

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Pós-Graduação em Biociências**

Carla Vanessa de Paula Lima

Ubiquitinoma quantitativo durante a metaciclogênese de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Instituto Carlos Chagas como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Biociências

**Orientador (es):** Prof. Dr. Fabricio Klerynton Marchini  
Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

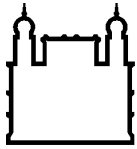
**CURITIBA/PR**

2014

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O modelo de estudo – <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.1.1 Aspectos Gerais .....	1
1.1.2 Aspectos Morfológicos.....	2
1.1.3 Ciclo de vida.....	7
1.1.3 Doença de Chagas .....	9
1.1.4 Métodos de cultivo e diferenciação <i>in vitro</i> .....	11
1.1.5 Organização genômica e expressão gênica .....	12
1.2 Modificações pós-traducionais por proteínas sinalizadoras .....	15
1.2.1 Proteínas modificadoras .....	15
1.2.2 Processo de modificação por ubiquitina.....	18
1.2.3 Componentes da via de ubiquitinação .....	22
1.2.5 Proteassomo.....	30
1.2.6 Identificação de substratos ubiquitinados (ubiquitinoma).....	32
1.2.7 Ubiquitinação em tripanossomatídeos.....	34
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Soluções e tampões.....	38
3.2 Organismos.....	41
3.3 Confecção de meios de cultura tradicionais .....	41
3.4 Confecção de meios quimicamente definidos para cultivo de <i>T. cruzi</i> .....	42
3.5 Manipulação de bactérias cálcio competentes.....	45
3.6 Amplificação e clonagem do gene de ubiquitina de <i>T. cruzi</i> para expressão em bactérias .....	46
3.7 Expressão e Purificação de Ub recombinante em <i>E. coli</i> .....	50
3.8 Produção de anticorpos policlonais contra Ub .....	54
3.9 Análise metabolômica de <i>T. cruzi</i> .....	56
3.10 Cultivo e diferenciação de <i>T. cruzi</i> .....	56

3.11	Curvas de crescimento.....	58
3.12	Preparo de células para análises em microscopia óptica e eletrônica de transmissão .....	58
3.13	Preparo de amostras para proteômica.....	59
3.14	Marcação isotópica estável por aminoácidos em cultivo celular (SILAC) .....	63
3.15	Enriquecimento de alvos ubiquitinados.....	64
3.16	Enriquecimento de proteínas que interagem com ubiquitina .....	67
3.17	Análise em espectrometria de massas .....	68
3.18	Análise dos dados gerados.....	69
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	71
4.1	Amplificação e clonagem de Ub .....	71
4.2	Expressão e purificação de Ub recombinante e produção de soro anti-Ub.....	72
4.3	Confecção de meio quimicamente definido para cultivo de <i>T. cruzi</i> .....	78
4.4	Metabolômica de <i>T. cruzi</i> .....	91
4.5	Estabelecimento do método SILAC .....	96
4.6	Proteômica quantitativa de <i>T. cruzi</i> .....	103
4.7	Enriquecimento, identificação e quantificação de proteínas ubiquitinadas.....	121
4.8	Identificação de proteínas que interagem com Ub .....	131
5.	CONCLUSÕES .....	137
6.	REFERÊNCIAS .....	138



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

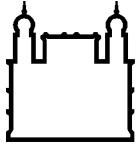
### Ubiquitinoma Quantitativo da Metaciclologênese de *Trypanosoma cruzi*

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

**Carla Vanessa de Paula Lima**

O *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da Doença de Chagas, alterna entre formas morfológica e fisiologicamente distintas durante seu ciclo de vida. Devido à ausência de mecanismos de controle transcricionais, a regulação da expressão gênica neste parasita acontece principalmente a nível pós-transcricional. Esta regulação pode acontecer a nível protéico através da modulação da quantidade, atividade e localização sub-celular de proteínas estágio-específicas. Abordagens baseadas em proteômica quantitativa em larga escala são extremamente úteis para estudar alterações globais na expressão de proteínas em *T. cruzi* durante sua diferenciação, uma vez que muitos genes que não apresentam variações no nível de mRNA acabam por apresentar expressão diferencial nos níveis proteicos. A metodologia de marcação isotópica estável por aminoácidos (SILAC) gera uma quantificação protéica de alta acurácia e têm sido aplicada com sucesso em análises comparativas de diversos tipos celulares. No presente trabalho, desenvolvemos um meio quimicamente definido para o cultivo de *T. cruzi*, o que possibilitou a aplicação da metodologia SILAC para realizar a quantificação de proteínas em larga escala ao longo da diferenciação do parasita para formas infectivas (metaciclologênese). Além disso, usando o meio definido para cultivo de *T. cruzi*, foi possível realizar uma análise metabolômica baseada em espectrometria de massas para medir o consumo e a produção de componentes no meio pelo parasita. No presente trabalho, mais de 3000 proteínas foram identificadas e quantificadas com sucesso em diferentes etapas da diferenciação do parasita, tornando possível a identificação de quase 500 proteínas reguladas durante o processo. Também foram identificados 138 sítios de ubiquitinação em 107 proteínas, com algumas delas sendo reguladas durante o processo de diferenciação.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

### **Quantitative Ubiquitinome of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis**

#### **ABSTRACT**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Carla Vanessa de Paula Lima**

*Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, alternate between distinct morphological and functional forms during its life cycle. In *T. cruzi* due to the lack of transcriptional control mechanisms, gene expression is mainly post-transcriptionally regulated. This regulation may occur at protein level by modulation of amount, activity, and sub-cellular localization of stage-specific proteins. Quantitative proteomics-based approaches are extremely useful to study global protein expression changes in *T. cruzi* during its differentiation, once many genes showing no variation at total mRNA level, still may present differential expression at protein level. The stable isotope labeling by amino acids (SILAC) method yields highly accurate protein quantification and has been successfully applied to perform comparative analysis of biological systems. In this work we developed a chemically defined medium for *T. cruzi* growth, which allows the use of SILAC methodology to perform high accuracy large-scale protein quantification from initial points of this protozoan differentiation to its infective forms. Besides, using defined media for *T. cruzi* cultivation we were able to perform mass spectrometry-based metabolomics to measure consumption and production of medium components by the parasite. In the present work, more than 3 000 proteins were successfully identified and quantified at different stages of parasites differentiation, making possible to identify almost 500 regulated proteins during the process. We also identified 138 ubiquitination sites in 107 proteins, with some regulations during the differentiation process.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1 Representação de uma célula epimastigota de <i>T. cruzi</i> .....	2
Figura 1.2 Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> . ....	6
Figura 1.3 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	8
Figura 1.4 Distribuição mundial da Doença de Chagas. ....	10
Figura 1.5 Processamento do pré-RNA policistrônico.....	14
Figura 1.6. Representação da estrutura da família de Ub/Ub-like.....	17
Figura 1.7. O processo de modificação de proteínas por pequenas proteínas Ub e Ub-like. ...	19
Figura 1.8 Ligação isopeptídica entre ubiquitina: formação de cadeias poli-Ub. ....	20
Figura 1.9 Cadeias de poli-Ub heterogêneas. ....	21
Figura 1.10 Estrutura do proteassomo 26S.....	31
Figura 1.11 Estratégia para identificação do sítio específico di-glicina após digestão por tripsina em MS. ....	33
Figura 1.12 Alinhamento múltiplo da sequência de Ub de diferentes eucariotos. ....	34
Figura 3.1 Sequência nucleotídica da Ub de <i>T. cruzi</i> . ....	47
Figura 3.2 Desenho dos vetores de clonagem e expressão em <i>E. coli</i> . ....	49
Figura 3.3 Ilustração do método de preparo das <i>Stage-tips</i> .....	62
Figura 4.1.1 Amplificações do gene para Ub e purificação do produto de amplificação.....	71
Figura 4.1.2 PCR de plasmídeo para confirmação da inserção do gene nos vetores de interesse pDONR221 e pDEST17.....	72
Figura 4.2.1 Expressão de Ub recombinante em bactérias <i>E. coli</i> Tuner.....	73
Figura 4.2.2 Purificação de Ub recombinante em fração solúvel.....	74
Figura 4.2.3 Purificação e renaturação de Ub recombinante em corpos de inclusão solubilizados com uréia.....	75
Figura 4.2.4 Teste de soro pré-imune.....	76
Figura 4.2.5 Tese de soro pós-imunizações com Ub recombinante.....	77
Figura 4.2.6 Ensaio de inibição de proteassomo e DUBs.....	78
Figura 4.3.1 Morfologia de células epimastigotas cultivadas em meio AR-103.....	80
Figura 4.3.2 Avaliação do crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meio semi-definido.....	81
Figura 4.3.3 Avaliação do crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meios definidos e semi-definidos.....	82
Figura 4.3.4 Avaliação do efeito da Putrescina no crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meios definidos e semi-definidos.....	84

Figura 4.3.5 Avaliação do efeito da Biopterina no crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meios definidos e semi-definidos com ou sem Putrescina.....	86
Figura 4.3.6 Curva de crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> em meios definidos e complexos.....	87
Figura 4.3.7 Comparação da taxa de diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos de culturas provenientes de diferentes meios.....	88
Figura 4.3.8 Morfologia do parasita em diferentes estágios da diferenciação.....	89
Figura 4.3.9 Morfologia ultraestrutural de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em diferentes meios.....	90
Figura 4.3.10 Avaliação do crescimento de diferentes linhagens de <i>T. cruzi</i> em meio definido LM14.....	91
Figura 4.4.1 Análise metabolômica de células de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio definido HX25M+P.....	93
Figura 4.4.2 Relação entre o consumo de Uridina e Citidina e a produção de Uracila.....	95
Figura 4.5.1 Representação da incorporação de aminoácidos marcados no proteoma.....	97
Figura 4.5.2 Visão global do método SILAC.....	98
Figura 4.5.3 Titulação de K e R em cultivo de <i>T. cruzi</i> em meio definido.....	99
Figura 4.5.4 Ensaio de marcação metabólica do proteoma de <i>T. cruzi</i> por aminoácidos pesados.....	100
Figura 4.5.5 Ensaio de marcação metabólica do proteoma de <i>T. cruzi</i> por aminoácidos pesados em meio definido e verificação da compatibilidade do SFBd com a metodologia SILAC para o parasita.....	101
Figura 4.5.6 Teste de incorporação de K8 e R6 em proteínas de <i>T. cruzi</i> .....	103
Figura 4.6.1 Correlação entre as intensidades das duas réplicas para as proteínas leves e pesadas.....	104
Figura 4.6.2 Agrupamento de proteínas pelo perfil de expressão em epimastigotas cultivados em LITB+SFB e LM14.....	105
Figura 4.6.3 Correlação entre as intensidades das proteínas leves e pesadas.....	108
Figura 4.6.4 Correlação entre as razões das intensidades das proteínas leves e pesadas de diferentes fases da metacicloênese.....	109
Figura 4.6.5 Agrupamento da proteínas de <i>T. cruzi</i> diferencialmente expressas ao longo da metacicloênese.....	110
Figura 4.6.6 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas estressadas.....	112

Figura 4.6.7 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas aderidas por 12 horas.....	113
Figura 4.6.8 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas aderidas por 48 horas.....	116
Figura 4.6.9 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas tripomastigotas metacíclicas.....	118
Figura 4.7.1 Enriquecimento de proteínas ubiquitinadas de <i>T. cruzi</i> por imunoprecipitação de Ub.....	122
Figura 4.7.2 Perfil da modificação por ubiquitinação em proteínas ao longo da diferenciação de <i>T. cruzi</i> .....	130
Figura 4.7.3 Modulação dos tipos de cadeias de poliubiquitinas durante a metaciclogênese.....	131
Figura 4.8.1 Perfil eletroforético do resultado da cromatografia de afinidade à Ub recombinante.....	132
Figura 4.8.2 Cromatograma das proteínas que interagem com Ub em resina de interação hidrofóbica.....	133
Figura 4.8.3 Cromatograma das proteínas que interagem com Ub em resina de troca iônica.....	133
Figura 4.8.4 Representação esquemática de dois exemplos de ubiquitinação acoplada.....	136



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Ub- <i>like</i> conhecidas em humanos. ....	16
Tabela 1.2 Os domínios ligadores de ubiquitina (UBD) e suas funções. ....	29
Tabela 3.1 Composição de meios definidos. ....	42
Tabela 3.2 Características dos iniciadores desenhados para clonagem de Ub na plataforma Gateway.....	47
Tabela 3.3 Soluções e quantidades para preparo de gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	52
Tabela 3.4 Parâmetros selecionados no algoritmo MaxQuant. ....	69
Tabela 4.1 Proteínas/sítios ubiquitinados identificados em IP de Ub.....	123
Tabela 4.2 Sítios modificados por Ub em proteínas com função conhecida de <i>T. cruzi</i> .....	124
Tabela 4.3 Sítios modificados por Ub em proteínas hipotéticas de <i>T. cruzi</i> .....	126
Tabela 4.4 Lista das proteínas que possuem afinidade à Ub e modificadas pela mesma.....	135

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O modelo de estudo – *Trypanosoma cruzi*

O ano de 1909 foi marcado pelo anúncio de uma descoberta bastante relevante para a biologia e medicina no Brasil. Foi o ano em que Carlos Chagas publicou um artigo anunciando a identificação do protozoário *Trypanosoma cruzi*, o qual habitava o intestino de um inseto triatomíneo, subfamília de insetos hematófagos, e a associação dos mesmos com uma nova tripanossomíase humana chamada então de Doença de Chagas (CHAGAS, 1909).

O *T. cruzi* é um organismo bastante estudado principalmente por ser patogênico, mas existem outras características muito importantes que fazem deste parasita um interessante modelo de estudo: seu ciclo de vida é bastante complexo, alternando entre formas replicativas e infectivas; a regulação da expressão gênica se dá essencialmente a nível pós-transcricional, entre diversas outras peculiaridades que serão abordadas com mais detalhes ao longo desta introdução.

### 1.1.1 Aspectos Gerais

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado membro da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*. Este organismo tem sido foco de diversos estudos, pois, além de ser o agente causador da Doença de Chagas, ele pertence a um dos grupos mais antigos dos eucariotos – Euglenozoa –, tornando-se um excelente modelo parasitário de estudo.

A família *Trypanosomatidae* inclui diversos gêneros importantes, como *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas* e *Trypanosoma*. O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes por incluir diversas espécies causadoras de doenças humanas, como o *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas), *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense* (Doença do Sono), e doenças animais de interesse humano, como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum*.

O gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos, de acordo com sua forma de desenvolvimento no interior do hospedeiro:

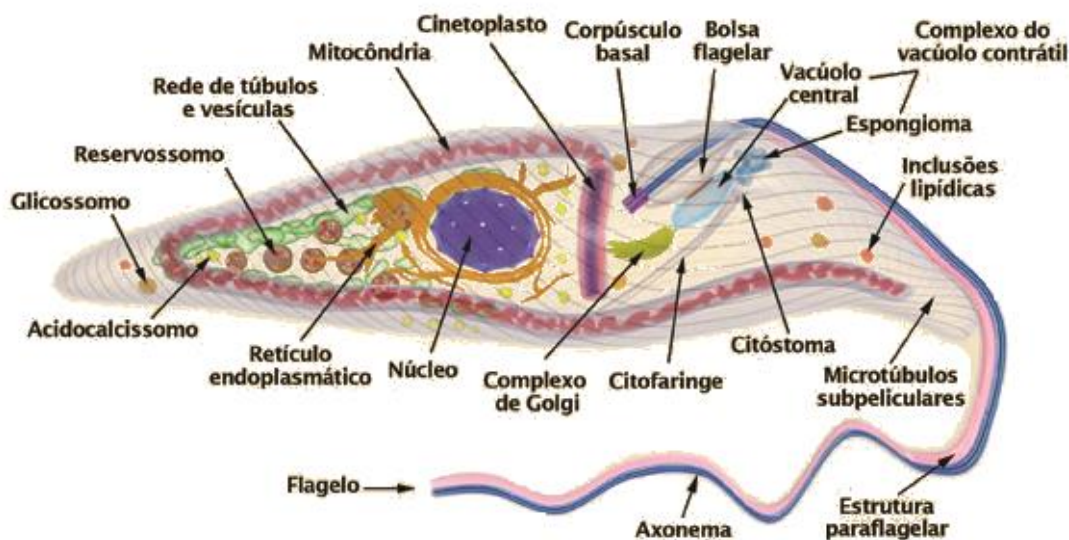
- Stercoraria, que inclui parasitas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progridem através do trato e são liberados através da excreção intestinal, como é o caso do *Trypanosoma cruzi*;

- Salivaria, que inclui parasitas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo do vetor, mas que posteriormente atravessam o epitélio, se deslocando para as glândulas salivares, nas quais as formas infectivas ficam disponíveis para serem transmitidas pela inoculação mecânica, como é o caso do *Trypanosoma brucei* e *T. rangeli*, por exemplo.

O *T. cruzi* é uma espécie altamente polimórfica, formada por múltiplas linhas clonais. A diversidade genética, bioquímica e biológica entre as linhagens deste parasita tem sido reconhecida há tempos (BRISSE; DUJARDIN; TIBAYRENC, 2000; LEWIS et al., 2009; MACEDO; PENA, 1998). Ao longo dos anos, várias abordagens foram utilizadas para separar a população de *T. cruzi* em diferentes grupos, inicialmente como TcI (ciclo silvestre) e TcII (ciclo doméstico) (BRIONES et al., 1999). Recentemente, Zingales e colaboradores reorganizaram a nomenclatura como TcI-TcVI (ZINGALES et al., 2009).

### 1.1.2 Aspectos Morfológicos

A figura 1.1 representa uma célula de *T. cruzi* na forma epimastigota. Nela estão apontadas as principais estruturas celulares do parasita.



**Figura 1.1** Representação de uma célula epimastigota de *T. cruzi*.

Modificado de (“Organização estrutural - Atlas Didático - O ciclo de vida do Trypanosoma cruzi - LabSpace - The Open University,”)

O *T. cruzi* apresenta organelas comuns a todos os eucariotos, como retículo endoplasmático e complexo de golgi, e outras organelas peculiares da família. Serão descritas abaixo algumas organelas que possuem características interessantes neste parasita.

## Núcleo

O núcleo do *T. cruzi* apresenta uma organização estrutural similar à de outras células eucarióticas. Seu tamanho é relativamente pequeno, medindo cerca de 2,5 µm, sendo que sua forma difere entre as diferentes formas do parasita (SOUZA, 2002).

O núcleo apresenta-se esférico, com um nucléolo grande e pequenas quantidades de heterocromatina, nas formas replicativas epimastigota e amastigota. Nas formas metacíclicas, o nucléolo desaparece e o núcleo, agora alongado, está repleto de heterocromatina. Os níveis de compactação da cromatina, observados ao longo do ciclo celular do *T. cruzi*, estão associados aos padrões de transcrição. Assim, em tripomastigotas são observados os níveis mais elevados de compactação da cromatina e mais reduzidos de transcrição (ELIAS et al., 2001)

## Mitocôndria e Cinetoplasto

O *T. cruzi*, assim como outros membros da família *Trypanosomatidae*, possui apenas uma mitocôndria que se estende por todo o corpo celular. O DNA mitocondrial (kDNA), que no caso dos tripanosomatídeos pode chegar a 30% do DNA total, está localizado em uma região específica denominada cinetoplasto, característica dos organismos da ordem *Kinetoplastida*.

O cinetoplasto das formas epimastigota e amastigota de *T. cruzi* apresentam morfologia similar. O material está arranjado como um bastão levemente curvado, orientado paralelamente ao eixo longitudinal do protozoário e localizado na região anterior ao núcleo. Já nas formas tripomastigotas o cinetoplasto é arredondado e migra para a região posterior ao núcleo (MEYER; DE SOUZA, 1976).

O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares, os minicírculos e maxicírculos, que são topologicamente concatenados formando uma rede na matriz mitocondrial. Minicírculos codificam pequenos RNAs-guia envolvidos no processo de edição de RNA, enquanto os maxicírculos codificam rRNAs e proteínas mitocondriais (MORRIS et al., 2001).

## Citóstoma

O Citóstoma é a principal característica que separa o sub-gênero *Schyzotrypanum*, *T. cruzi* entre eles, dos demais trypanosomatídeos.

As formas epimastigota e amastigota apresentam uma profunda invaginação da membrana plasmática em forma de funil, estendendo-se até a região próxima ao núcleo e

formando uma estrutura denominada complexo citóstoma-citofaringe. Este complexo desempenha papel importante no processo de endocitose, visando à captação de macromoléculas do meio. Ao penetrarem na abertura do citóstoma, as macromoléculas seguem pela citofaringe, onde são internalizadas em vesículas endocíticas que irão fundir com uma rede de túbulos e vesículas e, posteriormente, irão se fundir com os reservossomos (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009).

### Bolsa Flagelar

Todos os tripanossomatídeos apresentam uma região conhecida como bolsa flagelar, uma depressão encontrada na região anterior da célula, de onde emerge o flagelo. Ela é formada por uma invaginação da membrana plasmática que estabelece continuidade direta com a membrana do flagelo. Devido ao fato de a membrana do corpo celular e a membrana do flagelo se tocarem no ponto de emergência do flagelo, a bolsa pode ser considerada um compartimento extracelular especial, de certo modo isolado do meio extracelular. Na verdade, o uso de marcadores citoquímicos tem mostrado que macromoléculas e grandes partículas adicionadas ao meio de cultura podem ser excluídas da bolsa. Estudos morfológicos e citoquímicos mostraram que a junção estabelecida entre as duas membranas lembra um hemidesmossoma, já que a agregação de partículas intramembranas, como se vê em réplicas de criofratura, e a presença de material denso abaixo da membrana (SOUTO-PADRÓN; DE SOUZA, 1979) foram observadas.

A bolsa flagelar é uma região altamente especializada da superfície de tripanossomatídeos, ela é a única região que não apresenta a camada de microtúbulos, conhecidos como microtúbulos sub-peliculares, associados à membrana plasmática (WEBSTER; RUSSELL, 1993).

Esta região é um importante sítio de endocitose e exocitose em tripanossomatídeos, apesar de, na forma epimastigota de *T. cruzi*, o citóstoma ser o principal sítio de atividade endocítica (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009)

### Flagelo

O flagelo de *T. cruzi* tem estrutura básica similar a outros flagelos, exibindo um padrão 9 de microtúbulos periféricos e 2 centrais no axonema. Os amastigotas de *T. cruzi* têm um flagelo curto, com cerca de 1 µm de comprimento. Entretanto, no fim do ciclo intracelular, o parasita se alonga e o flagelo também cresce até cerca de 20 µm.

O flagelo encontra-se intimamente associado ao corpúsculo basal, à membrana mitocondrial externa e ao cinetoplasto. Desta forma, quando ocorre a diferenciação para formas tripomastigotas, onde o cinetoplasto migra para a região posterior ao núcleo, a base do flagelo migra juntamente, seguindo aderido ao corpo do parasita, numa região denominada zona de adesão flagelar, e torna-se livre na região anterior (DE SOUZA; MARTÍNEZ-PALOMO; GONZÁLEZ-ROBLES, 1978).

### Reservossomo

Cada epimastigota apresenta vários reservossomos, localizados principalmente na região posterior da célula. Apesar de sua morfologia poder variar com as condições e a cepa do parasito, geralmente eles são organelas esféricas com diâmetro médio de 0,7 µm, cercadas por uma unidade de membrana. A matriz do reservossomo é ligeiramente densa e apresenta inclusões eletrolucidas. Estudos citoquímicos mostraram que a matriz é feita principalmente de proteínas e as inclusões contêm lipídios (DE SOUZA, 1984).

A organela foi denominada reservossomo porque todas as macromoléculas ingeridas pelo parasita através de um processo endocítico acumulam-se nela. Ela desaparece gradualmente quando epimastigotas são incubados em meio pobre, condição que dispara o processo de transformação de epimastigotas não infectivos em formas tripomastigotas infectivas (BONALDO et al., 1988).

Uma característica dos reservossomos em *T. cruzi* é acumular grandes quantidades de cruzipaina, a cisteína protease majoritária na célula (CAZZULO; STOKA; TURK, 1997).

Em geral esta organela tem função de armazenamento, reciclagem e funções típicas de lisossomos, como a degradação de macromoléculas. As formas amastigota e tripomastigota, apesar de não apresentarem um reservossomo típico, também apresentam organelas relacionadas à lisossomos, denominadas reservossomo-like.

### Glicossomo

No interior desta estrutura reside uma grande quantidade de proteínas básicas, enzimas da via glicolítica localizadas na organela que apresentam um ponto isoelétrico alcalino, diferindo-as daquelas encontradas na matriz citoplasmática de células eucarióticas. Com base nos dados disponíveis podemos considerar o glicossomo como um tipo especializado de peroxissomo existente em membros da ordem Kinetoplastida.

Isolando os componentes da via glicolítica em um compartimento como o glicossomo possibilita que os parasitas tripanosomatídeos rapidamente alternem entre a glicólise aeróbica

e anaeróbica, uma vez que vivem em ambientes ricos em glicose em ambientes com baixo nível de oxigênio (MICHELS et al., 2006).

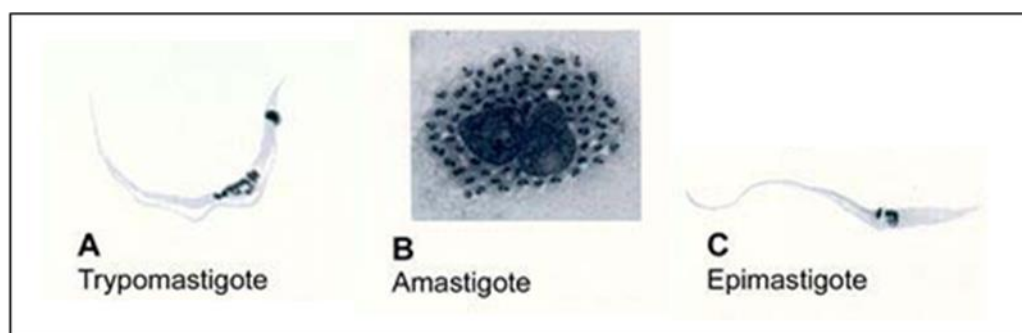
### Acidocalcisoma

Os acidocalcissomos são organelas com interior ácido, que atuam no armazenamento de cálcio e fósforo, manutenção da homeostasia intracelular, pH e osmorregulação.

Estudos por microscopia eletrônica mostram que as formas amastigotas do *T. cruzi* apresentam um número bem maior destas estruturas do que epimastigotas e tripomastigotas. Esta observação é de grande interesse uma vez que a forma amastigota vive em um ambiente intracelular onde normalmente a concentração de  $Ca^{2+}$  é baixa. Logo o parasita desenvolveu um mecanismo especial de acumulação de cálcio em uma estrutura especializada (MIRANDA et al., 2000).

### Formas evolutivas do *T. cruzi*

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, diversas alterações morfológicas são observadas, podendo facilmente diferenciá-lo em 3 formas evolutivas (Figura 1.2):



**Figura 1.2 Formas evolutivas do *T. cruzi*.**

Em (A) a forma infectiva, não replicativa, tripomastigota; em (B) as formas intracelulares replicativa, amastigotas; em (C) as formas replicativas, não infectivas, epimastigotas. Modificado de (SOUZA, 2002)

- As formas tripomastigotas (Fig.1.2A) têm um comprimento de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  e um diâmetro de cerca de 2  $\mu\text{m}$ . O cinetoplasto está localizado na região posterior ao núcleo. Estas formas não possuem capacidade de divisão, mas são as formas infectivas clássicas. São conhecidas as formas tripomastigotas metacíclicas que são encontradas nas fezes do inseto vetor, e tripomastigotas sanguíneas que não encontradas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado.

- As formas amastigotas (Fig.1.2B) apresentam uma morfologia arredondada, e um flagelo bastante reduzido. É encontrada no interior celular dos hospedeiros mamíferos,

tendo capacidade replicativa, podendo ser também liberada na circulação sanguínea ao ocorrer a lise celular. Estudos realizados com formas amastigotas de diferentes origens mostraram que elas também são infectivas para células de vertebrados (CRUZ et al., 2012; DE CARVALHO; DE SOUZA, 1986; LEY et al., 1988) e, portanto, na situação de lise celular, podem infectar novas células.

- As formas epimastigotas (Fig.1.2C) apresentam uma morfologia fusiforme, medindo entre 20 e 40 µm de comprimento. O cinetoplasto é anterior ao núcleo. São células encontradas no intestino do inseto vetor, capazes de se dividir, porém não tem capacidade infectiva.

### 1.1.3 Ciclo de vida

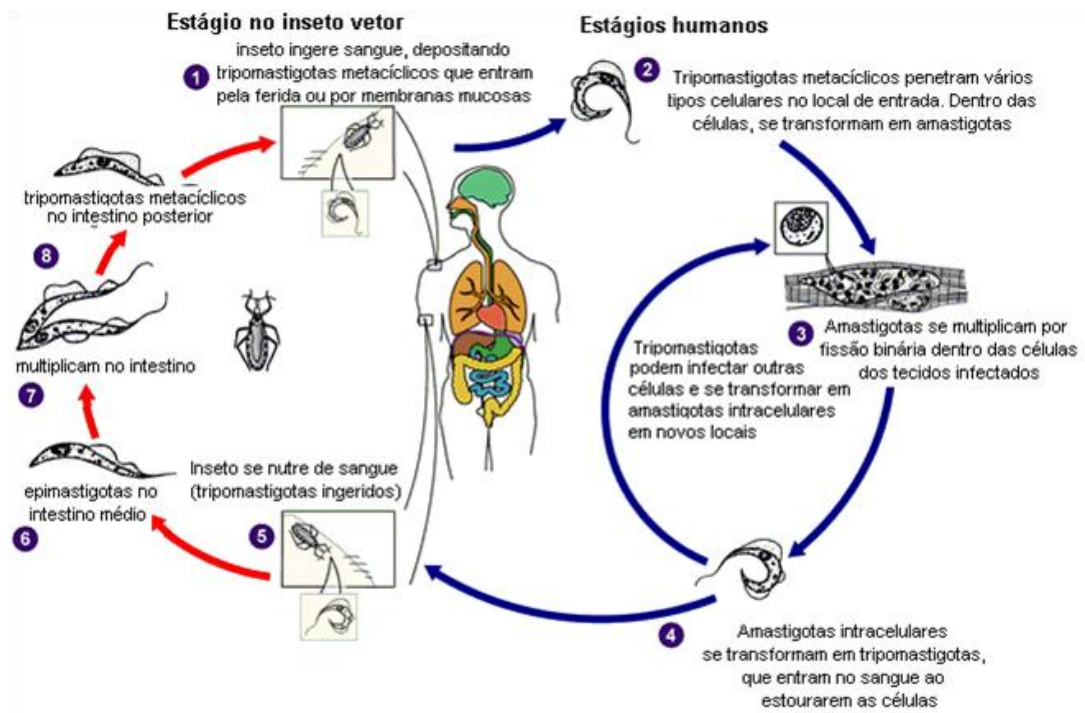
O *T. cruzi* habita dois hospedeiros, um inseto e um mamífero. Este protozoário possui um ciclo de vida complexo, caracterizado pela alternância entre formas replicativas e infectivas que variam de acordo com estímulos recebidos dos diferentes microambientes habitados (Figura 1).

O ciclo de vida deste organismo pode ser classificado em silvestre, peridomiciliar e domiciliar, conforme os hábitos de seus hospedeiros. No ciclo silvestre, o *T. cruzi* circula entre triatomas e reservatórios silvestres, como roedores, marsupiais e outros animais silvestres (BARRETO, 1979).

O ciclo domiciliar depende de muitos fatores ecológicos e antropológicos, mas em grande parte ocorre devido ao deslocamento de colônias de insetos vetores de seus ambientes naturais para o ambiente doméstico, tais como fendas de construções de barro principalmente em áreas rurais, fazendo do homem um reservatório natural do *T. cruzi* (BARRETO, 1979).

O ciclo peridomiciliar ocorre devido à livre circulação, nas residências, de mamíferos como roedores, cães, gatos e marsupiais e também pela atração de triatomíneos silvestres às casas pela luz e alimento. Deste modo, há uma dinâmica interação entre os ciclos silvestre e doméstico.





**Figura 1.3 Ciclo de vida do *T. cruzi***  
 Modificado de (“CDC - DPDx - Trypanosomiasis, American,”)

No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico do *T. cruzi* se inicia no repasto sanguíneo com a ingestão de tripomastigotas presentes no sangue do mamífero infectado do qual o inseto está se alimentando. Após alguns dias as formas tripomastigotas ingeridas diferenciam-se em formas epimastigotas no estômago do inseto vetor, estas por sua vez migram para o intestino médio e se multiplicam por fissão binária. A intensa replicação de epimastigotas resulta no aumento significativo da população de parasitas no intestino do inseto e, como consequência, diminui a disponibilidade de nutrientes. Tais condições levam ao estresse do parasita, que faz os mesmos se aderirem ao epitélio do intestino posterior do triatomíneo para então se diferenciarem nas formas tripomastigotas metacíclicas. Durante seu novo repasto sanguíneo, o barbeiro elimina juntamente com as fezes algumas formas epimastigotas não diferenciadas e as formas tripomastigotas metacíclicas que, em contato com ferimentos - como o da picada do inseto - ou com a mucosa do mamífero, levam à infecção do mesmo (DE SOUZA, 1984; TYLER; ENGMAN, 2001). O processo de diferenciação de formas epimastigotas replicativas para tripomastigotas metacíclicas infectivas é conhecido por metaciclogênese.

As formas metacíclicas acabam por penetrar a célula hospedeira, formando o vacúolo parasitário onde se inicia a diferenciação em formas amastigotas, que rompem o vacúolo e se proliferam no citoplasma da célula, este processo é conhecido como amastigogênese. A grande densidade intracelular de parasitas leva a uma nova diferenciação, desta vez para

formas tripomastigotas sanguíneas, as quais rompem a célula e são liberadas no sangue, juntamente com formas intermediárias e amastigotas, onde podem invadir novas células ou serem ingeridas pelo barbeiro em seu repasto sanguíneo, fechando o ciclo (DE SOUZA, 1984; TYLER; ENGMAN, 2001).

A metacicloênese e a amastigogênese podem ser reproduzidas *in vitro* (CONTRERAS et al., 1985, 2002), o que possibilita o estudo das formas intermediárias nas diferentes fases de diferenciação. As notáveis modificações morfológicas, metabólicas e comportamentais do *T. cruzi* durante a metacicloênese, fizeram desse processo um modelo escolhido para ser estudado por nossa equipe no Instituto Carlos Chagas – ICC –, uma vez que o estudo dos mecanismos envolvidos na diferenciação, sobretudo para formas infectivas, pode contribuir para o controle da doença e de sua transmissão.

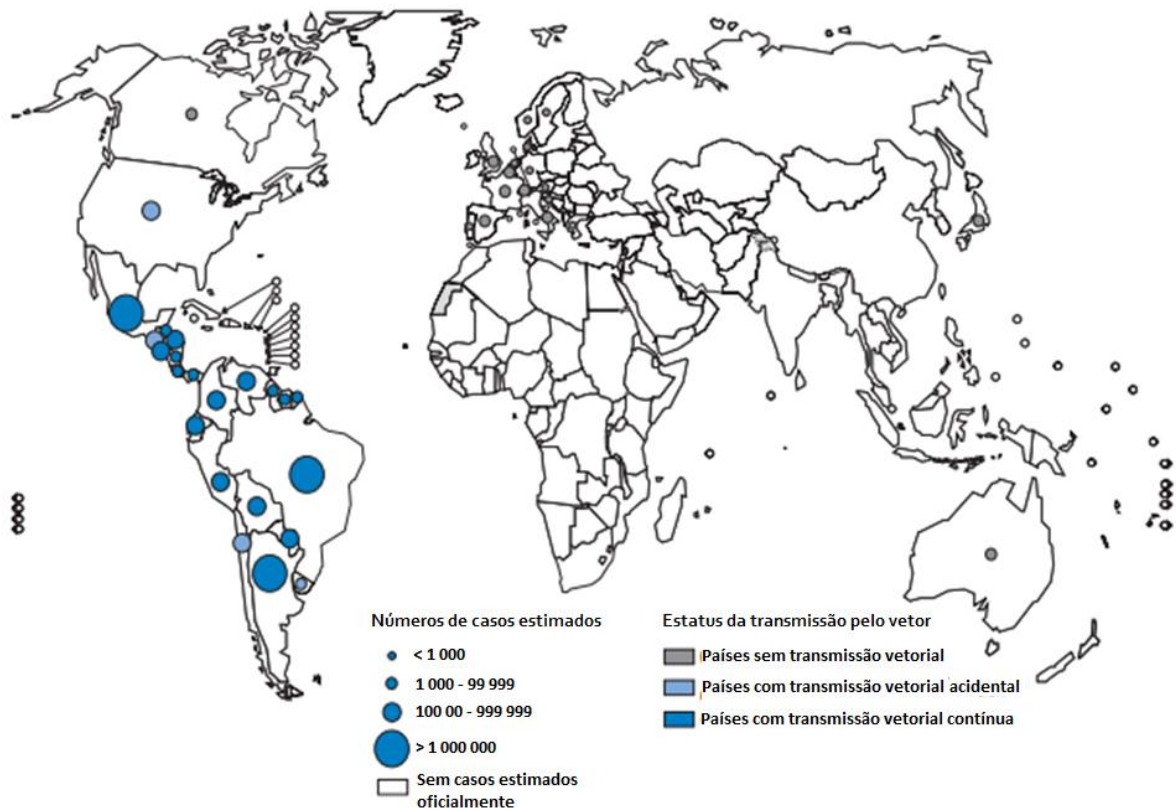
### 1.1.3 Doença de Chagas

A infecção pelo *T. cruzi* em humanos dá origem à Doença de Chagas, enfermidade que ainda acomete aproximadamente 10 milhões de pessoas, principalmente em áreas endêmicas na América Latina (WHO, 2010).

A forma natural de transmissão se dá através do contato com as fezes contaminadas de triatomíneos, insetos hematófagos popularmente conhecidos como barbeiros. Durante o repasto sanguíneo o inseto contaminado libera as formas infectivas do parasita, as quais em contato com alguma descontinuidade da pele (como a própria picada do inseto) ou mucosas, invadem as células do hospedeiro, iniciando a infecção (DIAS, 1934).

Diversas medidas foram tomadas na tentativa de diminuir a população das principais espécies de vetores domiciliares da doença: *Triatoma infestans* e *Rhodnius Prolixus*, o que resultou na diminuição desta forma de transmissão em diversos países da América Latina (PAHO, 2011, 2012). Porém, outras espécies de triatomíneos, antes considerados secundários na transmissão, são vetores bastante eficientes e capazes de migrar para o ciclo doméstico com facilidade (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

Além disso, outras formas não convencionais de transmissão tornaram-se conhecidas. A transmissão por transfusão sanguínea ganhou grande importância epidemiológica após a migração de indivíduos infectados de países endêmicos para países mais desenvolvidos como Canadá, Estados Unidos e países da Europa (Fig 1.4) (SCHMUNIS; YADON, 2010). Apenas o Brasil, Uruguai e Chile tem o controle total de contaminações da Doença de Chagas em seus bancos de sangue, sendo assim, em diversas localidades a transfusão sanguínea é a segunda mais importante via de contaminação pelo *T. cruzi* (WENDEL, 2010).



**Figura 1.4 Distribuição mundial da Doença de Chagas.**

Adaptado de (WHO, 2010)

Casos de contaminação oral também têm sido relatados com frequência. Neste caso, a infecção ocorre através da ingestão do triatomíneo infectado processado juntamente com a comida, ou ingestão de alimentos contaminados pelas fezes dos mesmos, ou pelas secreções de glândula anais de marsupiais (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

Existem ainda diversos casos de transmissão congênita e leite materno (JACKSON et al., 2010), acidentes laboratoriais (HERWALDT, 2001; HOFFLIN et al., 1987).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases distintas. A fase aguda da doença, quando sintomática, caracteriza-se por parasitemia elevada, febre, mal-estar, cefaléia, adenopatia, edema cutâneo, disfunção cardíaca, hepatomegalia e esplenomegalia. A fase aguda pode durar cerca de 2 meses. A letalidade dessa fase pode ser em decorrência de meningoencefalite e insuficiência cardíaca. Os casos agudos não tratados podem evoluir para fase crônica, onde o nível de parasitemia no sangue reduz drasticamente pois os mesmos estão escondidos em tecidos alvos. Na fase crônica a maioria dos pacientes é assintomática (forma crônica indeterminada), e outros manifestam distúrbios cardíacos e digestivos, como megacólon (forma crônica determinada). A doença crônica tem como importante

manifestação a dilatação congestiva do coração que pode ocorrer anos após a infecção aguda (DIAS, 2007). Mais de 10 mil mortes são estimadas anualmente devido à Doença de Chagas (WHO, 2010)

As drogas nifurtimox e benzonidazol têm sido usadas no tratamento da Doença de Chagas, porém são drogas que apenas são eficazes na fase aguda da doença, além disso, causam sérios efeitos colaterais e existem evidências de parasitos resistentes a ambos compostos (FILARDI; BRENER, 1987)

#### 1.1.4 Métodos de cultivo e diferenciação *in vitro*

Todas as formas adotadas durante o ciclo de vida do *T. cruzi* podem ser obtidas *in vitro*, através de metodologias bem estabelecidas (BONALDO et al., 1988; CAMARGO, 1964; CONTRERAS et al., 1985, 2002), tornando possível isolar e estudá-las em diferentes etapas da diferenciação.

Apesar da metaciclogênese *in vitro* ser conduzida sob condições quimicamente definidas, o cultivo das formas epimastigotas é realizado em um meio de cultivo complexo, bastante nutritivo, chamado LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*), no qual são adicionados, dentre outros componentes menos complexos, extrato de levedura, infusão de fígado de boi, triptose e soro fetal bovino (CAMARGO, 1964; GOITIA AULAR; DE BOISO, 1982). Muitos componentes deste meio tem composição desconhecida e podem conter fatores de crescimento, hormônios, entre diversos outros componentes, podendo influenciar em muitos aspectos biológicos do parasita. Além disso, a qualidade e a origem de componentes de fonte animal são muito variáveis. Estas variações refletem em variações na taxa de crescimento e diferenciação do parasita, bem como em diversos outros efeitos biológicos, dificultando a análise de resultados de experimentos conduzidos neste contexto.

O uso de um meio quimicamente definido para o cultivo de *T. cruzi* poderia auxiliar no desenvolvimento de ensaios mais uniformes e padronizados.

Outra aplicação importante para o uso de meio definido é a possibilidade de usar ferramentas úteis para o estudo mais aprofundado do organismo em questão, e que só podem ser usadas em condições de cultivo controladas. Por exemplo, marcação metabólica, perturbação de componentes do meio e avaliação de consumo e secreção de metabólitos pela célula (metabolômica) só podem ser realizados quando o cultivo é feito em condições quimicamente definidas.

Visando o estabelecimento de um meio quimicamente definido para cultivo de *T. cruzi*, alguns artigos foram publicados há mais de 30 anos mostrando o cultivo de

epimastigotas de diferentes linhagens de *T. cruzi*. Em 1977, Azevedo e Roitman publicaram uma nota comunicando o cultivo contínuo da linhagem Y em um meio definido nomeado AR-103 (AZEVEDO; ROITMAN, 1977), que foi desenvolvido com base em um meio definido previamente descrito para o cultivo de formas procíclicas de *T. brucei*, conhecido como HX25 (CROSS; MANNING, 1973). Em 1975, Anderson e Krassner (ANDERSON; KRASSNER, 1975), bem como Cross e colaboradores (CROSS; KLEIN; BAKER, 1975), cultivaram com sucesso as linhagens Costa Rica e Sonya, respectivamente, no meio definido HX25. Avila e colaboradores cultivaram as linhagens Y, Ma, Fl and Marin-1 em um meio definido contendo apenas D-glucose, sais inorgânicos, algumas vitaminas, nucleotídeos e catalase de fígado bovino (AVILA et al., 1979). Alguns anos depois, eles publicaram outro artigo mostrando o estabelecimento de um meio mínimo baseado no anterior, onde nucleotídeos e vitaminas foram excluídos (AVILA; PÉREZ-KEPP; BRETANÑA, 1983). No entanto, estes resultados foram fortemente criticados por O'Daly e Rodriguez (O'DALY; RODRIGUEZ, 1987), os quais mostraram a existência de 25 a 30 bandas de proteínas, bem como polímeros de DNA e RNA contaminando a solução de catalase de fígado bovino usada no meio.

Desde então, poucas publicações reportaram o cultivo de *T. cruzi* em meio definido, todos por uma única passagem, ressaltando a importância do desenvolvimento de um meio quimicamente definido para o cultivo contínuo de *T. cruzi*.

#### 1.1.5 Organização genômica e expressão gênica

O genoma do *T. cruzi* apresenta grande variabilidade intra-específica e possui duas frações, mitocondrial e nuclear. Apesar da estrutura clonal das populações desta espécie, trocas genéticas parecem contribuir para tal heterogeneidade (GAUNT et al., 2003; RAMÍREZ et al., 2012). Em 2009, por um consenso entre diversos pesquisadores, as diferentes populações de *T. cruzi* foram organizadas em diferentes DTUs (do inglês *discrete typing units*), TcI-TcVI (ZINGALES et al., 2009).

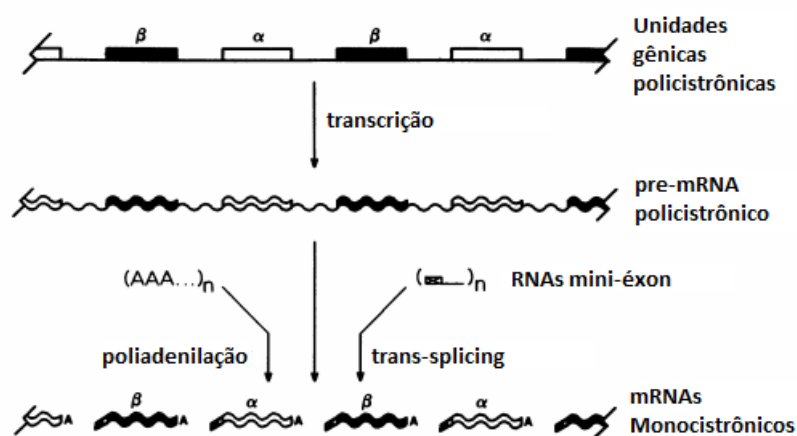
Os tripanossomatídeos possuem características peculiares na sua organização genômica: 20 a 25% de todo o conteúdo de DNA está condensado no cinetoplasto, uma estrutura típica da ordem Kinetoplastida localizado em uma porção de sua mitocôndria única. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é organizado em maxicírculos e minicírculos – 40-50 maxicírculos de 22 a 28 kb que correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos e 5.000-10.000 minicírculos de aproximadamente 1,5 kb com seqüências altamente variáveis (SHAPIRO; ENGLUND, 1995; SHLOMAI, 2004). Os maxicírculos contêm genes codificadores de RNA ribossomal e de proteínas mitocondriais. Os minicírculos não contém

genes codificadores de proteínas, seus genes geram transcritos conhecidos por RNAs guias que estão envolvidos na edição de RNA (AVILA; SIMPSON, 1995; OCHS et al., 1996)

A estrutura e organização cromossômica nos tripanossomatídeos também possuem suas particularidades: os cromossomos não se condensam durante a divisão celular, tornando difícil a visualização de cromossomos metafásicos e de estimar o número exato dos mesmos nos membros deste grupo (VICKERMAN; TETLEY, 1977). Através de técnicas de eletroforese de campo pulsado e hibridação teloméricas foi possível identificar bandas cromossômicas nestes parasitas (CANO et al., 1995). O genoma nuclear do *T. cruzi* consiste, em média, 60.3 Mb de DNA distribuídos entre 41 cromossomos (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009).

Em 2005 o seqüenciamento do genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005), *T. brucei* (BERRIMAN et al., 2005) e *Leishmania major* (IVENS et al., 2005) foi realizado através de um consórcio internacional. O genoma do clone CL Brener foi seqüenciado usando a estratégia WGS (*whole genome shotgun*) com cobertura de 14x, indicando a existência de 22570 genes codificadores de proteínas, dos quais 12570 representam pares de alelos. Foi possível atribuir função a 50.8% dos genes codificadores de proteínas preditos com base em resultados de similaridade com proteínas já caracterizadas ou na presença de domínios funcionais característicos (EL-SAYED et al., 2005). Os dados sobre a porção montada e anotada do genoma de *T. cruzi*, encontram-se disponíveis no site [www.tritrypdb.org](http://www.tritrypdb.org).

O *T. cruzi* apresenta em seu genoma longas unidades de transcrição policistrônica, com vários genes agrupados sequencialmente, os quais, em geral, não apresentam nenhuma relação funcional entre eles (ULLU; TSCHUDI, 1995). Em geral não ocorrem introns em seus genes, o processamento do transcrito policistrônico para gerar mRNA maduro monocistrônico é realizado através de *trans-splicing* e poliadenilação. O processamento por *trans-splicing* ocorre com a finalidade de inserir na extremidade 5' de moléculas de RNA codificadoras de proteína uma sequência de RNA de 39-41 nucleotídeos conhecida como mini-exon ou *spliced leader RNA* - SL-RNA – (Fig1.5) (TEIXEIRA; DAROCHA, 2003). O gene codificador de ubiquitina (Ub) está entre um dos exemplos de transcrição policistrônica, sendo encontrado em *T. cruzi* na mesma unidade policistrônica do gene codificador para calmodulina (CHUNG; GILLESPIE; SWINDLE, 1994; CHUNG; SWINDLE; AVE, 1990).



**Figura 1.5** Processamento do pré-RNA policistrônico.

Adaptado de (MUHICH; BOOTHROYD, 1988)

A transcrição em eucariotos é controlada por uma região que antecede o gene, chamada de região promotora. São descritos em *T. cruzi* apenas promotores para RNA polimerase I (DIETRICH et al., 1993), e o promotor do gene do mini-exon, que é transcrito por uma RNA polimerase II (NUNES et al., 1997). Em eucariotos a RNA polimerase I é responsável pela transcrição de genes para os RNA ribossomais, enquanto que a RNA polimerase II fica responsável pela transcrição de genes codificadores de proteínas. Os genes que codificam as três RNA polimerases clássicas de eucariotos foram descritos nos tripanossomatídeos (VANHAMME; PAYS, 1995).

Até hoje não existem evidências da existência de promotores clássicos para RNA polimerase II em genes que codificam proteínas de *T. cruzi*. Trabalhos recentes mostraram a existência de uma região que flanqueia as unidades policistrônicas de *T. cruzi* e *T. brucei* compostas por base de timina glicosiladas, conhecidas como bases J, que podem estar relacionadas com a regulação destes genes, recrutando a polimerase II quando estão ausentes (CLIFFE et al., 2010; EKANAYAKE; SABATINI, 2011).

Mas, por ainda existirem diversas lacunas à respeito da regulação da expressão de genes durante a transcrição, em conjunto com o fato de proteínas originadas do mesmo transcrito policistrônico poderem apresentar padrões de expressão diferentes e por existir uma expressão gênica estágio-específica durante a diferenciação do *T. cruzi* geram evidências de que a regulação da expressão gênica acontece ao nível pós-transcricional neste organismo (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

Sendo assim, acredita-se que os genes de *T. cruzi* são continuamente transcritos, e a regulação deve ocorrer no transporte seletivo de mRNA para o citoplasma, ou na estabilidade do mRNA ou mesmo pela mobilização polissomal diferencial dessas moléculas, selecionando

os mRNA que devem ser transcritos em momentos específicos do ciclo (AVILA et al., 2001; DALLAGIOVANNA et al., 2001; FRAGOSO et al., 2003). No entanto, os níveis de RNAs mensageiros e de suas proteínas expressas nem sempre seguem o mesmo padrão (DELOIA et al., 2012; GRY et al., 2009; MCNICOLL et al., 2006; MENEZES et al., 2013), onde podem estar atuando mecanismos de regulação pós-traducionais.

