and responses to the 11S regulator. **FEBS Lett.**, 376: 155-158, 1995.

VERDOT, L., et al. Cystatins up-regulate nitric oxide release from interferon- $\gamma$ -activated mouse peritoneal macrophages. **J. Biol. Chem.**, 271(45): 28077-28081, 1996.

VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M.N.L. Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma cruzi*-Host cell interaction: Possible biological model – a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89(1): 69-79, 1994.

VOGES, D.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Ann. Rev. Biochem.**, 68: 1015-1068, 1999.

WEISSMAN, J.S.; SIGLER, P.B.; HORWICH, A.L. From the cradle to the grave: ring complexes in the life of a protein. **Science**, 268: 523-524, 1995.

WEISSMAN, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 2: 169-178, 2001.

WENZEL, T.; BAUMEISTER, W. *Thermoplasma acidophilum* proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins. **FEBS Lett.**, 326: 215-218, 1993.

WHO - World Health Organization. TDR - Tropical Disease Research: progress 2003-2004. Seventeenth programme report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 1-98, Geneva, 2005.

WILK, S.; CHEN, W.; MAGNUSSON, R.P. Properties of the nuclear proteasome activator PA28 $\gamma$  (REG $\gamma$ ). **Arch. Biochem. Biophys.**, 383(2): 265-271, 2000.

WILKOWSKY, S.E.; WAINSELBAUM, M.J.; ISOLA, E.L.D. *Trypanosoma cruzi*: Participation of intracellular Ca<sup>2+</sup> during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 222: 386-389, 1996.

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

YAFFE, D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 61: 447-483, 1968.

YANG, Y., et al. Proteasomes are regulated by interferon- $\gamma$ : Implications for antigen processing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 4928-4932, 1992.

\_\_\_\_\_; FRÜH, K.; AHN, K.; PETERSON, P.A. *In vivo* assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. **J. Biol. Chem.**, 270(46): 27687-27694, 1995.

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

YEWDELL, J., et al. MHC-encoded proteasome subunits LMP2 and LMP7 are not required for efficient antigen presentation. **J. Immunol.**, 152: 1163-1169, 1994.

YOSHIDA, N., et al. *Trypanosoma cruzi*: Antibody production and T cell response induced by stage-specific surface glycoproteins purified from metacyclic trypomastigotes. **Exp. Parasitol.**, 77: 405-413, 1993.

ZÜHL, F., et al. Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome. **FEBS Lett.**, 400: 83-90, 1997a.

\_\_\_\_\_; SEEMÜLLER, E.; GOLBIK, R.; BAUMEISTER, W. Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome. **FEBS Lett.**, 418: 189-194, 1997b.

ZWICKL, P., et al. Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function and evolution of the multicatalytic proteinase. **Biochem.**, 31: 964-972, 1992.

\_\_\_\_\_; KLEINZ, J.; BAUMEISTER, W. Critical elements in proteasome assembly. **Struct. Biol.**, 1(11): 765-770, 1994.