Um dos mecanismos de regulação da expressão gênica ao nível pós-traducional conhecido em eucariotos é a ubiquitinação, que consiste na marcação de proteínas-alvo por moléculas de Ub, encaminhando-as a diferentes destinos, entre eles a degradação.

## 1.2 Modificações pós-traducionais por proteínas sinalizadoras

### 1.2.1 Proteínas modificadoras

Atualmente, a principal família de proteínas conhecidas por modificarem outras proteínas é a família das ubiquitinas (Ub). Esta família se divide em 2 grupos relativamente distintos: um grupo constituído pela própria ubiquitina, e outro grupo que abrange as demais proteínas modificadoras, conhecidas como *Ub-like* (proteínas semelhantes à Ub).

#### Ubiquitina

A Ub é uma proteína globular que apresenta 76 resíduos de aminoácidos e massa molecular equivalente a 8,5 kDa. Ela foi identificada por G. Goldstein e colaboradores como uma proteína, até então de função desconhecida, altamente conservada em diferentes organismos – células animais, leveduras, bactérias e plantas superiores – e foi nomeada por eles como UBIP – do inglês, *ubiquitous immunopoietic polypeptide* – pois estava relacionada com a indução da diferenciação de células B (GOLDSTEIN et al., 1975). Em seu trabalho seguinte, Goldstein passa a nomear esta proteína como ubiquitina (SCHLESINGER; GOLDSTEIN, 1975).

Em eucariotos a ubiquitina é expressa em 3 diferentes precursores: polímeros de poliubiquitinas (SHARP; LI, 1987) e outras 2 moléculas, Ub<sub>L40</sub> e Ub<sub>S27</sub>, que são ubiquitinas fusionadas a polipeptídeos ribossomais, L40 e S27 respectivamente (BAKER; BOARD, 1991). Estes precursores são clivados por endopeptidases específicas, gerando moléculas idênticas de ubiquitinas, que são utilizadas no processo de sinalização protéica.

A primeira proteína citada por ser modificada por ubiquitina foi a histona 2A (GOLDKNOPF; BUSCH, 1977) preferencialmente em seu sítio ativo, sugerindo um papel na regulação transcricional. Outro caso relatado especulava uma possível função na meia-vida /



degradação de globinas modificadas por ubiquitina (CIECHANOVER; HOD; HERSHKO, 1978). Finalmente, na década de 80, trabalhos demonstraram o envolvimento da ubiquitina na degradação seletiva de proteínas (CIECHANOVER et al., 1980; HERSHKO et al., 1980; WILKINSON; URBAN; HAAS, 1980).

A atribuição do prêmio Nobel em Química de 2004 para I. Rose, A. Ciechanover e A. Hershko pela contribuição na descoberta da proteólise mediada por ubiquitina, gerou um grande interesse da comunidade científica em estudar esta modificação e suas funções na célula. Com o avanço da ciência e a intensa investigação do papel desta ubíqua proteína, diversos estudos vêm mostrando o envolvimento direto da ubiquitina em quase todos os processos celulares, regulando os destinos e funções de inúmeras proteínas.

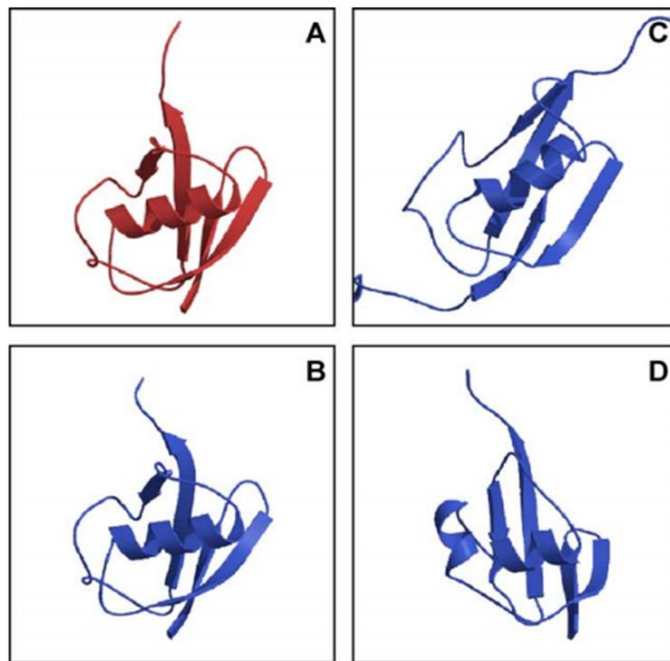
### Proteínas semelhantes à ubiquitina (Ub-like)

Desde a descoberta da Ub, inúmeras pequenas proteínas relacionadas à Ub e conhecidas como *Ub-like* têm sido descritas (Tabela 1.1). Tais proteínas não possuem necessariamente alta similaridade entre suas sequências, porém sua estrutura tridimensional é basicamente a mesma (Fig. 1.6). O modo de ligação entre as *Ub-like* e seus alvos é bem semelhante, envolvendo o resíduo de glicina carboxi-terminal (C-terminal) da *Ub-like*. Igualmente, todas estas proteínas precisam de enzimas ativadoras, conjugadoras e ligadoras de *Ub-like* (HOCHSTRASSER, 2000).

**Tabela 1.1: Ub-like conhecidas em humanos.**

A tabela mostra a porcentagem de identidade de cada Ub-like com a Ub de humanos e suas respectivas funções na célula. ISG15 e FAT10 possuem dois domínios de Ub cada, por isso possuem 2 valores diferentes de identidade com Ub. Adaptado de (WELCHMAN; GORDON; MAYER, 2005).

<b>Ub-like</b>	<b>Identidade com Ub</b>	<b>Funções mais conhecidas</b>
<b>NEDD8</b>	58%	Regulação de E3, regulação transcricional de p53, degradação por proteassomo
<b>SUMO</b>	18%	Controle da localização, função e estabilidade de proteínas, antagonista da ubiquitinação, regulação da transcrição
<b>SUMO-2</b>	16%	Regulação transcricional e de progressão do ciclo celular
<b>SUMO-3</b>		
<b>ISG15</b>	29,37%	Regulador da resposta imune relacionada a IFN, crescimento e diferenciação celular
<b>FAT10</b>	29,36%	Degradação por proteassomo, checagem na montagem do fuso (ciclo celular)
<b>FUB1</b>	37%	Ativação de células T
<b>UBL5</b>	22%	Splicing de pré-RNA
<b>URM1</b>	12%	Resposta a estresse oxidativo, via TOR de sinalização
<b>ATG8</b>	10%	Autofagia
<b>ATG12</b>	17%	Autofagia
<b>UFM1</b>	16%	Resposta ao estresse endoplasmático



**Figura 1.6. Representação da estrutura da família de Ub/Ub-like.**

(A) Ubiquitina (VIJAY-KUMAR; BUGG; COOK, 1987); (B) Nedd8 (WHITBY et al., 1998); (C) SUMO-1 (BAYER et al., 1998); (D) ThiS (WANG et al., 2001).

A maioria das *Ub-like*, assim com a Ub, é expressa como precursores inativos, que necessitam de processamento por proteases específicas para expor o sítio di-glicina necessário para a conjugação ao substrato.

Cada membro da família das Ub desempenha uma função diferente na célula, por isso, com a utilização destas proteínas, a célula pode criar diferentes tipos de modificações, as quais podem ser reconhecidas por diferentes reguladores, controlando inúmeros processos celulares.

Apesar de bactérias não possuírem proteínas funcionalmente análogas à Ub ou *Ub-like*, elas apresentam proteínas que compartilham a estrutura da família das Ub, essas proteínas são ThiS (Fig. 2D) e Moad, que são facilitadoras da inserção de enxofre nos cofatores orgânicos tiamina e molibdopterina, respectivamente, e o sistema de ativação destas moléculas é similar ao sistema de ubiquitinação, porém, essas proteínas não se ligam covalentemente ao substrato para modificá-los, e sim facilitam a inserção de enxofre nos mesmos (KAMBAMPATI; LAUHON, 2000).

Existem ainda proteínas que possuem domínios Ub, mas não são modificadoras de outras proteínas, pois não possuem a capacidade de se ligar covalentemente aos substratos de ubiquitinação. Este é o caso da parkina, uma enzima ligadora de Ub (E3) que possui o

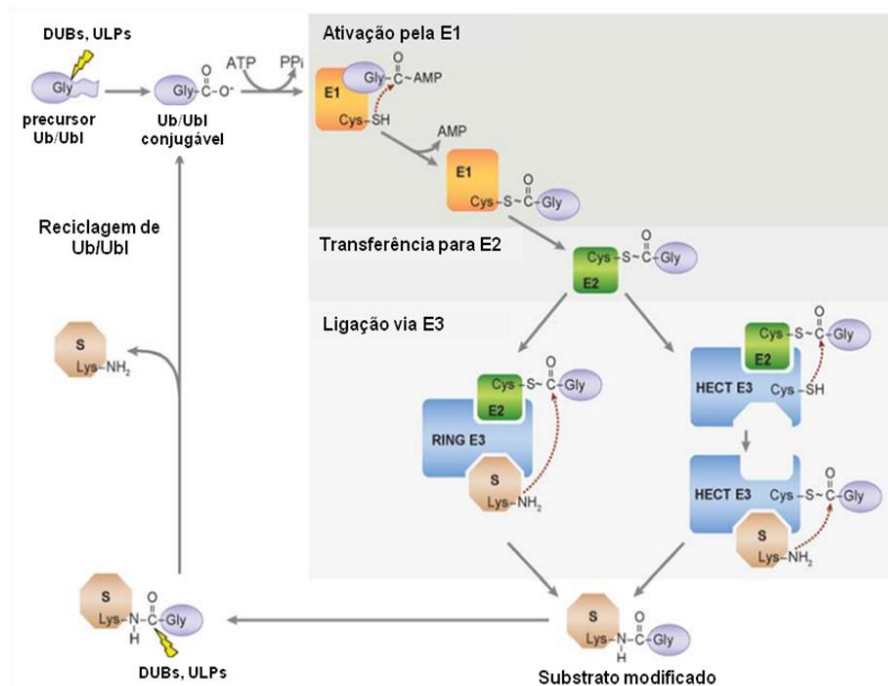
domínio Ub para ser reconhecida por um motivo de interação com Ub (UIM) da proteína eps15, a qual é ubiquitinada no momento da interação com a parkina (WOELK et al., 2006).

### 1.2.2 Processo de modificação por ubiquitina

Um dos mecanismos de regulação pós-traducional conhecido em eucariotos é a ubiquitinação, que consiste na marcação de proteínas-alvo por moléculas de Ub, encaminhando-as a diferentes destinos, sendo os mais conhecidos: ativação ou inativação da proteína marcada, mudança de localização ou função e degradação. Este processo, bem como seus componentes, foi descrito por completo pela primeira vez em 1983 (HERSHKO et al., 1983).

A ligação covalente de Ub – ubiquitinação – ocorre entre um resíduo de lisina do alvo protéico e um resíduo de glicina C-terminal da ubiquitina, este processo é dependente de ATP. A ubiquitinação de proteínas (Figura 3) envolve três principais enzimas: enzima ativadora de Ub (E1), enzima conjugadora de Ub (E2) e enzima Ub ligase (E3) (HERSHKO et al., 1983), além de fatores extensores de cadeia - E4 - (KOEGL et al., 1999) e as enzimas desubiquitinadoras (DUB) (PAOLINI; KINET, 1993).

A enzima E1, primeira enzima a ser descrita, inicialmente faz a adenilação da extremidade C-terminal da Ub para, então, formar uma ligação tioéster entre o resíduo de cisteína catalítico da E1 e a extremidade C-terminal da Ub, em uma reação dependente de ATP (HAAS; ROSE, 1982). Em seguida, a Ub ativada é passada para o resíduo de cisteína contido no sítio ativo de uma E2, formando uma ligação tioéster. A E2 possibilita o encontro entre a Ub ativada e o substrato protéico e, juntamente com uma E3, forma uma ligação isopeptídica entre um resíduo de glicina na extremidade C-terminal da Ub e o grupamento amina da cadeia lateral de um resíduo de lisina do substrato (HERSHKO et al., 1983), embora existam evidências de ubiquitinação da porção amino-terminal livre de algumas proteínas (BREITSCHOPF et al., 1998; CIECHANOVER; BEN-SAADON, 2004; GATTI et al., 2012; SADEH et al., 2008) ou em resíduos de cisteína, serina ou treonina (WANG et al., 2007) que não envolvem o resíduo de lisina.



**Figura 1.7. O processo de modificação de proteínas por pequenas proteínas Ub e Ub-like.**

Primeiramente os precursores de Ub/Ub-like precisam ser processados por proteases específicas para expor o resíduo de glicina carboxi-terminal. A Ub/Ub-like é então ativada pela E1, carregada pela E2 até a E3, que juntas fazem a ligação da Ub/Ub-like ativada ao substrato (S). Este processo é reversível devido a ação de proteases específicas, como as DUBs. Adaptado de KERSCHER; FELBERBAUM; HOCHSTRASSER, 2006.

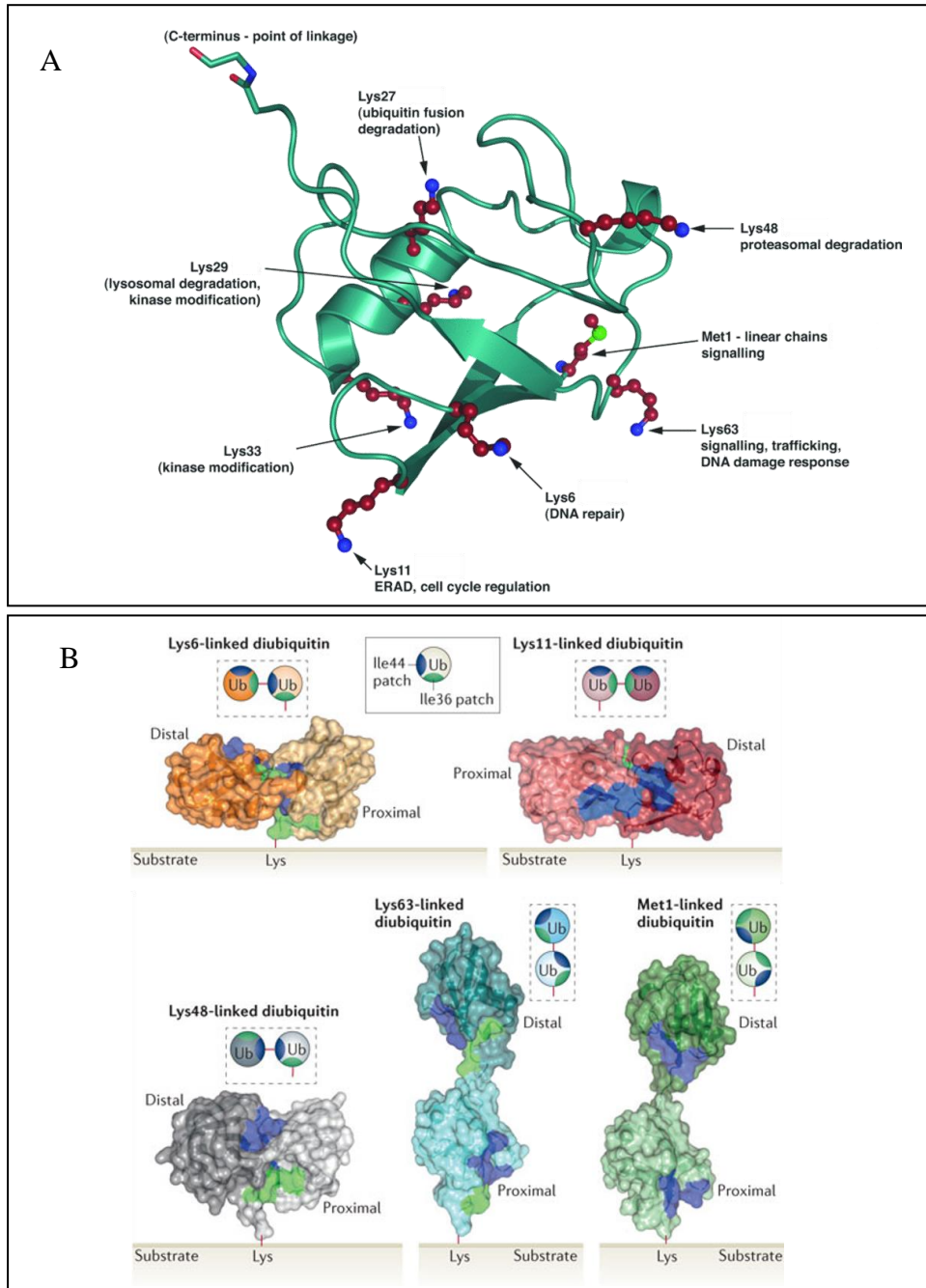
O processo de ubiquitinação pode ocorrer de três formas: monoubiquitinação, multiubiquitinação ou poliubiquitinação que geram sinais diferentes e por consequência direcionam a proteína modificada a destinos diferentes (WEISSMAN, 2001; WELCHMAN; GORDON; MAYER, 2005).

A monoubiquitinação é a ligação de uma única Ub ao alvo protéico. Diversas funções celulares são relacionadas a essa modificação, tais como mudança de atividade ou localização da proteína marcada (HAGLUND; DIKIC, 2005), sinal para internalização de proteínas no processo de endocitose (HICKE; DUNN, 2003), para degradação via lisossomo (HICKE, 2001) e para a regulação da transcrição pela modificação de histonas e fatores de transcrição (FINLEY; CIECHANOVER; VARSHAVSKY, 2004; HAAS; BRIGHT; JACKSON, 1988; HOEGE et al., 2002; MURATANI; TANSEY, 2003).

A ligação de moléculas individuais de Ub a diversos resíduos de lisina da proteína como a internalização de proteínas de membrana (HORAK; WOLF, 2001; MUKHOPADHYAY; RIEZMAN, 2007), controle da via de síntese *de novo* de fosfolípidos (BUTLER; MALLAMPALLI, 2010).

A poliubiquitinação consiste na adição de uma cadeia de Ubs à proteína alvo. A cadeia de poliubiquitinas (poli-Ub) é formada a partir da ligação entre um dos 7 resíduos de lisina

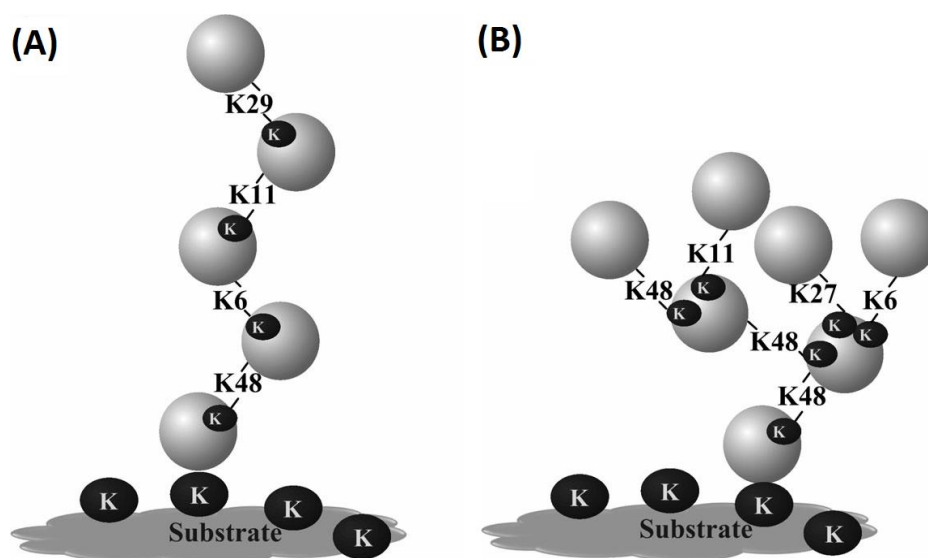
existentes na Ub já ligada ao substrato e o resíduo de glicina C-terminal da Ub a ser acoplada à cadeia. A existência destes 7 resíduos de lisina na ubiquitina (Fig 1.8A) torna possível a formação de cadeias de poli-Ub com topologias diferentes, gerando uma vasta diversidade de sinais na célula (1.8B). Existem ainda as cadeias lineares, ou *head-to-tail*, que são formadas pela ligação da glicina C-terminal da Ub com a metionina N-terminal da Ub pré-existente (IWAI, 2012).



**Figura 1.8 Ligação isopeptídica entre ubiquitina: formação de cadeias poli-Ub.**

(A) Representação dos sete resíduos de lisina na molécula de ubiquitina. (B) Diferenças obtidas na topologia da cadeia de poli-Ub quando usados diferentes resíduos de lisina (ou metionina) na ubiquitina prévia. Fonte: (KOMANDER, 2009; KULATHU; KOMANDER, 2012)

Outra maneira de gerar sinalizações ainda mais complexas é a formação de cadeias de poli-Ub heterogêneas, onde mais de um resíduo de lisina são utilizados na mesma cadeia, e as mesmas podem ser ramificadas ou mistas (Fig 1.9).



**Figura 1.9 Cadeias de poli-Ub heterogêneas.**

(A) Cadeias mistas, envolvendo a ligação em diferentes lisinas, mas apenas uma por molécula de Ub. (B) Cadeias ramificadas, onde mais de uma molécula de Ub são ancoradas em diferentes resíduos de lisina em uma única molécula de Ub prévia. Fonte: Kravtsova-Ivantsiv e cols (KRAVTSOVA-IVANTSIV; SOMMER; CIECHANOVER, 2013).

A função mais conhecida da poliubiquitinação de substratos protéicos é a proteólise mediada pelo proteassomo 26S (sistema ubiquitina-proteassomo), o qual reconhece o sinal gerado pela polimerização de Ub ligadas pelo resíduo de lisina 48 (K48) da Ub previamente ligada ao substrato (HOCHSTRASSER, 1992). Apesar de alvos poliubiquitinados por cadeias K48 serem os mais conhecidos e tradicionais alvos do proteassomo, diversos estudos mostram a capacidade do proteassomo de reconhecer e degradar outros tipos de modificações por ubiquitinação, como a monoubiquitinação (BOUTET et al., 2007), e cadeias formadas pela ligação de outras lisinas (BABOSHINA; HAAS, 1996; HOFMANN; PICKART, 2001; SAEKI et al., 2009). Artigos recentes envolvendo análise proteômica em espectrometria de massas mostraram o envolvimento de cadeias K6, K11, K27, K29, K33 e K48 na via de degradação pelo proteassomo, apenas a K63 não estaria envolvida, sendo uma modificação voltada para a o tráfego endossomal para o lisossomo (DAMMER et al., 2011; NATHAN et al., 2013; XU et al., 2009). Apesar disso, poucos trabalhos mostraram que, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o proteassomo é capaz de reconhecer e degradar substratos modificados por cadeias K63 (HOFMANN; PICKART, 2001; SAEKI et al., 2009).

Além da função proteolítica da cadeia de poliubiquitinas, outras funções não-proteolíticas são evidenciadas para esse tipo de modificação, como a regulação do fator de transcrição Met4, através da modificação por cadeia de poliubiquitinas ligadas por K48 (OUNI; FLICK; KAISER, 2011), reparo de DNA através da modificação de antígenos nucleares de proliferação celular (PCNA) – uma proteína que bloqueia o deslizamento da DNA-polimerase, envolvida na síntese e reparo de DNA – (HOEGE et al., 2002; KIRCHMAIER, 2011),

A utilização de *Ub-like* na modificação de proteínas é outra forma de obter diferentes sinalizações e consequentemente diferentes funções, como já mencionado anteriormente. Cada *Ub-like* possui sua própria maquinaria de conjugação, que pode ser compartilhada com outros membros da família de Ub, mas geralmente é exclusiva. Também possuem proteínas de interação diferentes, controlando diversos processos celulares. Quase todas as *Ub-like* são conjugadas à proteína alvo como monômeros, pois são incapazes de formar cadeias, com exceção da família de proteínas modificadoras SUMO (*small ubiquitin related modifier*): seus membros SUMO-2 e SUMO-3 podem formar cadeias.

### 1.2.3 Componentes da via de ubiquitinação

#### Enzima ativadora de Ub (E1)

A atividade da E1 foi descrita pela primeira vez por Haas e Rose em 1982: a E1, também conhecida como Uba (do inglês, *Ubiquitin Activating*), é uma enzima essencial para a ubiquitinação, uma vez que esta promove a ativação da Ub/*Ub-like* para poder ser utilizada no processo de modificação protéica. O resíduo de glicina C-terminal da Ub/*Ub-like* é ativado pela E1 na presença de ATP e  $Mg^{2+}$ . Inicialmente ocorre a formação intermediária de um adenilato de Ub/*Ub-like*, o qual serve de doador desta Ub/*Ub-like* para um grupo sulfidril de um resíduo de cisteína da E1, o sítio ativo da E1. Há o consumo de uma molécula de ATP, sendo liberado AMP e pirofosfato (HAAS; ROSE, 1982).

Cada membro da família das Ub/*Ub-like* possui uma E1 específica, esta especificidade é importante, pois a E1 também reconhece e transfere a Ub/*Ub-like* para uma E2 específica, assegurando uma correta sinalização e destino (LEE; SCHINDELIN, 2008). A preferência de E1 por membros da família de Ub particulares provém do resíduo aminoacídico existente na posição 72 da E1, que é uma arginina quando se trata da Ub, uma alanina no caso de NEDD8 e uma glutamina ou glutamato para SUMO, por exemplo (BOHNSACK; HAAS, 2003; WALDEN et al., 2003).

Todas as E1 de eucariotos possuem 2 repetições de um domínio que ligam à Ub/Ub-*like* específica e ATP e são os responsáveis pela adenilação da Ub/Ub-*like* (BACIK et al., 2010; LAKE et al., 2001; LOIS; LIMA, 2005). Outro domínio encontrado em E1 é o domínio ativo da enzima, que contém o resíduo de cisteína. Um terceiro domínio encontrado é o domínio de recrutamento de E2, conhecido como “*ubiquitin-fold domain*” – UFD – (HUANG et al., 2007; LOIS; LIMA, 2005; WANG et al., 2009a).

A E1 de algumas Ub-*like* são conhecidas: A Uba2 é responsável pela ativação das SUMO, Uba3 pela ativação de Nedd8, UbeL1 pela ativação de ISG15, Atg7 é responsável pela ativação tanto de Atg8 quanto de Atg12, a Uba4 faz a ativação da Urm1, Uba5 ativa a UFM1, Uba6 faz a ativação de Fat10 (SCHULMAN; HARPER, 2009).

Na maioria dos eucariotos apenas um tipo de E1 é responsável pela ativação da Ub, a Ube1/Uba1. Recentemente foi descoberta em humanos um segundo tipo de E1 para Ub, com aproximadamente 40% de similaridade com a Ube1, nomeada Uba6 (JIN et al., 2007). Ube1 e Uba6 possuem preferência por E2 diferentes, distinção esta que é possível pela seqüência do domínio UFD diferente, encontrado em cada E1. Uba6 divide sua função ativando tanto Ub quanto Fat10 (GAVIN et al., 2012).

#### Enzima conjugadora/carreadora de Ub (E2)

A E2 é também outra família de enzimas de grande importância para a conjugação de Ub, pois é neste nível do processo onde a especificidade do sistema pelo substrato começa.

As E2, devido sua maior especificidade pelo substrato, são mais numerosas que as E1. São conhecidas mais de 40 enzimas E2 em mamíferos (MICHELLE et al., 2009), 30 delas mediam a conjugação de Ub, enquanto as demais são responsáveis pela conjugação de Ubs-*like* (VAN WIJK; TIMMERS, 2010).

Todas as E2 possuem um domínio conservado de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos, conhecido como domínio UBC (do inglês, Ub *carrier*) que contém o resíduo de cisteína necessário para a ligação tio-éster com a Ub e possui aproximadamente 35% de similaridade entre os membros desta família. As E2 podem ser divididas em 3 grupos de acordo com sua estrutura: a classe I é constituída unicamente de 1 domínio UBC, a classe II que contém uma extensão C-terminal e a classe III que possui uma extensão N-terminal. Possivelmente tais extensões são importantes para a interação com E3 (PICKART, 2001), apesar das enzimas da classe I também apresentarem interação com E3.

Geralmente o processo de ligação da Ub no substrato utiliza as enzimas E1, E2 e E3, sendo a última a responsável pela ligação da Ub na proteína alvo. Porém, diversos estudos



têm demonstrado a existência de ubiquitinação de proteínas sem o envolvimento das E3 (HOELLER et al., 2007; KAO et al., 2012; RAMANATHAN; ZHANG; YE, 2013).

### Enzima ligadora de Ub / Ub ligase (E3)

As Ub ligases, ou E3, conferem o maior grau de especificidade ao processo de ubiquitinação do substrato. Devido este fator os membros existentes nesta família de enzimas são bastante numerosos, existindo centenas de E3 preditas através da busca por domínios conhecidos que as constituem, mais de 600 apenas em humanos (LI et al., 2008).

As E3 ligam-se ao mesmo tempo à E2 conjugada à Ub e ao substrato. Até o momento foram caracterizadas 4 classes de E3 com base em seus domínios de interação com substratos e/ou E2. São elas: HECT (HUIBREGTSE et al., 1995), RING *finger* (FREEMONT, 1993), U-box (ARAVIND; KOONIN, 2000) e RBR (MARÍN et al., 2004).

O domínio HECT (do inglês, *Homologous to E6-accessory protein Carboxy Terminus*) é constituído de uma sequência de 350 resíduos de aminoácidos que contém um resíduo de cisteína conservado, o qual forma uma ligação tio-éster com a Ub antes de transferi-la ao substrato protéico (HUIBREGTSE et al., 1995). Este domínio foi descoberto em linhagens de papillomavirus humano oncogênicas, as quais codificam proteínas responsáveis pela inativação da proteína supressora de tumor p53, estas proteínas são a E6 e a proteína associada a E6 (E6-AP). A E6-AP é uma E3, e a proteína E6 atua como um adaptador entre a E6-AP e p53, possibilitando a ubiquitinação da última (SCHEFFNER et al., 1993). A caracterização da E6-AP levou à identificação de uma família de proteínas relacionadas à ela, as quais possuíam o mesmo domínio HECT.

Ao domínio RING *finger* (do inglês, *Really Interesting New Gene*) era atribuído um papel na dimerização de proteínas no início da década de 90. Mais tarde, estudos começam a relatar o envolvimento desses domínios na ubiquitinação de proteínas (LORICK et al., 1999). Este domínio permite, devido à presença das cisteínas e histidinas, a contenção de dois átomos de zinco numa conformação espacial característica, *cross-brace*. Diferente das E3-HECT, as E3-RING *finger* não se ligam à Ub/Ub-like, e sim atuam como facilitadoras da interação entre as E2 e o alvo protéico (HATAKEYAMA et al., 2001). Esta é a classe de E3 mais numerosa, e ela se divide em 2 subgrupos: as RING *finger* simples, composta de apenas uma unidade protéica, e os complexos de multicomponentes organizados por várias subunidades protéicas (ROBINSON; ARDLEY, 2004). Um membro do subgrupo de RING-*finger* simples é a N-recognin ligase que regula o processo de ubiquitinação N-terminal (do inglês, *N-end rule*) (MOGK; SCHMIDT; BUKAU, 2007). As E3-RING *finger* que atuam em

complexos são as SCF (Skp1/Cullin/F-box/Rbx1/2), e as APC/C (do inglês, *anaphase-promoting complex/cyclosome*).

As E3-U-box são RING *finger* modificadas, que não possuem os resíduos de cisteína e histidina característicos e conseqüentemente não ligam-se a íon metálicos. A estrutura deste domínio mantém-se graças à uma rede de ligações intra-moleculares de hidrogênio (OHI et al., 2003).

O domínio RBR (do inglês, *RING in between RING*) envolve a combinação dos dois mecanismos citados acima. Assim como as E3-HECT, as E3-RBR contém um resíduo de cisteína catalítico e forma uma ligação tioéster com a Ub antes de transferi-la para o alvo protéico (WENZEL et al., 2011), e ainda utilizam um domínio RING convencional para o recrutamento da E2. Diferentemente das outras 3 classes de E3, todas as E3-RBR são proteínas com vários domínios. O representante desta classe mais conhecido é a parkina, uma E3 cuja ausência de função (através de mutações) está associada à doença de Parkinson (ZHANG et al., 2000).

#### Enzima de-ubiquitinadora (DUB)

A ubiquitinação de substratos protéicos é um processo reversível devido à atuação de enzimas que desfazem esta modificação, enzimas estas conhecidas como de-ubiquitinadoras (DUB) ou proteases específicas de Ub-*like* (ULP).

Dentre as funções atribuídas ao processo de de-ubiquitinação estão o resgate de proteínas que seriam degradadas pelo proteassomo, a reciclagem de Ub, controle do tráfego protéico, e ainda as DUB/ULP estão envolvidas no processamento de moléculas precursoras de Ub (LOVE et al., 2007).

Apesar de o mecanismo de especificidade das DUB/ULP por seus substratos ubiquitinados ser pouco conhecido, sabe-se que algumas DUBs são específicas para diferentes tipos de ligações em cadeia de poli-Ub, tais como K48 ou K63, enquanto outras agem menos especificamente e são capazes de clivar vários tipos de cadeia, ou mesmo outros tipos de Ub-*like* (REYES-TURCU; WILKINSON, 2009). Por esta razão, estas proteases são bastante numerosas. Estudos recentes sugerem a existência de 84 diferentes DUB/ULP no genoma de humanos (YE et al., 2009).

As DUB/ULP de eucariotos são divididas em 5 grupos, 4 são cisteíno-proteases e 1 é uma metallo-protease dependente de zinco (NIJMAN et al., 2005). As cisteíno-proteases contêm as famílias: hidrolases C-terminal de Ub (UCH), proteases específicas de Ub (USP),

proteases com domínio de proteínas da doença Machado-Joseph (MJD) e proteases de tumor de ovário (OTU) (REYES-TURCU; WILKINSON, 2009).

As famílias de cisteíno-proteases possuem um domínio conhecido como tríade catalítica, que envolve os resíduos de aminoácidos cisteína, histidina e aspartato. São enzimas que hidrolisam esteres e amidas C-terminais da Ub e que possuem um papel fisiológico na reciclagem de Ub e no processamento de precursores de Ub (ELETR; WILKINSON, 2014), apesar de outras famílias de DUBs também apresentarem papel semelhante no processamento dos precursores de Ub.

A mais numerosa família de DUB/ULP cisteíno-proteases é a família USP, existindo cerca de 56 USP em humanos. Ao contrário das UCH, as USP clivam grandes substratos, como cadeias de poliubiquitinas, na extremidade C-terminal da Ub (ELETR; WILKINSON, 2014; NIJMAN et al., 2005).

Uma busca bioinformática por classes de DUB/ULP identificou a proteína Ataxina-3 e algumas proteínas semelhantes à ela (*Ataxina-3-like*) (SCHEEL; TOMIUK; HOFMANN, 2003). Sua caracterização como uma família de DUB/ULP veio pouco tempo depois com experimentos de atividade *in vitro* (BURNETT; LI; PITTMAN, 2003). Mutações na Ataxina-3 causam a doença neurológica ataxia espinocerebelar tipo 3 ou doença de Machado-Joseph. Tais mutações levam a má formação e agregação de proteínas e toxicidade celular. A ataxina-3 hidroliza seletivamente cadeias de poliubiquitinas K63 (NICASTRO et al., 2010; WINBORN et al., 2008), através do reconhecimento por domínios UIM (do inglês, *ubiquitin interact motifs*). Com isso, esta família de DUB/ULP foi nomeada MJD.

Abordagens bioinformáticas, partindo do interesse em estudar um gene relacionado ao tumor de ovário em *Drosophila*, levaram à identificação da família OTU (MAKAROVA; ARAVIND; KOONIN, 2000). Os membros da família OTU apresentam especificidades marcantes por diferentes cadeias de poli-Ub: OTUB1 é altamente específica para cadeias K48; OTUB2 é capaz de clivar tanto cadeias K63 quanto K48; a enzima A20 é específica para cadeias K48; Cezanne prefere cadeias K11; e TRABID atua tanto em cadeias K29 quanto K33 (BREMM; FREUND; KOMANDER, 2010; EDELMANN et al., 2009; KOMANDER; BARFORD, 2008; LICCHESI et al., 2012; WANG et al., 2009b).

As proteases com domínio JAMM fazem parte da classe das metalo-proteases. Em eucariotos, 3 proteínas com domínio JAMM possuem atividade DUB/ULP: a Rpn11, uma subunidade do proteassomo 26S que cliva cadeias de poliubiquitinas dos alvos protéicos a serem degradados (VERMA et al., 2002; YAO; COHEN, 2002); a CSN5, uma subunidade do COP9 signalossomo (uma montagem diferente do proteassomo) que cliva Nedd8 conjugada

ao substrato protéico a ser degradado (LYAPINA et al., 2001); e a AMSH (do inglês, *associated molecule with the SH3 domain of STAM*), uma DUB/ULP envolvida na endocitose (MCCULLOUGH et al., 2006).

#### Fatores de extensão de cadeia (E4)

As enzimas E1, E2 e E3 costumam ser suficientes para a ubiquitinação. Contudo, foram descritos casos onde a presença de uma outra classe de fatores, E4, revelou-se essencial para a extensão das cadeias de Ub, mas não para a iniciação da mesma (KOEGL et al., 1999). Existem várias categorias de E4, segundo os domínios presentes nestas proteínas. As E4 constituem-se em fatores que favorecem a extensão de uma cadeia de Ub a partir de uma proteína monoubiquitinada (HOPPE, 2005). Para a atuação do fator E4, é necessária a reação dos componentes da via de ubiquitinação E1, E2 e E3.

A primeira família de E4 identificada foram as E3-U-box, já mencionadas anteriormente, que se ligam aos substrato já ubiquitinados por uma a três Ub e então promovem a polimerização de mais Ub à cadeia (BENIRSCHKE et al., 2010). Devido ao fato de as U-box serem enzimas E3, existem tendências de definir as E4 como E3 especializadas, que alongam cadeias de mono ou poli-Ub. Porém fatores como a incapacidade de algumas E4 de interagirem com E2 e estimular o processo de ubiquitinação e de não apresentar afinidade detectável com substratos do sistema sugerem que tais proteínas são uma nova classe de enzimas (HOPPE, 2005).

Existem ainda outras E4 que não possuem domínio U-box, como a p300 de humanos e o complexo BUL1-BUL2 (do inglês, *binds to ubiquitin ligase*) de leveduras. A p300 foi inicialmente descrita como cofator transcricional e acetiltransferase de histonas e, em sua função como E4, atua na proliferação celular, regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação e resposta a dano no DNA, além de regulação da proteína supressora de tumor p53 (GROSSMAN et al., 2003; IYER et al., 2004; KIMBREL; KUNG, 2009). O complexo BUL1-BUL2 atua na facilitação da poliubiquitinação da proteína GAP1 em *S. cerevisiae*, o que gera um sinal para internalização pela via de distribuição vacuolar para o complexo *trans*-Golgi (HELLIWELL; LOSKO; KAISER, 2001).

#### Domínios ligadores de Ub

Como descrito anteriormente, a Ub pode ser conjugada ao substrato protéico como um monômero ou em cadeia de poliubiquitinas, e esta cadeia pode ser ligada através de diversos resíduos de lisina diferentes contidos na Ub. Além disso, existem as Ub-like que também são

modificadoras de proteínas. Esses diferentes tipos de modificações geram sinais e funções diferentes que são reconhecidos e executados através de proteínas que contém motivos de ligação com Ub, que são frequentemente chamadas de receptores de Ub ou proteínas ligadoras de Ub (UBP – do inglês, *ubiquitin binding proteins*) (HICKE; SCHUBERT; HILL, 2005).

As UBPs geralmente possuem um pequeno domínio de ligação com Ub (UBD – do inglês, *ubiquitin binding domain*) com aproximadamente 20 a 150 aminoácidos, que podem interagir com mono, multi ou poliubiquitinação. Os UBDs não possuem o resíduo de lisina aceptor de Ub, e portanto formam uma interação não covalente com a modificação por Ub.

Os UBDs podem ser encontrados nas enzimas envolvidas na ubiquitinação e de-ubiquitinação de proteínas, bem como em proteínas que reconhecem e interpretam o sinal da modificação.

O primeiro UBD caracterizado foi o da proteína Rpn10, uma subunidade do complexo regulatório 19S, conhecido como a tampa do proteassomo 26S, que foi então utilizado como ponto de partida para buscas bioinformáticas de UBDs. A este domínio foi dado o nome de UIM (do inglês, *ubiquitin-interacting motif*) (YOUNG et al., 1998).

O domínio UBA (do inglês, *ubiquitin-associated*) é um domínio comum entre as enzimas envolvidas na ubiquitinação e de-ubiquitinação de proteínas. Foi encontrado por análises bioinformáticas comparando as sequências dessas enzimas (HOFMANN; BUCHER, 1996). Com a descoberta dos domínios UIM e UBA, criou-se grande interesse no estudo dos UBDs, principalmente pois eram encontrados em diversas proteínas que não apresentavam envolvimento direto com o sistema de ubiquitinação, indicando que estas proteínas seriam receptores do sinal gerado pela mesma.

Em seguida diversos esforços foram tomados para a identificação de UBDs. Pelo menos 20 UBDs já foram descritos: **CUE** (do inglês, *Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation*) (DONALDSON et al., 2003), **GAT** (**G**ga e **TOM1**) (SHIBA et al., 2004), **VHS** (**V**ps27, **H**RS, **S**TAM) (MIZUNO et al., 2003), **GLUE** (do inglês, *GRAM-Like Ubiquitin-binding in Eap45*) (SLAGSVOLD et al., 2005), **PAZ**/**ZnfUBP** (do inglês, *Poliubiquitin-Associated Zinc finger*) (HOOK et al., 2002), **NZF** (**N**pl4 **Z**inc **F**inger) (MEYER; WANG; WARREN, 2002), **A20 ZnF** (WERTZ et al., 2004), **UBZ** (do inglês, *Ubiquitin-Binding ZnF*) (BIENKO et al., 2005), **Ubc** (do inglês, *Ubiquitin-Conjugating enzyme*) (PICKART, 2001), **UEV** (do inglês, *Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant*, domínio semelhante ao domínio catalítico das E2 porém não possui o sítio ativo de cisteína) (PORNILLOS et al., 2002), **DUIM** (do inglês, *Double-sidedUIM*) (HIRANO et al., 2006),

**MIU** (do inglês, *Motif Interacting with Ubiquitin*) (LEE et al., 2006), **UBM** (do inglês, *Ubiquitin-Binding Motif*) (BIENKO et al., 2005), **Jab1/MPN** (BELLARE et al., 2006), **PFU** (do inglês, *PLAA Family Ubiquitin binding*) (MULLALLY; CHERNOVA; WILKINSON, 2006), **UBAN** (do inglês, *ubiquitin binding in ABIN and NEMO*) (WAGNER et al., 2008), **PRU** (do inglês, *pleckstrin-like receptor for ubiquitin*) (HUSNJAK et al., 2008), **SH3** (do inglês, *Src homology 3*) (STAMENOVA et al., 2007). Os domínios e suas respectivas funções estão descritos na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2 Os domínios ligadores de ubiquitina (UBD) e suas funções.**

<b>UBD</b>	<b>Representante protéico</b>	<b>Função</b>
<i><b><math>\alpha</math>-hélice</b></i>		
<b>UIM</b>	S5a/Rpn10, Vps27, STAM, epsinas e RAP80/UIMC1	Reconhecimento para degradação pelo proteassomo, endocitose, biogênese de corpos multivesiculares (MVB) e reparo de DNA
<b>IUIM/MIL</b>	RABEX5	Endocitose
<b>DUIM</b>	HRS	Biogênese de MVB
<b>UBM</b>	Polimerase iota e REV1	Tolerância a danos no DNA
<b>UBAN</b>	NEMO, ABIN1-3 e optineurin	Sinalização nuclear do fator $\kappa$ B
<b>UBA</b>	RAD23/R23A, Dsk2 e NBR1	Degradação pelo proteassomo, regulação de quinases e autofagia
<b>GAT</b>	GGA3 e TOM1	Biogênese de MVB
<b>CUE</b>	Vps9, TAB2 e TAB3	Endocitose e regulação de quinases
<b>VHS</b>	STAM e GGA3	Biogênese de MVB
<i><b>Dedo de Zinco (ZnF)</b></i>		
<b>UBZ</b>	Polimerase-h, polimerase-k e Tax1BP1	Tolerância a danos no DNA e Sinalização nuclear do fator $\kappa$ B
<b>NZF</b>	NPL4, Vps36, TAB2 e TAB3	Degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD), biogênese de MVB e regulação de quinases
<b>ZnF A20</b>	RABEX5 e A20	Endocitose e regulação de quinases
<b>ZnF UBP/PAZ</b>	Isopeptidase T e HDAC6	çAtividade do proteassomo, atividade do agressomo e autofagia
<i><b>Domínio homólogo a Plekstrin (PH)</b></i>		
<b>PRU</b>	RPN13	Atividade do proteassomo
<b>GLUE</b>	EAP45	Biogênese de MVB
<i><b>Domínios semelhantes à conjugadora de Ub (Ubc)</b></i>		
<b>UEV</b>	UEV1 e MMS2	Reparo de DNA, biogênese de MVB e regulação de quinases
<b>UBC</b>	UBCH5C	Transferência de Ub
<i><b>Outros</b></i>		
<b>SH3</b>	Sla1 e CIN85	Endocitose
<b>PFU</b>	Ufd3	ERAD
<b>Jab1/MPN</b>	Prp8	Processamento/ <i>splicing</i> de RNA

Outra característica das UBP é a capacidade de serem ubiquitinadas através de um processo que necessita da integridade do UBD, este processo é conhecido como ubiquitinação acoplada (*coupled ubiquitination*), e geralmente é realizada como monoubiquitinação. Woelk e colaboradores descreveram em 2006 que o mecanismo de ubiquitinação acoplada da proteína eps15, uma proteína que possui o domínio UIM, depende do reconhecimento da mesma por uma E3 ubiquitinada, ou pela E3 parkina, que possui um domínio de Ub, como já descrito anteriormente (WOELK et al., 2006).

### 1.2.5 Proteassomo

A proteólise mediada pelo proteassomo é um processo celular seletivo que resulta na degradação específica de proteínas mal formadas ou mesmo desnecessárias no momento. Os proteassomos são parte de um mecanismo no qual as células regulam a concentração de proteínas específicas e degradam proteínas mal formadas (ORLOWSKI, 1990). O sistema Ubiquitina-Proteassomo (UPS, do inglês Ubiquitin-Proteasome System) é um processo no qual envolve a degradação de alvos protéicos modificados previamente pela Ub (HOUGH; PRATT; RECHSTEINER, 1987).

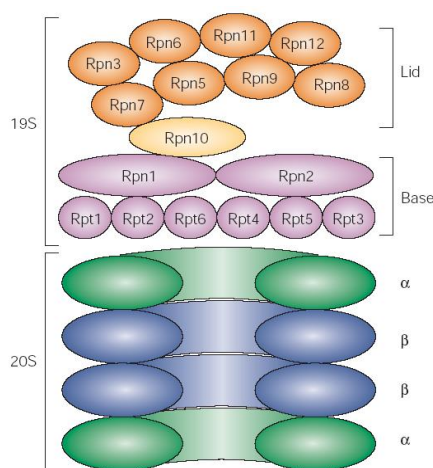
O complexo 20S (700 kDa) é o núcleo catalítico do proteassomo. Ele é composto de 4 anéis heptaméricos de subunidades protéicas  $\alpha$  (anéis externos) e  $\beta$  (anéis centrais) que se associam sob a forma de um tubo cilíndrico. As subunidades  $\beta$  possuem atividade proteolítica, portanto, atuam diretamente na degradação das proteínas (GROLL et al., 1997). O 20S pode ser encontrado livre nas células e, embora fosse considerado um forma latente do proteassomo, trabalhos recentes mostraram que este complexo pode estar envolvido na hidrólise de proteínas, em uma maneira independente de ATP (ASHER et al., 2005; DAL VECHIO et al., 2014).

Geralmente o núcleo catalítico é encontrado acoplado à complexos regulatórios. Três complexos podem regular a atividade do 20S, ativando-o: 19S, 11S (ou PA28 em humanos) e o Blm10 (ou PA200 em humanos). O complexo 19S, conhecido também como PA700, está envolvido no reconhecimento e degradação de proteínas ubiquitinadas, podendo também atuar de maneira independente de Ub (DEMARTINO et al., 1996; WOLF; HILT, 2004). O complexo 11S está envolvido na apresentação de antígenos via moléculas MHC de classe I (KUEHN; DAHLMANN, 1997), degradação de proteínas danificadas e oxidadas (HERNEBRING et al., 2013) permitindo a entrada de proteínas de forma independente de ubiquitina. Já o complexo Blm10 parece estar envolvido no reparo de DNA, regulação da

síntese de ribossomos e citoproteção em resposta a estresse, também de forma independente de ubiquitina (LOPEZ et al., 2011; TAR et al., 2014; USTRELL et al., 2002). Existem ainda complexos que inibem a atividade do 20S, estes são: PI31 e Pr39 (BOTELHO-MACHADO et al., 2010; LI et al., 2000; ZAISS et al., 1999).

### Sistema proteassomo-Ub (UPS)

O complexo 26S, em forma de barril, é formado pelo complexo regulatório (19S) e pelo núcleo catalítico (20S) (Figura 1.10). O complexo 19S é composto por subunidades ATPases da família AAA, que interagem com o núcleo catalítico, e por subunidades não ATPases, que são essenciais para o reconhecimento e processamento do substrato poliubiquitinado antes da degradação (THROWER et al., 2000). Mais de dezessete unidades diferentes no complexo 19S organizam-se em uma tampa e uma base (BHATTACHARYYA et al., 2014).



**Figura 1.10 Estrutura do proteassomo 26S.**

Esta figura representa a composição do complexo 19S de *Saccharomyces cerevisiae*. Os anéis  $\alpha$  e  $\beta$  do proteassomo 20S estão representados para mostrar como o complexo da base está ligado à estrutura central. Rpn: partícula regulatória não-ATPase, Rpt: partícula regulatória ATPase. Fonte: (PICKART; COHEN, 2004).

O sistema de degradação de proteínas mediado pelo proteassomo dependente de Ub e ATP (UPS) era, até pouco tempo atrás, considerado a principal via de degradação protéica em células eucarióticas. Porém, diversos estudos têm demonstrado o papel da ubiquitinação em inúmeros processos celulares que não envolvem a degradação via proteassomo, como já mencionado anteriormente (BELGAREH-TOUZÉ et al., 2008; CHEN, 2012; HAMMOND-MARTEL; YU; AFFAR, 2012; LIU; CHEN, 2011; MUKHOPADHYAY; RIEZMAN, 2007), bem como a degradação de proteínas pelo proteassomo de forma independente de Ub, em



proporções relativamente maiores que a degradação dependente de Ub (ERALES; COFFINO, 2014).

### 1.2.6 Identificação de substratos ubiquitinados (ubiquitinoma)

Como já mencionado anteriormente, o mecanismo de ubiquitinação desempenha um papel importante na maioria dos processos celulares, modulando a atividade, localização ou quantidade de diversas proteínas, se não a maioria. Portanto, conhecer quais proteínas são alvos deste processo e como elas são modificadas é essencial para entender mecanismos básicos da biologia celular de organismos.

Para tanto, a identificação do ubiquitinoma (GRILLARI; KATINGER; VOGLAUER, 2006) de uma célula usando espectrometria de massas é extremamente relevante. No entanto, devido à baixa abundância de proteínas ubiquitinadas comparadas ao proteoma total da célula, a análise direta dos alvos modificados não é suficiente para identificar a maioria deles.

Pesando nisso, diversos pesquisadores desenvolveram estratégias visando o enriquecimento de proteínas ubiquitinadas do proteoma total. Os primeiros trabalhos com esse objetivo usaram etiquetas moleculares ligadas à ubiquitina, expressas na célula de interesse. Estas etiquetas foram usadas tanto como sítios de ligação para anticorpos específicos, como no caso de HA e myc (ELLISON; HOCHSTRASSER, 1991), quanto como sítios que se ligam a resinas de afinidade, como biotina e poli-histidina (BEERS; CALLIS, 1993; LING et al., 2000). O uso da etiqueta de poli-histidina confere uma vantagem à metodologia de enriquecimento de alvos ubiquitinados pois pode ser realizado em condições desnaturadas, reduzindo consideravelmente a quantidade de proteínas contaminantes (que não são modificadas por Ub). Isso só é possível devido à natureza da ligação entre a Ub e o alvo, a qual é uma ligação covalente isopeptídica, as quais são mantidas mesmo após o tratamento desnaturante (CALLIS; LING, 2005).

Ainda assim era necessário o estabelecimento de um método que pudesse ser aplicado em tecidos provenientes de animais ou pacientes que não podem receber transgenes. Neste sentido, anticorpos contra ubiquitina (MATSUMOTO et al., 2005; VASILESCU et al., 2005), ou mesmo proteínas contendo domínios de ligação à Ub (UBD), ou o próprio UBD isolado, foram amplamente utilizados para o enriquecimento de proteínas ubiquitinadas (LAYFIELD et al., 2001; RAASI et al., 2005).

O primeiro estudo de identificação em larga escala dos alvos ubiquitinados usou a abordagem de etiqueta de poli-histidina seguido por proteômica em espectrometria de massas

(MS) (PENG et al., 2003). Neste estudo, realizado em leveduras, 1075 proteínas foram identificadas como potenciais alvos da ubiquitinação e 110 sítios modificados foram identificados em 72 proteínas. Este trabalho é bastante importante para a área pois mostra uma relevante constatação: a identificação dos sítios de ubiquitinação por MS é de extrema importância, uma vez que traz confiabilidade ao resultado obtido, ou seja, se um dos peptídeos da proteína identificada tiver a assinatura referente à modificação por Ub significa que a proteína é realmente ubiquitinada. Esta assinatura, facilmente identificável por MS, é originada a partir da digestão triptica dos alvos modificados. Logo após o último resíduo de arginina da molécula de Ub existem 2 resíduos de glicina ligados covalentemente à lisina do peptídeo alvo, quando a Ub é digerida pela tripsina (que cliva após lisina ou arginina) estes dois resíduos de glicina permanecem ligados ao peptídeo alvo e geram uma alteração na massa da lisina modificada de 114,1 Da (Fig 1.11) (PENG et al., 2003).



**Figura 1.11 Estratégia para identificação do sítio específico di-glicina após digestão por tripsina em MS.**

Após a digestão por tripsina, uma assinatura di-glicina remanescente da Ub que permanece covalentemente ligada ao resíduo de lisina do peptídeo alvo. Este resíduo de lisina, fica inacessível à tripsina e portanto não é clivado. Adaptado de (PENG et al., 2003).

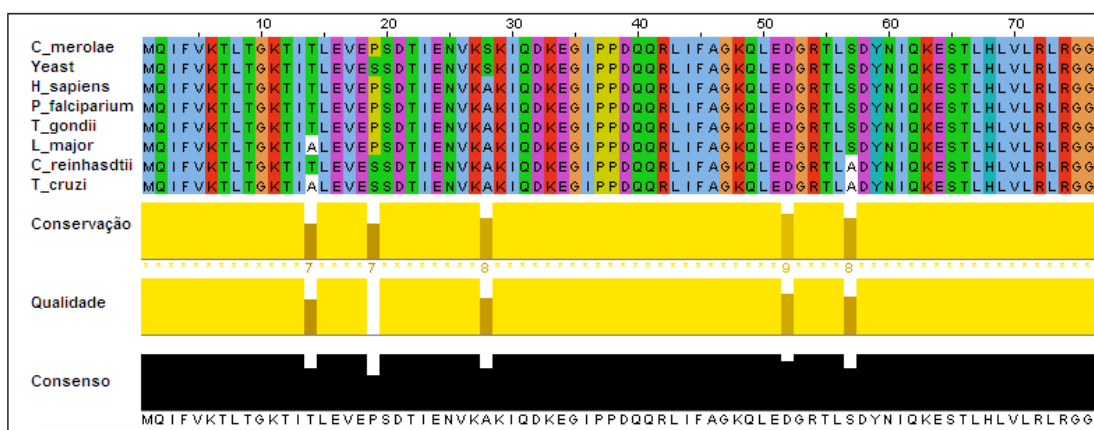
Em seguida, diversos trabalhos foram publicados mostrando novas proteínas e sítios ubiquitinados em diferentes organismos: levedura (NA; PENG, 2012; NAKAYASU et al., 2013; SEYFRIED et al., 2008; XU et al., 2009), planta (KIM et al., 2013), mosca (XU et al., 2012), camundongo (JEON et al., 2007) e humanos (KIRKPATRICK et al., 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2012; MATSUMOTO et al., 2005; OSHIKAWA et al., 2012)

Um importante trabalho recente descreveu um método bastante eficaz para identificação em larga escala de sítios de ubiquitinação. A abordagem consiste em enriquecer peptídeos ubiquitinados a partir do proteoma digerido por tripsina (XU; PAIGE; JAFFREY, 2010). Como mencionado anteriormente, após a digestão com tripsina, os alvos permanecem ligados à dois resíduos de glicina remanescentes da Ub. Este trabalho descreve a utilização de anticorpos que reconhecem especificamente esta assinatura GlyGly-Lys, possibilitando o enriquecimento de apenas o peptídeo modificado, excluindo todos os demais peptídeos da proteína ubiquitinada que poderiam competir durante a análise por MS. Neste trabalho foram

identificados 372 sítios ubiquitinados em células HEK293 (rim de embrião humano), dos quais 92% sítios nunca relatados antes na bibliografia. Em seguida, um salto gigantesco nesta área surgiu com dois novos trabalhos, os quais usaram a mesma abordagem para identificar cerca de 19 mil sítios em aproximadamente 5 mil proteínas em células HCT116 (câncer de cólon humano) (KIM et al., 2011), e 11.054 sítios em 4.273 proteínas em células HEK293 (WAGNER et al., 2011). Esta grande diferença encontrada na quantidade de sítios identificados entre os 2 últimos trabalhos e o primeiro se dá principalmente pela metodologia de preparo da amostra (quantidade de amostras, fracionamento de cada amostra, etc.) e equipamento utilizado na identificação, sendo o do primeiro artigo um equipamento muito menos sensível e sem cromatografia acoplada ao MS. Um artigo recente descreve uma metodologia passo-a-passo para identificação de dezenas de milhares de sítios ubiquitinados em uma determinada amostra (UDESCHI et al., 2013a, 2013b).

### 1.2.7 Ubiquitinação em tripanossomatídeos

A ubiquitina, como já mencionado anteriormente é uma das proteínas mais conservadas em eucariotos, diferindo entre humanos e *T. cruzi* em apenas 3 aminoácidos (Fig. 1.12). Apesar de existir esta conservação entre os genes codificadores de Ub, a organização destes no genoma de cada organismo é diferente, sendo observadas diversidades interespecies no número e composição dos genes de Ub.



**Figura 1.12 Alinhamento múltiplo da sequência de Ub de diferentes eucariotos.** ▲  
 Estão representados os 3 aminoácidos distintos entre *T. cruzi* e *Homo sapiens* nas posições 14, 19 e 57. As cabeças de seta apontam as lisinas K29, K48 e K63, geralmente usadas na polimerização de Ub. O alinhamento foi realizado usando a sequência de Ub das espécies *Cyanidioschyzon merolae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Plasmodium falciparium*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *T. cruzi*, visualizado com o auxílio do programa JalView (<http://www.jalview.org>) (Clamp e cols., 2004).

Em *T. cruzi* existem 5 genes de poliubiquitina (PUB) e 5 genes de fusão (FUS), os quais somam aproximadamente 100 unidades de domínios Ub. Os genes FUS codificam para uma Ub na extremidade N-terminal fusionada a um domínio C-terminal de 52 aminoácidos (KIRCHHOFF et al., 1988; SWINDLE et al., 1988). A predição da sequência aminoacética deste gene de 52 aminoácidos não codificador de Ub mostrou tratar-se de um motivo potencialmente ligador de metais e ácidos nucleicos, motivo pelo qual foi encontrado em um fator de transcrição de *Xenopus laevis* (MILLER; MCLACHLAN; KLUG, 1985). Pouco tempo depois Baker e Board publicaram um trabalho comparando este domínio com uma subunidade ribossomal (BAKER; BOARD, 1991). Os genes PUB consistem de repetições, de número variado, da sequência codificadora de Ub, seguido por um gene FUS. Curiosamente tais genes (PUB e FUS) são diferencialmente expressos em resposta a diferentes estímulos ambientais: células de *T. cruzi* em fase estacionária de crescimento têm a transcrição do gene PUB aumentada enquanto que a do gene FUS está diminuída (MANNING-CELA; JAISHANKAR; SWINDLE, 2006; SWINDLE et al., 1988).

Posteriores caracterizações da organização dos genes de Ub em *T. cruzi* descreveram a ligação dos genes de Ub à genes codificadores de calmodulina (CHUNG; GILLESPIE; SWINDLE, 1994; CHUNG; SWINDLE, 1990). A calmodulina é outra proteína altamente conservada entre os eucariotos que, assim como a Ub, regula a atividade de diversas proteínas, mas através de sua ligação ao cálcio (MEANS, 2008). O gene CUB (do inglês: *calmodulin-ubiquitin associated*), liga os genes de calmodulina e Ub (AJIOKA; SWINDLE, 1993) e foi visto como sendo um gene essencial para a viabilidade do *T. cruzi* (AJIOKA; SWINDLE, 1996) e para a virulência do mesmo (BARRIO; VAN VOORHIS; BASOMBRÍO, 2007).

A via de ubiquitinação, apesar de ser bem conhecida em eucariotos, em *T. cruzi* ainda não foi caracterizada. Um dos primeiros trabalhos realizados visando elucidar os mecanismos de degradação protéica em *T. cruzi* demonstrou que existia o envolvimento do sistema de ubiquitinação na degradação não lisossomal de proteínas em condições de estresse nutricional (HENRIQUEZ et al., 1993).

Alguns trabalhos reconhecem o envolvimento do processo de degradação por proteassomo dependente de Ub na diferenciação de formas tripomastigotas metacíclicas → amastigotas → tripomastigotas sanguíneos cultivados *in vitro* (DE DIEGO et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 1996), bem como na diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (CARDOSO et al., 2008).

O envolvimento da ubiquitinação na internalização de proteínas de membrana foi relatado no tripanosomatídeo *T. brucei*, especulando uma provável função na endocitose através de ubiquitinação de ectofosfatases de membrana (STEVERDING, 2006) e internalização da glicoproteína de superfície invariante (ISG)65 através do envolvimento de ubiquitinação e de clatrina (CHUNG et al., 2008). Também foi verificado o envolvimento da ubiquitinação na internalização do receptor de membrana PEX5 em *T. brucei*, receptor que auxilia na biogênese de glicosossomos (GUALDRÓN-LÓPEZ et al., 2013).

Além disso, o repertório das enzimas envolvidas no processo de ubiquitinação em *T. cruzi* pode ser identificado através de buscas em bancos de dados genômicos de tripanosomatídeos ([www.tritrypdb.com](http://www.tritrypdb.com)). Através da busca por domínios relacionados ao sistema de ubiquitinação foram encontrados em *T. cruzi* 7 potenciais enzimas E1, 26 E2 e 79 E3. Em *T. brucei* a busca resultou em 4 potenciais enzimas E1, 15 E2, 51 E3, e em *L. major* 4 potenciais enzimas E1, 14 E2 e 56 E3.

Porém, a atuação e caracterização desse sistema, bem como a atividade de seus elementos ainda não são bem entendidas neste eucarioto primitivo. Tais informações são de extrema importância, uma vez que seu pleno entendimento poderia contribuir para preencher lacunas existentes na compreensão de como ocorre a diferenciação em *T. cruzi*, e qual o papel desse sistema proteolítico no disparo da metaciclogênese.

A via proteassomo-Ub pode ser de grande importância na diferenciação do *T. cruzi*, pois acredita-se ser um dos principais processos mantenedores do equilíbrio síntese X degradação de proteínas estágio específicas. Do mesmo modo, como já mencionadas anteriormente, novas descobertas demonstram o envolvimento da ubiquitinação não apenas na degradação protéica, mas em inúmeras modificações pós-traducionais em proteínas chaves de diversos processos celulares, fato que tem estimulado os estudos sobre o papel dessa via em diversos organismos modelos e doenças.

Apenas um estudo em larga escala usando espectrometria de massas para identificação de alvos das Ub/Ub-like em tripanosomatídeos foi realizado usando *T. cruzi* com o objetivo de identificar os alvos da SUMOilação (BAYONA et al., 2011). Neste trabalho foram identificados um total de 236 proteínas enriquecidas através de dupla cromatografia de afinidade de extrato protéico de transfectantes expressando SUMO com etiqueta HA e 6xHistidina. Porém, em um trabalho recente foi realizada uma nova análise mais minuciosa dos resultados gerados no trabalho anterior e foi possível identificar apenas 8 peptídeos SUMOilados em 7 proteínas (XU et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

Com base no que foi exposto anteriormente, fica claro a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que conduzem à diferenciação do *T. cruzi* para formas infectiva, e o estudo de modificações pós traducionais tem um papel muito importante neste sentido uma vez que a regulação da expressão de genes neste parasita acontece a nível pós-transcricional. Mesmo com tamanha importância, o estudo de alvos ubiquitinados em *T. cruzi* é muito escasso, como mencionado anteriormente.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal a identificação e quantificação das proteínas modificadas por ubiquitina ao longo da diferenciação de formas epimastigotas de *T. cruzi* para tripomastigotas metacíclicas (formas infectivas). Com isso é possível visualizar e entender como proteínas são moduladas por este sistema durante a diferenciação.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Soluções e tampões

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

PBS (solução salina de fosfato) 10x: 2,7 mM de KCl, 1,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,3 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 137 mM de NaCl.

PSG: 47,47 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2,5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 36,76 mM de NaCl, 55,5 mM de Glicose.

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

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

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

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

Tampão de eluição com Imidazol: 0,5 M NaCl; 20 mM Tri-HCl pH 7.5; 10% Glicerol; 2 mM PMSF; 0,1 M a 0,3 M Imidazol.

Tampão de eluição para afinidade 1: 20mM de HEPES pH 7.4; 2,5 mM de MgCl; 1,2 M de Sulfato de Amônio; 300 mM de imidazol; 1 mM PMSF; 10  $\mu\text{M}$  E-64.

Tampão de eluição para afinidade 2: 100 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 50 mM de NaCl; 300 mM de imidazol; 1 mM PMSF; 10  $\mu\text{M}$  E-64.

Tampão de estocagem de células cálcio competentes: 100 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10 mM Hepes pH7.0; Glicerol 10%.

Tampão de extração para metabolômica: 20% Clorofórmio, 60% metanol.

Tampão de extração para proteômica com Uréia: 6M de uréia, 1M de tiouréia, 1mM de DTT, 1% de Noct, Mix de Inibidor de Protease (Amersham), 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de Cloroacetamida e 75 U de Benzonase por mg de proteína.

Tampão de extração para proteômica com SDS: 4% de SDS, 100mM de Tris pH 7.5, 100mM DTT.

Tampão de lavagem renaturante: 0,5 M NaCl; 20 mM Tri-HCl pH 7.5; 30 mM Imidazol; 10% Glicerol; 2 mM PMSF.

Tampão de lavagem de corpos de inclusão: 100 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 M NaCl; 2% Triton X-100; 2 M uréia; 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM.

Tampão de lise de bactérias: 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 M NaCl; 10 mM Imidazol; 10% Glicerol; 2 mM PMSF.

Tampão de lise desnaturante: 0,02 M Tris-HCl pH8.0; 0,01 M MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1% SDS; 0,01 M β-mercaptoetanol; 1 mM PMSF; 10 μM E-64; 0,01 M Iodoacetamida.

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

Tampão de lise hipotônico: 10mM de HEPES pH 7.4; 2,5 mM de MgCl; 10 mM NaCl; 1 mM PMSF; 10 μM E-64.

Tampão de preparo de células cálcio competentes: 100 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM Hepes pH 7.0.

Tampão de revelação de Western: 0,1 M Tris-HCl pH 9.5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Tampão de solubilização de corpos de inclusão: 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl pH8.0; 10 mM Imidazol e 8 M Uréia.



Tampão IAP: 50 mM de MOPS/NaOH pH7.2; 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 50 mM de NaCl.

Tampão isotônico: 10mM de HEPES pH 7.4; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 130 mM NaCl; 1 mM PMSF; 10 μM E-64.

Tampão *MonoQ* A: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 mM NaCl.

Tampão *MonoQ* B: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 M NaCl.

Tampão NKM: cicloheximida 10 μg/ml; heparina 20 U/ml; hepes pH 7,4 10 mM; KCl 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM e NaCl 140 mM.

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

Tampão *phenyl* A: 1,2 M de Sulfato de Amônio; 20 mM de HEPES pH 7.5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Tampão *phenyl* B: 20 mM de HEPES pH 7.5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Tampão *phenyl* C: 20 mM de HEPES pH 7.5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Glicerol 20%.

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

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

Solução A: 0,1 % de Ácido fórmico em água.

Solução ABC (Tampão de digestão): 50mM de bicarbonato de amônio em água (pH 8,0).

Solução B: 0,1 % de Ácido fórmico, 100% de acetonitrila.

Solução de fixação de SDS-PAGE: Etanol 50%; Ácido Acético 12%; Formaldeído 0,02%.

Solução de coloração por prata: Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%.

Solução de Descoloração de SDS-PAGE: Metanol 4%; Ácido Acético 7,5%.

Solução de revelação de prata: Carbonato de Sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 ml de solução de sensibilização.

Solução de sensibilização para coloração por prata: Tiosulfato de Sódio 0,02%.

Solução de término de revelação de prata: Etanol 50%; Ácido Acético 12%.

Solução UA: 8 M de Uréia, 0,1 M Tris/HCl pH 8.5.

### **3.2 Organismos**

*Escherichia coli*

Linhagens: Tuner e DH5 $\alpha$

*Trypanosoma cruzi*

Clone: Dm28c em diferentes fases da metaciclogênese (epimastigotas, epimastigotas estressados e tripomastigotas metacíclicos), CL14, CLBrenner, Colombiana, Esmeraldo e Y

*Mus musculus*

Fêmeas de linhagem *Swiss*

### **3.3 Confeção de meios de cultura tradicionais**

Meio LB: Para 1 litro de meio - Bacto-triptona 10 g/l; Extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l. Método de preparo: diluir em água ultrapura, esterilizar por autoclavagem.

Meio LB agar: Para 1 litro de meio - Meio LB suplementado com 15 g/l de agar. Dispor 25ml do meio ainda quente em placas de Petri estéreis.

LITB (*Liver Infusion Tryptose*): Para 1 litro de meio - Extrato de levedura 15 g/l; Fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; Glucose 2,2 g/l; Hemina 0,02 g/l; Infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4

g/l; NaCl 4,4 g/l; Triptose 5 g/l; suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e Penicilina 63 mg/l; pH 7,2. Método de preparo: Dissolver todos os ingredientes em água ultrapura, com exceção da hemina\* e do SFB. Ajustar pH com HCL fumegante. \*Dissolver hemina em NaOH 1M em uma concentração de 50 mg/ml, filtrar em filtro 0,45 µm e adicionar ao meio 0,5 ml. Esterilizar por filtração em 0,22 µm. Suplementar com 10% de SFB inativado estéril.

TAU (Triatomine Artificial Urine): Para 1 litro de meio - CaCl<sub>2</sub> 2 mM; KCl 17 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; NaCl 190 mM; Tampão fosfato 8 mM e Penicilina 63 mg/l. Método de preparo: Dissolver inicialmente o NaHCO<sub>3</sub> em água ultrapura, em seguida adicionar todos os demais componentes e esterilizar por filtração em 0,22 µm.

TAU3AAG: Para 1 litro de meio - Meio TAU suplementado com Glicose 10 mM; Ácido L-aspártico 2mM; Ácido L-glutâmico 50 mM; L-prolina 10 mM e Penicilina 63 mg/l.

### 3.4 Confeção de meios quimicamente definidos para cultivo de *T. cruzi*

Composição dos meios definidos:

**Tabela 3.1** Composição de meios definidos.

	Solvente	Concentração do estoque (mg/ml)	Concentração final (mg/L)				
			AR-103	HX25M	SDM79	HAS	LM14
CaCl <sub>2</sub>	Sem diluição estoque			176	180	180	176
Beta-Na Glicerofosfato 5H <sub>2</sub> O		20000			20000		
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O			2,6	0,14	2,6	2,6	
KCl		400	700	360	700	700	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			900		900	900	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O			176	180	180	176	
NaCl		4000	6980	6120	6980	6980	
NaHCO <sub>3</sub>			2740	3980	3980	2740	
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O		5000			5000		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O			123	126	126	123	
Na succinate		270			270		
Na acetate		790	548	10	790	548	
Citrato.Na <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O		600	600		600	600	
Glucose			4500	1900	4500	4500	
Glucosamina.HCl			73	50	73	73	

Frutose			2000			2000	
Vermelho de fenol				23	11	23	23
HEPES				19000	8000	19000	19000
MOPS					5000	5000	
EDTA				80		80	80
Hemina	0,5 M NaOH	20		10		10	10
Alanina	H <sub>2</sub> O	30	285	182	210	285	182
Arginina.HCl*	H <sub>2</sub> O	50	550	462	215	550	462
Asparagina	H <sub>2</sub> O	10	100	100	8	100	100
Ácido Aspartico	1M HCl	42,6	550	426	14	550	426
Cisteína	H <sub>2</sub> O	10	100	100	0,020	100	100
Cistina	1M HCl	29	140	58	29	140	58
Ácido Glutamico	1M HCl	48	1045	290	24	1045	290
Glutamina	H <sub>2</sub> O	23,5	100	188	320	100	188
Glicina	H <sub>2</sub> O	72	350	144	15	350	144
Histidina.HCl.H2O	H <sub>2</sub> O	30	260	178	38	260	178
Hidroxiprolina	H <sub>2</sub> O	3,6	50	9	2	50	9
Isoleucina	H <sub>2</sub> O	16	400	318	46	400	318
Leucina	1M HCl	51	760	513	54	760	513
Lisina.HCl*	H <sub>2</sub> O	50	750	422	72	750	422
Metionina	H <sub>2</sub> O	28	175	113	85	175	113
Fenilalanina	H <sub>2</sub> O	23	375	272	111	375	272
Prolina	H <sub>2</sub> O	23	780	228	615	780	228
Serina	H <sub>2</sub> O	45,5	285	182	71	285	182
Taurina	H <sub>2</sub> O	10			160	160	
Treonina	H <sub>2</sub> O	38,6	270	386	394	394	386
Triptofano	H <sub>2</sub> O	10	140	99	10	140	99
Tirosina	1M HCl	77,5	360	155	150	360	155
Valina	1M HCl	38,2	485	382	42	485	382
Ácido p-aminobenzoico	H <sub>2</sub> O	1	0,250	0,044	2,010	2,010	0,044
Ascorbic acid	H <sub>2</sub> O	1	0,250	0,044	0,010	0,250	0,044
D-alpha-tocopherol	Etanol Abs.	10	4	4	0,002	4	4
DL-alpha-lipoic acid	Etanol Abs.	10	0,400	0,400		0,400	0,400
B12 / Cobalamin	H <sub>2</sub> O	5		1		1	1
Biotin	H <sub>2</sub> O	0,02	10	1	0,200	10	1
D-Ca pantothenate	H <sub>2</sub> O	10	10	1	0,700	10	1
Choline chloride	H <sub>2</sub> O	10	12	1,440	0,800	12	1,440
Coenzima Q <sub>10</sub> **	DMSO	50		0,400			0,400
Calciferol	Etanol Abs.	5		0,088	0,021	0,088	0,088
Folic Acid	1M NaOH	5	30	10	4,735	30	10
i-Inositol	H <sub>2</sub> O	20	20	2,040	1,469	20	2,040
L-glutathione (reduced)	H <sub>2</sub> O	1	2,500	0,010	0,011	2,500	0,010
Menadione	Etanol Abs.	10	0,450	0,410	0,003	0,450	0,410
Niacin / Nicotinic Acid	H <sub>2</sub> O	1	0,125	0,022		0,125	0,022

Nicotinamide / Niacinamide	H <sub>2</sub> O	10	10	1	0,005	10	1
Pyridoxal.HCl	H <sub>2</sub> O	10	10	1,022	0,740	10	1,022
Pyridoxine.HCl	H <sub>2</sub> O	1	0,125	0,022	0,005	0,125	0,022
Riboflavina	H <sub>2</sub> O	0,2	10	0,109	0,002	10	0,109
Ácido Trans-retinoico	Etanol Abs.	10		0,400		0,400	0,400
Vitamina A acetato	H <sub>2</sub> O	3,3		0,120	0,030	0,120	0,120
Piruvato.Na	1M NaOH	10			100	100	
Ácido Succinico	H <sub>2</sub> O	189		270		270	270
Adenina SO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	1M NaOH	8,8	50	8,800	2,127	50	8,800
Adenosina	H <sub>2</sub> O	2,3	20	20	10	20	20
AMP.H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	0,5	1	0,180	0,051	1	0,180
ATP.Na <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	10	50	0,880	0,213	50	0,880
Citidina	H <sub>2</sub> O	35		20		20	20
D-ribose	H <sub>2</sub> O	20		0,440	0,100	0,440	0,440
deoxi-D-ribose	H <sub>2</sub> O	20		0,440	0,100	0,440	0,440
Guanina.HCl.2H <sub>2</sub> O	1M NaOH	4	1,500	0,260	0,064	1,500	0,260
Guanosina	1M NaOH	10	20	20		20	20
Hipoxantina	H <sub>2</sub> O	0,25	1,500	0,260	0,064	1,500	0,260
Timina	1M NaOH	3,3		0,260	0,064	0,260	0,260
Tiamina	H <sub>2</sub> O	10	10	1	0,737	10	1
Uracila	1M NaOH	5		0,260	0,064	0,260	0,260
Uridina	H <sub>2</sub> O	46,6		20		20	20
Xantina.Na	1M NaOH	5	1,500	0,260	0,073	1,500	0,260
Colesterol	Etanol Abs.	4		0,180	0,043	0,180	0,180
Tween 80	H <sub>2</sub> O	106,4		17,6	4,254	17,6	17,6
Tween 40 (palmitato)	H <sub>2</sub> O	108,3		5		5	5
Ácido Linoleico		902		8		8	8
Albumina bovina				300		300	300
Soro fetal bovino					0,100		
Penicilina			63	63	59	63	63
Estreptomina					133		
Putrescina	H <sub>2</sub> O	160					1,6
6-Biopterina	H <sub>2</sub> O	240					0,24

\* Arginina e Lisina não são adicionadas ao meio SILAC.

\*\* Coenzima Q10 foi usada apenas nos primeiros testes com o meio, mas não é essencial e resultou na diminuição do crescimento e morte das células, portanto foi excluída da composição.

### Método de preparo dos meios definidos:

O método de preparo de todos os meios definidos utilizados no presente trabalho foi o mesmo descrito a seguir.

Os componentes insolúveis em água foram dissolvidos individualmente em seus respectivos solventes, a uma concentração abaixo do limite de solubilidade de cada

componente (nas tabelas de composição de cada meio estão identificados os solventes apropriados e as concentrações usadas para diluição). Os componentes solúveis em água e que possuem uma quantidade de uso no meio muito pequena (abaixo de 10 mg) também foram dissolvidos individualmente para evitar variações na quantidade.

Para remoção do etanol, as quantidades requeridas para 1 litro de meio dos componentes solubilizados no mesmo foram dispostas em um *beaker* de volume superior a 1 litro e aquecidos a 40 °C até que o etanol fosse completamente evaporado. Em seguida, 500 ml de água ultrapura foi adicionada ao recipiente e a mistura foi agitada a 40 °C por aproximadamente 1 hora para que todos os componentes fossem solubilizados. À esta mistura foram adicionados todos os sais, bem como os demais componentes solubilizados individualmente. Por último foram colocados a hemina (preparo conforme descrito anteriormente na seção de preparo do meio LITB), a penicilina e o vermelho de fenol. O pH foi ajustado para 7,2 e a esterilização foi realizada por filtração em filtro 0,22 µm

### **3.5 Manipulação de bactérias cálcio competentes**

#### Preparo de células cálcio competentes

Uma colônia de *E. coli* da linhagem desejada foi inoculada em 5.0 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado para cada linhagem. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. Um volume de 1.0 mL (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB e a mesma foi incubada a 37 °C sob agitação constante até o início da fase de crescimento exponencial (densidade ótica<sub>600</sub> de 0.4 a 0.6, aproximadamente 3 horas).

Após o crescimento, as células foram resfriadas no gelo por 15 minutos. A partir desse ponto todas as etapas foram feitas a 4 °C. A cultura foi centrifugada a 4000 x g, por 5 minutos, a 4 °C, e as células foram ressuspensas em 50 mL (metade do volume da cultura original) de tampão de preparo de células cálcio competentes gelado e estéril e mantidas no gelo durante 30 minutos para então serem submetidas à uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2.0 mL (1/50 do volume da cultura original) de tampão de estocagem de células cálcio competentes. As células foram aliquotadas e estocadas a -70 °C.

### Transformação por choque térmico

Aproximadamente 100 µl de células cálcio competentes foram incubadas com aproximadamente 50 ng dos plasmídeos purificados por 30 minutos em gelo. Logo depois, foi realizado choque térmico – 3 minutos a 42 °C e 3 minutos no gelo. Após a realização da transformação, as células foram incubadas em meio LB, por 1 hora a 37 °C sob agitação de 220 rpm, e inoculadas em 5 ml de meio LB com antibiótico apropriado para seleção ou plaqueadas em meio LB agar também com antibiótico para seleção. A cultura líquida foi incubada sob agitação (220 rpm) a 37 °C durante a noite (16 horas) e a cultura em placa foi incubada da mesma forma, porém sem agitação.

### **3.6 Amplificação e clonagem do gene de ubiquitina de *T. cruzi* para expressão em bactérias**

#### Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

A extração e purificação das moléculas de DNA foi realizada conforme publicado previamente (FRAGOSO; GOLDENBERG, 1992). Assim,  $1 \times 10^{10}$  células foram lavadas em tampão NKM e lisadas como descrito previamente (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), para ter os núcleos celulares parcialmente purificados foi necessário três ciclos de centrifugação a 800 x g, por 10 minutos, a 4 °C. Esta fração foi incubada em EDTA 5 mM, NaCl 10 mM, proteínase K 100 µg/ml, SDS 0,5 % e Tris-HCl pH 7,6 10 mM, por 12 horas, a 37 °C. O DNA foi extraído com fenol saturado em tris-base 100 mM e purificado em várias diálises em EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e tris-HCl pH 7,6 10 mM.

#### Eletroforese de DNA

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

## Desenho de iniciadores e amplificação

Foram desenhados iniciadores direto e reverso para amplificação da sequência correspondente ao genes da Ub de *T. cruzi*, com o auxílio do programa *Primer Select (Laser Gene, DNA Star)*, usando como base a sequência deste gene disponível no banco de dados do TriTrypDB ([www.tritrypdb.org](http://www.tritrypdb.org)) (Figura 3.1).

```
ATGCAGATCTTTGTGAAGACTGACGGGCAAGACGATCGCGCTCGAGGTGGAATCCAGCGACACCATTGAGAACGTG
AAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAAGGCATTCCACCGGACCAGCAGCGCCTGATCTTCGCTGGCAAGCAGCTGGAGGAC
GGCCGCACGCTTGCAGACTACAACATCCAGAAGGAGTCCACGCTGCACCTTGTGCTGCGCCTGCGCGGCGGCTAA
```

**Figura 13.1 Sequência nucleotídica da Ub de *T. cruzi*.**

Sequência com 231 pb, usada como base para o desenho dos iniciadores para amplificação da Ub. A sequência representada é uma fita simples, referente à porção codificante e está na orientação 5'→3'.

Aos iniciadores foram acrescentadas sequências de bases para a ligação entre o gene e o vetor chamadas attB1 e attB2, que são sítios que possibilitam a clonagem na plataforma Gateway®. As características dos iniciadores desenhados estão apresentadas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2 Características dos iniciadores desenhados para clonagem de Ub na plataforma Gateway.**

Estão identificados o nome do iniciador, sua respectiva sequência e Temperatura de Fusão (T<sub>m</sub>). Os nucleotídeos em destaque nos iniciadores correspondem aos sítios attB para recombinação com o vetor de entrada pDONR<sup>TM</sup>221. Legenda: F' = iniciador direto (*forward*); R' = iniciador reverso.

INICIADORES	SEQUENCIA	T <sub>m</sub> .
attb1_Ub F'	5' <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAGATCTTTGTGAAGACT</u> G 3'	70.5 °C
attb2_Ub R'	5' <u>GGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCCGCCGCGCAGGCGCAG</u> 3'	78.7 °C

O gene da Ub foi amplificado a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, clone Dm28c, com o auxílio do *kit PCR Platinum® Pfx* (INVITROGEN), o qual utiliza uma DNA polimerase proveniente de *Thermococcus sp.* de linhagem KDO (TAKAGI et al., 1997), chamada *Platinum® Pfx DNA Polymerase*. Esta é uma enzima de alta fidelidade que minimiza os erros de polimerização, possibilitando melhores resultados. A mistura para a reação continha, em um volume final de 20 µl, 10 pmol dos iniciadores direto e reverso, 0,3 mM dos quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP), 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 5ng de DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c e 1 unidade de *Platinum® Pfx* DNA polimerase, em tampão *Pfx* 1X, as mesmas concentrações de reação foram utilizadas para todos os iniciadores. As reações foram submetidas a 35 ciclos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase): desnaturação – 94 °C, 15 segundos –, hibridação dos iniciadores – 55 °C, 30 segundos – e polimerização – 68 °C, 1 minuto. Antes do primeiro ciclo, as reações foram mantidas a 94 °C, por 3 minutos. O resultado da amplificação foi verificado em gel de Agarose 1,5%.



### Purificação de produtos de amplificação

A purificação dos produtos de amplificação é realizada tanto para eliminar possíveis seqüências amplificadas inespecificamente e que não são de interesse para o trabalho, quanto para remover os iniciadores que contém os sítios de recombinação attB, e que são fortes competidores pelo sítio attP do vetor, dificultando a clonagem dos insertos.

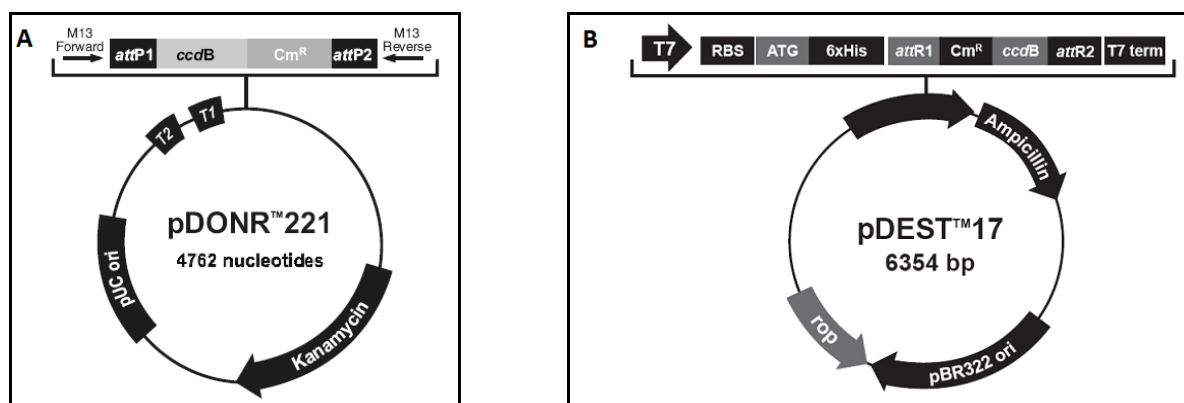
A metodologia de purificação escolhida foi a purificação em gel: 10% do produto de amplificação foi aplicado em uma canaleta do gel de agarose 2% e todo o produto restante foi aplicado em outra canaleta do mesmo gel, colocando o marcador de massa molecular ao lado da canaleta com 10% da amostra. O gel foi submetido a eletroforese e, então, a parte do gel que possui 10% do produto de amplificação foi cortada do restante do gel, juntamente com o marcador de massa molecular, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador. Assim, foi possível visualizar a banda de interesse e marcar o gel na posição em que ela se encontrava. Em seguida, este gel marcado foi disposto ao lado do restante do gel que não foi corado com brometo de etídeo e, com base na marcação realizada no gel corado, pôde-se cortar o pedaço do gel no qual o fragmento de interesse se encontrava, evitando contaminá-lo com brometo de etídeo e expô-lo a UV.

Em seguida, a banda excisada do gel foi colocada no interior de uma ponteira de 1000 mL com filtro, a qual foi encaixada em um tubo eppendorf. A seguir, este tubo foi centrifugado a 6000 x g por 5 minutos. Do material deste modo obtido, o fragmento de DNA foi precipitado acrescentando acetato de sódio 3 M na proporção 1:10 (1 parte de acetato de sódio para 10 partes de produto da purificação), etanol 100% na proporção 3:1 e 1 µl de glicogênio. A solução foi homogeneizada e incubada por 20 minutos no gelo seco ou durante a noite a -20° C. Foi centrifugada por 20 minutos a 14000 x g, lavada 2 vezes com etanol 70% e o precipitado foi seco a 50° C para evaporar os resíduos de etanol, então o fragmento de DNA purificado foi ressuspenso em 10 µl de água ultrapura.

### Clonagem do gene nos vetores de interesse

A clonagem e expressão foram realizadas de acordo com a tecnologia *Gateway*<sup>®</sup> (INVITROGEN), a qual utiliza métodos baseados na recombinação sítio-específica existente em bacteriófagos lambda (LANDY, 1989). Para a clonagem foram utilizados um vetor de entrada na plataforma, pDONR<sup>TM</sup>221, e um vetor de expressão em bactérias, pDEST<sup>TM</sup>17 (Figura 3.2).

A clonagem do fragmento correspondente ao gene de Ub na Plataforma *Gateway*® foi possível através da recombinação entre os sítios attB do produto da amplificação e attP do vetor pDONR221 (INVITROGEN) com o auxílio do *mix* enzimático *BP Clonase*<sup>TM</sup>II (INVITROGEN) originando um sítio attL. Para tanto, 9 ng do produto de PCR previamente purificados foram incubados com 150 ng do vetor pDONR221 e com a *BP Clonase* por 7 horas a 25 °C, diluído em tampão TE pH8.0. A reação foi parada com a adição de Proteinase K.



**Figura 14** Desenho dos vetores de clonagem e expressão em *E. coli*.

A) pDONR<sup>TM</sup>221 - Em destaque o sítio RFA de inserção do gene com os adaptadores attP1 e attP2 que permitem a recombinação com os adaptadores attBtev e attB2 do gene. B) pDEST<sup>TM</sup>17 - destacando as principais características do vetor, como o promotor T7, a seqüência codificadora de 6 histidinas, sítios attR de recombinação com os sítios attL dos clones de entrada, gene de seleção ccdB. Fonte: Catálogo *Gateway*® *Technology Invitrogen* (2006)

Bactérias *E. coli* cálcio competentes de linhagem DH5α foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos recombinados a fim de propagá-los. Os plasmídeos clonados foram purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*QIAGEN*), conforme recomendações do fabricante.

O inserto foi transferido para o vetor pDEST17 (INVITROGEN), com o auxílio do *mix* enzimático *LR Clonase*<sup>TM</sup> II (INVITROGEN), através dos sítios attL do clone de entrada e attR do vetor de destino. A recombinação foi obtida através da incubação de 150 ng do clone de entrada, 150 ng de vetor de destino, tampão TE pH 8.0 e *LR Clonase*<sup>TM</sup>II por 12 horas a 25 °C. Após incubação foi acrescentado 1 µl de Proteinase K para encerrar a reação. Estes plasmídeos recombinados foram propagados em *E. coli* cálcio competentes de linhagem DH5α através de choque térmico e purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*QIAGEN*), conforme recomendações do fabricante.

A verificação das clonagens foi realizada por PCR do plasmídeo purificado ou PCR de colônias de *E. coli* transformadas com os plasmídeos, utilizando os iniciadores para a

sequência da Ub e visualizando os resultados por eletroforese da amplificação em matriz de agarose, como descrito anteriormente. Como controle negativo desta verificação, os vetores sem clonagem foram submetido à PCR, também utilizando os iniciadores para a sequência da Ub, nas mesmas condições. A correta inserção da sequência foi avaliada por sequenciamento dos vetores em um sequenciador automático de DNA (*Applied Biosystems Thermo Sequenase* modelo 3100 *Genetic Analyser*). A metodologia aplicada no sequenciamento foi baseada no método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), o qual utiliza nucleotídeos modificados denominados didesoxirribonucleotídeos trifosfato – ddNTP's –. Estes análogos nucleotídicos são também conhecidos como “terminadores” pois, por não possuírem o 3'OH, não permitem a ligação com o próximo dNTP, encerrando a replicação. Os ddNTPs possuem uma fluorescência diferente para cada base, possibilitando a identificação dos mesmo através da coloração emitida e a interpretação dos resultados são verificados automaticamente através de um gráfico chamado eletroferograma.

### **3.7 Expressão e Purificação de Ub recombinante em *E. coli***

#### Expressão de Ub recombinante em *E. coli*

A expressão da Ub foi realizada em uma célula cálcio competente de *E. coli*, linhagem Tuner. Para tanto, a célula foi transformada com o vetor de expressão recombinado (pDEST17+Ub). A seguir, as células foram incubadas em 1 ml de meio LB por 1 hora a 37 °C sob agitação de 220 rpm, depois inoculadas em 10 ml de meio LB com 100 mg/l de ampicilina, cultivadas sob agitação (220 rpm) a 37 °C durante a noite (16 horas). As culturas foram diluídas 100 vezes acrescentando 900 ml de meio LB com ampicilina (100 mg/l), e cultivadas novamente a 37 °C sob agitação (a massa foi dividida em 2 frascos de cultivo de 2,6 litros de volume total) até que a densidade óptica<sub>600</sub> (D.O.) medida através de espectrofotômetro atinja 0.6 (final da fase exponencial de crescimento). Para induzir a expressão gênica foi adicionado 0,5 mM de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactopiranosídeo – regulador de atividade da enzima *T7 RNA polymerase*) às culturas e estas foram incubadas por 18 horas a 26 °C sob agitação. As células cultivadas foram centrifugadas a 8000 RCF durante 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi pesado (pesar inicialmente o frasco vazio e depois subtrair o peso do mesmo do valor obtido na pesagem do frasco com o sedimento, para saber a massa de células obtidas (aproximadamente 9 g).

As proteínas solúveis e insolúveis foram fracionadas. O precipitado foi ressuspendido, em 20 ml de tampão de lise de bactérias (aproximadamente 2 ml de tampão para cada grama

de células), foi sonicado (lise das células através de ultra-som) à potência 8 por 15 segundos e resfriado em gelo (repetido 4 vezes). Nessa fração estão as proteínas totais expressas pela célula. A solução foi centrifugada novamente a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C, no sobrenadante estão as proteínas solúveis e no precipitado a fração de proteínas insolúveis (isoladas em corpos de inclusão). Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 20 ml de tampão de lavagem de corpos de inclusão, sonicado e centrifugado como anteriormente, esta lavagem foi repetida uma vez. Para obtenção das proteínas insolúveis, o precipitado foi ressuspensionado em 15 ml de tampão de solubilização de corpos de inclusão, sonicado e novamente centrifugado nas mesmas condições. No sobrenadante estão as proteínas solubilizadas por Uréia.

#### Renaturação e purificação de Ub recombinante

A purificação de proteínas recombinantes com etiquetas de 6 histidinas (o caso da Ub) se dá através da afinidade de histidinas pelo níquel. Sendo assim, a mistura de proteínas deve ser incubada com resina de níquel e lavada para remoção de contaminantes antes de ser eluída. Como purificação de proteínas solúveis por resina de níquel não elimina completamente os contaminantes devido à interação com proteínas nativas da bactéria, optamos por purificar a fração insolúvel (corpos de inclusão) de forma desnaturante para remover de forma eficiente os contaminantes e, em seguida, fazer a renaturação da Ub.

As proteínas dos corpos de inclusão solubilizadas foram incubadas por 2 horas com 600 µl de resina de níquel NiNTA Agarose (Qiagen, #30230) equilibrada em tampão de solubilização de corpos de inclusão. A resina foi lavada uma vez com o mesmo tampão e, em seguida lavada com uma mistura 1:1 de tampão de solubilização de corpos de inclusão:tampão de lavagem renaturante, incubando 1 hora a temperatura ambiente. A coluna de purificação foi acoplada à bomba de formação de gradiente para realização da lavagem renaturante. A partir deste ponto, todo o procedimento foi realizado em câmara fria. Ajustou-se a velocidade do gotejamento da solução que sai da bomba de gradiente para que ficasse na mesma velocidade do gotejamento da coluna de purificação e tomando o cuidado para que a resina nunca secasse, sempre com um pouco de solução sobre ela. Em seguida, iniciou-se o gradiente de forma que a uréia fosse lentamente eliminada da coluna de purificação, incluindo as seguintes proporções no segundo reservatório da bomba de gradiente:

- 1º = 4 ml de t. de lavagem renaturante + 2 ml de t. de solubilização de corpos de inclusão;
- 2º = 4 ml de t. de lavagem renaturante + 1 ml de t. de solubilização de corpos de inclusão;
- 3º = 4 ml de t. de lavagem renaturante + 0,5 ml de t. de solubilização de corpos de inclusão;

- 4° = 2 ml de t. de lavagem renaturante + 0,1 ml de t. de solubilização de corpos de inclusão;
- 5° = 2 ml de t. de lavagem renaturante + 0,05 ml de t. de solubilização de corpos de inclusão.

Em seguida, as proteínas foram eluídas da resina. Foram feitas 5 eluições com 1ml de tampão de eluição com imidazol na concentração de 100 mM e mais 5 eluições com 1 ml do mesmo tampão, mas com 300 mM de imidazol, sempre agitando por aproximadamente 1 minuto antes de coletar cada eluído. Na última eluição, o tampão e a resina foram incubados por aproximadamente 16 horas antes da coleta.

Os eluídos foram dializados contra 500 ml de tampão de eluição sem imidazol para remoção do mesmo. A diálise foi realizada a 4 °C por aproximadamente 16 horas.

Todas as etapas de expressão e purificação da Ub foram acompanhadas por eletroforese em gel SDS-PAGE, de acordo com o seguinte protocolo:

#### Eletroforese de proteínas:

As proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE sob condições desnaturantes, conforme o descrito anteriormente (HAMES; RICKWOOD, 1990). As receitas dos géis de corrida e de empilhamento estão descritos na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3 Soluções e quantidades para preparo de gel de poliacrilamida SDS-PAGE.**

Soluções	Gel de Corrida		Empilhamento
	13%	15%	
Acrilamida/Bisacrilamida (33/0.9%)	3.8mL	4.4mL	0.7mL
Tris-HCl 2.5 M pH8.8	1.6mL	1.6mL	-
Tris-HCl 1M pH 6.8	-	-	0.6mL
H <sub>2</sub> O	4.6mL	4mL	3.7mL
SDS 10%	100µL	100µL	50µL
Persulfato de amônio 10%	70µL	70µL	35µL
TEMED	7µL	7µL	7µL

As amostras de proteínas foram preparadas antes de serem aplicadas no gel: foram diluídas em tampão de amostra de proteína (T.A 4X) na proporção 4:1 (quatro partes de amostra para 1 parte de T.A. 4X). Desta forma, foram fervidas por 5 minutos, incubadas no gelo por mais 5 minutos e centrifugadas a 14000 x g por 10 minutos.

Preparadas as amostras, estas foram aplicadas no gel vertical de poliacrilamida juntamente com o padrão de massa molecular (Bench Mark, *Invitrogen*) e a corrida foi feita em tampão de eletroforese para SDS-PAGE a 30 miliampères, aproximadamente 150 Volts.

### Coloração por Coomassie blue

Os resultados obtidos após eletroforese das amostras em SDS-PAGE foram observados pela coloração do gel por Coomassie blue. Para tanto os géis foram incubados por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente neste corante e, a seguir, os géis foram descorados com solução de descoloração para SDS-PAGE para visualização das bandas.

### Coloração por Nitrato de Prata

Outra alternativa de coloração de SDS-PAGE para visualização dos resultados é pela marcação por nitrato de prata que é mais sensível, marcando bandas que poderiam não ser visualizadas pela coloração por Coomassie blue.

Para tanto, as proteínas no gel foram inicialmente fixadas em solução de fixação de SDS-PAGE por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50%, incubado com solução de sensibilização por 2 minutos e incubados com solução de coloração por prata por 30 minutos. A revelação foi realizada com solução de revelação depois de lavar o gel com água corrente, e a reação foi parada com solução de término de coloração por prata.

### Imuno blot com anti-histidina para confirmação da expressão

Os ensaios padrões de imuno blot (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979) foram possíveis a partir da transferência de proteínas em gel SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose (*Hybond N+*, *Amersham Biosciences*). O gel foi disposto em um suporte e a membrana de nitrocelulose foi colocada sobre o gel, evitando a formação de bolhas. O gel e a membrana foram protegidos por papel 3MM e o suporte contendo ambos foi inserido na cuba de transferência de proteínas juntamente com tampão para transferência gelado. A transferência foi feita por 2 horas a 60 Volts a 4 °C.

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos, para visualização das bandas e marcação, lavada em água corrente e bloqueada em PBS 1X, Tween 20 0,05% e leite 5%, por 1 hora, em temperatura ambiente ou durante a noite a 4° C.

Para analisar a expressão da Ub recombinante, os extratos protéicos da bactéria induzida foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose, como descrito anteriormente. Após o bloqueio da membrana, a mesma foi incubada por 1 hora com anticorpos comerciais anti-histidina de camundongo (*Pharmacia*) diluídos 1:3000 em PBS 1X, Tween 20 0,05%, estes anticorpos reconhecem a etiqueta de 6 histidinas acrescentada nas proteínas recombinantes. Para revelação foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a fosfatase

alcalina, tal anticorpo tem especificidade à IgG de camundongo, reconhecendo o anticorpo primário. A incubação do anticorpo secundário foi feita por 1 hora e a diluição do mesmo foi 1:10000 em PBS 1X, Tween 20 0,05%. Esta ligação foi detectada pela reação entre fosfatase alcalina, nitroblue tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (*Promega*) em tampão de revelação de western, como recomendado pelo fabricante.

### **3.8 Produção de anticorpos policlonais contra Ub**

Os anticorpos policlonais anti-Ub de *T. cruzi* foram obtidos através da imunização de camundongos fêmeas de linhagem Swiss com aproximadamente 45 dias de idade no início das inoculações. Todos os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o protocolo institucional foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ / Licença de número L-005/09).

A fim de obter anticorpos específicos para Ub, foi realizado um teste pré-imune, para verificar se existiam anticorpos pré-formados pelo camundongo capazes de reconhecer proteínas de *T. cruzi*. Para tanto, foram realizados ensaios de imuno blot, no qual extratos de proteínas totais de *T. cruzi* foram fixados em membrana de nitrocelulose, como descrito anteriormente, e incubados com soros pré-imune de diferentes camundongos. A revelação foi realizada através de reação com fosfatase alcalina (como descrito anteriormente), e alternativamente por um processo de revelação mais sensível, a quimioluminescência. Este processo consiste na utilização de um anticorpo secundário conjugado a peroxidase, revelado com a adição de substrato quimioluminescente (*ECL detection kit, Amersham Biosciences*). O sinal gerado é captado por filme (Hyperfilm™ ECL, *Amersham Biosciences*) conforme as recomendações do fabricante.

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

Uma semana após a 4ª inoculação, uma gota de sangue dos camundongos foi coletada através de excisão da extremidade do rabo, os soros coletados foram testados por imuno blot. Assim que a titulação do soro estivesse suficientemente alta, após sedação com solução de cetamina 10mg + xilasina 20mg + acebromasina 3mg por kilograma, o sangue do animal foi

coletado através de punção cardíaca, em no máximo 10 dias após a última inoculação. O material foi mantido em temperatura ambiente por no mínimo 1 hora para a coagulação do sangue e, então, centrifugado por 30 minutos a 2000 x g. O sobrenadante (anti-soro) foi coletado e armazenado a -20 °C.

#### Verificação da especificidade dos anticorpos e análise do perfil de ubiquitinação em *T. cruzi*

Para verificar se os anti-soros estavam reconhecendo a Ub, os mesmos foram submetidos a imuno blot para as proteínas recombinantes previamente separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de náilon. Os anti-soros foram diluídos na proporção de 1:200 em PBS 1X e Tween 20 0,05%, e incubados com as proteínas recombinantes por 2 horas a temperatura ambiente, com posterior revelação por reação de fosfatase alcalina.

A análise do perfil de ubiquitinação em *T. cruzi* foi feita em gel unidimensional, para verificar se o padrão observado possui similaridade com os padrões descritos em literatura (PENG, 2008; VASILESCU et al., 2005). Tal análise foi realizada através de ensaios de imuno blot, incubando extratos protéicos totais de *T. cruzi* na fase de epimastigota, contra anti-Ub nas mesmas condições anteriores.

A análise do perfil de ubiquitinação em *T. cruzi* também foi realizada em extratos nos quais foram utilizadas drogas que inibem a atividade do proteassomo de das enzimas de-ubiquitinadoras (DUB). A inibição do proteassomo foi realizada com a adição de 0,5 µM de carbobenzoxy-L-isoleucyl-gamma-t-butyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI) em uma cultura de epimastigotas com 3 dias de crescimento, cultivando esta cultura por 5 horas a 28° C. Esta droga conhecida como PSI é um inibidor específico para a atividade quimiotripsina-like do proteassomo (FIGUEIREDO-PEREIRA; BERG; WILK, 1994). O composto iodoacetamida (IAA) foi utilizado para a inibição das DUB. O IAA é um inibidor de DUB bastante conhecido, é um agente alquilador que age nas cisteínas do sítio ativo das DUBs, inativando-as. Este processo foi realizado apenas no momento da preparação do extrato protéico, pois o IAA é extremamente tóxico quando colocado em cultura, levando à morte celular. Portanto, 10 mM de IAA foi acrescentado ao tampão de lise desnaturante para inibição de DUB. Com a inibição de proteassomo e DUB, as proteínas ubiquitinadas foram acumuladas, o que pôde ser verificado por ensaios de imuno blot com anti-Ub.



### 3.9 Análise metabolômica de *T. cruzi*

Com o objetivo de analisar o consumo e/ou produção de componentes dos meios definidos resultante do metabolismo dos parasitas, foi realizada a extração de metabólitos de culturas em meio HX25M+P.

Para tanto, células epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas por 7 dias em meio HX25M a 27 °C em triplicata biológica. As amostras analisadas foram: meio inicial (meio não metabolizado que foi utilizado para realizar o repique das culturas, controle 1); meio incubado por 7 dias a 27 °C (meio sem parasitas, controle 2); sobrenadante da cultura após 7 dias de cultivo; células após 7 dias de cultivo (sedimento, total de  $5 \times 10^7$  células).

Antes da coleta das amostras, as culturas foram refrigeradas rapidamente em banho de gelo seco/etanol. O sobrenadante foi obtido através de centrifugação a 4 °C, por 10 minutos a 1250 RCF. Um total de 5 µl do sobrenadante, 5 µl do controle 1 e 5 µl do controle 2 foram individualmente incubados em 100 µl de tampão de extração para metabolômica e imediatamente congelados em gelo seco.

O sedimento de células ( $5 \times 10^7$  células) foi lavado com 1 ml de PBS 1X e então ressuspendido em 100 µl de tampão de extração para metabolômica, incubadas por 1 hora a 4 °C e armazenadas, juntamente com as demais amostras, em congelador a -80 °C até que as amostras fossem enviadas para análise.

A análise do metaboloma das amostras preparadas foi realizada por espectrometria de massas (MS), na Universidade de Glasgow, no Laboratório de Metabolomica, através da *Core Facility Polyomics*, sob responsabilidade dos pesquisadores Michael Barrett e Isabel Vincent, grupo que publicou recentemente o metaboloma de *T. brucei* (CREEK et al., 2013; VINCENT et al., 2012), onde é possível encontrar a metodologia aplicada na análise de metabólitos por MS.

### 3.10 Cultivo e diferenciação de *T. cruzi*

Para o cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi*, as culturas foram mantidas a 28 °C em estufas incubadoras B.O.D. (demanda bioquímica de Oxigênio), em meio LITB suplementado ou não com 10% de SFB (CAMARGO, 1964; GOITIA AULAR; DE BOISO, 1982), com passagens a cada três dias na concentração de  $10^6$  células/ml em meio fresco.

O cultivo em meio definido foi obtido partindo de células previamente cultivadas em meio LITB suplementado com 10% de SFB (LITB+SFB). Para eliminar o meio LITB+SFB

antes de cultivar as células em meio definido, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X estéril e então, ressuspensas no meio de interesse. As culturas foram mantidas a 28 °C em estufas incubadoras B.O.D. (demanda bioquímica de Oxigênio), exceto as culturas em meio SDM-79, as quais foram mantidas na mesma temperatura porém em estufa incubadora de CO<sub>2</sub>.

Para submeter os parasitas ao estresse nutricional e estimular a metacicloênese, foram realizados dois repiques sequenciais de uma cultura de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias) na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml em 100 ml de meio LITB+SFB em frasco erlenmeyer de 250 mL. A cultura foi mantida à 28 °C por 5 dias (final de fase exponencial e/ou início de fase estacionária de crescimento) até que a cultura chegasse a densidade celular de  $5$  a  $6 \times 10^7$  células/ml em média.

As formas epimastigotas no final da fase exponencial de crescimento em meio LITB+SFB foram submetidas a estresse em meio TAU - *Triatomine Artificial Urine* - (BONALDO et al., 1988; CONTRERAS et al., 1985). Para isso as células foram centrifugadas a 7.000 RCF por 5 minutos a 10 °C, ressuspensas em meio TAU na concentração de  $5,0 \times 10^8$  células/ml e incubadas a 28 °C por duas horas (estresse nutricional). Em seguida, as células estressadas foram diluídas na proporção 1:100 em meio TAU3AAG e dispostas em garrafas plásticas de cultivo celular nas seguintes proporções: 16 ml para garrafas de 25cm<sup>2</sup>, 100 ml para garrafas de 175 cm<sup>2</sup> e 200 ml para garrafas de 300 cm<sup>2</sup>. Nestas condições os parasitas se aderem ao substrato (garrafa) e, após 72 horas já é possível obter grandes quantidades de tripomastigotas metacíclicos no sobrenadante da cultura.

Os parasitas aderidos foram coletados da seguinte forma: o sobrenadante da diferenciação em garrafas de 300 cm<sup>2</sup> foi descartado e foi adicionado à garrafa 10 ml de TAU3AAG + 10 mM EDTA, as garrafas foram agitadas por vortex para facilitar o descolamento e a solução de células foi coletada. Este procedimento foi repetido 3 vezes para cada garrafa.

A coleta das formas tripomastigotas metecíclicas foi realizada após 96 horas de diferenciação. A purificação destas formas foi realizada através de cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose equilibrada em PSG (DE SOUSA, 1983). A superfície das formas tripomastigotas metacíclicas são menos negativas que a superfície das formas epimastigotas. Como a resina DEAE celulose é positiva, as formas tripomastigotas metacíclicas são eluídas primeiro conforme a resina é lavada com PSG pH8.0.

### **3.11 Curvas de crescimento**

A avaliação do crescimento das células cultivadas em meios definidos foi feita em triplicata biológica, com passagens a cada 3 dias de cultivo, com concentração inicial de  $10^6$  células/ml. As passagens foram feitas em 3 ml de meio, em tubos cônicos de 15ml.

Após a confirmação do crescimento contínuo e estabilizado das culturas nos meios testados, foram realizadas as curvas de crescimento, nas mesmas condições mencionadas anteriormente, porém foram lançadas uma cultura para casa dia de contagem, evitando manipulação excessiva das culturas, o que poderia alterar os resultados. As culturas foram contadas diariamente até alcançarem a fase estacionária de crescimento e/ou morte celular.

As contagens foram realizadas usando um contador automático de células (Z2 Coulter® – Beckman Coulter).

### **3.12 Preparo de células para análises em microscopia óptica e eletrônica de transmissão**

A coloração utilizada para visualização das células por microscopia óptica foi feita pelo kit Panótico Rápido LB (Laborclin, Pinhais, Paraná, BR). Para tanto,  $2 \times 10^6$  células foram lavadas em PBS 1X, ressuspensas em 10µl de PBS 1X, espalhadas sobre uma lâmina limpa e mantidas à temperatura ambiente por tempo suficiente para que evaporasse toda a solução. Em seguida, a lâmina com o material seco foi submersa sequencialmente nas 3 soluções do kit por 30 segundos em cada, lavadas com água, e dispostas em estufas para secagem (37 °C). Foi adicionado uma pequena gota de resina Permunt sobre o material e coberto por uma lamínula limpa para preservar o material. As imagens foram obtidas em aumento de 100x.

Para a análise ultraestrutural dos parasitas em meio definido em complexo, os mesmos foram processados para microscopia eletrônica de transmissão. As culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 ml e centrifugadas 30 a 60 segundos a 10.000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram fixados por 20 a 30 minutos com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação, as células foram lavadas por centrifugação a 10.000 x g/30 a 60 segundos com tampão fosfato e em seguida com tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Logo após, foi feita a fixação por 15 minutos em ósmio diluído a 1% em tampão cacodilato 0,1 M (contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , concentração final), seguido de duas lavagens no mesmo tampão, sem ósmio. As desidratações foram feitas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 100%),

três minutos em cada. Em seguida, os sedimentos foram infiltrados por duas a 18 horas em solução Epon/acetona (1:1), quatro horas em Epon puro e então embebidos em nova solução de Epon puro para a polimerização da resina durante 48 a 72 horas a 60°C. Os cortes ultrafinos foram contrastados por 30 minutos em acetato de uranila aquoso 2% e por dois minutos no citrato de chumbo. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1200-EXII, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR com a colaboração do Dr. Maurílio José Soares do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba (PR).

### **3.13 Preparo de amostras para proteômica**

As análises proteômicas realizadas no presente trabalho foram baseadas em espectrometria de massas (MS). Quando se trata de preparo de amostras para MS, deve-se sempre ter em mente que qualquer material ionizável pode ser identificado pelo espectrometro de massas. A manipulação das amostras gera com frequência contaminantes que podem atrapalhar a análise, como queratina e polímeros de plástico. Alguns cuidados devem ser tomados para minimizar estas contaminações, como usar luvas e água ultrapura para eliminar queratina e usar plásticos de boa qualidade. Neste último caso, utilizamos prioritariamente tubos e ponteiras da marca Eppendorf, que minimizam a contaminação da amostra com polímeros de plástico.

#### Lise por tampão com Uréia

As células foram sedimentadas por centrifugação 5 min a 6.000 x g e 4 °C, lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspensas por pipetagem em tampão de extração para proteômica com uréia e incubadas por 30 minutos em agitador orbital. A proporção de células por volume de tampão é de 40 µl de tampão para 5x10<sup>7</sup> células. Após a incubação, a extração deve ficar livre de qualquer viscosidade. A seguir os debris foram retirados por centrifugação a 20.000 RCF por 10 min. A dosagem de proteínas na amostra foi realizada pelo kit BCA (Sigma).

#### Lise por tampão com SDS

As células foram sedimentadas por centrifugação 5 min a 6.000 x g e 4 °C, lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspensas por pipetagem em tampão de extração para proteômica com SDS. A proporção de células por volume de tampão é de 40 µl de tampão para cada 5x10<sup>7</sup> células. Amostras com volume abaixo de 100 µl foram submetidas à

sonicação em banho sonicador por 1 hora. Já as amostras com volume superior a 100 µl foram sonicadas em aparelho sonicador, em potência 2 por 15 segundos, repetindo o procedimento caso a viscosidade não tenha desaparecido. A seguir os debris foram retirados por centrifugação a 20.000 RCF por 10 min. A dosagem de proteínas na amostra foi realizada pelo kit BCA (Sigma).

#### Digestão clássica de proteínas

Previamente à digestão, as proteínas devem ser completamente desnaturadas em uréia 8M e mantidas neste estado para que a enzima possa acessar todos os sítios de clivagem da proteína. Para tanto, inicialmente as pontes dissulfeto foram reduzidas com DTT na concentração final de 1 mM por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada a alquilação para que estas pontes dissulfeto permaneçam desfeitas. A alquilação foi realizada com 5,5 mM de cloroacetamida (CAA) por 20 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A CAA foi utilizada ao invés de iodoacetamida (IAA) pois a modificação de cisteínas pela IAA gera uma massa/carga (m/z) igual à da modificação da lisina pela ubiquitina, gerando muitos falso-positivos nas buscas de sítios ubiquitinados (NIELSEN et al., 2008).

A tripsina, enzima usada neste trabalho para digestão protéica, resiste em condições com até 2 M de uréia. Caso a solução de lise possua uréia em sua composição, o extrato deve ser diluído em solução de bicarbonato de amônio (ABC), até que a concentração de uréia no extrato seja reduzida à 2 M. Extratos obtidos com solução de lise contendo SDS não devem ser diretamente conduzidas à digestão por tripsina pois a atividade da mesma não é compatível com SDS, neste caso o procedimento de digestão deve ser pelo método FASP (descrito abaixo). A proporção de tripsina usada neste trabalho foi de 1 µg de tripsina para 50 µg de proteína, a reação de digestão foi conduzida à 37 °C por cerca de 16 horas.

Para parar a digestão da amostra, a mesma foi acidificada com TFA em uma concentração final na amostra de 0,5%.

Os peptídeos foram dosados por nanodrop no método de dosagem de proteínas A280.

#### Digestão de proteínas em filtros (Método FASP)

O detergente SDS é muito usado em soluções de extração de proteínas por resultar em uma solubilização total de células e tecidos, obtendo proteínas de todas as fontes, desde citoplasma e núcleo à membranas. Infelizmente, detergentes, mesmo em baixas concentrações, podem prejudicar a digestão enzimática de proteínas, bem como prejudicar as análises em espectrômetro de massa por serem facilmente ionizáveis e significativamente

mais abundantes que alguns peptídeos. Portanto, a remoção de SDS da amostra é de extrema importância para se obter uma análise em MS eficiente.

O método FASP (*Filter aided sample preparation*) foi desenvolvido com o objetivo de remover a solução com SDS da amostra protéica e substituí-lo por uma solução com uréia usando um filtro Microcon, e realizar a digestão das proteínas pela tripsina no próprio filtro (WISNIEWSKI; ZOUGMAN; MANN, 2009; WISNIEWSKI et al., 2009). O extrato foi diluído pelo menos 4 vezes em solução UA e transferido para um filtro de Amicon Ultra 15 (Millipore). Em seguida centrifugou-se a 3.000 RCF por 40 min a 20 °C, lavou-se com 10 ml de solução UA centrifugando nas mesmas condições, alquilou-se as proteínas com 2 ml de solução de cloroacetamida 55 mM diluída em solução UA, por 30 min no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, o filtro foi lavado duas vezes com 10 ml de solução UA, duas vezes com 10 ml de solução ABC e as proteínas foram digeridas por aproximadamente 16 horas a 37 °C com de tripsina (relação de 1:100, tripsina:amostra em massa). Os peptídeos foram eluídos por centrifugação, seguida de lavagem com 1 ml de solução ABC e 1 ml de NaCl 0,5 M.

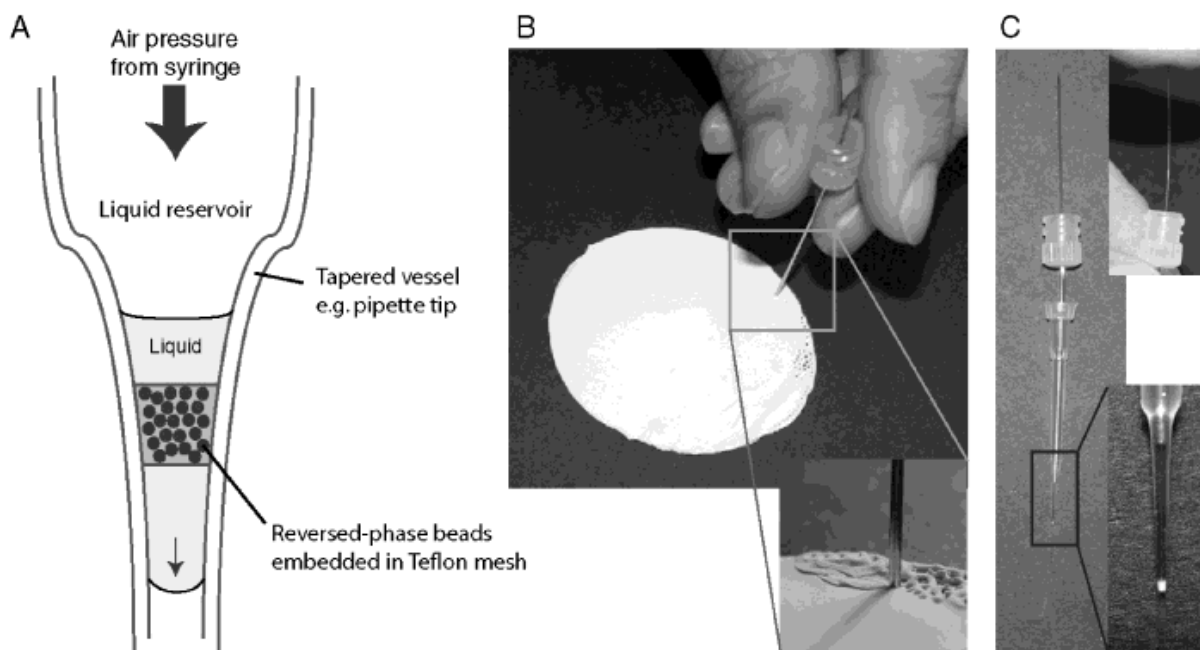
Os peptídeos foram dosados por nanodrop no método de dosagem de proteínas A280.

### Concentração e purificação de peptídeos para MS por coluna C18

#### **Método Stage-tip:**

Após a digestão das proteínas, os peptídeos gerados encontram-se em solução contendo diferentes tipos de sais, oriundos da solução de lise celular e do tratamento da amostra prévio e durante a digestão. Estes sais interferem na espectrometria de massas e precisam ser removidos da amostra. Isto normalmente é feito pelo método Stage-tip (*Stop and go extraction tips*) onde um filtro de C18 (SIGMA ALDRICH, #66883-U) é acoplado à uma ponteira de 200 µl (RAPPSILBER; ISHIHAMA; MANN, 2003), na qual os peptídeos em solução aquosa se ligam por hidrofobicidade e os sais são removidos desta coluna por lavagem da mesma também com solução aquosa.

O procedimento foi realizado da seguinte maneira: 50 µL de metanol foi adicionado ao Stage-tip com o objetivo de ativar a resina. O stage-tip foi colocado em uma adaptador para centrífuga de microtubos (Fig. 3.3), centrifugados por 1 minutos a 1.000 RCF. Em seguida, a resina foi equilibrada com 100 µL de solução A e submetida a nova centrifugação por 3 minutos a 1.000 RCF. A amostra foi diluída em solução A, e então o equivalente a 10 µg de peptídeos foi adicionado ao Stage-tip, centrifugando novamente nas mesmas condições. Os peptídeos foram armazenados em Stage-tip a 4 °C.



**Figura 3.3 Ilustração do método de preparo das *Stage-tips*.**

A) As *beads* de fase reversa para micropurificação são imobilizadas em uma malha de teflon e colocados na ponta de uma ponteira da 200  $\mu\text{l}$ . O líquido é adicionado e passa pela coluna através de pressão por uma seringa ou centrifugação. B) Uma agulha hipodérmica sem ponta (ponte reta) é utilizada para cortar os micro-discos de coluna e C) dispostos manualmente na ponta de uma ponteira da 200  $\mu\text{l}$ . Fonte: (Rappsilber et al., 2003).

A eluição dos peptídeos só foi realizada no momento da corrida em espectrômetro de massas. Para tanto, a resina foi lavada 1 vez com 100  $\mu\text{l}$  de solução A, submetida à centrifugação sob as mesmas condições e, em seguida, os peptídeos foram eluídos 2 vezes com 20  $\mu\text{l}$  de solução B (40  $\mu\text{l}$  de volume final). As amostras eluídas foram secas em speed vac por 11 minutos no vácuo máximo e sem aquecimento para remover a acetonitrila da amostra. A mesma foi diluída em aproximadamente 30  $\mu\text{l}$  de solução A e encaminhada para cromatografia líquida acoplada ao espectrometro de massas (LC-MS/MS) para análise proteômica das amostra.

### **Método SepPak:**

A coluna de C18 preparada pelo modo Stage-tip tem capacidade de reter aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  de peptídeos por tip. Para amostras com quantidades muito superiores, o procedimento de purificação foi realizado por colunas C18 com maior capacidade de retenção de peptídeos, como as colunas SepPak C18 130 mg (Waters, #WAT023501).

A amostra de peptídeos foi diluída em solução A, em volume final de 10 ml, de modo que o pH da amostra ficasse entre 2 e 3. A coluna SepPak foi acoplada ao reservatório de uma seringa de 10 ml e foi ativada com 5 ml de metanol e equilibrada com 10 ml de solução A. Aproximadamente 500  $\mu\text{g}$  de peptídeos foram ligados em cada SepPak (a capacidade de

ligação da SepPak é de 130 mg de proteína, como 130 mg de peptídeos equivale a um número de moléculas muito superior à mesma massa de proteínas, é aconselhável usar menos massa de peptídeos para assegurar que não haverá perda de material que não ligou na coluna). Em seguida a coluna foi lavada com 10 ml de solução A. Do mesmo modo que no Stage-tip, as amostras foram armazenadas em SepPak até o momento da corrida em MS.

A eluição dos peptídeos só foi realizada no momento da aplicação em LC-MS/MS. Para tanto, a resina foi lavada 1 vez com 10 ml de solução A e os peptídeos foram eluídos 2 vezes com 500 µl de solução B. Os eluídos foram secos em speed vac por 1 hora (ou até que amostra ficasse seca) no vácuo máximo e sem aquecimento para remover a acetonitrila da amostra.

### **3.14 Marcação isotópica estável por aminoácidos em cultivo celular (SILAC)**

#### Padronização do método SILAC em *T. cruzi*

A metodologia de análise de proteômica quantitativa por SILAC foi escolhida para este projeto. Como esta metodologia ainda não estava estabelecida para *T. cruzi*, foi necessário definir o tempo e eficiência da incorporação dos aminoácidos com isótopos pesados, bem como a quantidade dos mesmos a ser usada.

O primeiro passo foi fazer a titulação de lisina (K) e arginina (R) no meio para verificar qual era a mínima concentração dos mesmos que não prejudicava o crescimento celular. Esta titulação é de extrema importância tanto para redução de custos, uma vez que os aminoácidos marcados são de custo elevado, quanto para evitar a conversão de arginina pesada para prolina pesada que acontece quando a arginina é encontrada em grandes quantidades no meio, evitando a marcação das proteínas por um aminoácido não desejado. Foram testadas as quantidades referentes a 1%, 2,5%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% e 100% da concentração original de K e R do meio LM14. Foram realizadas contagens a cada 3 dias de cultivo, com repiques em concentração inicial de  $10^6$  células/ml, até que o controle sem K e R morresse.

Em seguida foi realizado um teste de incorporação de aminoácidos. Para tanto, utilizamos uma cultura de *T. cruzi* em meio definido HX25M+P, as células foram previamente lavadas em meio HX25M+P sem lisina e arginina para remoção dos aminoácidos leves. Em seguida foi feito um inóculo no mesmo meio, porém substituindo os aminoácidos lisina e arginina pelas suas versões “pesadas” lisina 8 (K8: 6 carbonos 13 + 2 nitrogênios 15) e arginina 10 (R10: 6 carbonos 13 + 4 nitrogênios 15) da empresa Cambridge Isotope



Laboratories. O experimento foi conduzido em meio definido (HX25M+P) e semi-definido (HX25M+P suplementado com SFB dializado). A cada dia de cultivo, uma alíquota da cultura foi retirada, as células foram lisadas em tampão de extração de proteína com uréia, digeridas pelo método convencional para espectrometria de massas e purificados em Stage-tips (métodos descritos anteriormente). A amostra foi analisada por LC-MS/MS.

#### Método SILAC de *T. cruzi*

Epimastigotas de *T. cruzi* cultivados em meio definido LM14 foram lavados duas vezes com PBS 1X para remoção completa de todos os aminoácidos e proteínas que possam estar presentes no meio de cultivo. Em seguida as células foram diluídas a  $10^5$  células/ml em meio LM14 com K e R pesados nas concentrações de 105 e 115 mg/ml, respectivamente e mantidas a 27 °C por cerca de 10 dias, ou até que alcancem a concentração aproximada de mais de  $10^7$  células/ml.

Quando as culturas marcadas foram usadas com maior frequência, as células foram mantidas em volume pequenos (1 ml) de meio LM14 com K e R pesados e repiques quinzenais com concentrações baixas de células ( $10^5$  células/ml) para manutenção de células marcadas.

#### Método Super-SILAC para *T. cruzi*

A mistura super-SILAC de *T. cruzi* foi obtida da seguinte forma: células epimastigotas marcadas com K e R pesados foram submetidas ao processo padrão de diferenciação *in vitro* para formas tripomastigotas metacíclicas. Células nas formas epimastigotas, epimastigotas submetidas à estresse por 2 horas, epimastigotas aderidos por 12 e 48 horas e tripomastigotas metacíclicos originados da cultura marcada foram misturados na mesma proporção, lisados em tampão com SDS e digeridos pelo método FASP. A dosagem dos peptídeos foi inferida em nanodrop no método de dosagem de proteínas A280 e então misturados na mesma proporção com as amostras a serem comparadas, originadas de meio “leve” LITB+SFB.

### **3.15 Enriquecimento de alvos ubiquitinados**

#### Enriquecimento de proteínas ubiquitinadas - Imunoprecipitação de Ub

Os extratos protéicos de *T. cruzi* foram obtidos através de lise celular com tampão de lise desnaturante, a fim de que todas as interações não covalentes entre proteínas fossem rompidas, precipitando apenas as proteínas modificadas covalentemente pela Ub. Do mesmo

modo, proteínas nucleares e de membrana também podem ser obtidas quando as células são submetidas a lise desnaturante, e é fato que proteínas nucleares (Daniel e cols., 2004; Hoege e cols., 2002) e de membrana (Horak e Wolf, 2001; revisto por Mukhopadhyay e Riezman, 2007) são também ubiquitiliadas.

Para tanto, aproximadamente  $10^9$  células previamente incubadas com  $0,5 \mu\text{M}$  de PSI por 2 horas (inibidor de proteassomo), foram lavadas com PBS 1X, ressuspensas em 1 ml de tampão de lise desnaturante, inicialmente sem SDS e  $\beta$ -Mercaptoetanol para solubilização completa das células, em seguida foi adicionado os dois componentes desnaturantes e então acrescentado 15 unidades/mL de DNase 1 para fragmentação de DNA; incubadas a  $95^\circ\text{C}$  por 10 minutos, no gelo por 5 minutos e então centrifugadas por 10 minutos à rotação de  $14.000 \times g$ , coletando o sobrenadante, o extrato deve ficar livre de qualquer viscosidade. Ao extrato desnaturado foi acrescentado 1 ml de tampão de lise não desnaturante, o excesso de NP-40 quebra o SDS do extrato, possibilitando a incubação deste com o anticorpo sem danos à sua funcionalidade. O extrato foi dosado com auxílio do kit *Micro BCA Protein Assay (Pierce)* seguindo recomendações do fabricante.

O enriquecimento de proteínas marcadas por Ubs de um extrato protéico complexo foi obtido a partir de ensaios de imunoafinidade. Para tal finalidade,  $20 \mu\text{l}$  de soro de camundongo contendo anti-Ub e diluído em  $100 \mu\text{l}$  de PBS 1X e  $1 \text{ mg/mL}$  de BSA foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente com  $100 \mu\text{l}$  de esferas de proteína G sefarose, sob agitação. Após incubação, a resina foi centrifugada a  $600 \times g$  por 1 minuto, o soro restante foi retirado e foi realizada uma reação de *crosslinking* para ligar o anticorpo à proteína G covalentemente, evitando a liberação de anticorpos na amostra eluída da imunoafinidade, o que poderia prejudicar análises posteriores em espectrometria de massas. O *crosslinking* foi possível com o auxílio do reagente dimethyl pimelimidate (DMP): a resina foi lavada por 5 minutos com PBS 1X acrescido de  $1 \text{ mg/mL}$  de BSA, depois somente com PBS 1X e, então, incubada por 30 minutos com  $0,02 \text{ M}$  de DMP diluído em  $0,2 \text{ M}$  de trietanolamina pH 8,0, repetindo este processo 3 vezes, sempre lavando com  $0,2 \text{ M}$  de trietanolamina pH 8,0 entre as incubações. A reação foi parada com  $0,05 \text{ M}$  de etanolamina pH 8,0 e a resina foi lavada 3 vezes com PBS 1X.

Aproximadamente  $5 \text{ mg}$  de extrato protéico foram incubados com  $100 \mu\text{l}$  de resina de anti-Ub durante a noite (16 horas) a  $4^\circ\text{C}$ . A seguir, a resina foi lavada 6 vezes com 1 ml de tampão de lise não desnaturante (sempre agitando levemente entre as lavagens) e as proteínas foram eluídas 2 vezes com  $150 \mu\text{l}$  de glicina  $0,2 \text{ M}$  pH 2,5 por 5 minutos, neutralizando o pH logo em seguida com a adição de  $15 \mu\text{l}$  de Tris-HCl pH9,0.

Metade do material eluído e as amostras de cada etapa de purificação foram concentradas com TCA (ácido tricloroacético). Às amostras foram acrescentados 10% de TCA e incubadas por 1 hora no gelo. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 30 minutos, a 10000 xg, lavadas 2 vezes com acetona 100%, sempre centrifugando a 10000 x g por 30 minutos a 4° C. Após as lavagens as amostras foram ressuspensas em 15 µl de 100 mM Bicarbonato de Amônio, diluídas em T.A. 4X e separadas em gel SDS-PAGE corado com prata para visualização dos resultados.

A outra metade do material eluído foi preparada para análise em LC-MS/MS. Para tanto, aos 150 µl da amostra foi adicionado 54 mg de Uréia (6M final), 23 mg de tiourea (2M final) e 0,5 µl de HEPES 1M pH 7.4. A amostra foi reduzida com 1 mM de DTT por 30 minutos, alquiladas com 5,5 mM de IAA por 20 minutos ao abrigo da luz, em seguida a amostra foi diluída em 200 µl de tampão ABC para diluir a concentração de uréia e digeridas com 0,4 µg de tripsina por 16 horas a 37 °C. As amostras foram purificadas por Stage-tip, analisadas em LC-MS/MS.

#### Enriquecimento de peptídeos ubiquitinados – Imunoprecipitação de sinal remanescente de Ub

O enriquecimento de peptídeos ubiquitinados foi feito com o auxílio do kit *PTMScan Ubiquitin Remnant Motif (K-ε-GG)* (Cell Signaling Technology, #5562), seguindo as recomendações do fabricante.

Com este kit, é possível enriquecer apenas os peptídeos que sofreram a modificação por Ub, excluindo todos os demais peptídeos da proteína modificada que é muito mais abundante que o peptídeo modificado, fazendo com que este peptídeo seja mais facilmente identificado por MS. Para tanto, as proteínas devem ser digeridas previamente ao enriquecimento. Os pontos de estudo escolhidos para este trabalho foram formas epimastigotas com 3 dias de cultivo (Epi 3D), formas epimastigotas submetidas à estresse nutricional (St), formas epimastigotas após 12 horas de adesão (12h), formas epimastigotas após 48 horas de adesão (48h) e formas tripomastigotas metacíclica (Meta). Cerca de 2 horas antes das coletas de cada ponto, foi adicionado às culturas 0,5 µM de PSI para inibição do proteossomo e consequente aumento da quantidade de proteínas ubiquitiladas.

Aproximadamente  $5 \times 10^8$  células epimastigotas (Epi 3D, St e aderidos) foram lisadas pelo procedimento de lise por tampão com SDS, enquanto que para as formas Meta foi necessário a utilização do dobro de células. Ao mesmo tempo e do mesmo modo, cerca de  $3 \times 10^9$  células cultivadas em meio LM14 com aminoácidos pesados (SILAC) foram preparadas para posterior mistura com os pontos de interesse. Todas as amostras foram submetidas à

digestão pelo método FASP, como descrito previamente. Após a eluição, a concentração de peptídeos foi estimada pelo equipamento NanoDrop pelo método de dosagem de proteínas Protein A280. Uma pequena alíquota (aproximadamente 20 µg) da amostra padrão pesada (SILAC) foi separada para análise da incorporação de aminoácidos pesados.

Em seguida as misturas dos pontos de interesse com a amostra SILAC foram feitas, sempre cuidando para que a proporção amostra:SILAC sejam sempre a mesma possibilitando a comparação entre as amostras. Cerca de 30 µg de peptídeos foi separada nesta etapa para poder extrair os dados do proteoma total das amostras, e armazenadas em Stage-tips até o momento da corrida em LC-MS/MS.

As misturas de peptídeos foram purificadas de acordo com o método SepPak, descrito anteriormente. Após a secagem das amostras em speed vac, as mesmas foram ressuspensas em 400 µl de tampão IAP sem detergente (provido pelo kit), submetidos à banho sonicador por 15 minutos para completa solubilização dos peptídeos e centrifugados por 5 minutos a 5000 RCF. Cada amostra foi incubada com metade do volume de resina disponibilizada por reação no kit (40 µl de resina para cada amostra). Os passos seguintes seguiram de acordo com as recomendações do fabricante. Os eluídos foram dosados por NanoDrop, Protein A280 e acondicionados em Stage-tips até o momento da corrida em LC-MS/MS

### **3.16 Enriquecimento de proteínas que interagem com ubiquitina**

Para a realização do ensaio de afinidade por Ub, inicialmente 1 mg de Ub recombinante renaturada de *T. cruzi* foi imobilizada em 200 µl de resina NiNTA-Ag por 16 hora a 4 °C sob agitação (segundo o procedimento de ligação de proteína à resina já descrito anteriormente na secção de purificação de Ub recombinante).

Cerca de  $5 \times 10^9$  células foram previamente lavadas com PBS 1X, ressuspensas em 10 ml de tampão de lise hipotônico e mantidas por 10 minutos no gelo, ou até que as células assumissem uma morfologia redonda (visualizar no microscópio óptico). As células foram lisadas com o auxílio de bomba de cavitação a 2000 psi por 30 minutos. O lisado foi centrifugado a 10000 RCF por 10 minutos a 4° C. A quantidade de sal no sobrenadante foi ajustada para 130 mM de NaCl e foi adicionado mais inibidores de proteases PMSF (1 mM) e E-64 (10 µM). O extrato foi incubado com a resina de Ub, preparada anteriormente, durante a noite a 4° C.

Após incubação a resina foi lavada com diferentes concentrações de sal: foi lavada 1 vez com 15 mL de tampão de lise isotônico, em seguida, 2 vezes com 2 ml de tampão de lise

isotônico acrescido de 0,2 M de NaCl, 2 vezes com 2 ml de tampão de lise isotônico com 0,4 M de NaCl, 2 vezes com 2 ml de tampão de lise isotônico com 0,9 M de NaCl. As proteínas ligadas na resina de Ub foram eluídas 4 vezes com 400 µl de tampão de eluição para afinidade 1 (para seguir na separação por coluna de interação hidrofóbica *Phenyl High Sub*) ou tampão de eluição para afinidade 2 (para seguir na separação por coluna de troca iônica *MonoQ*).

As cromatografias em *Phenyl* e *MonoQ* foram realizadas no equipamento Akta purifier (GE heathcare) com fluxo de 1 ml/minuto, coletando frações de 0,5 ml. A cromatografia em coluna *Phenyl* seguiu da seguinte forma: a amostra foi diluída 2x em tampão *phenyl A*, injetada na coluna, a coluna foi lavada com 2 ml de tampão *phenyl A* então foi iniciado o gradiente de eluição com os tampões *phenyl A* e *phenyl B*. A eluição final para remoção de proteínas que não saíram durante o gradiente foi feita com 2 ml do tampão *phenyl C*.

Para a cromatografia em coluna *MonoQ* a amostra foi diluída 1x em água para diminuir a concentração de sal na amostra. O procedimento seguiu da mesma forma anterior, mas usando tampão *MonoQ A* no lugar do tampão *phenyl A*, e tampão *MonoQ B* no lugar do tampão *phenyl B*, não foi realizada a última eluição no caso da *MonoQ*.

Como controles negativos o mesmo ensaio foi realizado em resina NiNTA, porém, sem a Ub ligada, para verificar se existia uma reação inespecífica entre a resina e as proteínas de *T. cruzi*. Outro controle utilizado foi o ensaio de competição, onde o extrato protéico do parasita foi incubado previamente com a Ub recombinante antes de ser incubado com a resina de NiNTA+Ub, o que deslocaria as proteínas de interação com Ub para a Ub recombinante existente na solução. As amostras preparadas no controle não foram submetidas à separação posterior pelas cromatografias mencionadas anteriormente.

As amostras de cada etapa da afinidade foram preparadas para LC-MS/MS através da digestão clássica de proteínas e os peptídeos foram purificados por método Stage-tip.

### **3.17 Análise em espectrometria de massas**

Foram injetados 10 µl (aproximadamente 3 µg da amostra de proteoma e 15 µg de ubiquitinoma) de amostra no cromatógrafo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). A separação dos peptídeos foi feita com gradiente linear de 120 min (ubiquitinoma) ou 360 min (proteômica) de 5 a 40% de ACN em coluna analítica de 15 cm, com diâmetro interno de 75 µm e partículas de C18 de 3 µm. Os peptídeos foram ionizados por nano eletro spray (voltagem de 2,3 kV) e injetados no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD

(Thermo Scientific). O método de análise foi o seguinte: *scan* inicial no Orbitrap com resolução de 15.000, seguido de seleção dos 10 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por CID e analisados no *ion trap*. Paralelamente ao MS2, foi realizado um *full scan* no Orbitrap com uma resolução de 60.000. Na seleção dos íons foi usada uma lista de exclusão de 90 segundos. A opção *lock mass* (OLSEN et al., 2005) foi utilizada para obtenção de melhor acurácia – erro abaixo de 0,5 p.p.m. - de massa dos peptídeos trípticos precursores detectados por MS.

### 3.18 Análise dos dados gerados

Os arquivos de proteoma e afinidade por Ub gerados (.RAW) foram analisados no algoritmo MaxQuant versões 1.4.1.2 (COX; MANN, 2008). Os parâmetros usados foram Maximum miss-cleavage sites = 2; maximum charge state = 7; enzima tripsina/P; modo específico e os descritos na Tabela 3.4. Para os arquivos de ubiquitinoma, os parâmetros foram os mesmos mencionados anteriormente, incluindo à análise a busca pelos sítios diglicina nos peptídeos alvos (Modificações fixas = GlyGly (K)). O banco de dados utilizado para busca dos peptídeos foi o banco de proteínas do UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)).

**Tabela 3.4 Parâmetros selecionados no algoritmo MaxQuant.**

Parâmetros	Valor	Parâmetros	Valor
Version	1.4.1.2	Modifications included in protein quantification	Acetyl (Protein N-term);Oxidation (M)
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)	Peptides used for protein quantification	Razor
Decoy mode	revert	Discard unmodified counterpart peptides	True
Special AAs	KR	Min. ratio count	2
Include contaminants	True	Site quantification	Use least modified peptide
MS/MS tol. (FTMS)	20 ppm	Re-quantify	True
Top MS/MS peaks per 100 Da. (FTMS)	12	Use delta score	False
MS/MS deisotoping (FTMS)	True	iBAQ	False
MS/MS tol. (ITMS)	0.5 Da	iBAQ log fit	False
Top MS/MS peaks per 100 Da. (ITMS)	8	MS/MS recalibration	False
MS/MS deisotoping (ITMS)	False	Match between runs	True
MS/MS tol. (TOF)	0.1 Da	Matching time window [min]	1

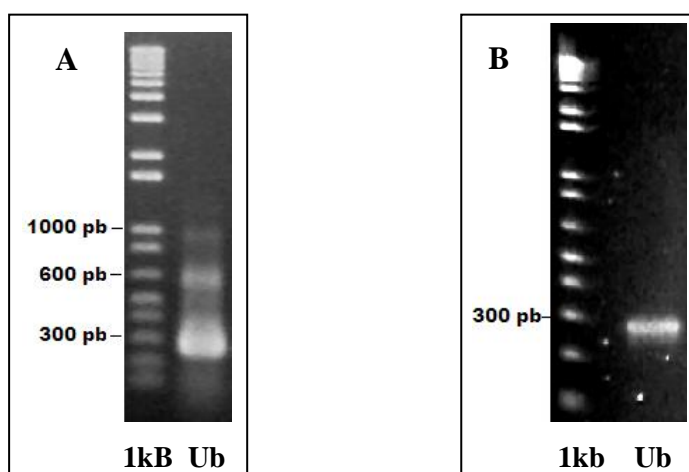
Top MS/MS peaks per 100 Da. (TOF)	10	Alignment time window [min]	20
MS/MS deisotoping (TOF)	False	Find dependent peptides	False
MS/MS tol. (Unknown)	0.5 Da	Fasta file	C:\Databases\TcUniprot3A353153_3A181_20140506.fasta
Top MS/MS peaks per 100 Da. (Unknown)	10	Labeled amino acid filtering	True
MS/MS deisotoping (Unknown)	False	Site tables	Oxidation (M)Sites.txt
PSM FDR	0.01	Cut peaks	True
Protein FDR	0.01	Decoy mode	revert
Site FDR	0.01	Special AAs	KR
Use Normalized Ratios For Occupancy	True	Include contaminants	True
Min. peptide Length	7	RT shift	False
Min. score for unmodified peptides	0	Advanced ratios	False
Min. score for modified peptides	40	AIF correlation	0.47
Min. delta score for unmodified peptides	0	First pass AIF correlation	0.8
Min. delta score for modified peptides	17	AIF topx	20
Min. unique peptides	0	AIF min mass	0
Min. razor peptides	1	AIF SIL weight	4
Min. peptides	1	AIF ISO weight	2
Use only unmodified peptides and	True	AIF iterative	True
		AIF threshold FDR	0.01

As tabelas geradas pelo MaxQuant foram analisadas no software Perseus versão 1.4.1.3 (<http://www.perseus-framework.org/>). Os contaminantes e as entradas identificadas no banco de dados reverso foram retirados da tabela.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Amplificação e clonagem de Ub

A amplificação do gene da Ub resultou em alguns produtos (Figura 4.1A), um com o tamanho predito para a Ub e outros dois maiores. Tais bandas são referentes à amplificação de 1, 2 e 3 sequências referentes à Ub (300pb, 600pb e 900pb respectivamente) pois, como mencionado na introdução, os genes de Ub são encontrados no genoma de *T. cruzi* como genes de poliubiquitinas, com várias repetições da região codificadora, os quais são transcritos juntos e processados após a tradução (KIRCHHOFF et al., 1988; SWINDLE et al., 1988). Portanto, o menor produto das amplificações foi purificado em gel de agarose para eliminação das outras bandas indesejadas, bem como dos iniciadores, resultando em uma única banda correspondente à uma Ub fusionado às sequencias adaptadoras attB1 e 2 (Figura 4.1.1B).

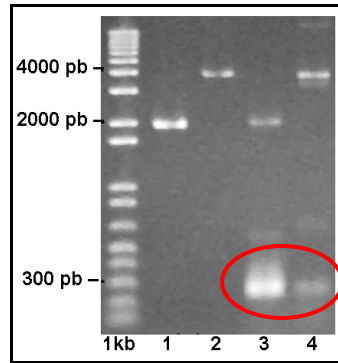


**Figura 4.1.1 Amplificações do gene para Ub (A) e purificação do produto de amplificação (B)**

É possível observar as bandas correspondentes aos produtos de amplificação da Ub fusionada aos sítios attB (aproximadamente 250 pb). Nota-se um aumento na massa molecular de Ub com attB, pois os sítios attB aumentam em torno de 32 nucleotídeos no fragmento. A presença de três bandas na amplificação do gene de Ub a partir do DNA genômico de *T. cruzi* acontece devido à característica do mesmo, que é encontrado como um gene com várias repetições da sequência codificadora de Ub. Legenda: 1kb = padrão de massa molecular *1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)*; Ub = gene Ub com sítios attB para clonagem na plataforma Gateway®. Matriz de Agarose 1,5%.

Depois de purificado, o produto da amplificação foi clonado no vetor de entrada plataforma Gateway, pDONR221 e, em seguida passado para o vetor de expressão em *E. coli*, pDEST17. A verificação da correta inserção do gene nos vetores foi realizada através de PCR de plasmídeo (Fig 4.1.2) e sequenciamento.



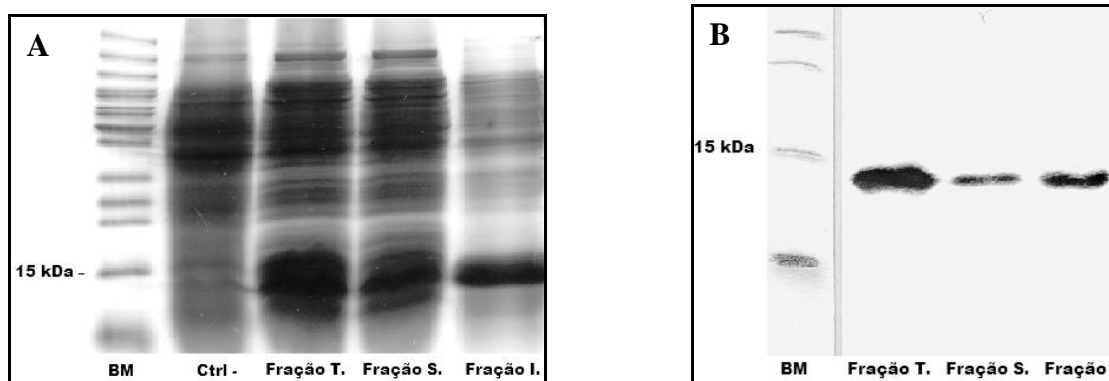


**Figura 4.1.2 PCR de plasmídeo para confirmação da inserção do gene nos vetores de interesse pDONR221 e pDEST17.**

É possível observar as bandas correspondentes aos produtos de amplificação da Ub (aproximadamente 250 pb, destacado por círculo vermelho). Legendas: 1kb = padrão de massa molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1 – vetor pDONR221 controle (sem inserto); 2 – vetor pDEST17 controle (sem inserto); 3 – clone em pDONR221; 4 – clone em pDEST17. Matriz de Agarose 1,5%.

## 4.2 Expressão e purificação de Ub recombinante e produção de soro anti-Ub

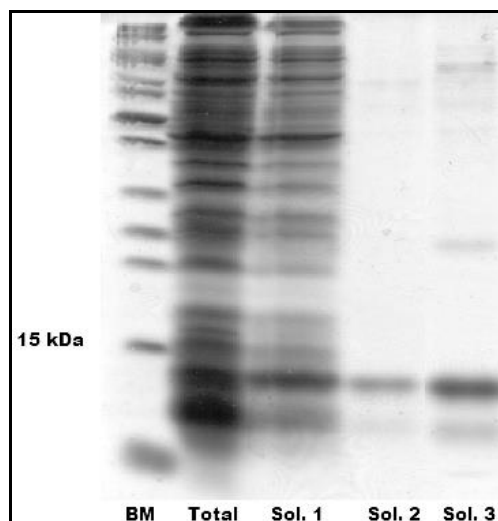
Os clones em pDEST17 foram expressos em *E.coli* linhagem Tuner, produzindo Ub recombinante solúvel e, quando em corpos de inclusão, solubilizados por uréia (desnaturadas) (Figura 4.2.1A). O resultado foi confirmado por *Imuno blot* com anticorpos anti-histidina, que reconheceram a etiqueta de histidinas inserida na proteína recombinante (Figura 4.2.1B). A Ub possui massa molecular correspondente a 8,5 kDa, porém, a presença da etiqueta de 6 histidinas pode aumentá-la até 4 kDa. Como pode ser visualizado na figura abaixo, apesar de ter sido produzido uma grande quantidade de proteína recombinante, diversas outras proteínas provenientes do proteoma bacteriano são recuperadas juntamente, mesmo na fração de proteínas dos corpos de inclusão (fração insolúvel). Sendo assim, é necessário realizar a purificação da proteína recombinante para poder realizar os ensaios previstos para a mesma (produção de anticorpos e afinidade à Ub).



**Figura 4.2.1** Expressão de Ub recombinante em bactérias *E. coli* Tuner.

Legenda: B.M = BenchMark – padrão de massa molecular; Ctrl- = Controle negativo - extrato de proteínas produzidas pela célula Tuner sem o plasmídeo; Fração T. – fração protéica total, proteínas expressas pela célula; Fração S. – fração de proteínas solúveis; Fração I. – fração de proteínas insolúveis (corpos de inclusão). Matriz de SDS-PAGE 20% corado com Coomassie blue (A) e imuno blot em nitrocelulose (B).

Para tanto, diversos protocolos foram testados com o objetivo de purificar a Ub presente na fração solúvel de proteínas da bactéria. Porém, muitos contaminantes permaneceram ligados durante as lavagens e foram eluídos juntamente com a Ub recombinante (Figura 4.2.2). A co-purificação de contaminantes em purificações por afinidade à metais em condições solúveis já é esperado e frequente devido à existência de proteínas ricas em histidinas presentes no proteoma das células em geral, inclusive bactérias (CHENG et al., 2013; WÜLFING; LOMBARDERO; PLÜCKTHUN, 1994) A presença de contaminantes, mesmo em poucas quantidades, na fração purificada da proteína é bastante prejudicial nos ensaios de afinidade de ligantes com Ub, isso porque podem atuar como iscas para proteínas que serão identificadas como falsos ligantes de Ub em nossas análises. A eluição das proteínas com etiqueta de histidina da resina de níquel é feita com a adição de imidazol, um anel aromático alcaloide que é parte da estrutura da histidina, o qual atua como um competidor pelo metal da resina. A lavagem da resina pode ser realizada com baixas concentrações de imidazol (geralmente 20 a 30 mM), objetivando remover proteínas com baixa afinidade ao metal. Como pode ser percebido na figura 4.2.2, as lavagens com 30 mM de Imidazol resultou em uma proteína com mais contaminantes (Sol.3). Já as lavagens com 50 mM também apresentaram contaminantes, mas com menor concentração, porém a Ub também foi parcialmente removida da resina nestas condições.



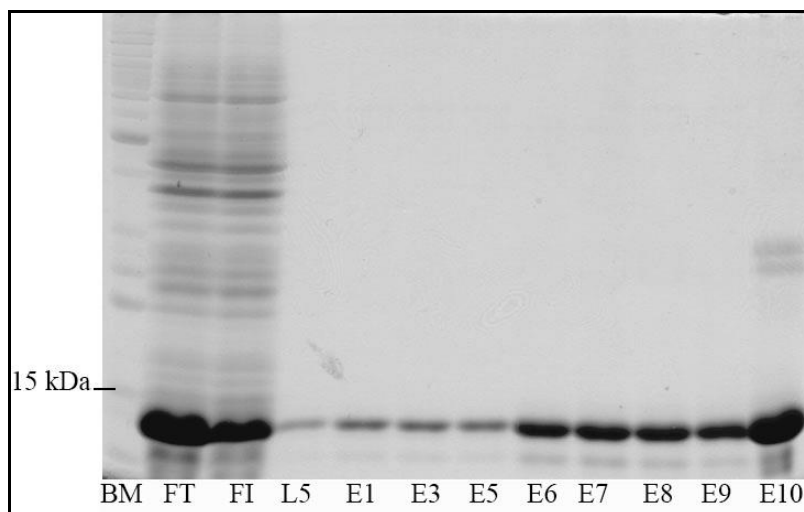
**Figura 4.2.2 Purificação de Ub recombinante em fração solúvel.**

Legenda: BM - padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); Total – fração de proteínas totais; Sol. 1 – fração solúvel sem purificação; Sol. 2 – fração solúvel purificada com NiNTA com lavagens de 50 mM de Imidazol; Sol. 3 – fração solúvel purificada com NiNTA com lavagens de 30 mM de Imidazol. Matriz de SDS-PAGE 20% corado com Coomassie blue.

A alternativa para obter uma proteína mais pura e solúvel foi realizar a purificação de corpos de inclusão solubilizados com uréia e renaturar a proteína durante a purificação, retirando a uréia lentamente com gradientes de lavagem. Como a Ub é uma proteína pequena com estrutura terciária relativamente simples (sem pontes dissulfeto), a renaturação *in vitro* traz resultados satisfatórios. Dessa forma conseguimos bons resultados, como observado na figura 4.2.3.

A fração 10 da eluição (5<sup>a</sup> eluição com 300 mM de imidazol) mostrou ser mais eficiente na eluição da proteína (maior quantidade de proteína eluída) pois ficou aproximadamente 16 horas em incubação com a resina a 4 °C, porém esta fração foi excluída pois estavam presentes duas bandas indesejadas entre 25 e 30 kDa que foram eluídas em conjunto com a Ub recombinante.

Os eluídos 1 a 5 (10 mM de Imidazol) resultaram, em média, em 0,5 mg/ml, enquanto que os eluídos 6 a 10 (300 mM de Imidazol) apresentaram uma concentração média de 1,5 mg/ml.

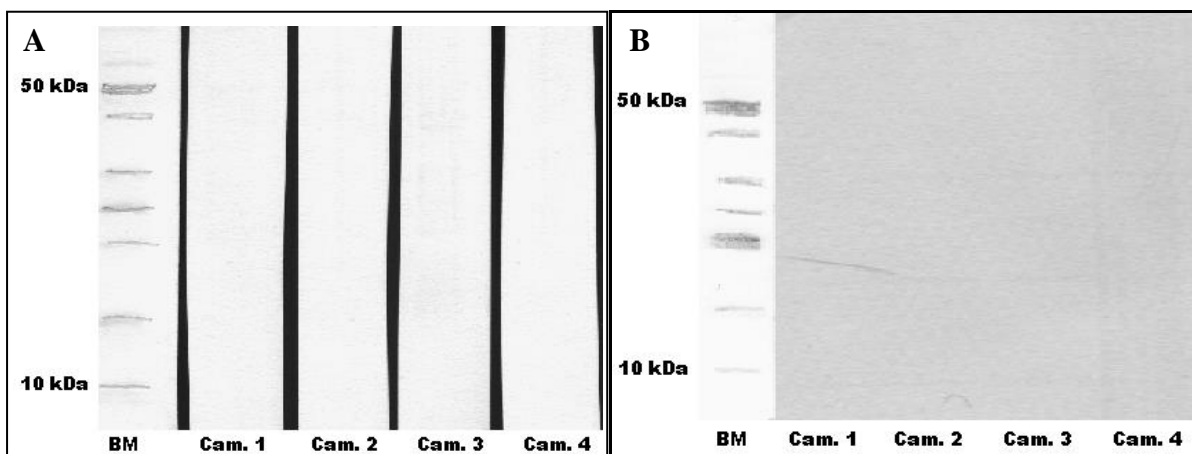


**Figura 4.2.3** Purificação e renaturação de Ub recombinante em corpos de inclusão solubilizados com uréia.

Legenda: BM - padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); FT – fração de proteínas totais; FI – fração insolúvel sem purificação; L5 – última lavagem renaturante com 30 mM de Imidazol; E1, E3, E5– eluídos com 100 mM Imidazol; E6 a E10 – Eluídos com 300 mM de Imidazol. Matriz de SDS-PAGE 20% corado com Coomassie blue.

Desta forma, Ub recombinante altamente purificadas puderam ser obtidas e utilizadas para produção de anticorpos específicos em camundongos. Antes do início das imunizações, foram coletados os soros dos camundongos a fim de verificar se os mesmos estavam reagindo ou não com o extrato protéico de *T. cruzi*. Para tanto, foi realizado um ensaio de *Imuno blot* onde o extrato de proteínas de *T. cruzi* foi separado em gel de acrilamida SDS-PAGE e fixado em membrana de náilon. A seguir, as membranas com os extratos foram incubadas com os soros pré-ímmunes por 1 hora à temperatura ambiente. A revelação foi realizada por reação da fosfatase alcalina (Figura 4.2.4 A) e por quimioluminescência (Figura 4.2.4 B).

O resultado confirmou a ausência de reação dos anticorpos dos camundongos para proteínas de *T. cruzi*, o que poderia comprometer os resultados de experimentos futuros.



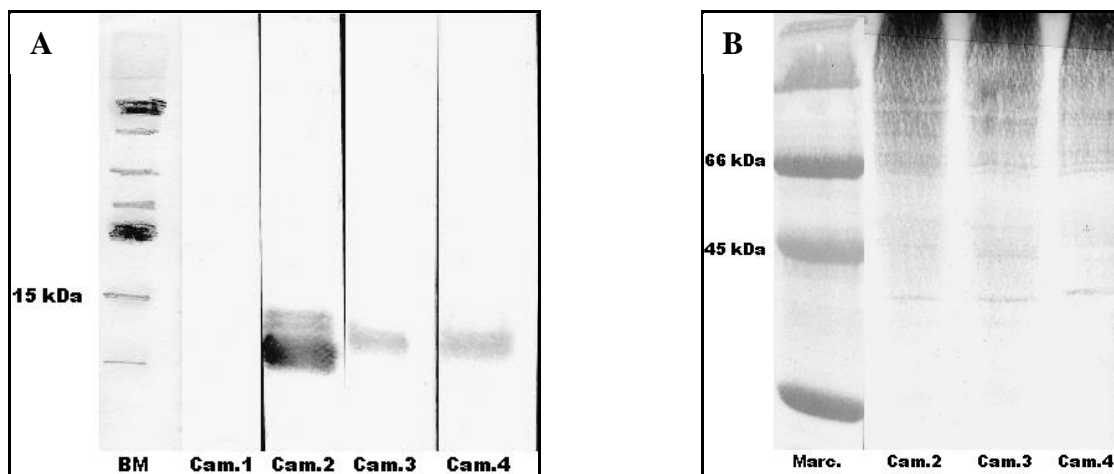
**Figura 4.2.4** Teste de soro pré-imune.

*Imuno blot* de extratos protéicos de *T. cruzi* contra soro de camundongos antes de serem imunizados com a proteína recombinante. (A) Revelação por fosfatase alcalina; (B) Revelação por quimioluminescência. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); Cam.1 a Cam. 4 – Soro de Camundongo 1 a 4.

Em seguida, todos os camundongos foram imunizados com a Ub recombinante purificada. Após a confirmação da resposta e titulação do soro, os mesmos foram coletados por punção cardíaca e utilizados na diluição de 1:200 em ensaios de imuno blot contra as Ub recombinantes (Figura 4.2.5 A) e extratos protéicos de *T. cruzi* na fase de epimastigotas (Figura 4.2.5 B).

Nota-se na figura 4.2.5 A que o soro do camundongo 1 não reconheceu as proteínas recombinantes no imuno blot. Uma possível explicação seria devido à variabilidade individual da resposta imunológica dos camundongos, sendo que o camundongo 1 não respondeu ao estímulo gerado pela inoculação da proteína recombinante, enquanto os demais apresentaram resposta. O soro de todos os camundongos foi coletado, processado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

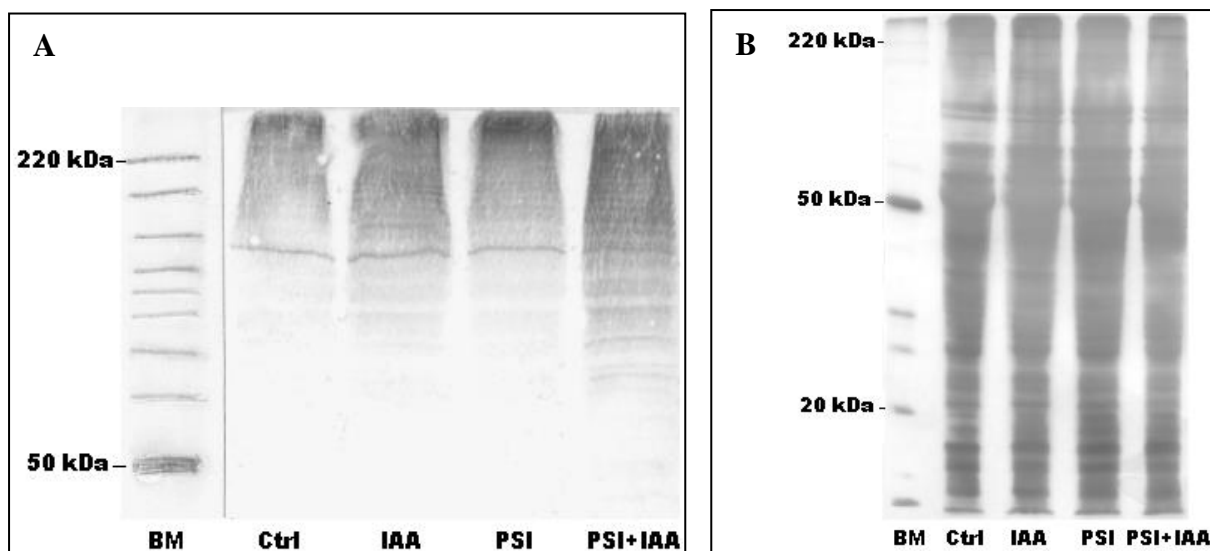
O perfil encontrado no imuno blot contra extrato protéico de *T. cruzi* (Figura 4.2.5 B) é semelhante ao descrito na literatura para outros eucariotos, apresentando uma “mancha” de alta massa molecular, que corresponde aos substratos protéicos que são mono, multi ou poliubiquitinados, em especial os poliubiquitinados por possuírem um tamanho bastante aumentado devido à grande quantidade de Ub adicionadas aos mesmos (PENG, 2008; SEYFRIED et al., 2008).



**Figura 4.2.5** Teste de soro pós-imunização com Ub recombinante.

(A) reação do soro contra a proteína Ub recombinante; (B) reação do soro contra extrato de epimastigotas de *T. cruzi*. Revelação por fosfatase alcalina. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (Invitrogen); Marc – Padrão de massa molecular (Sigma); Cam. 1 a Cam. 4 – Soro de Camundongo 1 a 4.

Com a finalidade de verificar se a resposta obtida era realmente referente às proteínas modificadas por ubiquitinas, realizamos um ensaio de inibição de enzimas deubiquitinadoras (DUBs) e de proteassomo. Com isso poderíamos verificar um acúmulo de proteínas ubiquitinadas no extrato protéico incubado com as drogas específicas. Para inibição do proteassomo usamos PSI, que é um inibidor específico para a atividade quimiotripsina-*like* do proteassomo (FIGUEIREDO-PEREIRA; BERG; WILK, 1994). O composto iodoacetamida (IAA) foi utilizado para a inibição das DUBs. O IAA é um inibidor de DUB bastante conhecido, é um agente alquilador que age nas cisteínas do sítio ativo das DUBs, inativando-as. Os extratos foram analisados por imuno blot com anti-Ub, comparando o perfil encontrado em extratos onde proteassomo e DUB estavam inibidos e em extratos sem inibição dos mesmos (Figura 4.2.6 A). Como controle da quantidade de proteína usada no imunoblot foi utilizado o perfil eletroforético das amostras em gel de SDS-PAGE 13% corado com prata, com as mesmas quantidades usadas no imuno blot (Figura 4.2.6 B).



**Figura 4.2.6** Ensaio de inibição de proteassomo e DUBs.

Em (A) *Imuno blot* utilizando anti-Ub contra extratos de epimastigotas (Ctrl) preparados com IAA para inibição de DUBs (IAA), PSI para inibição de proteassomo (PSI) e os 2 inibidores juntos (PSI+IAA). (B) Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata apresenta perfil eletroforético do extrato de epimastigotas de *T. cruzi* com as mesmas quantidades aplicadas na realização do imuno blot (50 µg) e corado com nitrato de prata. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (Invitrogen).

Analisando os resultados é possível verificar um aumento razoável do sinal de proteínas ubiquitinadas quando apenas o proteassomo é inibido, um aumento maior do sinal quando apenas as DUBs são inibidas, e um significativo aumento do sinal de proteínas ubiquitinadas quando ambos estão inibidos, reforçando a aplicabilidade dos anticorpos produzidos no reconhecimento das proteínas ubiquitinadas de *T. cruzi*. Este resultado encontrado reflete o que já era esperado, uma vez que a inibição de apenas um dos componentes não é suficiente para o aumento da quantidade de proteínas ubiquitinadas. Por exemplo, inibindo apenas o proteassomo, ainda existe a atuação das DUBs fazendo o equilíbrio da quantidade de proteínas ubiquitinadas na célula, e vice-versa.

O anticorpo produzido será utilizado para enriquecer as proteínas ubiquitinadas do parasita através da técnica de imunoprecipitação em condições desnaturadas. Este resultado será exposto mais adiante.

### 4.3 Confeção de meio quimicamente definido para cultivo de *T. cruzi*

A idéia de incluir no presente trabalho o objetivo de estabelecer um meio definido para o cultivo de *T. cruzi* surgiu da necessidade do mesmo na aplicação do método SILAC para proteômica quantitativa. A metodologia SILAC consiste na marcação metabólica de todas as proteínas de uma célula por aminoácidos marcados com isótopos pesados de carbono e/ou

nitrogênio, possibilitando a comparação direta em MS de 2 populações celulares em condições distintas, sendo uma marcada e outra não marcada. Para que exista a completa marcação do proteoma por estes aminoácidos, os mesmos devem substituir todos os aminoácidos normais da célula, e isso só é possível com a utilização de um meio definido ou semi-definido (utilizando soro fetal bovino dializado -SFBd).

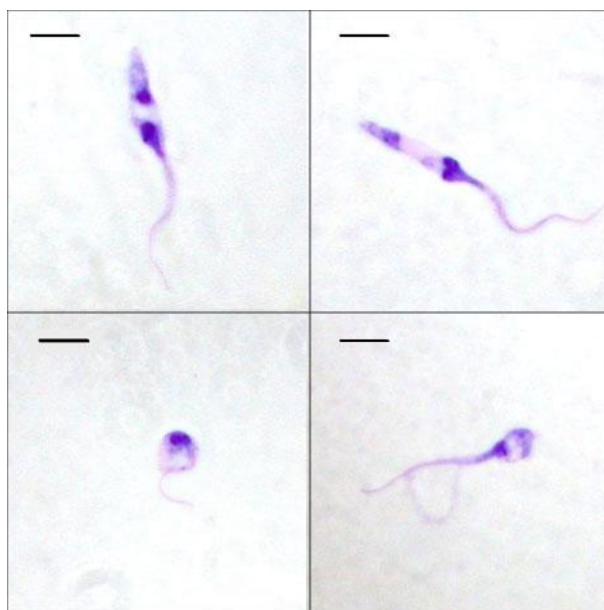
Até o momento, poucos trabalhos foram publicados reportando o cultivo de *T. cruzi* em meio definido, conforme mencionado na introdução deste trabalho. Os trabalhos mais recentes fazem cultivo em meio definido (em geral semi-definido) por apenas 1 passagem, sem cultivo contínuo. Desta forma, surgiu a necessidade de encontrar um meio definido que suportasse o crescimento contínuo do parasita.

Inicialmente, o meio escolhido para este objetivo foi o AR-103, uma vez que era um dos mais recentes meios para cultivo de *T. cruzi*, era específico para este organismo, e foi capaz de sustentar o cultivo de epimastigotas por mais de 256 passagens, segundo os autores (AZEVEDO; ROITMAN, 1977).

Para o cultivo inicial, o primeiro repique foi realizado diluindo 4 ml de uma cultura de epimastigotas em LITB+SFB com 3 dias de crescimento (aproximadamente  $3,2 \times 10^7$  células/ml) em 10 ml de AR-103 suplementado ou não com 10% de SFBd, repicando a cultura a cada 3 e/ou 6 dias de cultivo com inóculo inicial de  $10^6$  células/ml. Foi considerada a idéia de utilizar SFBd no meio, mesmo não sendo um componente quimicamente definido, pois existe a possibilidade de realizar a marcação metabólica por SILAC na presença do mesmo (ONG, 2002). A diálise remove todas as substâncias que possuem massa molecular inferior a 10.000, desta forma aminoácidos, bem como hormônios e citocinas, são significativamente reduzidos no SFB, possibilitando a inserção de aminoácidos marcados e consequente marcação do proteoma pelos mesmos.

Mesmo seguindo todos os passos de confecção do meio e início de cultivo recomendados pelos autores (MIZES, 1993), e mesmo acrescentando SFBd ao meio (o qual não faz parte da composição do meio definido originalmente) não obtivemos sucesso na primeira tentativa de cultivo neste meio. Após o terceiro repique parte das células começaram a apresentar uma morfologia diferente do padrão (Figura 4.3.1) e outra parte das células morreram.



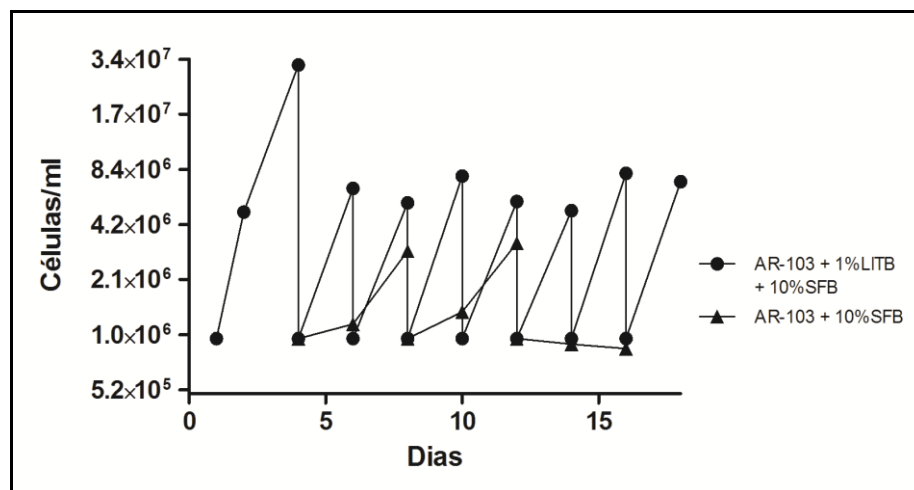


**Figura 4.3.1 Morfologia de células epimastigotas cultivadas em meio AR-103.**

As células foram coradas com o kit Panótico Rápido LB (Laborclin). Morfologias diversas encontradas em culturas de epimastigotas em meio AR-103: células com núcleo e cinetoplasto disformes e reduzidos, e com um grande vacúolo na porção central das células (A e B), células com tamanho bastante reduzido e em forma esférica (C e D). A barra de tamanho representa 10  $\mu\text{m}$ .

Diversos testes foram conduzidos com o objetivo de adaptar as células ao meio definido selecionado: repique em começo de fase exponencial de crescimento para usar apenas células “jovens”; diferentes quantidades de células no inóculo inicial, assumindo que seja necessário uma densidade específica de células para estimular o crescimento; utilização de meio condicionado proveniente do primeiro repique em meio definido, onde as mesmas apresentam multiplicação celular; aumento na quantidade de componentes do meio (hemina, glicose e mix de componentes); testes com a linhagem Y, utilizada pelos autores do meio AR-103. Nenhuma das tentativas resultaram em cultivo contínuo das células no meio definido.

Tentamos, por fim, fazer a remoção lenta e gradual de LITB do meio definido, para que as células passassem por um processo de adaptação ao meio definido. O cultivo só foi possível até a remoção de 99% de LITB da cultura, ou seja, o meio AR-103 suplementado com 1% de LITB e 10% de SFB. Quando o LITB foi completamente removido, as células pararam de se multiplicar, como pode ser observado na Figura 4.3.2.



**Figura 4.3.2 Avaliação do crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* em meio semi-definido.**

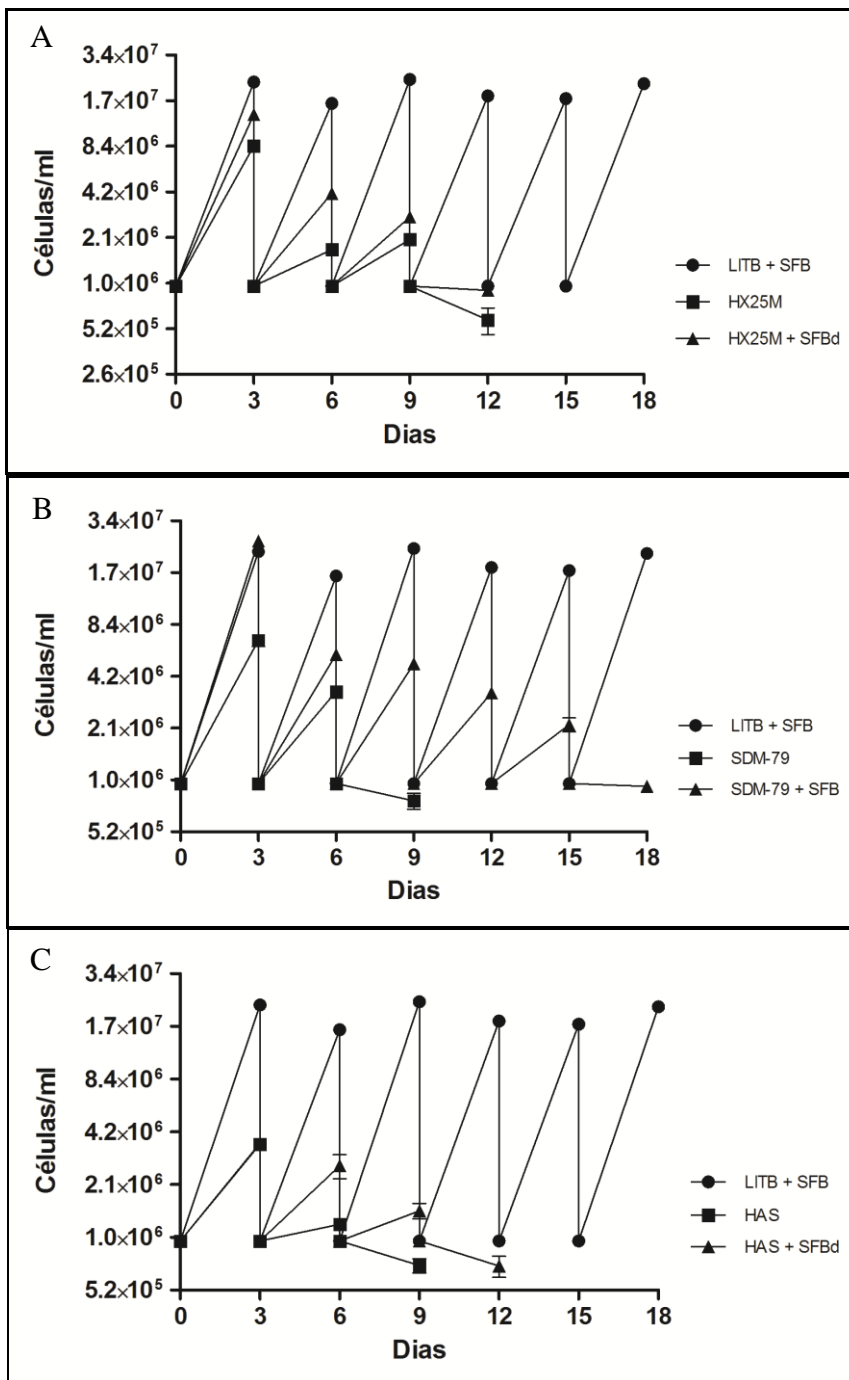
As contagens foram feitas a cada 2 dias. As células cultivadas em meio AR-103 suplementado com 1% de LITB e 10% de SFBd foram repicadas a cada 2 dias, enquanto que as células cultivadas em meio AR-103 sem LITB foram repicadas assim que tivessem concentração de células suficiente para o repique (4 dias). Células cultivadas na ausência de LITB (▲) não apresentaram crescimento após o terceiro repique e morreram.

Sendo assim, o meio AR-103 sem adição de LITB não suportou o cultivo contínuo de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Diferente do que foi encontrado por Azevedo e Roitman em seus estudos, onde foi verificado a manutenção de *T. cruzi* no meio AR-103 por mais de 256 passagens (AZEVEDO; ROITMAN, 1977). Existem vários fatores que poderiam justificar tal discordância, como a utilização, em nossos ensaios, de células com muitas passagens em LITB; condições de cultivo diferentes e, ao nosso entendimento, mais relevantemente diferenças no grau de pureza entre os componentes utilizados em 1977 e atualmente, os quais estão muito mais puros hoje do que no trabalho anterior, onde possivelmente possuíam contaminantes que poderiam estimular o crescimento das células.

Em seguida, optamos por testar outros 3 meios definidos: o HX25M, meio desenvolvido para cultivo de *T. brucei* (CROSS; KLEIN; LINSTEA, 1975; CROSS; MANNING, 1973), que foi utilizado posteriormente para cultivo de *T. cruzi* (ANDERSON; KRASSNER, 1975; CROSS; KLEIN; BAKER, 1975) e foi usado como base para elaboração do meio AR-103; o meio SDM-79, meio de cultivo semi-definido para cultivo de *T. brucei* (BRUN; SCHÖNENBERGER, 1979) e que também tem sido utilizado para passagens curtas (1 ou 2 repiques) de *T. cruzi* (CARRILLO et al., 1999; CURTO et al., 2014); e o meio HAS, que foi elaborado no presente trabalho e consiste na mistura dos componentes existentes nos 3 meios utilizados: HX25M, AR-103 e SDM-79.

Como pode ser visualizado na Figura 4.3.3, nenhum dos meios definidos testados foram suficientes para o cultivo contínuo de *T. cruzi*, mesmo quando cultivados na presença de SFB dializado (SFBd). Resultados similares foram obtidos em experimentos

independentes, realizados com diferentes lotes de meio e tipos de frascos, reforçando que nenhum dos meios citados são capazes de manter o cultivo de *T. cruzi*.

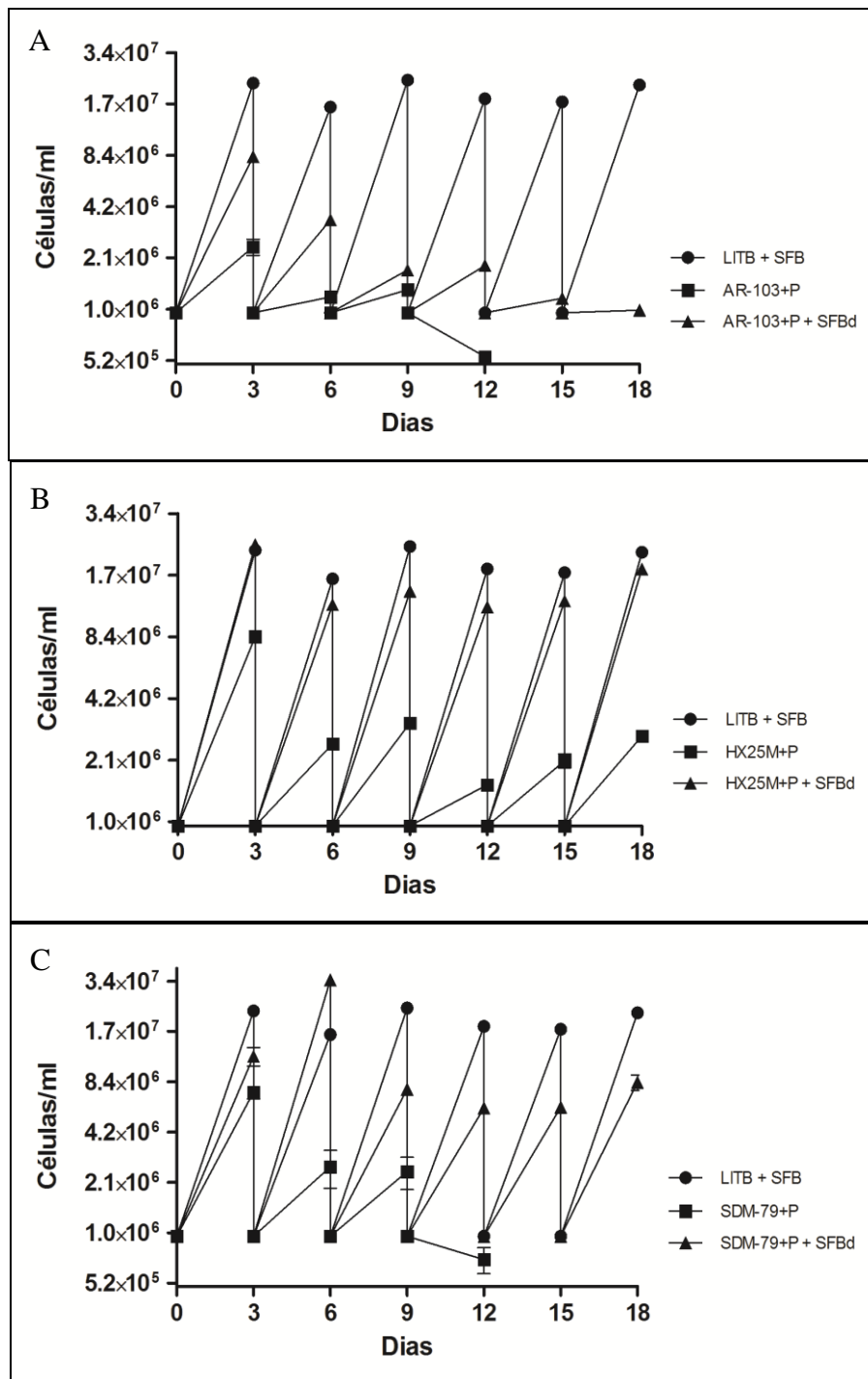


**Figura 4.3.3** Avaliação do crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* em meios definidos (HX25M, SDM-79 e HAS) e semi-definidos (meios definidos com SFBd).

As contagens foram feitas a cada 3 dias de cultivo, seguidas por repiques a  $10^6$  células/ml. Nenhum meio aplicado foi suficiente para suportar o cultivo de *T. cruzi* por mais de 5 repiques. Os dados inseridos são resultados de experimentos em triplicata biológica. Algumas barras de erro não são visíveis em alguns pontos devido ao pequeno desvio padrão entre as réplicas.

A ausência de crescimento contínuo do *T. cruzi* nos meios definidos testado pode ser explicada pela falta de algum componente vital para o parasita. As células epimastigotas de *T. cruzi* são auxotróficas para diaminas, como a putrescina. Isso acontece pois, ao contrário dos outros tripanosomatídeos, *T. cruzi* não possui genes codificadores para ornitina e arginina descarboxilase (ODC e ADC, respectivamente), enzimas responsáveis pela biossíntese de putrescina (ARIYANAYAGAM; FAIRLAMB, 1997; CARRILLO et al., 1999; HUNTER; QUESNE; FAIRLAMB, 1994). Diaminas são moléculas essenciais para a proliferação e diferenciação celular e síntese de macromoléculas (TABOR; TABOR, 1984). O *T. cruzi* é capaz de absorver putrescina exógena e convertê-la a espermidinina, a qual se liga à glutatona para formar tripanotiona, uma molécula antioxidante exclusiva de kinetoplastídeos e que desempenha papéis semelhantes aos descritos para glutatona em outros eucariotos (FAIRLAMB; CERAMI, 1992; FAIRLAMB et al., 1985).

Os meios definidos testados neste trabalho não possuem diaminas em sua composição, sendo necessária a adição deste componente para que o organismo possa se desenvolver e sobreviver neste meio. Desta forma, o cultivo de *T. cruzi* foi verificado nos meios definidos com a adição de 10 µM putrescina (HX25M+P, AR-103+P e SDM-79+P). Pode ser observado na Figura 4.3.4 que os parasitas cultivados em AR-103+P morreram após o quarto repique, enquanto que no meio HX25M+P exibiram um crescimento contínuo, com aumento na taxa de crescimento após alguns repiques, mesmo na ausência de SFBd. Já as células em SDM-79+P apenas apresentaram crescimento quando cultivadas com SFBd, isso porque o meio SDM-79 é semi-definido, ou seja, é necessária a suplementação com SFB para que o parasita apresente crescimento (BRUN; SCHÖNENBERGER, 1979), diferente do meio HX25M que foi desenvolvido como um meio definido para cultivo de *T. brucei* devido sua alta osmolaridade e presença de vitaminas e ácidos graxos que não existem no SDM-79 (CROSS; MANNING, 1973). Já no meio AR-103 estão ausentes diversos componentes que são bastante importantes no crescimento do parasita, como hemina, um importante fator de crescimento para o parasita (ARÉVALO; PANEBRA; SANTA CRUZ, 1985; CICCARELLI et al., 2007; LOMBARDO; ARAUJO; BATLLE, 2003); vitaminas como cobalamina e vitamina A-acetato e ácido trans-retinoico; ausência de nucleosídeos e nucleotídeos; e nenhum ácido graxo está presente no meio.



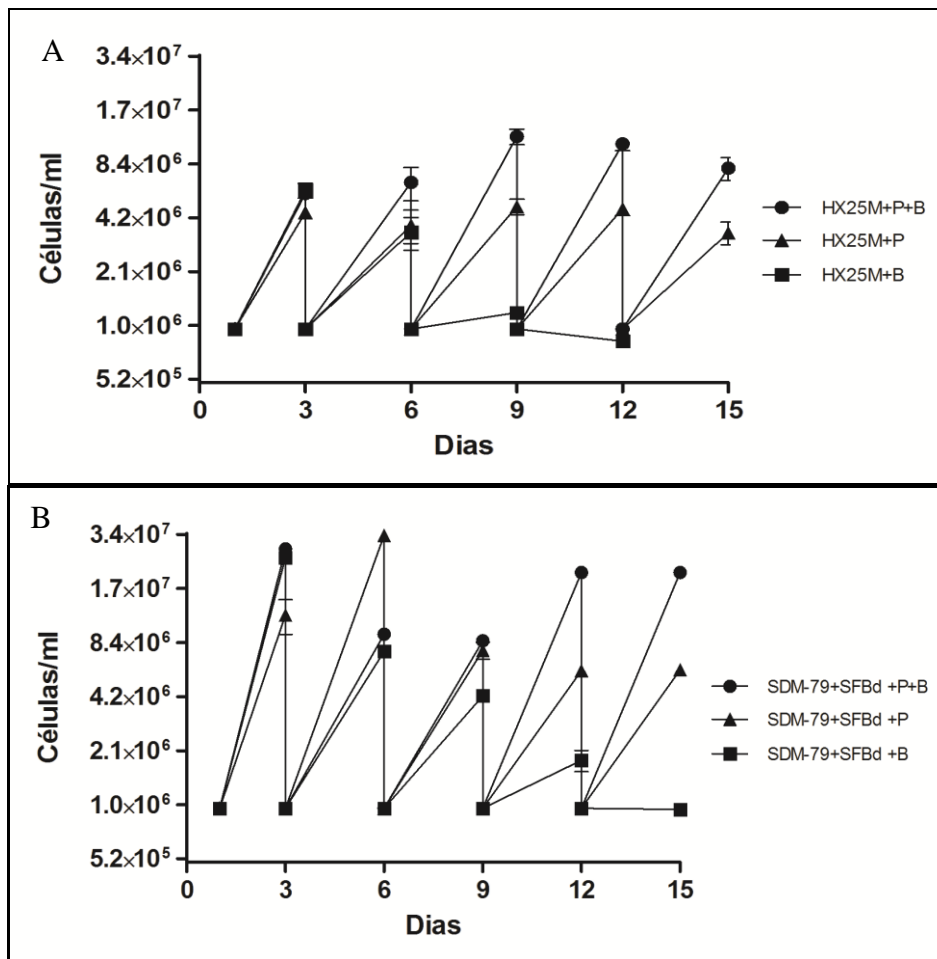
**Figura 4.3.4** Avaliação do efeito da Putrescina (P) no crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* em meios definidos (HX25M, SDM-79 e AR-103) e semi-definidos (meios definidos com SFBd).

A putrescina foi adicionada aos meios na concentração final de 10 $\mu$ M. As contagens foram feitas a cada 3 dias, seguidas por repiques de 10<sup>6</sup> células/ml. Novamente o cultivo de *T. cruzi* em meio AR-103 não foi possível, mesmo com a suplementação de putrescina (A). O meio definido HX25M+P foi capaz de manter o cultivo de epimastigotas por pelo menos 7 passagens, tanto na presença quanto na ausência de SFBd (B). Já o meio SDM-79 só foi capaz de manter o cultivo de *T. cruzi* na presença de SFBd. Os dados inseridos são resultados de experimentos em triplicata biológica.

Com isso, conseguimos obter um meio quimicamente definido para cultivo contínuo de *T. cruzi*, o HX25M+P. Como mencionado anteriormente, existe a possibilidade de aplicar a metodologia SILAC mesmo com a utilização de SFB, neste caso é necessário utilizar um SFBd no qual a quantidade de aminoácidos livres é significativamente reduzida. Vários experimentos realizados no ICC, inclusive alguns mostrados neste trabalho, concluem que a ausência de SFB no meio de cultivo de *T. cruzi* causa uma redução significativa na taxa de crescimento e, por consequência, no rendimento final de células. Portanto, para assegurar uma população de células marcadas suficiente para os experimentos a serem conduzidos neste trabalho optamos por testar a incorporação de aminoácidos marcados em culturas com e sem SFBd, o resultado deste experimento será apresentado na sessão de Estabelecimento do método SILAC.

Com o objetivo de melhorar a taxa de crescimento do parasita no meio definido HX25M+P, nos foi recomendado pelo doutor Carlos Robello, professor da Universidad de la República - Uruguai, testar a resposta de *T. cruzi* na presença de biopterina no cultivo. A biopterina atua como um cofator essencial para diversas enzimas em processos como hidroxilação de aminoácidos aromáticos, quebra de ligações éter-lipídeos e síntese de óxido nítrico (KWON; NATHAN; STUEHR, 1989; TAYEH; MARLETTA, 1989; TIETZ; LINDBERG; KENNEDY, 1964). Alguns tripanossomatídeos, como *Leishmania sp.*, *Crithidia sp.* e *T. brucei*, são incapazes de sintetizar a molécula de biopterina a partir de GTP (trifosfato de guanosina), sendo necessário adquiri-la do hospedeiro/meio de cultura (BECK; ULLMAN, 1990; KIDDER; DUTTA, 1958; ONG et al., 2011).

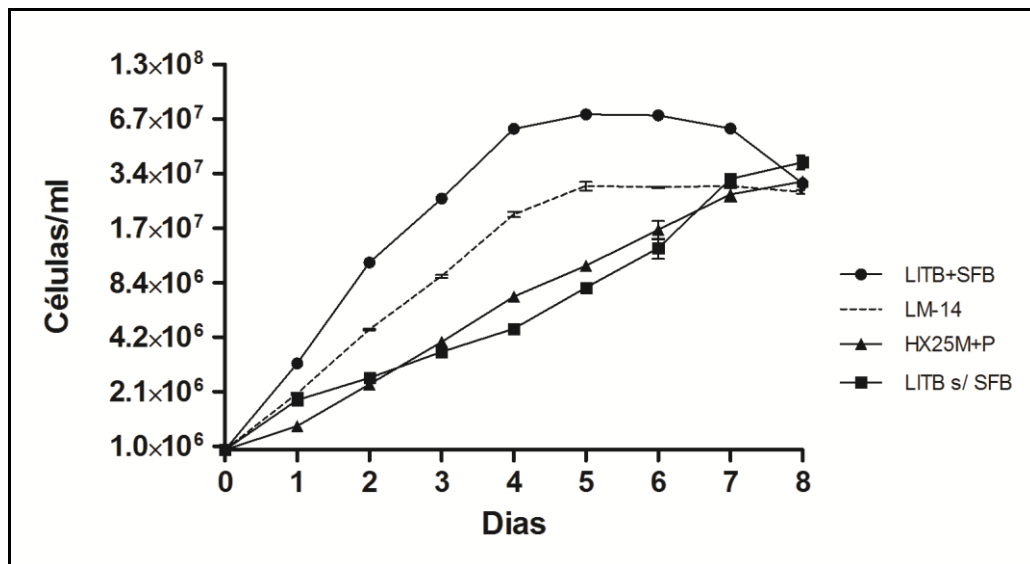
Sendo assim, 1  $\mu\text{M}$  de biopterina foi adicionado aos meios definidos em teste, HX25M e SDM-79+SFBd com e sem putrescina. A taxa de crescimento foi medida através de contagens de células por 5 passagens com concentração inicial de  $10^6$  células/ml contadas a cada 3 dias de cultivo. A biopterina não foi suficiente para manter o cultivo de *T. cruzi* sem putrescina (Figura 4.3.5, HX25M+B), enquanto que a adição de biopterina ao meio HX25M+P refletiu em um aumento significativo da taxa de crescimento dos parasitas, quando comparados ao meio sem biopterina ( $P < 0.01$ ) (Figura 4.3.5, HX25M+P+B). O mesmo resultado foi obtido para SDM-79+SFB. Estes resultados reforçam que putrescina é essencial para o crescimento celular e indicam que a presença de biopterina estimula o crescimento.



**Figura 4.3.5 Avaliação do efeito da Biopterina (B) no crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* em meios definido (HX25M) e semi-definidos (SDM-79+SFBd) com ou sem Putrescina (P).**

A biopterina foi adicionada aos meios na concentração final de  $1\mu\text{M}$ . As contagens foram feitas a cada 3 dias, seguidas por repiques de  $10^6$  células/ml. A suplementação de biopterina aos meios testados resultou em um aumento significativo do crescimento de células epimastigotas ( $p < 0,01$ ). Os dados inseridos são resultados de experimentos em triplicata biológica.

Ao meio quimicamente definido HX25M modificado, descrito acima, para o uso em cultivo de *T. cruzi* foi dado o nome de LM14 (até então nomeado HX25M+P+B). A curva de crescimento dos parasitas cultivados em meio LM14 foi obtida através do cultivo de formas epimastigotas em uma densidade inicial de  $10^6$  células/ml, contagens a cada 24 horas até que a cultura atingisse a fase estacionária de crescimento ou morte celular. Na figura 4.3.6, esta curva de crescimento foi comparada à curva de crescimento em LITB suplementado ou não com SFB e em HX25M+P. A fase estacionária de crescimento das culturas em meio definido LM14 foi alcançada no quinto dia ( $3 \times 10^7$  células/ml), assim como em LITB+SFB ( $6 \times 10^7$  células/ml). Já as culturas em LITB sem SFB e HX25M+P começaram a apresentar uma diminuição na taxa de crescimento apenas no sétimo dia (cerca de  $3$  a  $3,5 \times 10^7$  células/ml).



**Figura 4.3.6** Curva de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* em meios definidos (LM14 e HX25M+P) e complexos (LITB+SFB e LITB sem SFB).

As contagens foram feitas a cada 24 horas, por 8 dias (começo da morte celular). Os dados inseridos são resultados de experimentos em triplicata biológica.

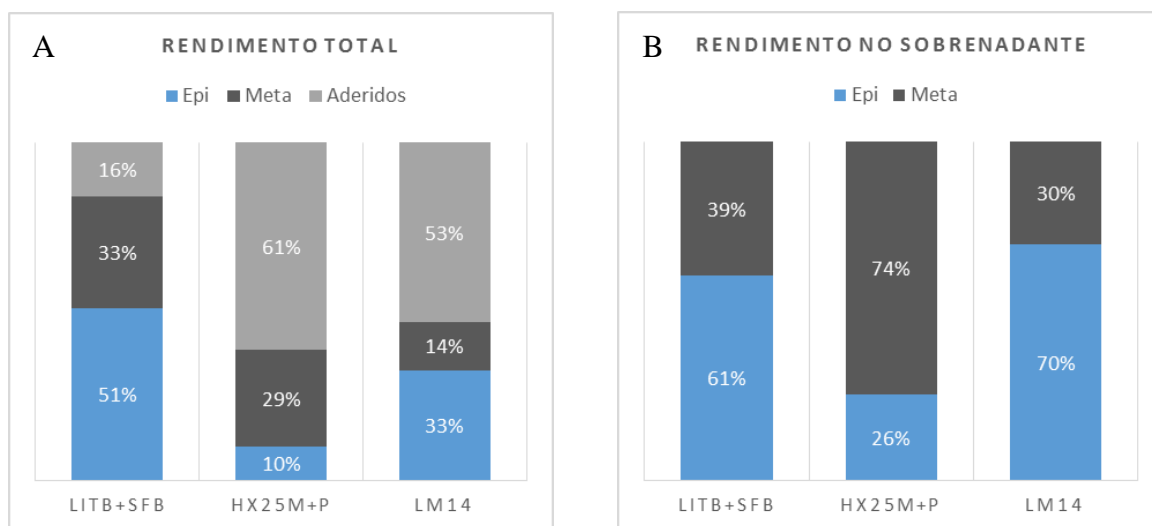
Apesar de a taxa de crescimento de parasitas cultivados em LM14 ser mais lenta que parasitas cultivados em LITB+SFB, quando comparados com as culturas em LITB sem SFB são expressivamente e significativamente mais rápida (Figura 4.3.6). Estes resultados sugerem que o meio definido LM14 é mais adequado para o cultivo de *T. cruzi* que o próprio meio padrão LITB quando o SFB está ausente.

Com o objetivo de verificar se a capacidade de diferenciação do *T. cruzi* é mantida mesmo após cultivo no meio definido, os parasitas cultivados em LM14 foram submetidos à metaciclogênese *in vitro*. Após 5 dias de cultivo em meio LM14, os parasitas foram submetidos à estresse nutricional por 2 horas (conforme descrito nos materiais e métodos), o mesmo tratamento foi aplicado à parasitas cultivados em LITB+SFB e HX25M+P.

Os parasitas provenientes do meio definido HX25M+P (o qual não possui biopterina em sua composição) apresentaram uma taxa de diferenciação semelhante ao encontrado no controle (células provenientes de LITB+SFB): cerca de 29% de metacíclicos após 72 horas de diferenciação foram encontrados em células provenientes de cultura em HX25M+P e cerca de 33% de metacíclicos foram encontrados em culturas provenientes de LITB+SFB. Porém a quantidade de células que permaneceram aderidas após a diferenciação é expressivamente maior em HX25M+P, onde cerca de 61% de parasitas permaneceram aderidos enquanto que na diferenciação de células provenientes de LITB+SFB apenas 16% das células permaneceram aderidas após a diferenciação (Figura 4.3.7A).



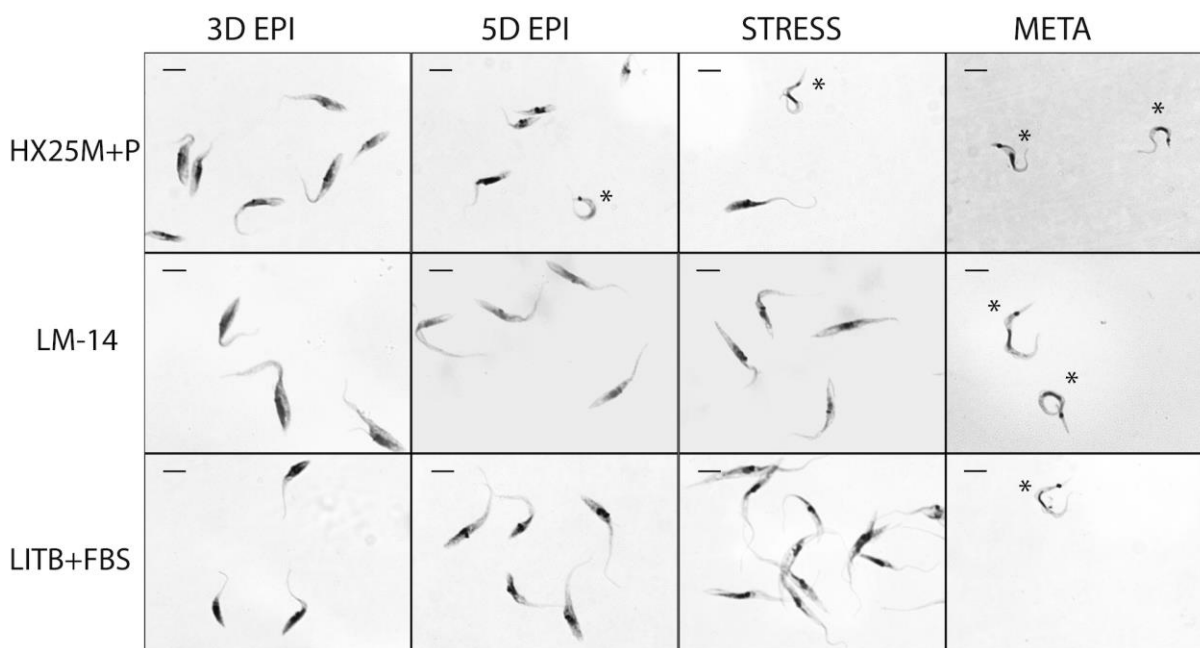
Já os parasitas provenientes do meio LM14 apresentaram uma taxa de diferenciação significativamente mais baixa, com cerca de 14% de metacíclicos após 72 horas de diferenciação e a maioria dos parasitas permaneceram aderidos à garrafa (53%) (Figura 4.3.7A). Esta diferença também foi observada em *Leishmania major*, onde a deficiência de tetra-hidrobiopterina (forma ativa da biopterina) em formas promastigotas resultaram no aumento da diferenciação em formas infecciosas promastigotas metacíclicas, porém o mecanismo por trás deste efeito permanece desconhecido (CUNNINGHAM et al., 2001).



**Figure 4.3.7** Comparação da taxa de diferenciação de epimastigotas (Epi) em tripomastigotas metacíclicos (Meta) de culturas provenientes de diferentes meios.

Após 72 horas de diferenciação em meio TAU3AAG, o sobrenadante foi retirado para contagem diferencial de Epi e Meta em câmara de Neuhauser. Em (A) estão apresentadas as proporções das formas celulares Epi e Meta relacionadas ao total de células submetidas à diferenciação no início do experimento, o valor que faltava para 100% foi considerado como células aderidas. Em (B) estão representadas as proporções de formas Epi e Meta relacionadas ao total de células contadas no sobrenadante, sem levar em consideração as células aderidas.

Outra questão relevante constatada por nossos experimentos foi a diferenciação espontânea observada em culturas em meio HX25M+P, fato que não ocorre em meio LM14 e LITB+SFB (Figura 4.3.8, 5D EPI e STRESS). Pteridinas reduzidas foram descritas em *Leishmania sp.* como uma das moléculas responsáveis pela captura de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NARE; HARDY; BEVERLEY, 1997; WANG et al., 1997) e parasitas nocaute para a proteína pteridina redutase, responsável por reduzir biopterinas em pterinas reduzidas, são mais sensíveis ao estresse oxidativo (MOREIRA; LEBLANC; OUELLETTE, 2009; NARE et al., 2009). Tais evidências sugerem que possivelmente a biopterina está atuando de alguma forma no aumento da resistência do parasita às situações de estresse em *T. cruzi*, e a ausência da mesma poderia ser um dos fatores a desencadear a diferenciação dos parasitas.

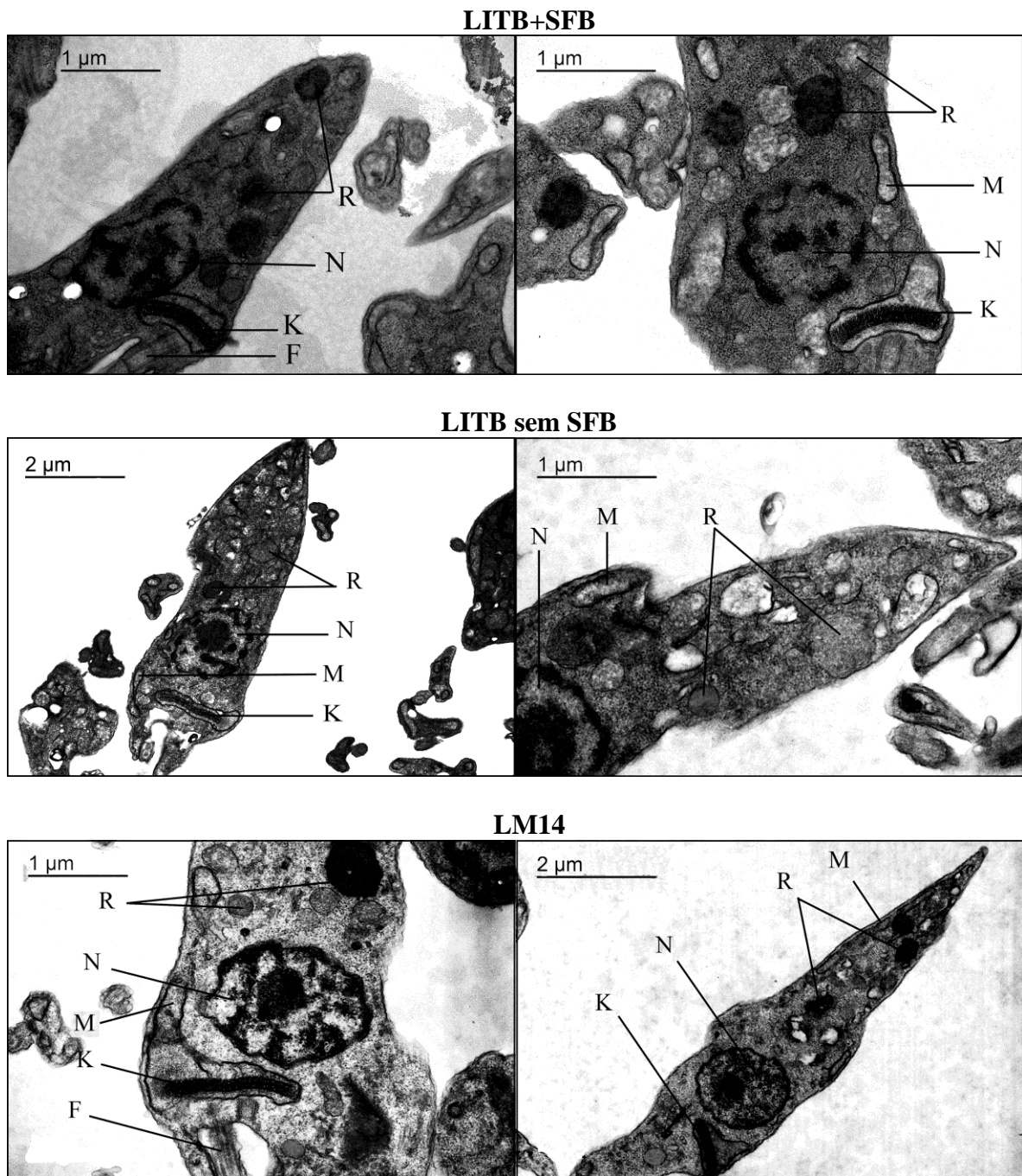


**Figure 4.3.8 Morfologia do parasita em diferentes estágios da diferenciação.**

As células foram coradas com o kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, BR). As imagens apresentadas são relacionadas à epimastigotas após 3 dias de cultivo nos meios apontados (3D EPI), 5 dias de cultivo (5D EPI), parasitas após 2 horas de incubação em meio TAU (STRESS) e tripomastigotas metacíclicos após metaciclogênese *in vitro* (META). Tripomastigotas metacíclicos estão indicados com um asterisco. As barras de tamanho indicam 10  $\mu$ m.

Apesar de os parasitas provenientes do meio LM14 apresentaram uma taxa de diferenciação mais baixa que os parasitas proveniente do LITB+SFB, a diferenciação existe, representando fortes indícios de que as capacidades biológicas do parasita neste meio definido são mantidas.

Análises ultraestruturais de epimastigotas de *T. cruzi* cultivados em meio definido também foram realizadas e comparadas com epimastigotas cultivados em LITB+SFB e LITB sem SFB para verificar se existiam possíveis alterações morfológicas. Cortes ultrafinos de *T. cruzi* foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão e nenhuma alteração no formato da células e em organelas intracelulares foi notada (Figura 4.3.9), reforçando a aplicabilidade do meio definido LM14 para cultivo de *T. cruzi*.



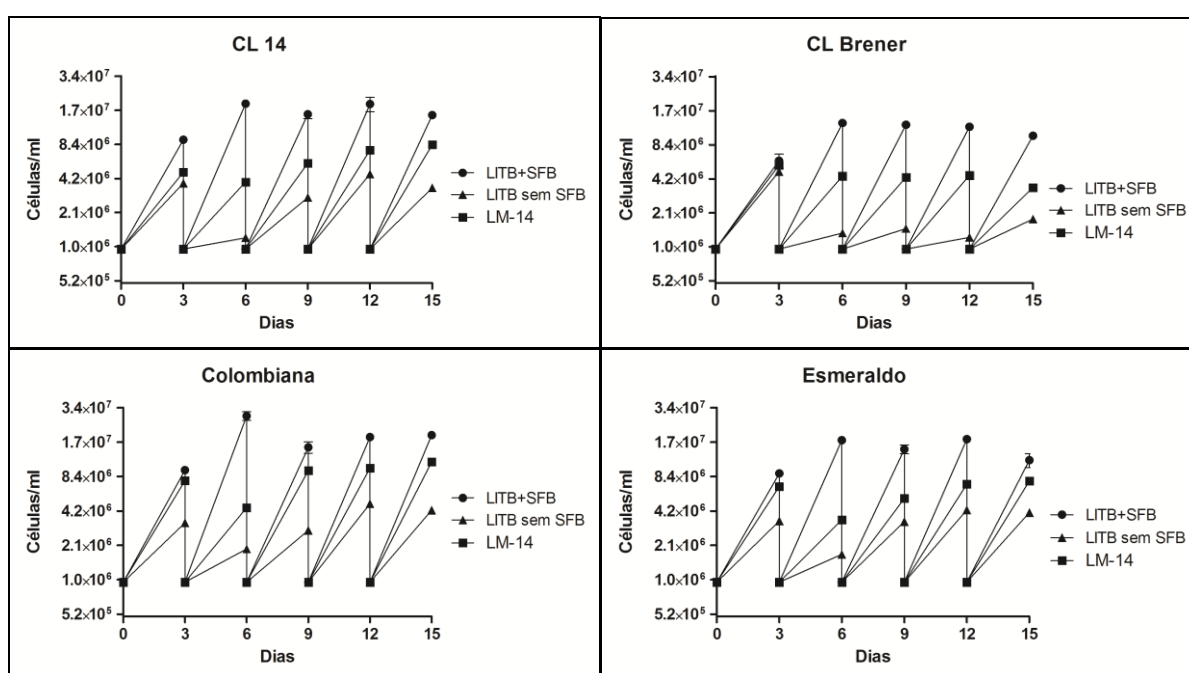
**Figure 4.3.9** Morfologia ultraestrutural de epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em diferentes meios.

Epimastigotas foram cultivados em meios LITB+SFB (painel superior), LITB sem SFB (painel central) ou LM14 (painel inferior) e então processados para microscopia eletrônica de transmissão. Nenhuma alteração morfológica foi observada no formato das células nem em organelas intracelulares, tais como flagelo (F), kinetoplasto (K), núcleo (N), mitocôndria (M) e reservosomos (R), quando comparados parasitas provenientes de cultura em LITB+FBS e LM-14 media. Os parasitas cultivados em LITB sem SFB apresentaram reservosomos levemente menos densos.

O parasita *T. cruzi* é uma espécie altamente polimórfica. A diversidade biológica, bioquímica e genética entre as diferentes populações de *T. cruzi* tem sido reconhecida à muito tempo (BRISSE; DUJARDIN; TIBAYRENC, 2000; LEWIS et al., 2009; MACEDO; PENA, 1998). Diversas abordagens foram utilizadas na tentativa de separar as populações de *T. cruzi*

em diferentes grupos denominados DTUs (do inglês, *discrete typing units*), porém cada trabalho publicado organizava-os com base em características diferentes, refletindo em grupos com diferentes composições. Recentemente, Zingales e colaboradores chegaram a um consenso e reorganizaram a nomenclatura desses DTUs como TcI-TcVI (ZINGALES et al., 2009).

Nós selecionamos linhagens de diferentes DTUs para testar a aplicabilidade do meio definido LM14 no cultivo das mesmas. As linhagens selecionadas foram: Colombiana (DTU I), Esmeraldo (DTU II), CL14 e CL Brener (DTU VI). Nossos resultados claramente demonstram que o meio LM14 foi eficiente para o cultivo de todas as linhagens testadas, e os resultados foram melhores que os observados no cultivo em LITB sem SFB (Figura 4.3.10).



**Figura 4.3.10 Avaliação do crescimento de diferentes linhagens de *T. cruzi* no meio definido LM14.**

As contagens foram feitas a cada 3 dias, seguidas por repiques de 10<sup>6</sup> células/ml. Todas as linhagens testadas foram cultivadas com sucesso no meio definido LM14. Os dados inseridos são resultados de experimentos em triplicata biológica.

#### 4.4 Metabolômica de *T. cruzi*

As análises metabolômicas baseadas em espectrometria de massas permitem a identificação e quantificação relativa de componentes consumidos e metabólitos produzidos em uma amostra biológica de interesse (DREXLER; REILY; SHIPKOVA, 2011; HAN et al., 2009; SCALBERT et al., 2009). Esta metodologia tem sido usada em tripanossomatídeos, trazendo conhecimentos valiosos a respeito do metabolismo destes organismos (CREEK et

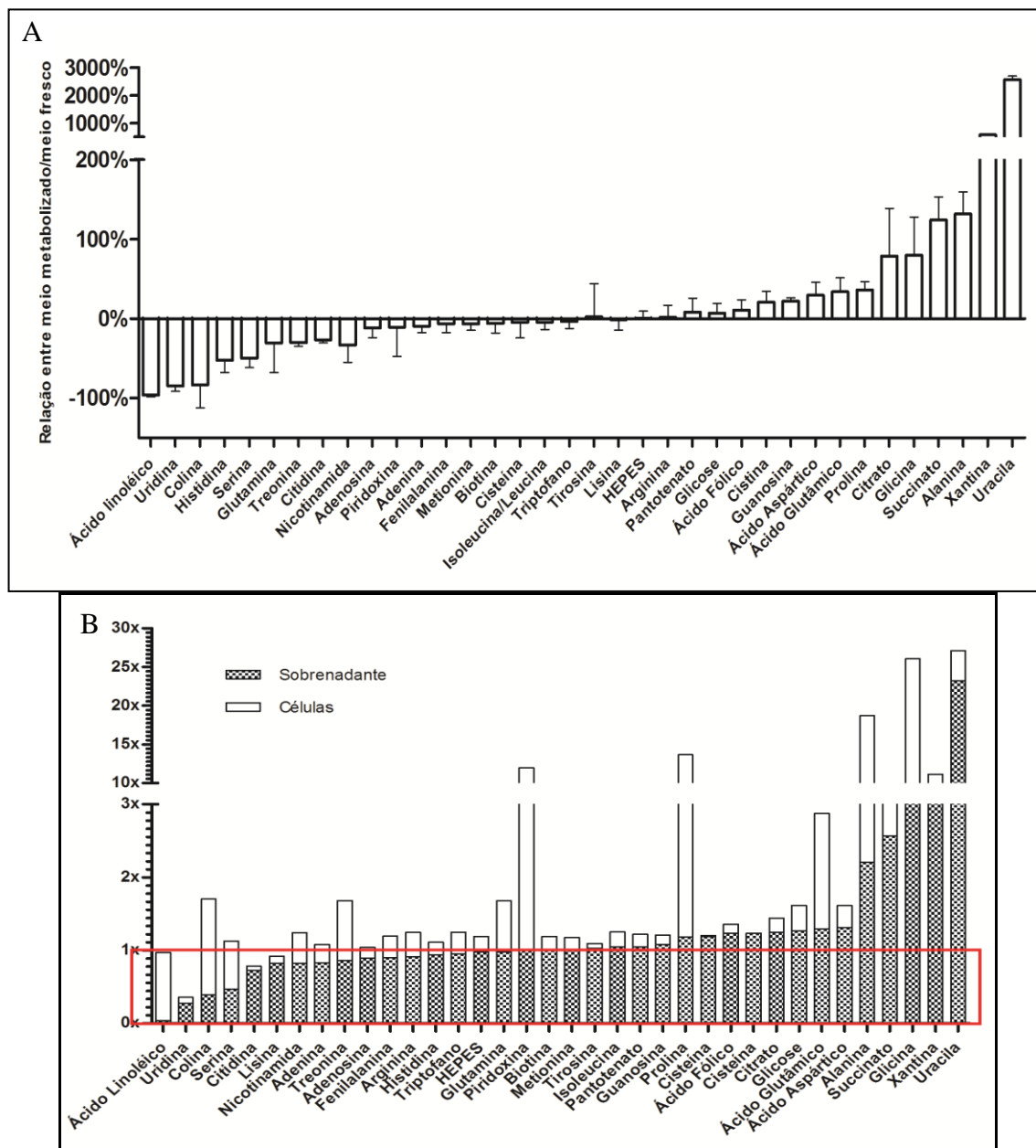
al., 2012a, 2012b; SCHELTEMA et al., 2010; SILVA; CORDEIRO-DA-SILVA; COOMBS, 2011).

Utilizando abordagens metabolômicas, Creek e colaboradores avaliaram os principais nutrientes requeridos para o crescimento de formas sanguíneas de *T. brucei* cultivadas no meio padrão HMI11, possibilitando o desenvolvimento de um meio mínimo para o cultivo deste parasita (CREEK et al., 2013).

Com o objetivo de confeccionar um meio definido mais relevante biologicamente e otimizar o crescimento de *T. cruzi* neste meio, foi realizada uma análise metabolômica dos parasitas cultivados em HX25M+P (até então não havíamos testado a biopterina no meio). Para tanto, células epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas por 7 dias em meio HX25M+P a 27 °C em triplicata biológica. As amostras analisadas foram: meio inicial (meio não metabolizado que foi utilizado para realizar o repique das culturas, controle 1); meio incubado por 7 dias a 27 °C (meio sem parasitas, controle 2); sobrenadante da cultura após 7 dias de cultivo; células após 7 dias de cultivo (sedimento, total de  $5 \times 10^7$  células). Escolhemos trabalhar com tempo de 7 dias de cultivo pois é o momento referente ao início da fase estacionária de crescimento neste meio, ou seja, onde o parasita já esgotou todos os nutrientes que ele necessita do meio e começa a parar de se dividir. Desta forma fomos capazes de identificar componentes do meio que foram altamente consumidos, e outros que foram consumidos em quantidades bem pequena ou nem foram consumidos.

Do total de componentes existentes no meio, aproximadamente 50% deles foram detectados. A ausência de identificação pode ter ocorrido devido ao tamanho muito reduzido de alguns sais (a maioria dos casos), baixa abundância de alguns componentes ou ausência de ionização antes de ser injetado no espectrômetro de massas.

A análise metabolômica revelou um consumo mínimo da maioria dos nutrientes analisados. Alguns metabólitos, como o citrato, glicina, alanina, succinato, xantina e uracila aumentaram no meio metabolizado, indicando que houve produção e secreção dos mesmos pelo parasita. Uracila apresentou o maior aumento (proporcional à quantidade inicial) dentre todos os componentes, alcançando cerca de 25 vezes a quantidade original do meio, seguido pela xantina com cerca de 6 vezes a mais (Figura 4.4.1A). Serina, histidina, colina, uridina e ácido linoleico foram altamente depletados do meio, com consumo de mais de 50% do componente no meio metabolizado quando comparado aos controles. O ácido linoleico foi o componente mais consumido do meio, cerca de 96% de depleção (Figura 4.4.1A).



**Figura 4.4.1** Análise metabolômica de células epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas em meio definido HX25M+P.

Foi realizado o perfil metabolômico das amostras de HX25M+P controle sem parasitas (meio fresco), o sobrenadante da cultura após 7 dias de cultivo e o sedimento de células da mesma cultura (cell pellet). Em (A) está representado o valor da razão normalizada entre a intensidade de cada componente encontrada no meio metabolizado (sobrenadante da cultura) e o meio controle (fresco), e o resultado foi subtraído de 100% para obter a porcentagem do componente original consumida pelo parasita. Os valores plotados em (B) são correspondentes a soma da proporção encontrada no meio metabolizado e no precipitado celular relacionadas à quantidade original no meio de cultura. A linha vermelha aponta a concentração de 1x a quantidade original, ou seja, os componentes que se encontram abaixo desta delimitação foram metabolizados e transformados em outros componentes e os que se encontram acima foram produzidos ou estavam presentes na células antes de incubadas com o meio de cultivo.

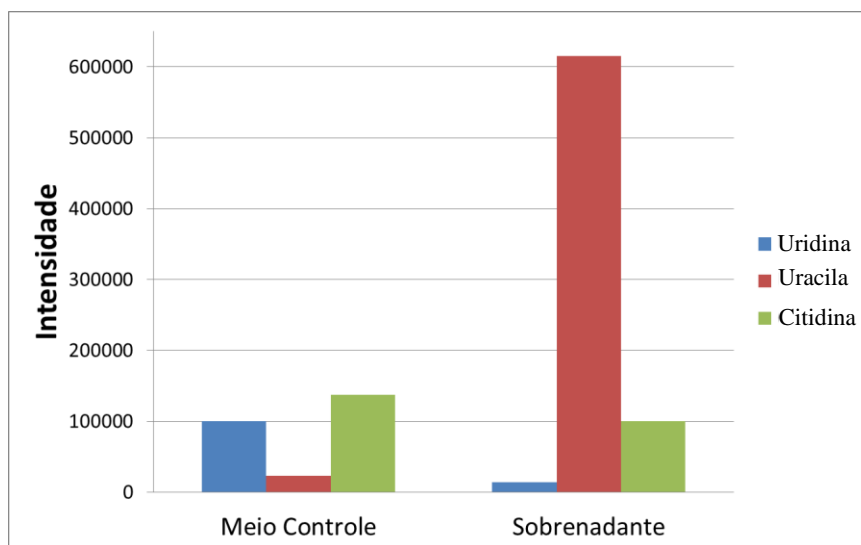
Succinato, alanina e ácido aspártico são os principais metabólitos originados da fermentação de glicose em tripanossomatídeos. Este processo é conhecido como “fermentação

aeróbica” pois ocorre a metabolização parcial da glicose e eliminação de succinato mesmo na presença de oxigênio, quando na maioria dos organismos aeróbicos a presença do oxigênio envia os substratos da glicólise (piruvato) para a cadeia respiratória e não para a fermentação (BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006; CANNATA; CAZZULO, 1984; CAZZULO, 1992; GRANT; FULTON, 1957). A presença de altas concentrações desses componentes, principalmente os dois primeiros, no meio metabolizado após 7 dias de cultivo é, portanto, reflexo do metabolismo energético do parasita. O *T. cruzi* é capaz de metabolizar aminoácidos, em especial a prolina, aspartato e glutamato, para produzir energia quando a quantidade de glicose no ambiente em que se encontra é baixa (CAZZULO, 1984; CAZZULO et al., 1985), porém os metabólitos originados deste processo ainda são desconhecidos. Curiosamente o nível de glicose nesta análise permanece praticamente inalterado, como se não houvesse consumo deste componente. Prolina, por sua vez, aparece como um componente produzido no meio, ao invés de consumido como esperado, assim como glutamato e aspartato.

Outros aminoácidos têm sua concentração bastante reduzida no meio, como serina e histidina. Serina é um aminoácido importante que é utilizado em várias vias biossintéticas, bem como compondo proteínas. Uma das mais importantes funções da serina é a formação de precursores e cofatores para a biossíntese de nucleotídeos. Com o auxílio da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT), a serina é convertida em glicina e doa um carbono para a molécula tetraidrofolato (THF), metabólito que entra na via de síntese *de novo* de purinas e nucleosídeos (LABUSCHAGNE et al., 2014; RABBANI; AKRABAWI; DAGHIR, 1973; TIBBETTS; APPLING, 2010). A atividade da enzima SHMT em *T. cruzi* já foi verificada e parece estar envolvida na síntese de THF devido à presença de altas concentrações de glicina no meio (CAPELLUTO et al., 2000; NOSEI; AVILA, 1985), corroborando os resultados obtidos em nossos experimentos de metabolômica onde é encontrado produção de glicina no meio metabolizado e consumo de serina.

É possível observar um alto consumo de uridina e uma grande produção de uracila pelo parasita no meio definido. Uridina é um nucleosídeo composto por uma base nitrogenada uracila e uma ribose. A ribose é um monossacarídeo composto de 5 carbonos que é amplamente utilizado pelas células na composição de ácidos nucléicos e de moléculas armazenadoras de energia, como NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido). Alguns trabalhos também apontam a ribose como fonte de energia e de carbono, tanto em eucariotos quanto em procariotos (GIANNECCHINI et al., 2005; TOZZI et al., 2006). A uracila pode ser obtida a partir de moléculas de uridinas pela ação das enzimas uridina

nucleosidase ou uridina fosforilase, e a partir da molécula de citosina pela ação da enzima citosina deaminase. A enzima uridina fosforilase foi identificada em *T. cruzi* e ensaios comprovaram sua função na defosforilação de uridina, produzindo uracila + ribose (LARSON et al., 2010; SILVA; SCHRAMM, 2011). O alto consumo de uridina e citidina (citosina+ribose) pelo parasita e grande excreção de uracila pode apontar uma possível utilização da ribose pelo mesmo, apesar de não haver correlação entre as quantidades de consumo de uridina e citidina com a quantidade de produção de uracila (Figura 4.4.2)



**Figure 4.4.2 Relação entre o consumo de Uridina e Citidina e produção de uracila.**

No eixo Y estão inseridas as intensidades encontradas na análise em MS dos componentes em questão. É possível notar uma grande produção de uracila (vermelho) no sobrenadante do meio metabolizado e consumo de uridina e citidina. Porém não existe relação entre a soma das intensidades dos produtos consumidos com a intensidade obtida na produção de uracila.

O ácido linoleico, um ácido graxo insaturado, foi um dos componentes mais consumidos do meio definido (Figura 4.4.1A), com cerca de 96% de depleção. Possivelmente é uma das fontes de energia do parasita e um dos lipídeos constituintes de membranas, uma vez que foi identificado no precipitado celular do experimento (Figura 4.4.1 B). Tripanosomatídeos possuem uma alta concentração de ácido linoleico em sua membrana celular (MELLORS; SAMAD, 1989; TRIPODI et al., 2006), conferindo maior fluidez à mesma, o que pode estar relacionado com a adaptação ao estresse químico e de temperatura que o parasita sofre durante seu ciclo de vida.

Como mencionado anteriormente, o objetivo de obter os dados de metabolômica de *T. cruzi* neste meio definido era para torna-lo mais biologicamente relevante e otimizar o crescimento do parasita neste meio. Portanto, com base nos resultados obtidos, foram testadas diversas condições. Componentes com um consumo acima de 50% (ácido linoleico, uridina,

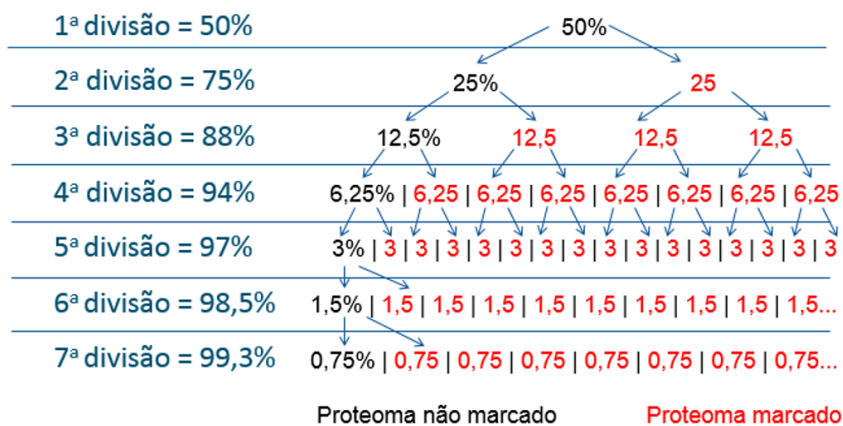


colina, serina e histidina) foram adicionados ao meio em concentrações 2 vezes superiores à original, e testados individualmente aumentados e em conjunto. Como a grande maioria dos componentes apresentaram poucas alterações com relação à quantidade consumida, também testamos o meio diluído 2 vezes com o objetivo de simplificar a composição do meio, porém adicionando a mesma concentração dos componentes com grande consumo citados acima. Nenhum dos testes realizados resultaram em aumento da taxa de crescimento do *T. cruzi*. Mesmo que o objetivo de melhoramento do meio não tenha sido alcançado, as análises metabolômicas nos trouxe importantes contribuições para uma melhor compreensão do metabolismo de *T. cruzi*, apesar de ainda serem necessários outros experimentos para possibilitar uma melhor interpretação dos resultados expostos.

Os resultados obtidos neste capítulo constituíram um artigo sobre meio definido para cultivo de *T. cruzi*, o qual está em revisão pela conceituada revista *BMC Microbiology*.

#### **4.5 Estabelecimento do método SILAC**

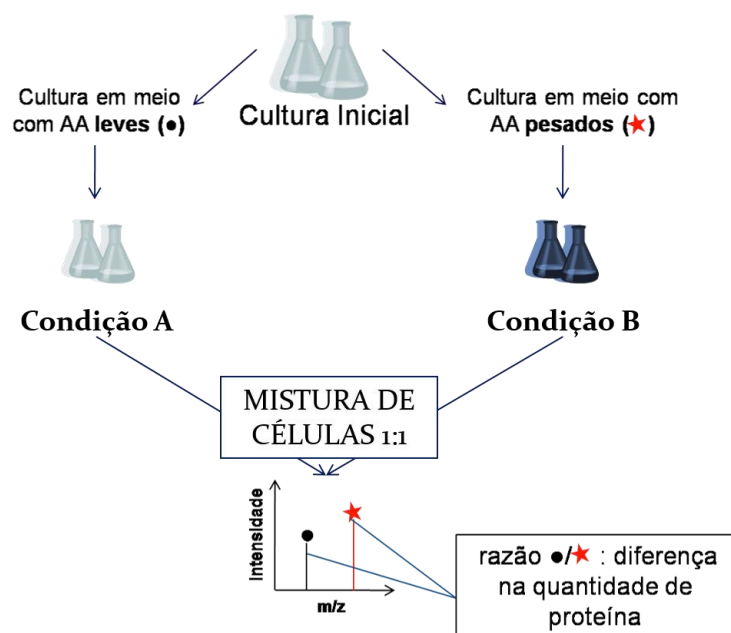
Na metodologia SILAC (ONG, 2002), ocorre a marcação metabólica das proteínas celulares. As células são cultivadas em um meio específico, o qual deve possuir algum aminoácido marcado, de acordo com a enzima utilizada na digestão das proteínas, por exemplo, lisina e arginina quando se usa tripsina. Os aminoácidos marcados possuem isótopos pesados de carbono e/ou nitrogênio. Neste trabalho foram utilizados os aminoácidos arginina 6 (R6: 6 carbonos 13) ou arginina 10 (R10: 6 carbonos 13 + 4 nitrogênios 15) e lisina 8 (K8: 6 carbonos 13 + 2 nitrogênios 15). Desta forma, ao utilizar estes aminoácidos como fonte para síntese de proteínas, a célula faz a incorporação dos mesmos. Após aproximadamente 5 divisões celulares, a taxa de incorporação dos aminoácidos marcados deve ser de mais de 95%, ou seja, mais de 95% do proteoma deve estar marcado para obter um resultado confiável (Figura 4.5.1).



**Figura 4.5.1 Representação da incorporação de aminoácidos marcados no proteoma celular.**

A cada divisão celular, as novas células são formadas utilizando os aminoácidos marcados para constituir suas proteínas. Chegando ao fim de 7 divisões celulares com mais de 99 % das células da cultura possuirão o proteoma marcado com o aminoácidos pesados.

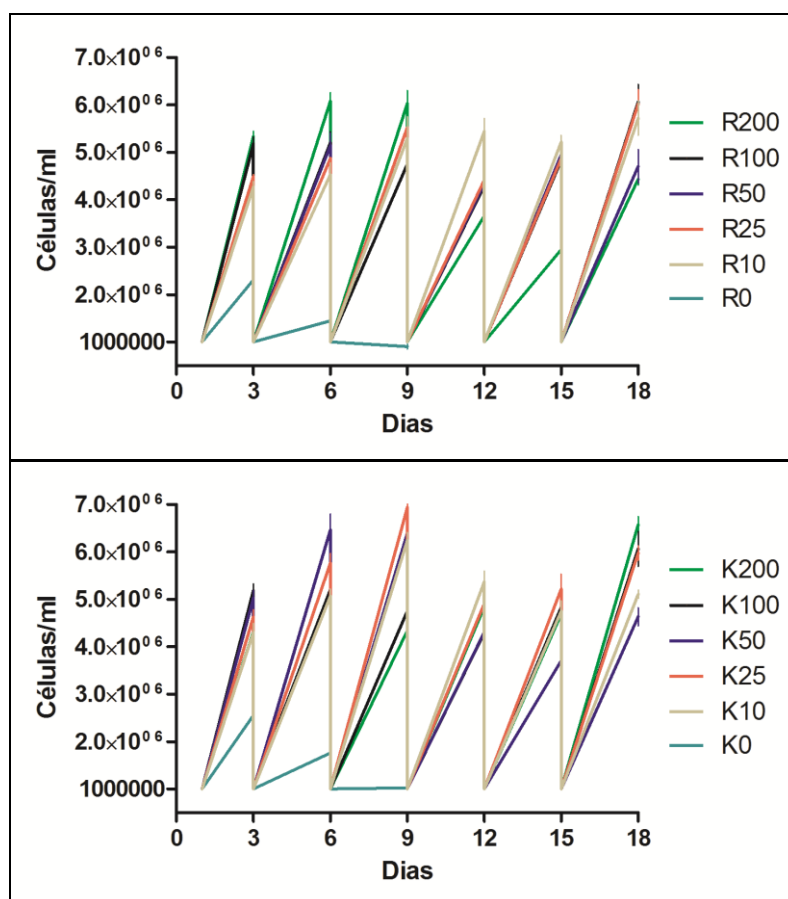
Nesta metodologia é feito o cultivo em paralelo de duas ou mais culturas em condições biológicas distintas, sendo uma marcada (pesada) e outra não marcada (leve). Antes da extração das proteínas, as células são misturadas 1:1 e submetidas ao mesmo tratamento subsequentes (Figura 4.5.2). Esta é uma das vantagens desta metodologia para quantificação, pois diminui as possíveis interferências decorrentes da manipulação individual das amostras. Uma desvantagem desta metodologia é o aumento na complexidade da amostra pelo fato de duplicar ou triplicar (no caso de três condições biológicas) o número de proteínas na amostra. Outra questão importante é que as células a serem estudadas devem ser cultivadas em meio definido para que seja possível substituir os aminoácidos normais do meio por suas versões pesadas, ferramenta já estabelecida no presente trabalho.



**Figura 4.5.2 Visão global do método SILAC.**

Primeiramente uma cultura deve ser incubada com os aminoácidos pesados até que ocorra a completa marcação do proteoma. Em seguida, as culturas marcada e não marcada são submetidas à tratamentos diferenciados e então misturadas na proporção 1:1. Todos os passos subsequentes são realizados com uma única amostra contendo as duas populações que, na análise em MS poderão ser diferenciadas.

Inicialmente foi realizada a titulação de arginina (R) e lisina (K) no meio definido para verificar qual era a mínima concentração dos mesmos que não prejudicava o crescimento celular. Esta titulação é de extrema importância tanto para redução de custos, uma vez que os aminoácidos marcados são de custo elevado, quanto para evitar a conversão de arginina pesada para prolina pesada que acontece quando a arginina é encontrada em grandes quantidades no meio, evitando a marcação das proteínas por uma aminoácido não desejado que pode interferir na acurácia da quantificação (ONG; KRATCHMAROVA; MANN, 2003). Foram testadas as quantidades referentes a 10%, 25%, 50%, 100% e 200% da concentração original de K e R do meio LM14. Foram realizadas contagens a cada 3 dias de cultivo, com repiques em concentração inicial de  $10^6$  células/ml, até que o controle sem K e R morresse (Figura 4.5.3).



**Figura 4.5.3 Titulação de K e R em cultivo de *T. cruzi* em meio definido.**

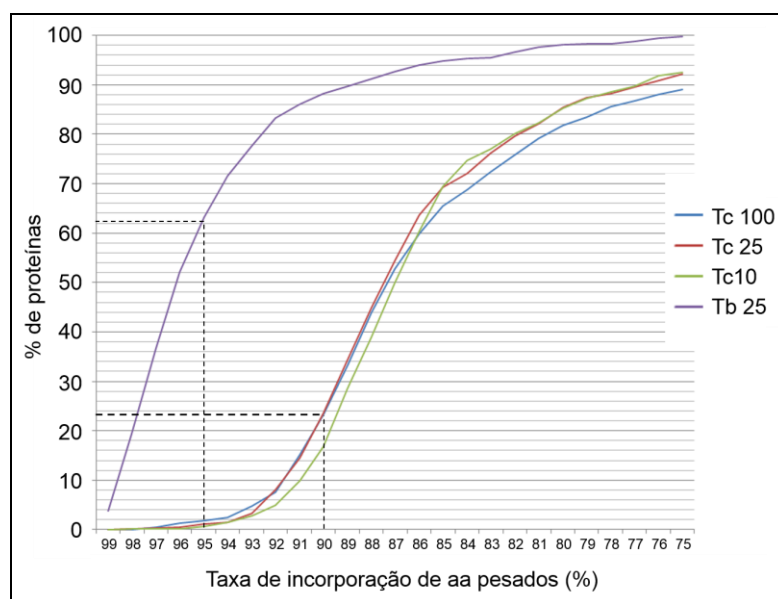
As contagens foram feitas a cada 3 dias, seguidas por repiques de 10<sup>6</sup> células/ml. Concentrações relativas à original do meio.

De acordo com o resultado exposto acima, decidimos testar a incorporação dos aminoácidos com 25 e 10% da concentração original de K e R, pois foram os cultivos que apresentaram melhor crescimento.

Em seguida foi realizado um ensaio de incorporação para verificar se o parasita é capaz de utilizar os aminoácidos pesados disponibilizados no meio de cultura para produzir suas proteínas. Este primeiro ensaio foi realizado em meio semi-definido HX25M+P suplementado com 10% de SFBd com as versões pesadas de lisina e arginina (R6 e K8). Como mencionado anteriormente, parasitas cultivados em meio suplementado com SFB apresentam uma melhor taxa de crescimento comparados aos cultivados sem a adição do mesmo (Figura 4.3.6), porém é necessário utilizar SFB dializado (SFBd) para aplicação do método SILAC para que não existam aminoácidos leves livres no meio, o que prejudicaria a marcação metabólica por aminoácidos pesados.

Inicialmente as células foram lavadas em PBS 1X e posteriormente diluídas em meio pesado com SFBd na concentração de 10<sup>5</sup> células/ml e mantidas em cultivo por 10 dias, alcançando aproximadamente 8 divisões celulares (cerca de 3 x 10<sup>7</sup> células/ml). Foram

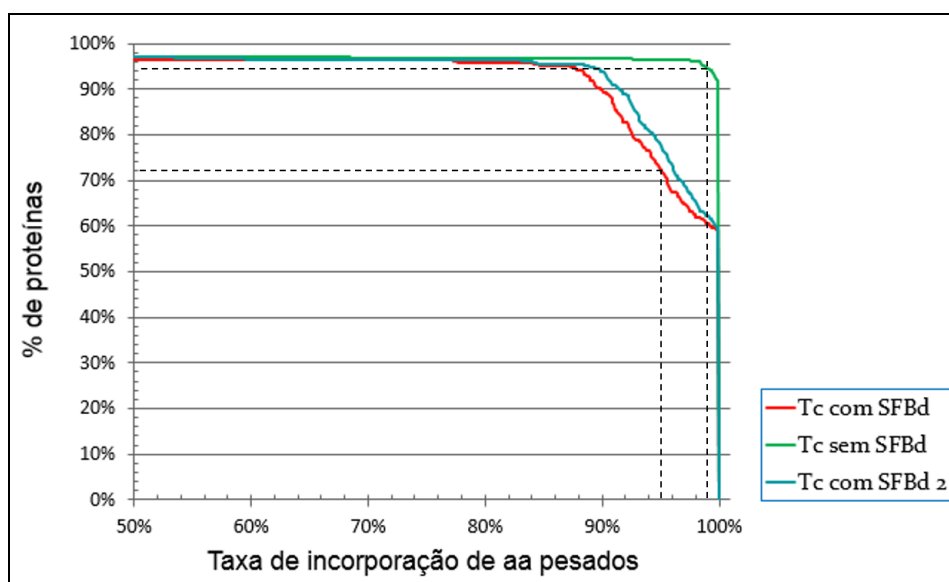
testadas as concentrações de 100, 25 e 10% de K e R pesados, para verificar se os 25% eram suficientes para incorporação total do proteoma. Foi inserido como controle células de *T. brucei* marcadas em SDM-79 + 10% SFBd, pois já estava padronizado método SILAC para este organismo pela nossa equipe. Na figura 4.5.4 pode ser visualizado que menos de 25% das proteínas de *T. cruzi* tiveram mais de 90% de incorporação de aminoácidos marcados. Quando verificamos a quantidade de 95% de incorporação (taxa mínima desejada para realizar a quantificação de forma confiável) a quantidade de proteínas foi de cerca de 2% do proteoma. Em *T. brucei*, por sua vez, a taxa de incorporação foi bem melhor, apesar de também não ser satisfatória pois apenas 60% do proteoma apresentou incorporação de 95% de aminoácidos pesados. Experimentos posteriores mostraram melhores resultados em *T. brucei* (dados apresentados na tese de doutorado de Michel Batista e dissertação de mestrado de Fernanda G. Kugeratski). Outra informação relevante, apesar do resultado insatisfatório, é a redução da taxa de incorporação da cultura realizada com 10% de K e R quando comparada com 25 e 100%. As culturas com 25 e 100% de K e R apresentaram uma taxa de incorporação bastante semelhante, portanto os experimentos seguintes de SILAC serão realizados com a concentração de 25% desses aminoácidos.



**Figura 4.5.4 Ensaio de marcação metabólica do proteoma de *T. cruzi* por aminoácidos pesados.**

O gráfico apresenta a relação entre a porcentagem de aminoácidos pesados incorporados nas proteínas de *T. cruzi* (eixo X) pela porcentagem de proteínas marcadas no proteoma. Os dados plotados são referentes à culturas de *T. cruzi* (Tc) cultivadas em meio semi-definido HX25M+P+SFBd com a adição de 100, 25 ou 10 % da quantidade original de K e R, e cultura de *T. brucei* (Tb) em meio semi-definido SDM-79+SFBd com 25% da quantidade original de K e R.

Com o objetivo de verificar se o componente complexo SFBd poderia estar influenciando de alguma forma na incorporação de aminoácidos marcados, foi realizado um ensaio de marcação com culturas mantidas em meio definido HX25M+P. Três condições diferentes foram comparadas: 1) tempo de cultivo para incorporação mais prolongado em meio semi-definido pesado (extendido para 18 divisões celulares); 2) cultivo em meio definido pesado por cerca de 9 divisões celulares e, 3) após o cultivo em meio definido pesado por 9 divisões, retirar uma alíquota de células marcadas e diluí-las em meio semi-definido pesado para cultivá-las por mais 8 divisões celulares. Como pode ser observado na figura 4.5.5, as células cultivadas em meio definido com aminoácidos pesado apresentaram uma excelente incorporação dos mesmos, cerca de 99% de aminoácidos incorporados em 95% das proteínas totais do parasita. Já a célula cultivada em meio semi-definido, mesmo com 10 divisões a mais que o ensaio anterior, apresentou uma marcação bem baixa, cerca de 72% das proteínas totais apresentaram incorporação mínima exigida de 95% de aminoácidos pesados.



**Figura 4.5.5** Ensaio de marcação metabólica do proteoma de *T. cruzi* por aminoácidos pesados em meio definido e verificação da compatibilidade do SFBd com a metodologia SILAC para o parasita.

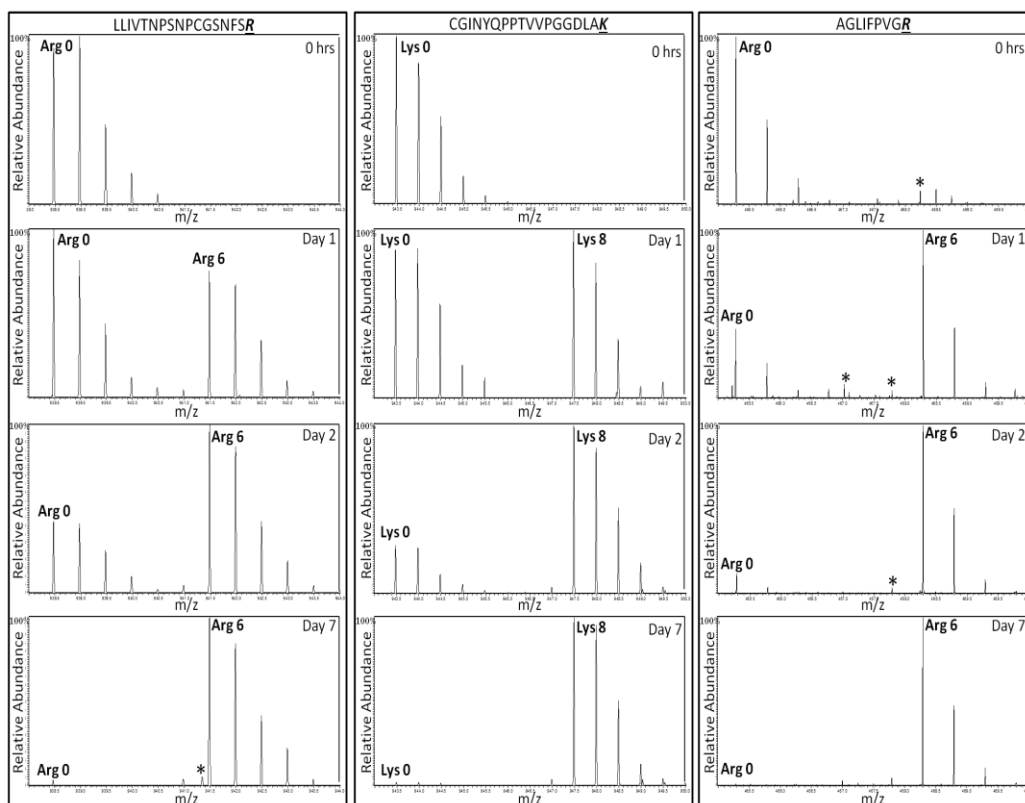
O gráfico apresenta a relação entre a porcentagem de aminoácidos pesados incorporados nas proteínas de *T. cruzi* (eixo X) pela porcentagem de proteínas marcadas no proteoma (eixo Y). Os dados plotados são referentes à culturas de *T. cruzi* (Tc) cultivadas em meio HX25M+P suplementado (semi-definido) ou não (definido) com SFBd. A amostra Tc com SFB<sub>2</sub> foi obtidas após incubação das células marcadas em meio definido por mais 8 divisões celulares em meio semi-definido.

Um resultado bastante interessante foi obtido das amostras do terceiro teste citado acima, a cultura utilizada neste experimento é exatamente a mesma em meio definido que apresentou 99% de aminoácidos incorporados em 95% das proteínas, porém após a marcação ela foi passada para um meio com aminoácidos pesados mas com suplementação de SFBd. É

possível verificar que estes parasitas perderam, ao longo das divisões seguintes, os aminoácidos pesados que haviam sido previamente incorporados, sendo substituídos por aminoácidos leves. Este resultado sugere 2 hipóteses: ou o SFBd comercial utilizado neste experimento apresenta K e R livres ainda presentes após a dialize para a célula consumir e incorporar em suas proteínas, ou o parasita consome as proteínas presentes no soro e as utiliza como fonte de aminoácidos para produção de suas proteínas. Diversos trabalhos mostram que *T. cruzi* endocita proteínas do meio extracelular e as encaminha para os reservossomos (EGER; SOARES, 2012; FIGUEIREDO et al., 2004; SOARES; DE SOUZA, 1991). O reservossomo é uma organela repleta de proteases que atua como reserva de nutrientes, entre eles proteínas, para serem utilizados em situações de inanição, como o estresse nutricional sofrido por epimastigotas previamente à diferenciação para formas infectivas. Como no meio semi-definido existem menos nutrientes disponíveis que no LITB, existe a possibilidade de que o parasita esteja consumindo as proteínas disponíveis do soro e degradando-as para produção de energia e fonte de aminoácidos.

Com estes resultados nós pudemos concluir que a metodologia SILAC para *T. cruzi* só pode ser realizada utilizando meio definido sem SFB para obter uma marcação metabólica suficiente.

Em seguida foi realizado um teste de incorporação para verificar qual é o tempo de cultivo mínimo para obter uma incorporação suficiente para os ensaios quantitativos. Para tanto, células cultivadas em HX25M+P foram lavadas e diluídas no mesmo meio porém com R6 e K8 substituindo suas versões leves. As células foram incubadas por 10 dias e amostras para análise proteômica foram preparadas diariamente com alíquotas da cultura. Como mostrado na figura 4.5.6, a incorporação de aminoácidos pesados pôde ser detectada nos peptídeos já no primeiro dia de cultivo. Uma maior taxa de incorporação foi observada em tempos posteriores, alcançando uma incorporação completa no dia 7. Este tempo de cultivo corresponde a aproximadamente 5 divisões celulares. Nem todos os peptídeos apresentam a mesma taxa de incorporação, isso acontece principalmente porque cada proteína tem um tempo diferente para síntese e degradação, com meia-vida curta ou longa na célula. Na figura 4.5.6 exemplos de ambos os casos estão ilustrados: o primeiro peptídeo (esquerda) apresenta uma taxa de incorporação mais lenta (meia-vida longa), enquanto que o último (direita) apresenta uma taxa de incorporação mais rápida (meia-vida curta).



**Figura 4.5.6** Teste de incorporação de K8 (Lys8) e R6 (Arg6) em proteínas de *T. cruzi* em diferentes tempos.

O meio com aminoácidos pesados foi incubado com as células no ponto inicial (0 hrs). As amostras foram analisadas por 10 dias, a cada 24 horas. Apenas estão representados na figuras os dias 0, 1, 2 e 7 do teste de incorporação. Os picos anotados são relacionados à fragmentação dos pares dos peptídeos leves (Arg0 e Lys0) e pesados (Arg6 e Lys8). Os peptídeos em questão estão indicados no topo da figura. É possível visualizar que nos painéis superiores (0 hrs) foram identificados apenas peptídeos leves, e nos painéis inferiores são visualizados os peptídeos com total incorporação de aminoácidos pesados. Os painéis centrais mostram que, antes de 7 dias de cultivo (5 divisões celulares), ainda existem em cultivo populações com peptídeo pesado e outra com peptídeos leves. Os grupos de picos marcados com uma asterisco são correspondentes a peptídeos não relacionados ao analisado.

#### 4.6 Proteômica quantitativa de *T. cruzi*

##### Comparação entre o proteoma de epimastigotas cultivados em meio LM14 e em meio LITB+SFB

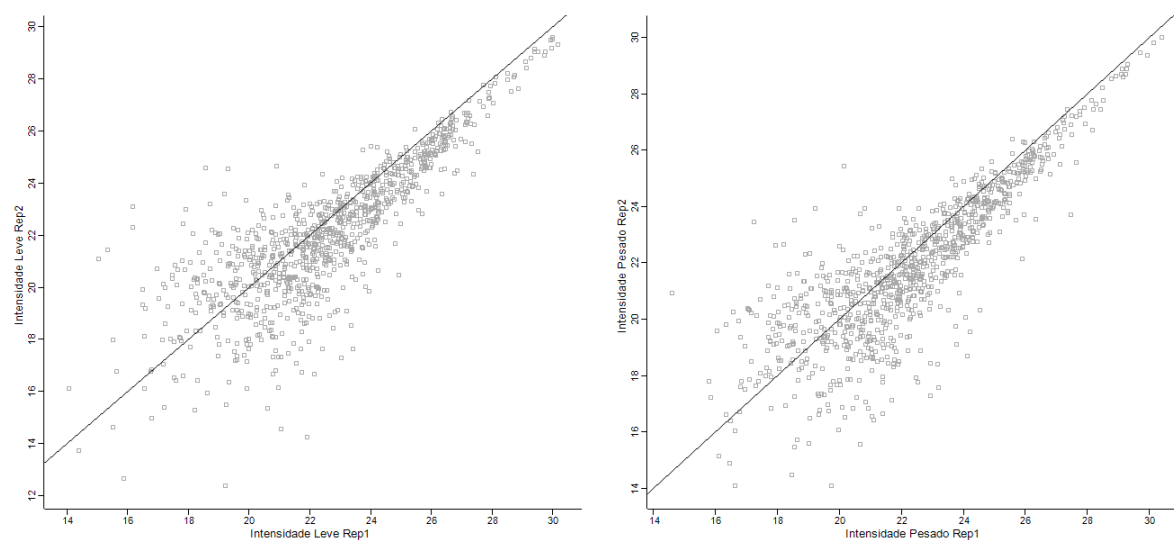
Com o objetivo de verificar se os níveis e perfil de expressão das proteínas são semelhantes entre os parasitas cultivados em meio quimicamente definido LM14 e meio complexo LITB+SFB, foi realizado um experimento de proteômica quantitativa utilizando a metodologia SILAC comparando os parasitas submetidos aos dois diferentes cultivos.

Para tanto,  $2,5 \times 10^7$  epimastigotas cultivados em LITB+SFB (amostra com R e K leves) por 3 dias e a mesma quantidade de epimastigotas cultivados em LM14 (com R e K pesados = K8 e R6) foram previamente lavados em PBS 1X para remoção dos meios de



cultura e então misturados na mesma proporção e seguido então os processos de lise em tampão com SDS e digestão pelo método FASP. Após a digestão, foi recuperado cerca de 75  $\mu\text{g}$  de peptídeos a partir de  $5 \times 10^7$  células. Os peptídeos foram purificados e concentrados em Stage-tips. As amostras foram analisadas em LC-MS/MS, os dados gerados foram analisados na plataforma MaxQuant e em seguida manipulação dos dados foram realizadas no programa Perseus.

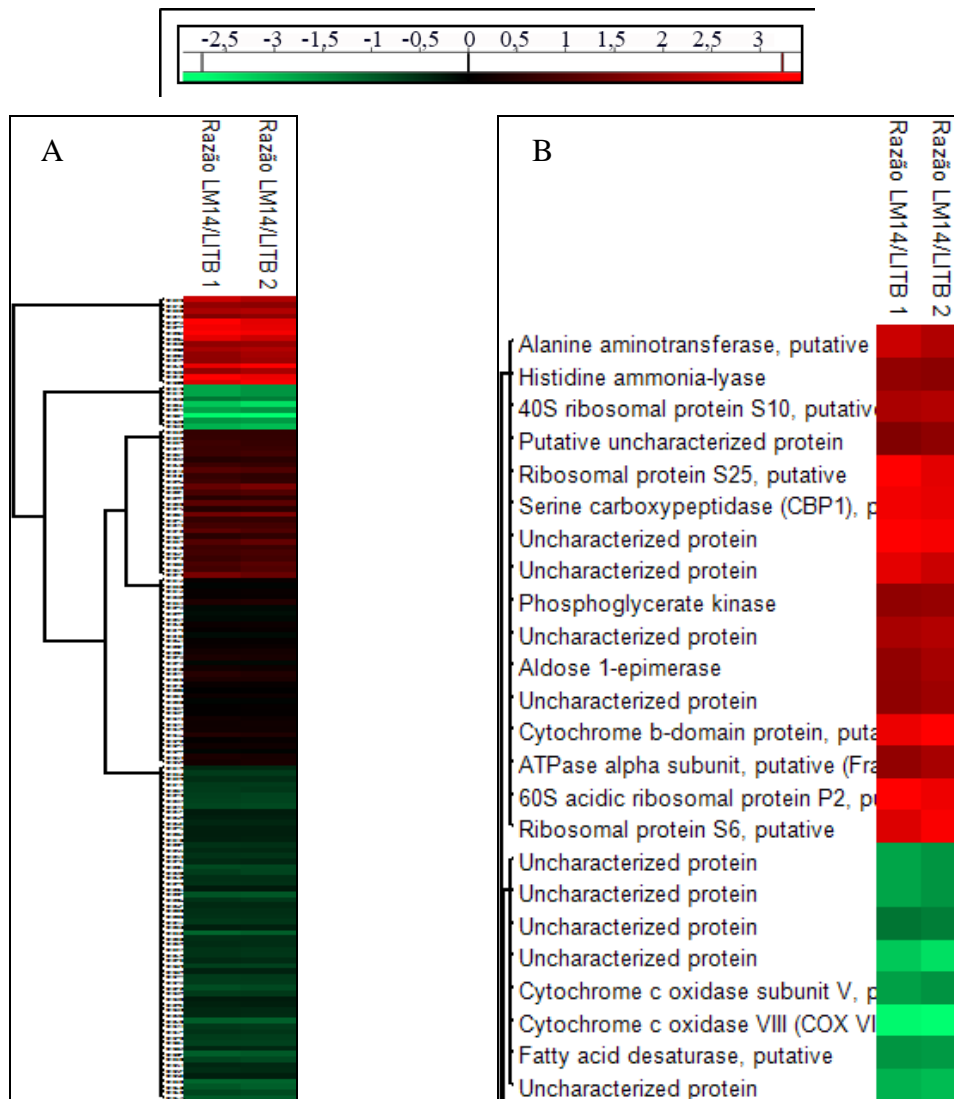
Um total de 1356 proteínas foram identificadas somando as identificações nas duas réplicas. Este valor reduziu para 776 quando analisadas apenas as proteínas identificadas em ambas as réplicas. A taxa de correlação de Pearson das intensidades foi de 0,84 entre as réplicas das proteínas pesadas (meio LM14) e de 0,83 entre as réplicas das proteínas leves (LITB+SFB) (Figura 4.6.1). Lembrando que as proteínas leves e pesadas de cada réplica pertenciam à mesma amostra e sofreram os mesmos procedimentos, por isso as duas correlações foram muito semelhantes.



**Figura 4.6.1** Correlação entre as intensidades das duas réplicas para proteínas leves (A) e pesados (B).

A taxa de correlação de Pearson obtida foi de 0,83 para as proteínas leves e 0,84 para as pesadas. Os valores inseridos são resultados do  $\log_2$  das intensidades.

Foi possível constatar com este experimento que diversas proteínas apresentam diferenças no perfil de expressão entre os dois meios (Figura 4.6.2).



**Figura 4.6.2 Agrupamento de proteínas pelo perfil de expressão em epimastigotas cultivados em LITB+SFB e LM14.**

Os dados inseridos são referentes ao  $\log_2$  da razão normalizada entre proteínas pesadas (meio LM14) e leves (meio LITB+SFB), em réplica. Desta forma, as proteínas relacionadas à cor vermelha estão aumentadas em células cultivadas em LM14, enquanto que as verdes estão diminuídas neste meio em relação às células cultivadas em meio LITB+SFB. Em (A) pode ser visualizado o perfil geral de expressão da proteínas. Em (B) uma imagem em maior aumento, direcionada para o topo do agrupamento onde estão as proteínas consideradas mais aumentadas (vermelho) e mais diminuídas (verde) no meio definido com relação ao meio complexo.

Dentre as proteínas que possuem seu nível de expressão reduzido no meio definido LM14 estão várias proteínas relacionadas ao complexo citocromo C (Citocromo C oxidase VIII; subunidade IV e V da Citocromo C oxidase; chaperona de cobre para Citocromo C oxidase e uma proteína hipotética com função molecular relacionada à atividade da Citocromo C oxidase). Também se encontram diminuídos no meio definido proteínas relacionadas à síntese de ácidos graxos e esteróis (ácido graxo desaturase, prostaglandina F sintase, proteína alongadora de ácidos graxos, esterol 24-c-metiltransferase e esterol 14-alfa demetilase), possivelmente pela presença de ácido linoleico, um ácido graxo insaturado, no

meio definido, o qual é altamente consumido do mesmo pelo parasita (ver resultados de metabolômica de *T. cruzi* em meio definido).

Existem também várias proteínas que se encontram aumentadas no meio definido, como peptidases constituintes do lisossomo (serina carboxipeptidases e cisteína peptidase), enzimas responsáveis pelo controle da homeostase celular e estado redox (triptofano redutase), metabolismo de carboidratos (aldose 1-epimerase, fosfoglicerato quinase) e metabolismo de histidina (histidina amônio liase e arginase).

A tabela com a lista das proteínas identificadas e quantificadas, IDs, e valor da relação da intensidade de LM14/LITB+SFB pode ser encontrada em anexo (Anexo 1).

O fato de o perfil proteômico das células cultivadas em meio definido ser diferente das células cultivadas em meio LITB+SFB nos direcionou a seguir uma abordagem diferente da que foi proposta inicialmente por este trabalho. A idéia inicial era realizar a proteômica quantitativa das diferentes fases da metaciclologênese alternando entre fases marcadas com aminoácidos pesados (meio definido com aminoácidos pesados) e fases não marcadas (meio definido com aminoácidos leves ou LITB+SFB). Porém, para obter resultados mais relacionados à realidade atual da pesquisa com *T. cruzi*, o qual é rotineiramente cultivado em LITB+SFB, decidimos realizar a proteômica quantitativa com o método Super-SILAC publicado recentemente para análises proteômicas quantitativas de tecidos animais (no caso tecido de tumores humanos), os quais não podem ser marcados metabolicamente (GEIGER et al., 2010). Neste trabalho foi desenvolvido uma mistura denominada Super-SILAC mix, possuindo lisados de diferentes linhagens celulares relacionadas a determinados tumores, as quais foram previamente marcadas com aminoácidos pesados. Este mix é misturado, na mesma proporção, à todas as amostras a serem comparadas como um padrão. Deste modo é possível quantificar amostras protéicas provenientes de qualquer origem.

Usando esta abordagem foi possível comparar todas as fases da diferenciação de *T. cruzi* proveniente do meio LITB+SFB, pois todas as amostras receberam a mesma quantidade de uma mistura Super-SILAC de *T. cruzi*, a qual era composta por uma mistura de todas as formas a serem comparadas, previamente marcadas em meio LM14 com aminoácidos pesados.

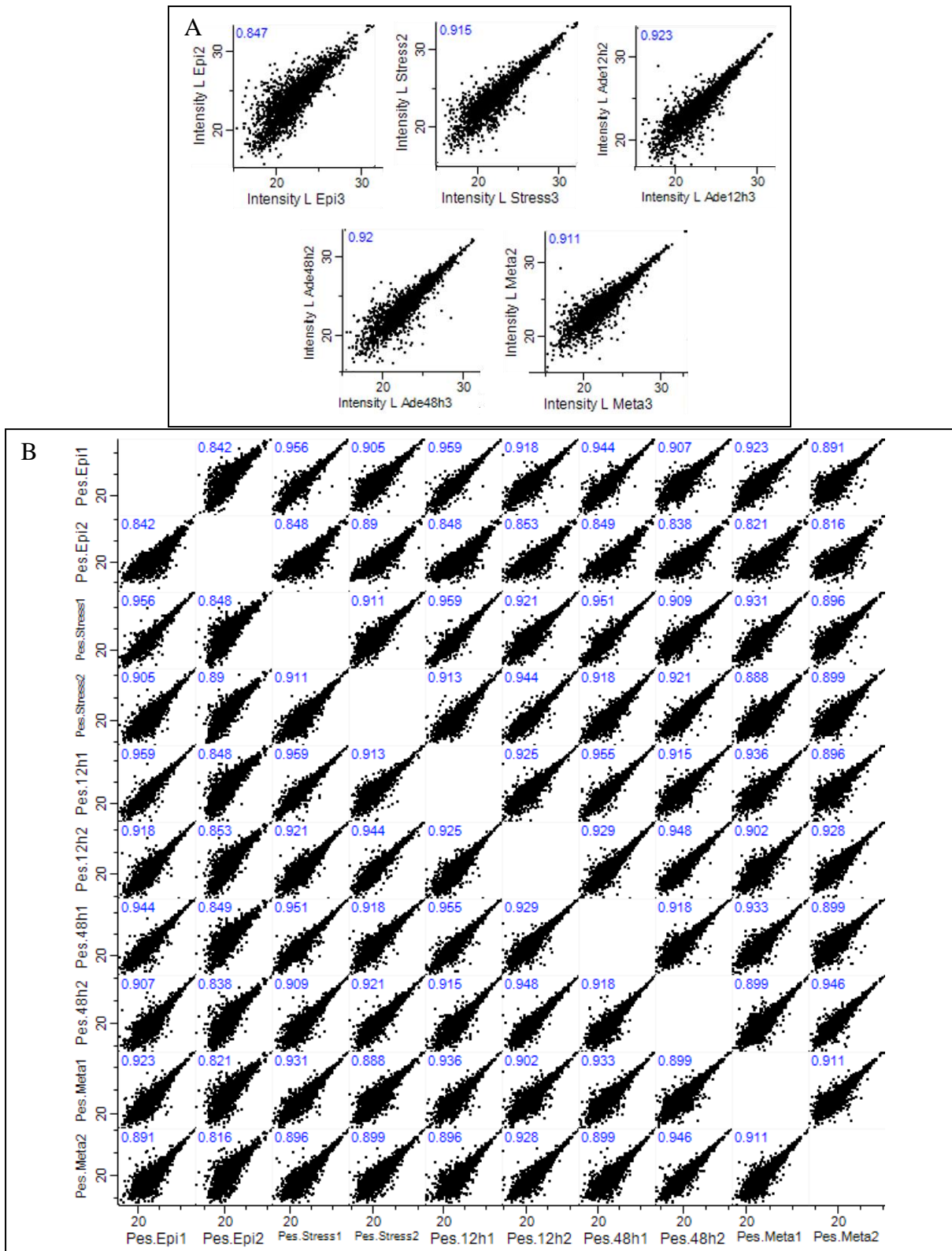
### Comparação do proteoma das diferentes fases da metaciclologênese

Para realizar uma correta interpretação dos resultados de ubiquitinoma quantitativo da metaciclologênese (objetivo principal do presente trabalho) é necessário realizar o proteoma quantitativo da metaciclologênese. O proteoma é usado como uma espécie de controle para as

análises de ubiquitinoma. Por exemplo, se uma determinada proteína tem intensidade diferenciada nos experimentos de enriquecimento de proteínas ubiquitinadas ao longo da metacicloênese, para confirmar se essa diferença está relacionada à diferenças na quantidade de modificação por Ub ou não é necessário verificar qual é o perfil de intensidade dessa proteína no proteoma geral.

Portanto, juntamente com a obtenção de amostras para análise do ubiquitinoma, foram preparadas amostras do proteoma total de células de *T. cruzi* nas seguintes etapas da metacicloênese: epimastigotas com 3 dias de crescimento (Epi), epimastigotas submetidos à estresse nutricional em meio TAU (St), epimastigotas aderidos após 12 horas (Ade12h) e 48 horas (Ade48h) em meio TAUG3AAG, tripomastigotas metacíclicos (Meta), todos provenientes de cultura em LITB+SFB. Em paralelo foi confeccionado a mistura Super SILAC, abrangendo todas as formas citadas anteriormente em uma única amostra porém provenientes de meio definido LM14 com aminoácidos pesados (K8 e R10). Cada uma dessas amostras foram lisadas e digeridas pelo método FASP isoladamente. Após obtenção dos peptídeos, os mesmos foram dosados e os peptídeos “leves” provenientes da diferenciação de células cultivadas em meio LITB+SFB foram misturadas na mesma proporção com os peptídeos pesados da amostra Super SILAC. Parte das amostras foram destinadas para enriquecimento de peptídeos ubiquitinados e uma pequena alíquota de cada amostra foi purificada em Stage-tips e analisada em LC-MS/MS, foram realizadas 2 corridas para cada amostra a fim de obter um maior número de identificações.

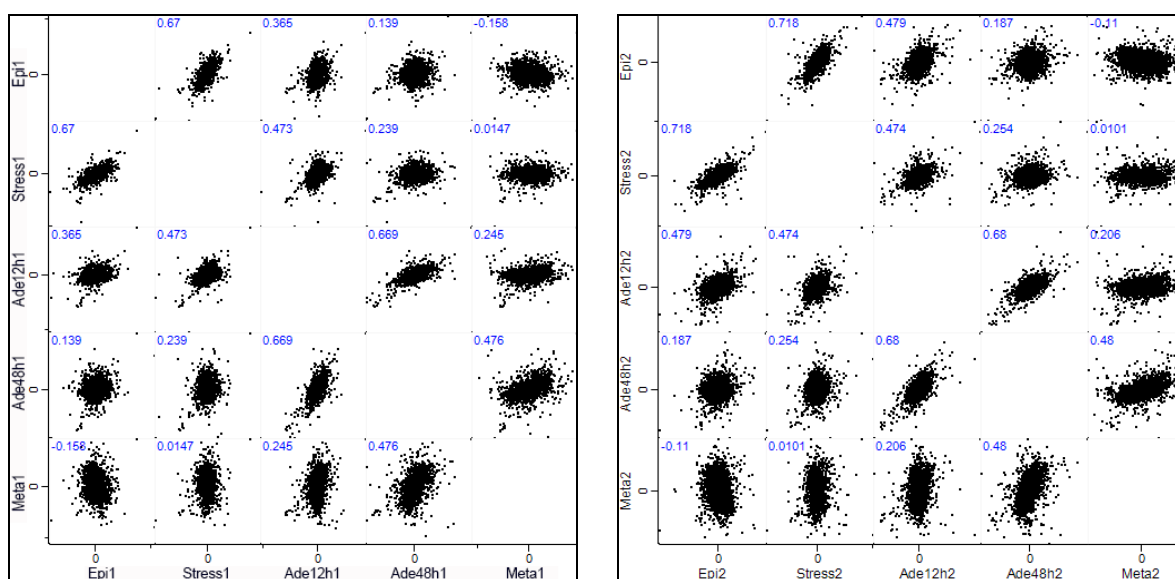
Foram identificados um total de 18.750 peptídeos correspondentes à 3277 proteínas somando as identificações das 5 fases testadas. Os valores da correlação de Pearson para as réplicas das intensidades de proteínas leves e pesadas de cada uma das amostras resultaram em uma média de 0,9, significando uma alta correlação entre as réplicas. Os valores da correlação de Pearson para cada amostra (leve) está plotado na Figura 4.6.3A, e a correlação entre todas as amostras de proteínas pesadas (padrão Super SILAC) estão expostas na Figura 4.6.3B, mostrando uma alta correlação entre elas em todas as amostras, indicando ser uma boa base de comparação entre as amostras dos diferente pontos da metacicloênese.



**Figura 4.6.3** Correlação entre as intensidades das proteínas leves (L) e pesadas (P).

Em A estão representadas as correlações entre proteínas leves X leves nas duas réplicas de cada ponto da metaciclôgenese. Em B estão representadas as correlações existentes entre as amostras pesadas (padrão Super SILAC) entre todas as amostras estudadas. Os valores em azul representam o valor de correlação de Pearson. Os valores inseridos são resultados do  $\log_2$  das intensidades.

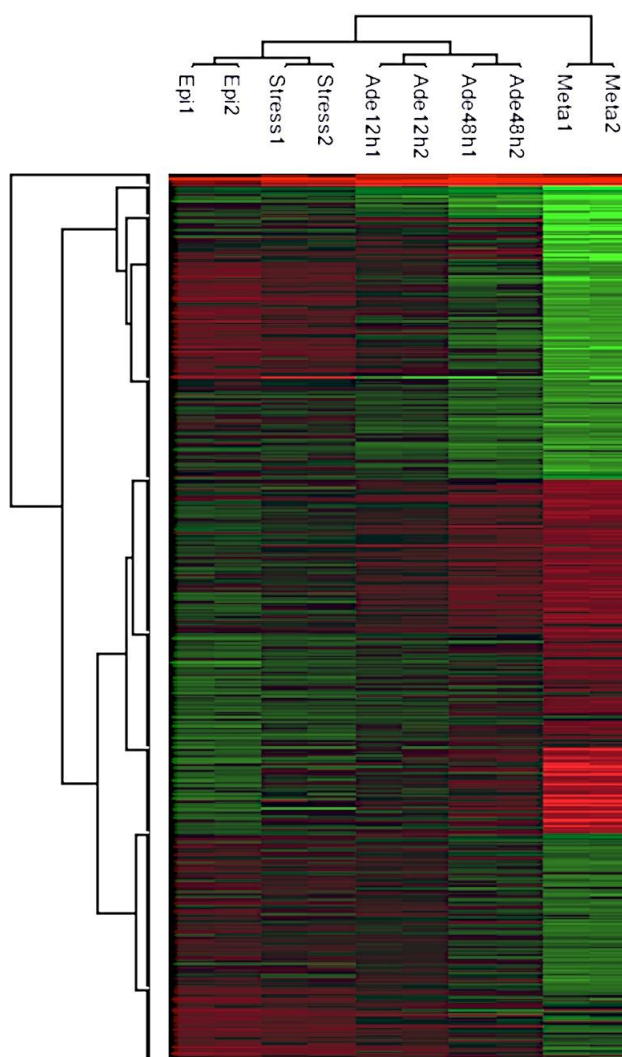
Com o objetivo de comparar a correlação existente entre as diferentes fases da diferenciação, foram analisadas as correlações entre as razões pesado/leve de cada fase analisada (Figura 4.6.4). Neste caso é necessário analisar as razões entre proteínas leves e pesadas para que os resultados de intensidade de cada fase sejam normalizados com a mesma amostra padrão (pesado). Como esperado, a correlação de Pearson neste caso foi bem baixa, com o menor valor encontrado para Epi X Meta (-0,11 para a réplica 2 e -0,16 para réplica 3), indicando baixa correlação entre os pontos estudados.



**Figura 4.6.4** Correlação entre as razões das intensidades das proteínas leves e pesadas em amostras de diferentes fases da metaciclogênese.

Estão representadas as correlações entre todas as fase da metaciclogênese, comparando a razão normalizada da intensidade das proteínas pesadas (padrão) / proteínas leves (fase da metaciclogênese). Os valores em azul representam o valor de correlação de Pearson. Os valores inseridos são resultados do  $\log_2$  das razões das intensidades.

Do total de proteínas identificadas neste experimento, 3132 foram quantificadas em pelo menos 1 das amostras. Destas, 819 proteínas se mostraram significativamente diferenciadas (FDR de 1%, teste ANOVA). A lista das proteínas identificadas e das diferencialmente expressas pode ser encontrada em anexo (Anexo 2). A figura 4.6.5 mostra o perfil de expressão das proteínas diferencialmente expressas durante a metaciclogênese.



**Figura 4.6.5 Agrupamento das proteínas de *T. cruzi* diferencialmente expressas ao longo da metaciclôgenese (FDR 1%).**

Os grupos representados em verde estão diminuídos na fase indicada e os vermelhos aumentados. Os valores agrupados nesta imagem são referentes ao  $-\log_2$  da razão normalizada das intensidades pesado/leve.

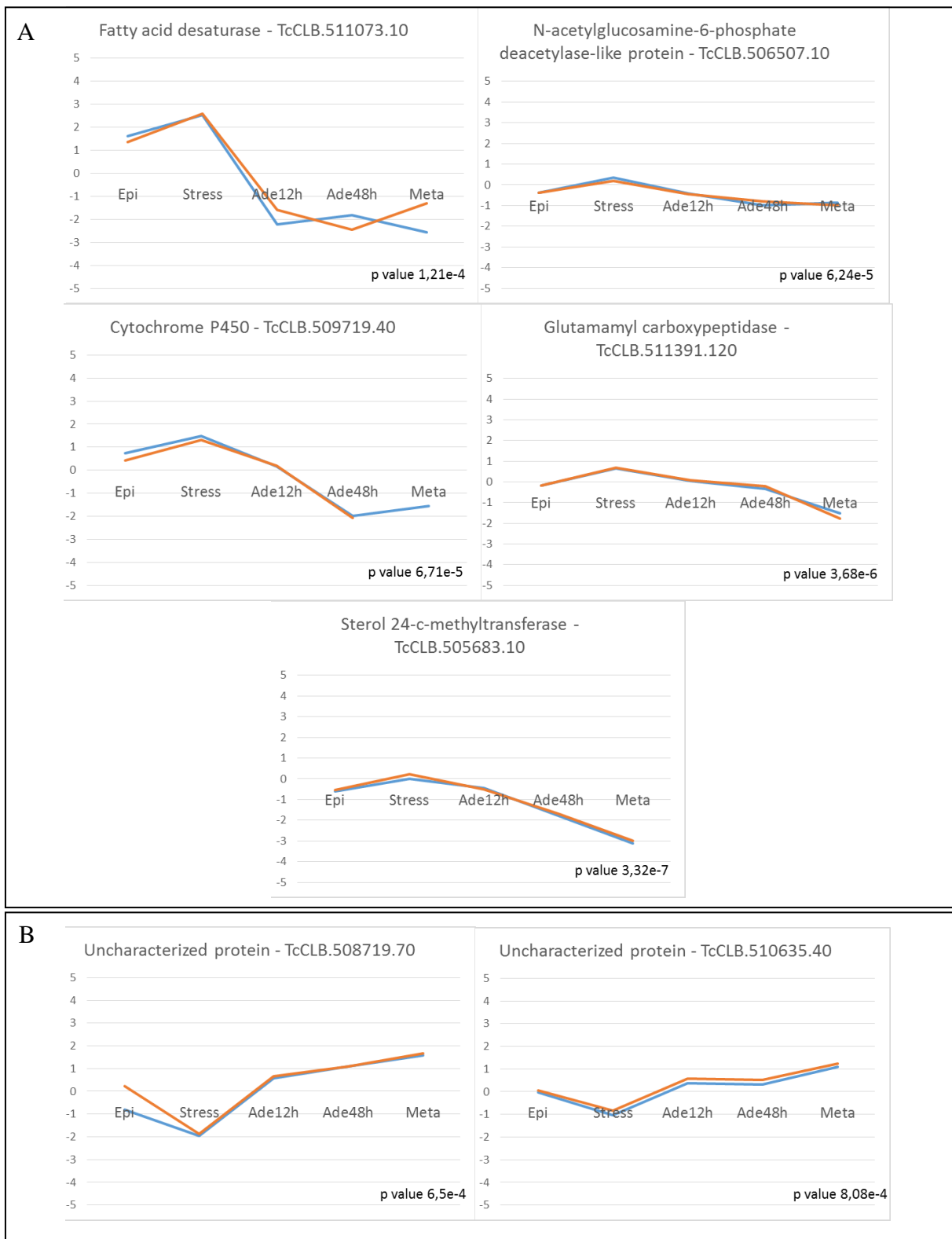
Dentre as proteínas selecionadas como diferencialmente expressas durante a metaciclôgenese, algumas apresentaram modulação de pelo menos 1,5x ( $\pm 0,58$  em  $\log_2$ ) para mais ou para menos em fases específicas (FDR 1%), como pode ser visualizado nos gráficos apresentados a seguir. Para as proteínas moduladas em células estressadas e células aderidas por 12 horas foram inseridas todas que apresentaram modulação. No entanto, para as modulações ocorridas em 48 horas de adesão e tripomastigotas metacíclicos, estão representadas apenas as 4 proteínas mais significativamente aumentadas e as 4 diminuídas (com mais aumento ou diminuição dentre e com p value mais significativos). As demais proteínas moduladas especificamente nestas fases foram inseridas em Anexo 3. Algumas proteínas não puderam ser quantificadas em alguns pontos da metaciclôgenese,

provavelmente um reflexo da baixa intensidade das mesmas nesses pontos. Quando não houve quantificação, o ponto não foi adicionado ao gráfico.

As proteínas moduladas positivamente em células estressadas foram a desaturase de ácido graxo, N-acetilglucosamina-6-fosfato deacetilase, citocromo P450, glutamamil carboxipeptidase e esterol 24-c-metiltransferase (SMT) (Figura 4.6.6). Desaturases de ácidos graxos são enzimas responsáveis pela conversão de ácidos graxo saturados em insaturados (AGI) (BRETT; MÜLLER-NAVARRA, 1997). A incorporação de AGI na membrana celular pode aumentar a flexibilidade e fluidez da mesma. Diferente de seus hospedeiros, os tripanossomatídeos tem uma grande quantidade de AGI em suas membranas (MELLORS; SAMAD, 1989) e, especula-se que seja um dos mecanismos adotados pelo parasita para escapar de drásticas alterações de temperatura e parâmetros químicos (TRIPODI et al., 2006), mecanismo que já foi descrito em outros microrganismos, como leveduras e bactérias (GUERZONI; LANCIOTTI; COCCONCELLI, 2001; GUERZONI et al., 1997) e que poderia explicar o aumento da expressão da proteína que sintetiza AGI em formas submetidas ao estresse. A enzima SMT também é muito importante para a constituição da membrana celular de tripanossomatídeos. É uma enzima vital na produção de ergosterol (MAGARACI et al., 2003), um esterol constituinte da membrana de tripanossomatídeos.

Duas proteínas foram encontradas como sendo moduladas negativamente em células estressadas (Figura 4.6.6), ambas proteínas hipotéticas, ou seja, proteínas sem função conhecida. Foi realizada busca nos bancos de *Gene ontology* (GO - <http://www.geneontology.org/>) e Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) para verificar se possuíam alguma informação sobre função destas proteínas ou domínios característicos e nenhum dado foi encontrado para ambas.



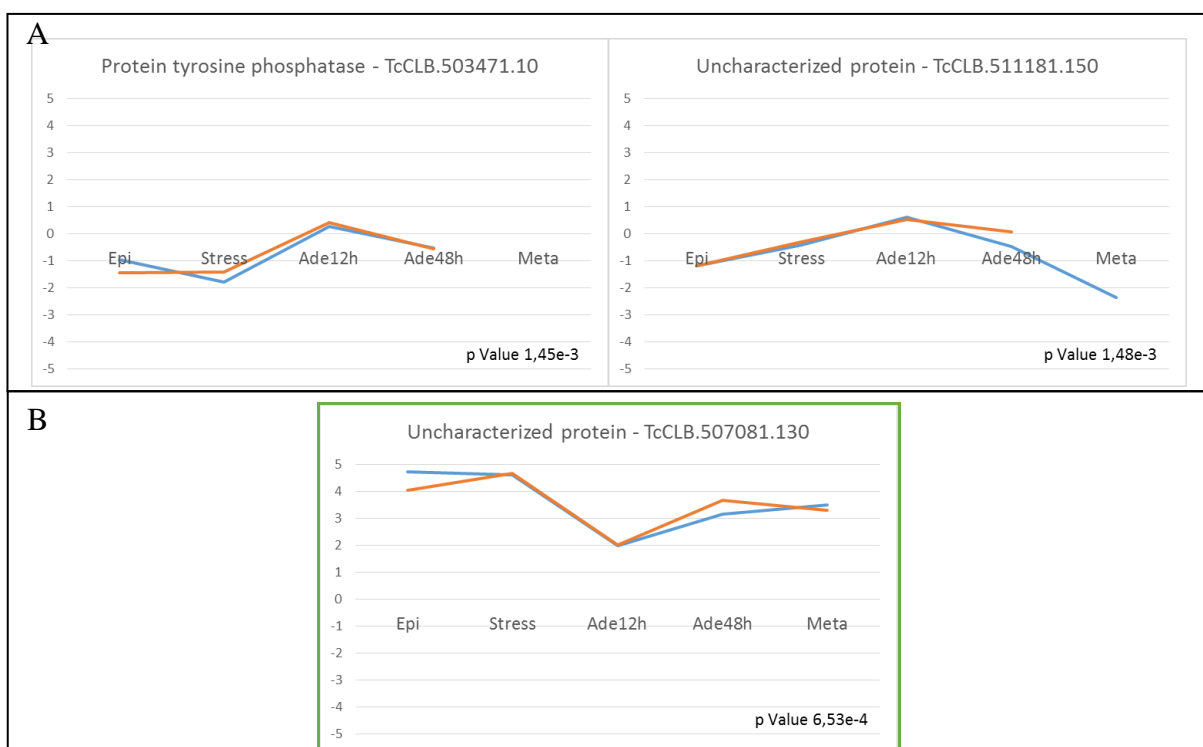


**Figura 4.6.6 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas estressadas.**

Apenas estão representada as proteínas que apresentaram pelo menos 1,5x de aumento ou diminuição em estresse ( $\pm 0,58$  em  $\log_2$ ). As proteínas que se encontram aumentadas em formas estressadas foram incluídas no quadro A, enquanto que as diminuídas em estresse estão no B. Os valores inseridos no eixo Y correspondem ao  $-\log_2$  da razão normalizada entre as intensidades das proteínas pesadas (padrão) e leves (fases da metacicloênese). As duas réplicas biológicas estão representadas nos gráficos (laranja e azul).

Já na fase em adesão, foram encontradas 3 proteínas reguladas em 12 horas de adesão (Figura 4.6.7). Destas, 2 são aumentadas em 12 horas: uma tirosina fosfatase e uma proteína hipotética. Esta proteína hipotética (TcCLB.511181.150) também não possui informações de GO e nem domínios característicos. Proteínas tirosina fosfatases são proteínas que atuam na reversão da fosforilação de resíduos de tirosina, uma modificação pós-traducional bastante importante para regulação de inúmeros processos celulares. Estudos recentes apontam o envolvimento da proteína tirosina fosfatase de *T. cruzi* no disparo da metaciclo gênese e invasão celular, acelerando a diferenciação quando é inibida e reduzindo a infectividade (GALLO et al., 2011; LOUNTOS; TROPEA; WAUGH, 2013). Esta proteína portanto, pode estar envolvida na regulação do disparo da diferenciação, controlando este processo.

Uma proteína hipotética (TcCLB.507081.130) foi encontrada como diminuída em células aderidas por 12 horas. A busca por domínios retornou a entrada HpcH\_Hpal, pertencente à família de liase citrato/aldolase. A função molecular desta proteína nos bancos de GO é de atividade de liase carbono-carbono, ou seja, enzimas que clivam ligações de carbono em processos metabólicos. O processos metabólicos começam a ser reduzidos assim que as células sofrem o estresse nutricional. Possivelmente a redução de uma enzima de via metabólica em epimastigotas aderidos aconteça por esta razão.



**Figura 4.6.7 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas aderidas por 12 horas.**

Apenas estão representada as proteínas que apresentaram pelo menos 1,5x de aumento ou diminuição em aderidos 12 horas (+/- 0,58 em log<sub>2</sub>). As proteínas que se encontram aumentadas em formas aderidas por 12 horas estão inseridas no quadro A, enquanto que a diminuída está no B. Os valores inseridos no eixo Y

correspondem ao  $-\log_2$  da razão normalizada entre as intensidades das proteínas pesadas (padrão) e leves (fases da metacicloênese). As duas réplicas biológicas estão representadas nos gráficos (laranja e azul).

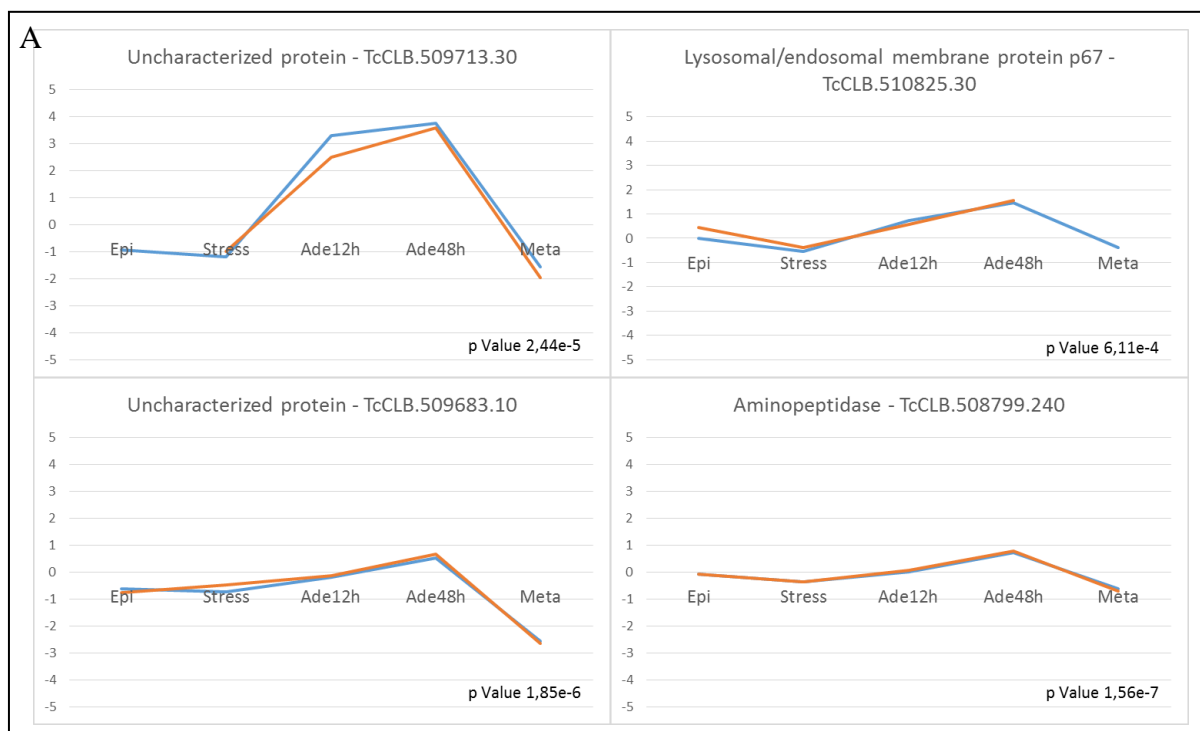
Ao total, 20 proteínas apresentaram modulação em células aderidas por 48 horas. Doze proteínas tiveram seu nível aumentado e 8 apresentaram diminuição. Na figura 4.6.8 estão apresentados as 8 proteínas que apresentaram uma diferença mais significativa para mais ou para menos. Já era esperado esta grande quantidade de proteínas moduladas no ponto de 48 horas de adesão pois é a etapa mais próxima do final da diferenciação, onde começa uma maior liberação de metacíclicos no meio. Dentre as proteínas moduladas positivamente estão: 2 proteínas hipotéticas, uma proteína de membrana lisossomal/endossomal p67 e uma aminopeptidase. A primeira proteína hipotética apresentada apresentou um aumento na fase aderida, tanto em 12 horas quanto em 48 horas, com um aumento ainda maior em 48 horas. Esta proteína está associada ao transporte de membranas de acordo com anotação de processo biológico no banco de GO. Esta proteína possui um domínio chamado MFS\_1 (do inglês, *Major Facilitator Superfamily*), uma classe de proteínas de transporte de membrana que facilita no movimento de pequenos solutos através da membrana celular. Curiosamente é uma proteína majoritária nas fases aderidas e com um grande *fold-change* de cerca de 8 vezes de aumento em aderido 12 horas e 12 vezes em 48 horas comparados à células epimastigotas. Células em movimento podem mudar de região em busca de nutrientes ou condições mais favoráveis, o que não pode acontecer quando as células estão aderidas, as quais permanecem no mesmo local e precisam de algum mecanismo que as auxilie a captar mais nutrientes de um ambiente bastante metabolizado. Estas proteínas facilitadoras do transporte de membranas podem estar atuando nesta função para as células aderidas.

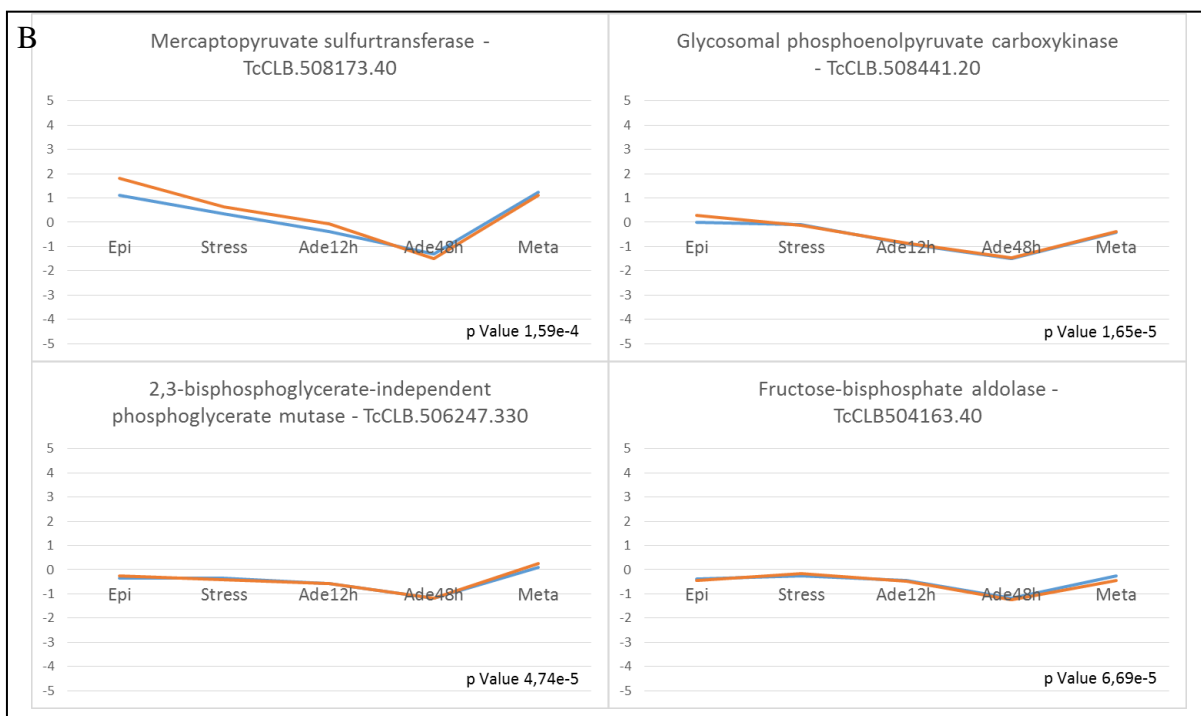
A proteína lisossomal p67 é uma proteína transmembrana que tem sido alvo de estudo em *T. brucei* devido seu envolvimento na resistência do parasita à lise pelos fatores tripanolíticos existentes no soro de humanos (HAGER et al., 1994; SHIMAMURA; HAGER; HAJDUK, 2001). O knockdown de p67 em *T. brucei* altera drasticamente a morfologia dos lisossomos e reduz o crescimento de formas sanguíneas (PECK et al., 2008). *T. cruzi* possui uma organela semelhante ao lisossoma conhecida como reservossomo que é responsável pelas funções de reserva de nutrientes originados da endocitose (DE SOUZA; SANT'ANNA; CUNHA-E-SILVA, 2009; DE SOUZA, 1999). Figueiredo e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que, durante a fase de adesão de formas epimastigotas previamente à diferenciação em tripomastigotas metacíclicos existe uma alta atividade endocítica, tanto nas células em suspensão quanto nas células aderidas, processo que é interrompido nas formas tripomastigotas metacíclicas (FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000). Não existem relatos

na bibliografia sobre a existência de p67 em *T. cruzi*, e nem se são constituintes da membrana do reservossomo, no entanto esta justificativa explicaria o aumento desta proteína em formas aderidas.

A segunda proteína hipotética identificada neste experimento (TcCLB.509683.10) não apresentou nenhuma informação de função nem domínios característicos. Uma aminopeptidase também foi identificada como aumentada e aderidos por 48 horas, essas enzimas são metaloproteases responsáveis pela clivagem de proteínas em sua região amino-terminal. As formas tripomastigotas metacíclicas apresentam uma drástica redução de tamanho e conteúdo celular principalmente pela ação de suas diversas proteases, o que explicaria o aumento gradual de proteases durante as fases de adesão.

Dentre as proteínas que tiveram sua expressão diminuída nos parasitas aderidos por 48 horas estão algumas enzimas responsáveis por metabolismo de diversas biomoléculas como metabolismo de cisteína e metionina: Mercaptopyruvate sulfurtransferase e as outras 3 participando do metabolismo de carboidratos e biossíntese de álcool: Fructose-bisphosphate aldolase, Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase e 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase.





**Figura 4.6.8 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas aderidas por 48 horas.**

Apenas estão representada as proteínas que apresentaram pelo menos 1,5x de aumento ou diminuição em aderidos 48 horas ( $\pm 0,58$  em  $\log_2$ ). Nesta representação gráfica foram inseridas apenas as 4 proteínas aumentadas e 4 diminuídas com menor p value. As proteínas que se encontram aumentadas em formas aderidas por 48 horas estão incluídas no quadro A, enquanto que as diminuídas estão no B. A primeira proteína apresentada (superior esquerda), apresenta uma forte modulação nas 2 formas aderidas estudadas. Os valores inseridos no eixo Y correspondem ao  $-\log_2$  da razão normalizada entre as intensidades das proteínas pesadas (padrão) e leves (fases da metaciclo gênese). As duas réplicas biológicas estão representadas nos gráficos (laranja e azul).

Como esperado, as formas tripomastigotas metacíclicas (Meta) foram as que mais apresentaram modulação na expressão de proteínas. Apesar de existirem diferenças em todas as etapas da diferenciação, as diferenças nas etapas iniciais são mais sutis e pontuais, algumas talvez nem tenhamos identificado no presente trabalho devido à alta complexidade da amostra analisada. Porém quando se trata de uma célula morfológica e fisiologicamente bastante diferente, as modulações são mais perceptíveis. Um total de 412 proteínas apresentaram modulação significativa (FDR 1%) de 1,5x de aumento ou diminuição em Meta quando comparadas com todas as demais fases em conjunto. As 8 proteínas com modulação mais relevante foram plotadas nos gráficos que constituem a figura 4.6.9.

Diversas proteínas relacionadas à movimentação celular, como dineínas e proteínas paraflagelares, foram encontradas com aumento em Meta. O perfil de expressão da proteína paraflagelar rod 3 está apresentado no gráfico abaixo, e o aumento de sua expressão em Meta é esperado uma vez que a estrutura paraflagelar é mais desenvolvida nesta fase.

Outro exemplo de processo biológico regulado positivamente em Meta é a via do AMP cíclico (cAMP). Alguns trabalhos relatam o envolvimento da via do cAMP na diferenciação do *T. cruzi* para forma infectivas (GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988; RANGEL-ALDAO et al., 1988). Foram encontrados como positivamente regulados em metacíclico diversas proteínas envolvida nesta via: cAMP fosfodiesterase específica, 2 subunidades regulatórias da proteína kinase A, 1 subunidade catalítica da proteína kinase A (a principal proteína efetora da via).

As trans-sialidases são proteínas glicosil hidrolases bastante conhecidas como típicas da forma Meta por estarem envolvidas diretamente com a virulência do parasita (DC-RUBIN; SCHENKMAN, 2012; TAYLOR, 1996). Elas são uma família multigênica que inclui 1430 genes (EL-SAYED et al., 2005). Foram identificadas 28 trans-sialidases neste experimento, e todas elas aumentadas em Meta.

A proteína hipotética TcCLB.506625.100 não possui nenhuma descrição de GO e nenhum domínio.

Dentre as proteínas diminuídas em Meta, foram selecionadas as 4 mais relevantes para apresentação do perfil de expressão ao longo da diferenciação. A proteína hipotética selecionada não possui nenhuma descrição de GO e nenhum domínio foi encontrado. Foi selecionada a protease semelhante à calpaína cisteína peptidase como diminuída em Meta, este dado corrobora com ensaios de Western blot publicados por uma equipe do ICC nos quais não foi encontrada marcação desta mesma proteína em formas Meta (GIESE et al., 2008).

A prostaglandina F2 alpha sintase é uma tioredoxina, e atua no estado redox das células. São conhecidas duas enzimas responsáveis pela defesa do parasita contra danos oxidativos são a trypanothiona e ovothiol A, ambas foram descritas com baixa expressão em Meta e amastigotas (ARIYANAYAGAM, 2001; IRIGOÍN et al., 2008).

A cadeia pesada da miosina foi encontrada como uma proteína diminuída em Meta, um resultado que não surpreendeu uma vez que a miosina é componente do citoesqueleto e, como já mencionado anteriormente, a forma Meta do parasita apresenta redução drástica do tamanho celular.



**Figura 4.6.9 Perfil de expressão das proteínas moduladas em formas tripomastigotas metacíclicas.**

Apenas estão representada as proteínas que apresentaram pelo menos 1,5x de aumento ou diminuição em tripomastigotas metacíclicas (Meta) ( $\pm 0,58$  em  $\log_2$ ). Nesta representação gráfica foram inseridas apenas as 4 proteínas aumentadas e 4 diminuídas com menor p value. As proteínas que se encontram aumentadas em formas tripomastigotas metacíclicas estão incluídas no quadro A, enquanto que as diminuídas estão em B. Os valores inseridos no eixo Y correspondem ao  $-\log_2$  da razão normalizada entre as intensidades das proteínas pesadas (padrão) e leves (fases da metaciclogênese). As duas réplicas biológicas estão representadas nos gráficos (laranja e azul).

Vários resultados obtidos neste experimento podem ser comparados com um experimento já publicado de proteoma quantitativa da metaciclogênese de *T. cruzi* por uma

equipe do ICC (DE GODOY et al., 2012). Neste trabalho os autores utilizaram o método de quantificação label-free, onde as intensidades dos peptídeos medidas ao longo das cromatografias de cada corrida são comparadas (ONG; MANN, 2005). Com essa metodologia foi possível identificar apenas 8 proteínas diferencialmente expressas nas fases iniciais da diferenciação. de Godoy e cols. identificaram 2 proteínas moduladas em parasitas submetidos à 30 minutos de estresse, uma delas foi identificada em nossos experimentos (TcCLB.506227.110 – prot. hipotética) e não apresentou modulação, provavelmente porque no presente trabalho foi utilizado o tempo de 2 horas de estresse, e não 30 minutos.

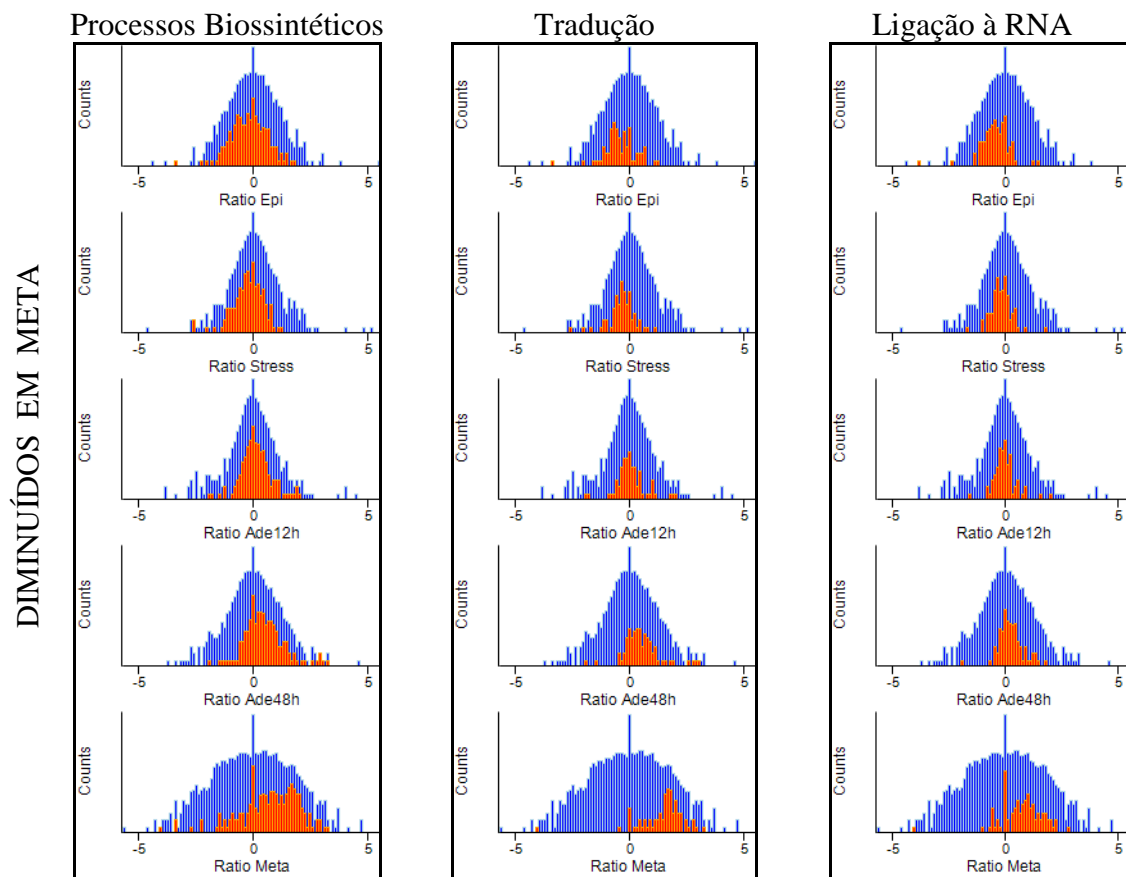
Uma proteína (TcCLB.510661.230 – prot. hipotética) foi encontrada com modulação em estresse 2 horas nos experimentos de Godoy e cols., a qual foi identificada em nossos experimentos mas não mostrou modulação. Dentre as proteínas identificadas com modulação em 12 horas, as três aumentadas de acordo com o trabalho de Godoy e cols. (TcCLB.509561.20 – Flagellum adhesion glycoprotein; TcCLB.509713.30 – prot. Hipotética; TcCLB.511575.130 – folate/pteridine transporter) também apresentaram modulação positiva em nossos experimentos, mas a modulação se manteve em 48 horas, porém é válido salientar que no trabalho de Godoy e cols. não foram contempladas as formas aderidas por 48 horas, apenas 12 horas. A proteína TcCLB.506701.10 (dihydrolipoamide dehydrogenase) foi mostrada como diminuída em 12 horas no trabalho anterior; no presente trabalho ela foi identificada porém não apresentou quantificação em 12 e 48 horas, possivelmente pela intensidade muito baixa, o que poderia significar uma correlação de dados. A última proteína (TcCLB.500183.40 – prot. Hipotética), a qual apresentou padrão de aumento gradual ao longo da metaciclo gênese no trabalho anterior, foi identificada mas o padrão entre as 2 réplicas apresentou diferenças significativas.

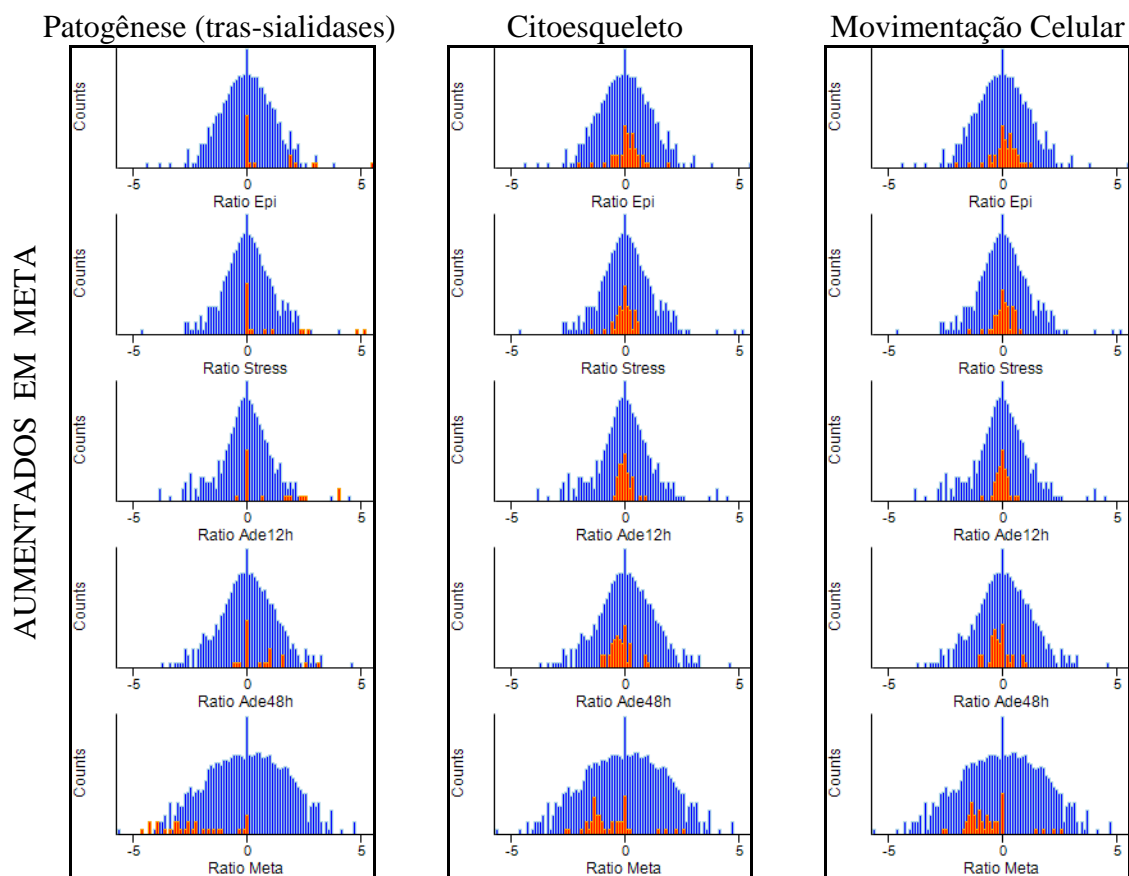
As análises de modulações em Meta apresentaram vários pontos concordantes com o presente trabalho: ambas as análises evidenciaram um aumento na expressão de proteínas relacionadas à movimentação celular, como dineínas e proteína paraflagelar Rod3; aumento também da família das trans-sialídes, proteínas da via do cAMP e de algumas histonas. Concordância também nas proteínas que apresentaram diminuição em Meta, como miosina, proteínas envolvidas na síntese de proteínas e proteases.

Tais evidências sustentam os dados encontrados em ambos os trabalhos, pois foram realizados com técnicas diferentes e em momentos diferentes, e trazem confiabilidade para as novas informações provenientes do presente trabalho, como as novas proteínas identificadas com modulação nas formas iniciais da diferenciação.



A seguir, estão expostos histogramas com representação de todas as proteínas identificadas para uma visualização mais ampla dos processos biológicos regulados ao longo da metaciclôgenese, baseados em anotações de GO. Nos eixos X estão inseridos os valores de  $\log_2$  da razão normalizada entre proteínas pesadas/leves, lembrando que as proteínas pesadas são o padrão referência (Super SILAC), portanto, neste caso, a razão é inversa, ou seja, se a proteína está em valor negativo significa aumento, positiva significa diminuição. Portanto todas as proteínas encontradas à esquerda estão aumentadas com relação ao padrão e à direita estão diminuídas com relação ao padrão. O eixo Y se refere à contagem de proteínas naquela determinada posição. As barras azuis são referentes ao proteoma total identificado e as vermelhas são referentes às proteínas relacionadas ao processo biológico em questão.





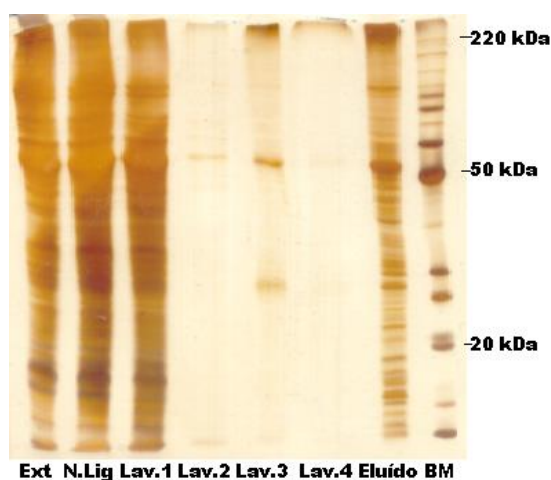
#### 4.7 Enriquecimento, identificação e quantificação de proteínas ubiquitinadas

Existem inúmeros tipos de modificações pós-traducionais (PTM) que ocorrem em uma célula. Proteínas de membrana podem receber a adição de carboidratos, os quais conferem proteção para a célula e intermedeiam interações com outras moléculas. Grupamentos fosfatos são frequentemente utilizados na modificação de proteínas atuando como uma abrangente forma de sinalização celular, conhecido como fosforilação. Assim como a fosforilação, a ubiquitinação de proteínas é um mecanismo de PTM e sinalização celular bastante frequente e que regula inúmeros processos celulares.

As PTMs, em geral, geram um aumento na massa do peptídeo alvo, o que torna possível a identificação destas modificações pela MS. A modificação pela Ub gera um aumento na massa na lisina alvo do peptídeo modificado de 114,1 Da, facilmente detectável pelo MS. No entanto, a análise em larga escala do perfil de ubiquitinação de uma célula representa um desafio devido à baixa abundância das proteínas modificadas comparadas às demais proteínas. Dessa forma, é necessário realizar um enriquecimento dessas proteínas previamente à análise em MS. Existem diversos métodos de enriquecimento de proteínas ubiquitinadas publicados,

desde o uso de transfectantes com Ub fusionada a diferentes etiquetas, colunas cromatográficas com domínios de ligação com Ub e anticorpos contra Ub, como mencionado na introdução deste trabalho.

Na minha dissertação de mestrado foram testadas diferentes abordagens para realizar o enriquecimento de proteínas ubiquitinadas de *T. cruzi*: transfectantes expressando Ub fusionada à histidina; transfectantes expressando Ub fusionada à etiqueta-TAP (tandem affinity protein – com proteína A e proteína ligadora de calmodulina) e imunoprecipitação (IP) com anti-Ub. Destas abordagens apenas a IP apresentou resultados satisfatórios (Figura 4.7.1).



**Figura 4.7.1 Enriquecimento de proteínas ubiquitinadas de *T. cruzi* por imunoprecipitação de Ub.**

BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); Ext - extrato protéico total de *T. cruzi*; N.Lig - Fração de proteínas não ligadas na resina; Lav.1 a Lav.4. – lavados 1 a 4; Eluído – proteínas eluídas, proteínas ubiquitinadas. Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata.

Após o enriquecimento das proteínas ubiquitinadas por imunoprecipitação, as mesmas foram digeridas pelo protocolo de digestão clássica, os peptídeos foram purificados em Stage-tip e encaminhados para LC-MS/MS, buscando na análise no programa MaxQuant a modificação variável do sítio di-glicina da Ub ligado à lisina do peptídeo alvo (a massa da lisina com um acréscimo de 114,1 Da). Depois de inúmeras tentativas de identificar a modificação no MS, apenas 5 peptídeos modificados puderam ser identificados em formas epimastigotas (tabela 4.7.1), apesar de um número bem maior de proteínas terem sido identificadas (cerca de 300). Este é um resultado muito inferior ao que já é publicado, cerca de 40 a 750 peptídeos ubiquitinados identificados, dependendo da abordagem de enriquecimento, organismo estudado e método de análise aplicada (DANIELSEN et al., 2011; MEIERHOFER et al., 2008; PENG et al., 2003).

**Tabela 4.1 Proteínas/sítios ubiquitinados identificados em IP de Ub.**

PFAM e Interproscan: domínios relacionados às proteínas hipotéticas. Posição: posição da lisina modificada na proteína. Seq. Modificada: sequência do peptídeo modificado, (ox) oxidação, (gl) sítio di-glicina - ubiquitinação.

ID Gene	Proteína	PFAM	Interproscan	Posição	Seq. Modificada
TcCLB.432867.10	hypothetical protein, conserved	-	-	156	LAM(ox)EIEAAGK(gl)
TcCLB.504163.70	hypothetical protein, conserved	-	Isoleucyl-tRNA Synthetase; Domain 1	282	QGM(ox)KAAMHTSQK(gl)
TcCLB.506945.220	serine/arginine-rich protein specific kinase SRPK	Protein Kinase Domain	Protein Kinase Domain	6	M(ox)PKFNK(gl)K
TcCLB.503719.30	hypothetical protein, conserved	-	-	13	(ac)MVLSSAPESGGEK(gl)
TcCLB.506215.19	hypothetical protein, conserved	WD domain	WD, tetratricopeptide repeat region (TPR)	1403	DQGNWNLACKK(gl)

O problema deste tipo de análise é que a modificação por ubiquitina geralmente ocorre em apenas 1 resíduo de lisina em cada proteína, modificações de múltiplos sítios são raras. Pensando em uma proteína com um tamanho médio de 50 kDa e que cada peptídeo tríptico possui em média 7 a 10 aminoácidos, podemos encontrar 1 peptídeo ubiquitinado em cada 5 peptídeos gerados. Como a complexidade de proteínas em amostras originadas de uma IP de Ub é muito grande (Figura 4.7.1), a identificação do sítio ubiquitinado da proteína continua sendo um desafio com esta abordagem.

Recentemente foi publicado um artigo divulgando uma nova metodologia de enriquecimento de alvos ubiquitinados com a utilização de um anticorpo que reconhece especificamente o sítio di-glicina ligado à lisina alvo, chamado de *Ub-remnant antibody* (anticorpo para Ub remanescente) (XU; PAIGE; JAFFREY, 2010). Com este anticorpo é possível enriquecer o peptídeo modificado pela ubiquitina após a digestão pela tripsina, reduzindo a quantidade dos demais peptídeos não modificados na amostra.

Sendo assim, a nova abordagem para enriquecimento dos alvos ubiquitinados de *T. cruzi* foi a utilização do kit PTMScan® Ubiquitin Remnant Motif (K-ε-GG) (Cell Signaling Technology).

Ao total, 138 sítios di-glicina foram identificados em 107 proteínas, analisando todas as corridas realizadas com esta metodologia para as diferentes formas do *T. cruzi* ao longo da metaciclogênese (Tabelas 4.7.2 e 4.7.3).

**Tabela 4.2 Sítios modificados por Ub em proteínas com função conhecida de *T. cruzi*.**

Posição: posição da lisina modificada na proteína. Seq. Modificada: sequência do peptídeo modificado, (gl) sítio di-glicina - ubiquitinação.

<b>ID genes</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Posição</b>	<b>Seq. Modificada</b>
TcCLB.506679.150	40S ribosomal protein S10	103	AEYK(gl)VLER
TcCLB.509353.30	40S ribosomal protein S3	210	SM(ox)QNEEEILPDVITVLEPK(gl)EITA
TcCLB.508355.260	60S acidic ribosomal protein P0 (P0)	77	ASAYDK(gl)LLYNTCIEK
TcCLB.511215.119	69 kDa paraflagellar rod protein	65	TSCLSNEEFIQDLHVSWSSETQK(gl)QK
TcCLB.509331.200	ABC transporter	433	MFGLSEPQPQLEK(gl)R
TcCLB.510837.9	acetylornithine deacetylase	54	NK(gl)ANLWATLPGDGGVTK
TcCLB.510655.120	aminopeptidase P, metallo-peptidase, Clan MG, Family M24	493	TVEEVEK(gl)TMAGAPFSR
TcCLB.507241.30	arginine kinase	9	(ac)ASAEVVSK(gl)LEAAFAK
TcCLB.510889.231	ATP synthase subunit	125	DFVLEK(gl)ITR
TcCLB.506959.30	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	120	ELALQTAQVTK(gl)ELGK
TcCLB.506959.30	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	124	ELALQTAQVTKELGK(gl)
TcCLB.506563.40	beta tubulin	324	MSTK(gl)EVDEQMLNVQNK
TcCLB.506925.300	cyclophilin a, PPIase, rotamase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYCA)	153	HVVFGQVLEGIEVVK(gl)AMEAVGSQTGK
TcCLB.506925.300	cyclophilin a, PPIase, rotamase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYCA)	41	VVFELFADAVPK(gl)TAENFR
TcCLB.510073.10	cysteine peptidase (N-terminal), cysteine peptidase, clan CA, family C1, cathepsin L-like	195	AFK(gl)WIVDR
TcCLB.509719.40	cytochrome P450	130	VVYINDPLLLK(gl)R
TcCLB.506945.190	cytochrome p450-like protein	71	DPYTFWEK(gl)QR
TcCLB.509237.130	cytoskeleton-associated protein CAP5.5, cysteine peptidase, Clan CA, family C2	52	VEGVVQK(gl)QATVPEEVLER
TcCLB.510099.120	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	325	FIGLVNEYAK(gl)TK
TcCLB.505773.20	dispersed gene family protein 1 (DGF-1)	1569	YWQFSGK(gl)PLHER
TcCLB.503521.30	dynein light chain	113	VGNDDNLPVNIK(gl)K
TcCLB.503521.30	dynein light chain	114	VGNDDNLPVNIKK(gl)
TcCLB.504797.80	endo-beta-N-acetylglucosaminidase	60	EFYFDGGTGIVHESPGK(gl)TR
TcCLB.508737.70	fatty acid desaturase	18	VDNLTVAPGSPDVMK(gl)AVLK
TcCLB.508737.70	fatty acid desaturase	22	VDNLTVAPGSPDVMKAVLK(gl)
TcCLB.506749.30	flagellar calcium-binding protein	55	AVPK(gl)LEAWGAK
TcCLB.506749.30	flagellar calcium-binding protein	62	LEAWGAK(gl)VEDPAALFK
TcCLB.511575.130	folate/pteridine transporter	629	ESLSAQEPVLK(gl)
TcCLB.511391.120	glutamamyl carboxypeptidase, metallo-peptidase, clan MH, family M18	4	(ac)MNAK(gl)QWLAK
TcCLB.510187.60	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	219	GAAQNIIPSATGAAK(gl)AVGK
TcCLB.511211.170	heat shock protein 70 (hsp70)	113	GETK(gl)TFNPPEEVSSMVLSK
TcCLB.511211.170	heat shock protein 70 (hsp70)	570	NTVNEPNVAGKIEEADK(gl)
TcCLB.511211.170	heat shock protein 70 (hsp70)	160	QATK(gl)DAGTIAGMEVLR
TcCLB.509643.130	heat shock protein 85	281	DVTK(gl)EEYAAFYK
TcCLB.509157.80	heat shock protein-like protein	204	GNWK(gl)EGFAR

TcCLB.507951.114	high mobility group protein	141	EQNPGMK(gl)NTEILQSLGK
TcCLB.511817.180	histone H2A	22	SAK(gl)AGLIFPVGR
TcCLB.511635.20	histone H2B	97	LVLPADLAK(gl)HAMAEGTK
TcCLB.511635.20	histone H2B	105	LVLPADLAKHAMAEGTK(gl)
TcCLB.511635.20	histone H2B	49	TM(ox)K(gl)IVNSFVNDLFR
TcCLB.505931.50	histone H3	62	STDLLLQK(gl)APFQR
TcCLB.510351.31	histone H4	94	GK(gl)ILYGYA
TcCLB.510351.31	histone H4	58	GVIK(gl)SFVEGVVR
TcCLB.508323.100	I/6 autoantigen	40	FK(gl)LSSIEEATDSAR
TcCLB.507609.60	inositol-3-phosphate synthase	253	GVHDTADNLLAAVK(gl)R
TcCLB.507625.180	kinesin	336	KPNEDM(ox)SLFQLGENQK(gl)
TcCLB.507991.50	kinesin	1125	RLPATGLM(ox)QQTNYK(gl)
TcCLB.510755.98	kinetoplastid membrane protein KMP-11	76	AK(gl)FAELLEQQK
TcCLB.510755.98	kinetoplastid membrane protein KMP-11	85	FAELLEQQK(gl)NAQFPG
TcCLB.510755.98	kinetoplastid membrane protein KMP-11	11	(ac)ATTLEEFSAK(gl)LDR
TcCLB.510755.89	kinetoplastid membrane protein KMP-11	85	FAELLEQQK(gl)NAQFPGK
TcCLB.510825.30	lysosomal/endosomal membrane protein p67,lysosomal membrane glycoprotein	634	AK(gl)YLHEDM(ox)LLAH
TcCLB.503505.20	MFS transporter	355	EYELLMK(gl)ER
TcCLB.507447.19	microtubule-associated protein	43	STTQDAYRPVDPSAYK(gl)R
TcCLB.507019.20	nitrate reductase	413	K(gl)FELHYVFR
TcCLB.509617.20	paraflagellar rod protein 3 (PAR3)	298	ADLEDAEAMK(gl)R
TcCLB.509617.20	paraflagellar rod protein 3 (PAR3)	233	LIDLQDK(gl)FR
TcCLB.507483.4	polyubiquitin (pseudogene)	33	IQDK(gl)EGIPDQQR
TcCLB.507483.4	polyubiquitin (pseudogene)	48	LIFAGK(gl)QLEDGRTLADYNIQK
TcCLB.507483.4	polyubiquitin (pseudogene)	63	TLADYNIQK(gl)ESTLHLVLR
TcCLB.507483.4	polyubiquitin (pseudogene)	6	MQIFVK(gl)TLTGK
TcCLB.507483.4	polyubiquitin (pseudogene)	11	TLTGK(gl)TIALEVESDITIENVK
TcCLB.507483.4	polyubiquitin (pseudogene)	27	TIALEVESDITIENVK(gl)AK
TcCLB.507483.4	polyubiquitin (pseudogene)	29	TIALEVESDITIENVKAK(gl)
TcCLB.508461.80	prostaglandin F2alpha synthase (TcPGFS)	12	(ac)ATFPPELLRPLK(gl)LGR
TcCLB.509207.160	proteasome regulatory ATPase subunit 1	233	TLLAK(gl)AVANR
TcCLB.509207.160	proteasome regulatory ATPase subunit 1	216	YTQLGIDPPK(gl)GVLLYGPPGTGK
TcCLB.510103.30	protein associated with differentiation 4	342	EEDDCGGTERPSAGDEVANEPAAAGGPPK(gl)K
TcCLB.510103.30	protein associated with differentiation 4	343	EEDDCGGTERPSAGDEVANEPAAAGGPPKK(gl)
TcCLB.505763.10	proton motive ATPase 1	153	AYGGK(gl)VVEQYMENK
TcCLB.505763.19	P-type H -ATPase	19	GLTTAEAEELLAK(gl)YGR
TcCLB.504213.110	Putrescine-cadaverine transporter (POT1.1)	353	LLAGMGTMEMFPK(gl)R
TcCLB.510247.10	R27-2 protein	221	EADNEK(gl)LTEDLAQR
TcCLB.510879.20	ribosomal protein S19	126	SLTK(gl)LGLIEK
TcCLB.508823.140	ribosomal protein S20	5	(ac)AYVK(gl)KDQAPAQETQR
TcCLB.508823.140	ribosomal protein S20	6	(ac)AYVKK(gl)DQAPAQETQR
TcCLB.508823.140	ribosomal protein S20	27	NAK(gl)AVENVMTELLHAR
TcCLB.509943.30	ribosomal protein S6,NPH2/RS6-like protein	114	NAVALAILQSENSPVSAK(gl)VQAVK
TcCLB.511661.40	signal peptidase type I,serine peptidase, Clan SF, Family S26A	101	GDLLLLHK(gl)ISK

TcCLB.511661.40	signal peptidase type I,serine peptidase, Clan SF, Family S26A	141	VHGVHEDGGTLLFLTK(gl)GDNNELDDR
TcCLB.503715.30	small GTP-binding protein Rab1	116	FASENVNK(gl)LLVGNK
TcCLB.511661.50	small ubiquitin protein	44	VVNADGAEMFFK(gl)IK
TcCLB.508369.20	squalene synthase	129	LGK(gl)AYQDVISGICER
TcCLB.510185.10	sterol 24-c-methyltransferase	29	FEGK(gl)DASVSGR
TcCLB.510185.10	sterol 24-c-methyltransferase	218	HK(gl)IELGDSLPLETK
TcCLB.505183.130	sugar transporter	203	ENAFK(gl)LAER
TcCLB.510507.40	transmembrane amino acid transporter	58	STK(gl)NIDGVLHDFEEGPPTAEMLR
TcCLB.509885.70	transporter	470	IVSAAAEAK(gl)LA
TcCLB.509445.10	tryparedoxin peroxidase	120	SYGVLK(gl)EEDGVAYR
TcCLB.510187.50	tyrosine aminotransferase	227	GK(gl)DPNATFTSVADFETTVP
TcCLB.510187.70	tyrosine aminotransferase,L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase	178	TK(gl)AILMNNPSNPCGSNFSR
TcCLB.504109.90	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase,cysteine peptidase, Clan CA, family C12	4	K(gl)WLPIESNPDVLTNTYLR
TcCLB.511179.160	ubiquitin-conjugating enzyme e2	137	NAFNK(gl)TAMEWTR
TcCLB.508137.30	ubiquitin-conjugating enzyme e2	91	ICLDIHK(gl)DK
TcCLB.508971.50	ubiquitin-protein ligase-like	3791	DSFAQLSK(gl)LK
TcCLB.511627.60	vesicle-associated membrane protein (vamp)	164	IENLCDK(gl)TGQLR
TcCLB.511649.130	vesicle-associated membrane protein	170	SNTLADQAEQFK(gl)QR
TcCLB.511649.130	vesicle-associated membrane protein	158	VDTLHEK(gl)SNTLADQAEQFK

**Tabela 4.3 Sítios modificados por Ub em proteínas hipotéticas**

Posição: posição da lisina modificada na proteína. Seq. Modificada: sequência do peptídeo modificado, (gl) sítio di-glicina - ubiquitinação.

ID genes	Domínios (Pfam)	Posição	Seq. Modificada
TcCLB.506925.380	--	219	EK(gl)EWILGR
TcCLB.511285.100	--	191	MQK(gl)FDNEEAR
TcCLB.510187.210	Choline_transpo	6	(ac)MDQDLK(gl)SSK
TcCLB.508409.230	UBA	229	DLPTLLIINPLTTMK(gl)ESR
TcCLB.508039.70	--	97	TKLNDDLEK(gl)V
TcCLB.508039.70	--	90	TK(gl)LNDDLEKV
TcCLB.507949.250	DUF2946	252	EK(gl)EKLEVLNEGMQR
TcCLB.507949.250	DUF2946	254	EK(gl)LEVLNEGMQR
TcCLB.507083.109	Chorein_N;DUF1162	3702	VTLTAASK(gl)ETQEMR
TcCLB.510345.40	PqiA	775	AK(gl)PLEALAS
TcCLB.509997.40	--	38	LFNLLEAK(gl)SK
TcCLB.509767.220	zf-rbx1;zf-RING_2	218	IGFVSK(gl)GITR
TcCLB.508693.50	Amidino transf	181	SSEK(gl)LLDVVCSPENLNIPK
TcCLB.506811.30	Acid_PPase	117	ELLQK(gl)LSTDPK
TcCLB.506155.20	VHS	11	VVLSFLENVK(gl)DAASR
TcCLB.506925.400	RRM_5	212	EALVK(gl)QLLR
TcCLB.509429.59	--	90	DK(gl)LEEGLEQI
TcCLB.509429.59	--	88	INEPTTK(gl)DKLEEGLEQI
TcCLB.509429.59	--	74	RPDELHLPGSTVMVSK(gl)ESEEMK

TcCLB.507089.170	--	576	SLK(gl)FSDDFYSNLNH
TcCLB.509437.70	CorA	150	GPSLSAPAASEVEK(gl)ENTVVCTFACNDR
TcCLB.506811.100	PaaSYMP	577	ILHDK(gl)EAVQYAAAYIR
TcCLB.507709.60	PTR2	426	VVFPFVFNK(gl)TPPVR
TcCLB.507049.150	zf_UBP	231	REILSVDNQK(gl)
TcCLB.511003.80	--	323	HINAK(gl)YDSELETSNEK
TcCLB.508643.20	--	327	EWGK(gl)QNENDFAAK
TcCLB.508643.20	--	309	YQNDIHEK(gl)EEDTLSEPLLAQR
TcCLB.507007.70	CS	41	FTENTISITGK(gl)GITPK
TcCLB.510655.80	--	118	FDHLFAIAK(gl)
TcCLB.510515.30	--	353	DAPDEPVH FEDALK(gl)ATPADLQEHHM
TcCLB.508989.110	--	158	IVNFIDK(gl)GILDGIR
TcCLB.511189.90	--	916	SFLLFATK(gl)
TcCLB.507209.60	--	553	TFMK(gl)GITR
TcCLB.509713.30	MFS_1	17	PTTANSEDIVQGYVEK(gl)LVSVGQKPLTEWR
TcCLB.507569.10	--	308	K(gl)LAICGDTPLAALLIK
TcCLB.506441.20	--	391	K(gl)GSAVLLVESK
TcCLB.511065.23	--	266	K(gl)DVQNHL SR
TcCLB.509245.29	EmrE	6	(ac)MDAATK(gl)FLR
TcCLB.478283.10	--	211	LAAVVAPVHPK(gl)FK
TcCLB.478283.10	--	213	LAAVVAPVHPKFK(gl)

Como pode ser percebido nas tabelas acima, algumas proteínas possuem mais de um sítio de modificação por Ub. Isso pode ser decorrente de uma sinalização transiente, que devido à algum estímulo varia sua posição na proteína; ou devido à modificação em múltiplos sítios da proteína, conhecida como multi-ubiquitinação; ou mesmo devido à proximidade entre os dois sítios, possibilitando a co-existência das duas modificações mas sem consequência biológica intrínseca.

Com a abordagem em larga escala utilizada no presente trabalho é impossível inferir qual o tipo de modificação a proteína alvo está sofrendo (mono-, multi- ou poli-ubiquitinação), apenas podemos dizer com confiabilidade que a modificação existe devido à presença do sítio di-glicina no peptídeo alvo. Porém, um dado interessante descoberto é a existência de modificação em todas as 7 lisinas da Ub de *T. cruzi* (tabela 4.7.2 – gene TcCLB.507483.4 polyubiquitin). Isso significa que existe a formação de cadeias de poliubiquitinas neste organismo e, mais importante, todas as lisinas são usadas para formação desta cadeia. Conforme mencionado na introdução deste trabalho, as cadeias de ubiquitina são utilizadas para formar sinalizações distintas na célula. Por exemplo, proteínas modificadas por cadeias de ubiquitinas ligadas entre si pela lisina 48 (K48) são frequentemente alvos do proteassomo (HOCHSTRASSER, 1992), enquanto que cadeias de K63 estão envolvidas com



sinalizações para funções celulares não-proteolíticas como endocitose, reparo de DNA entre outros (LIM; LIM, 2011; NATHAN et al., 2013).

Diversas proteínas que identificadas neste experimento em *T. cruzi* são frequentemente citadas como sendo ubiquitinadas na literatura, como o caso de histonas (CHANDRASEKHARAN; HUANG; SUN, 2009; GATTI et al., 2012; ZHANG, 2003); proteínas ribossomais (OSSAREH-NAZARI et al., 2014; STAVREVA et al., 2006); proteínas do flagelo, como proteína paraflagelar e tubulina (ANNOURA et al., 2012; ZHAO et al., 2003); proteínas de choque térmico/chaperonas (KUNDRAT; REGAN, 2010; QIAN et al., 2006); subunidades do proteassomo e enzimas da via de ubiquitinação (HOCHSTRASSER, 1996); domínios de ligação com Ub (HAGLUND; STENMARK, 2006; WOELK et al., 2006) e proteínas envolvidas no tráfego de vesículas (MCCULLOUGH et al., 2006; NATHAN et al., 2013; RAIBORG; STENMARK, 2009).

Tais informações são de extrema relevância uma vez que este é o primeiro trabalho realizado em *T. cruzi* de identificação global de alvos ubiquitinados.

Ainda mais importante é a quantificação destes sítios para verificar se existem modulações específicas realizadas pela ubiquitina durante a diferenciação deste parasita para formas infectivas.

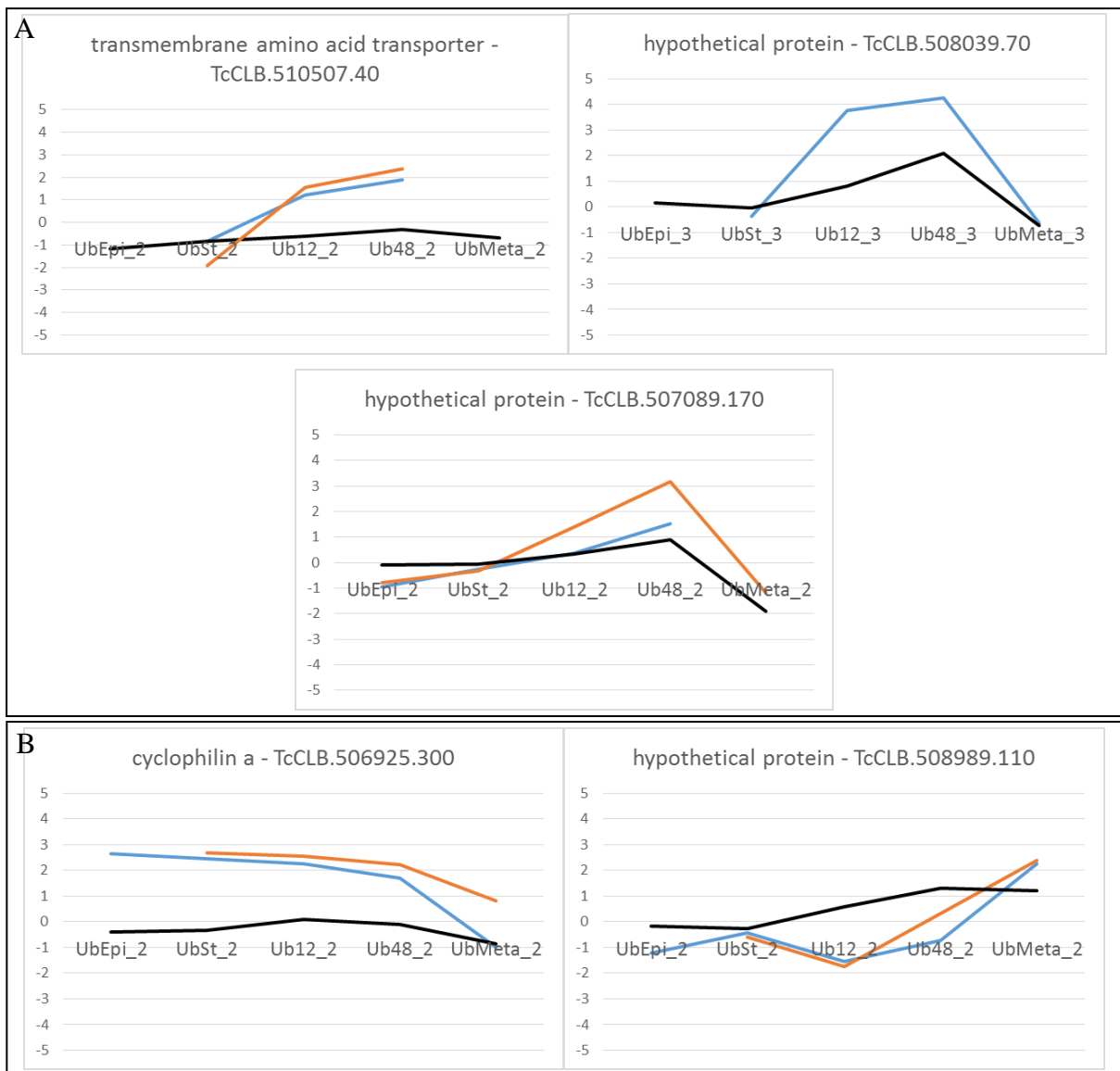
Desta forma, foram analisadas 2 réplicas de cada ponto da metaciclologênese escolhido para este trabalho e foi possível identificar 72 sítios di-glicina em 57 proteínas. Destes, 68 peptídeos foram quantificados em pelo menos 1 etapa da diferenciação, 13 foram quantificados em todas as etapas e 10 foram quantificados em apenas 1 fase.

Apesar de existir uma pequena variabilidade entre as réplicas de quantificação dos sítios ubiquitinados, alguns padrões interessantes puderam ser constatado. Todas as proteínas mostradas na figura 4.7.2 apresentaram uma modulação dos sítios de ubiquitinação ao longo da metaciclologênese. As 3 primeiras (painel A) mostraram um grande aumento da quantidade dos sítios ubiquitinados em aderidos, sendo que a primeira não apresentou quantificação em epimastigotas e Meta (possivelmente pela ausência da modificação nestas fase ou com quantidade muito baixa) e a segunda sem quantificação em epimastigotas. O perfil de expressão destas proteínas ao longo da metaciclologênese (dados de proteoma – linha preta) também mostra um leve aumento da expressão em aderidos, indicando que, nestes casos, a ubiquitinação pode estar envolvida em processos regulatórios e não na degradação das mesmas. Por exemplo, a proteína transmembrana transportadora de aminoácidos apresenta um leve aumento de expressão (menos de 2x) em aderidos 48 horas, enquanto que a quantidade de modificação nesta proteína aumenta quase 4 vezes. Existem diversos trabalhos

mostrando o envolvimento da ubiquitinação no transporte de proteínas de membrana, principalmente via poliubiquitinação por K63 (BIRSA et al., 2014; DORES; TREJO, 2014; HIRANO et al., 2006; KRAMER et al., 2010; SATO et al., 2014). Durante a fase de adesão *in vitro* do parasita os nutrientes disponíveis são restritos à 3 aminoácidos e glicose no meio TAU3AAG (BONALDO et al., 1988), sendo necessário, portanto, uma adaptação do parasita à esse novo ambiente para aproveitar o que lhe é fornecido. Desta forma, a ubiquitinação da proteína transmembrana transportadora de aminoácidos pode estar envolvida na sinalização do transporte da mesma para a superfície do parasita. As outras 2 proteínas do painel A da figura 4.7.2 são proteínas hipotéticas conservadas, sem domínio característico nem função associada.

As proteínas inseridas no painel B da figura 4.7.2 apresentaram uma modulação contrária ao padrão de expressão da proteína na metaciclogênese, ou seja, a proteína aumenta quando a ubiquitinação diminui, e vice-versa. A primeira proteína, ciclofilina A, apresentou uma diminuição gradual da quantidade de ubiquitinação ao longo da metaciclogênese, enquanto que observando o perfil de expressão da proteína no proteoma da diferenciação, a mesma apresentou um leve aumento (cerca de 1,5x) durante a adesão, voltando a cair em Meta. Este resultado pode indicar que a ubiquitinação, neste caso, está envolvida no controle da quantidade da proteína, podendo estar envolvida na degradação da mesma. Alguns trabalhos mostram o envolvimento da ciclofilina com a infecção, auxiliando na imunossupressão do hospedeiro quando secretada pelo parasita (BÚA et al., 2001; MORO et al., 1995; PELLÉ et al., 2002).

A última proteína apresenta uma modulação ainda mais intensa, mostrando níveis inversamente proporcionais entre a quantidade de ubiquitinação e quantidade da proteína no proteoma, indicando fortemente o envolvimento da ubiquitinação no controle da quantidade da proteína ao longo da metaciclogênese, podendo estar relacionada com a degradação da mesma. Esta proteína hipotética conservada não apresenta domínios característicos.



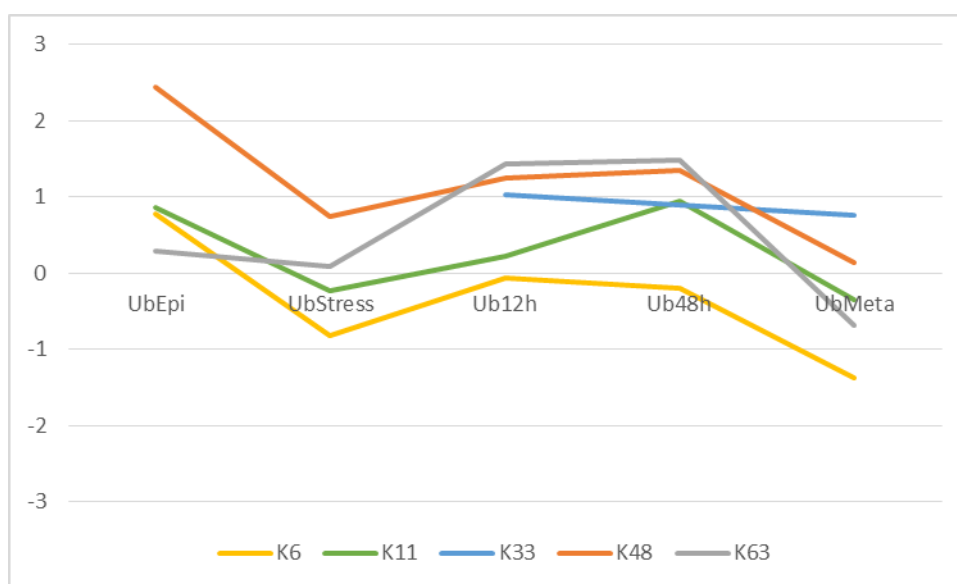
**Figura 4.7.2 Perfil da modificação por ubiquitinação em proteínas ao longo da diferenciação**

Os valores inseridos no eixo Y correspondem ao  $-\log_2$  da razão normalizada entre as intensidades das proteínas pesadas (padrão) e leves (fases da metacicloênese) marcadas por ubiquitina. As duas réplicas biológicas estão representadas nos gráficos (laranja e azul) e em preto está representado a média das razões encontradas no proteoma da metacicloênese. A proteína hipotética TcCLB.508039.70 apresentou quantificação em apenas uma réplica.

Outra informação interessante obtida foi a quantificação dos tipos de cadeias de poliubiquitinas usadas pelo parasita durante a diferenciação. Pudemos constatar que as cadeias mais utilizadas pelo parasita são as provenientes da polimerização utilizando as lisina 48 e 63 (Figura 4.7.3), as quais também são as mais frequentes em outros organismos (DAMMER et al., 2011; XU et al., 2009). Além disso, existe uma preferência por tipos distintos de cadeias ao longo da metacicloênese: K63 é mais utilizada em aderidos, enquanto que K48 é mais utilizada por epimastigotas, indicando uma maior associação da proteólise mediada pela via proteassomo-ubiquitina em formas epimastigotas e um maior

envolvimento de vias de sinalização mediada pela K63 nas fases aderidas. Apesar de a atividade endocítica (uma das funções da poliubiquitinação por K63) ser diminuída durante a diferenciação (FIGUEIREDO et al., 2004; FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000), outras funções são relacionadas à esta modificação, como transporte de vesículas e reciclagem de proteínas de membrana, como mencionada anteriormente.

Todas as formas de cadeias de poliubiquitinas encontram-se diminuídas em Meta. A modificação da lisina 33 da ubiquitina foi quantificada apenas nas fases de aderido 12 horas e Meta, e em apenas uma réplica, e a K27 não apresentou quantificação, provavelmente por possuir intensidades muito baixas ou simplesmente não existir em *T. cruzi* e ter sido identificada apenas por um erro durante a análise no MaxQuant que indentificou esta modificação devido à sua proximidade com a K33, apesar de ter sido identificada com uma alta probabilidade (97% de probabilidade de ser a K27 e não a K33).



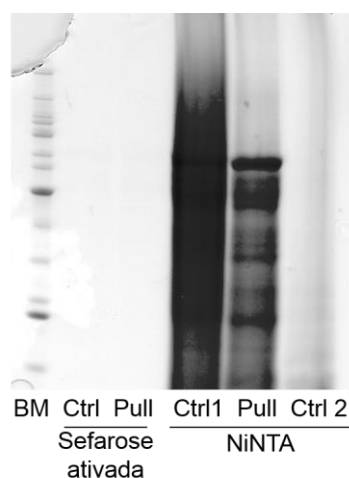
**Figure 4.7.3 Modulação dos tipos de cadeias de poliubiquitinas durante a metaciclologênese.**

Os valores inseridos no eixo Y correspondem à média do  $-\log_2$  da razão normalizada entre as intensidades dos peptídeos pesados (padrão) e leves (fases da metaciclologênese) modificados pela ubiquitina, possibilitando a visualização da modulação do tipo de lisina utilizada na polimerização de cadeias de Ub durante a metaciclologênese.

#### 4.8 Identificação de proteínas que interagem com Ub

Para compreender de forma mais abrangente os processos biológicos que a ubiquitina regula em *T. cruzi* é necessário conhecer as proteínas que interagem com a mesma. Com a obtenção da Ub recombinante de *T. cruzi* expressa em *E. coli* solubilizada e purificada é possível realizar ensaios de afinidade com a mesma.

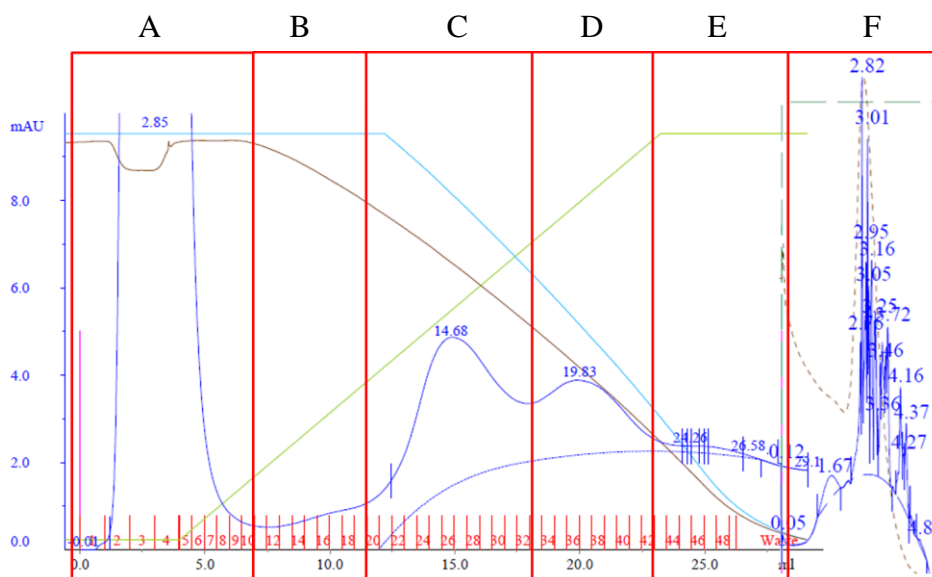
Para tanto, a Ub foi imobilizada em resina de níquel (NiNTA-Agarose), de forma que seja possível realizar uma cromatografia de afinidade à Ub com extrato de *T. cruzi*. Também foi realizado um experimento imobilizando a Ub recombinante em sefarose ativada, pois assim a Ub não seria eluída juntamente com as demais proteínas. O resultado das cromatografias podem ser visualizados na figura 4.8.1. Foi utilizado como controle o extrato previamente incubado com a Ub recombinante para em seguida ser incubado com a resina de Ub/Níquel (Ctrl1), desta forma as proteínas que interagem com a Ub poderiam ser deslocadas para a Ub da solução e não à Ub acoplada à resina. Porém, como esperado a Ub em solução também se ligou à resina de níquel e foi eluída juntamente com seus ligantes. O segundo controle usado foi apenas a resina de níquel sem Ub recombinante ligada à ela, o extrato foi inserido na resina, lavado e eluído da mesma forma que o experimento (Ctrl2). O ensaio de afinidade utilizando a resina de sefarose ativada não apresentou nenhum eluído, indicando que o procedimento não funcionou. Como controle foi utilizada apenas a resina de sefarose ativada e bloqueada onde foi realizada a cromatografia nas mesmas condições que o ensaio com Ub recombinante.



**Figura 4.8.1 Perfil eletroforético do resultado da cromatografia de afinidade à Ub recombinante.**

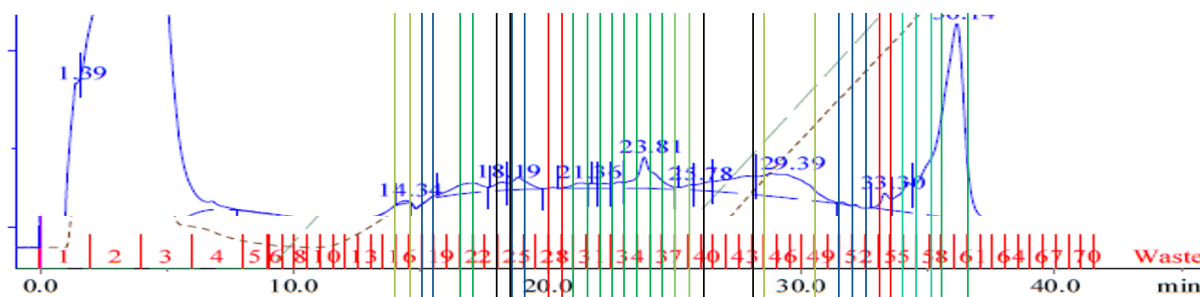
BM - Padrão de massa molecular *Bench Mark (Invitrogen)*; Ctrl – controle da cromatografia em Sefarose ativada; Pull – proteínas recuperadas na eluição da cromatografia de afinidade; Ctrl1 e Ctrl2 – controles da cromatografia em resina de níquel.

Em seguida, com o objetivo de enriquecer complexos de proteínas da mesma natureza que interagem com Ub, foi realizada uma segunda cromatografia. Primeiramente os complexos foram separados com uma resina *Phenyl High Sub* de interação hidrofóbica (IH) e os eluídos foram agrupados conforme descrito na figura 4.8.2.



**Figura 4.8.2** Cromatograma das proteínas que interagem com Ub em resina de interação hidrofóbica. As frações foram agrupadas em amostras de A a F.

Como pôde ser visualizado na figura 4.8.2, a cromatografia na resina de IH não resultou em picos com uma boa resolução, portanto optamos por realizar um novo enriquecimento de proteínas que interagem com Ub pelo método de níquel e os eluídos foram submetidos à cromatografia de troca iônica (TI) em resina *MonoQ*. Desta forma foi possível adquirir uma melhor resolução dos picos, ainda fora do esperado, porém com mais grupos (Figura 4.8.3), podendo resultar em diferentes complexos de proteínas.



**Figura 4.8.3** Cromatograma das proteínas que interagem com Ub em resina de troca iônica. As frações foram agrupadas em amostras de 1 a 23.

As frações foram processadas para MS por digestão clássica de proteínas, os peptídeos foram purificado e concentrados em Stage-tips e os dados analisados no programa MaxQuant.

Após a análise, foram identificadas 365 proteínas ao total das análises das amostras provenientes da cromatografia de IH e 307 proteínas identificadas após cromatografia de TI, gerando um total de 558 proteínas não redundantes. O repertório de proteínas encontradas nas

duas análises foi relativamente diferente, possivelmente devido à diferença no método de fracionamento da amostra após o enriquecimento das proteínas que interagem com Ub.

O GOs mais representativos nas análises de IH foram de atividade catalítica (Função Molecular-MF), seguido por ligantes de ácidos nucleicos (MF), componentes do citoplasma (Componente Celular – CC), processos metabólicos (Processos Biológicos – BP), processos metabólicos de proteínas (BP), ligantes (MF) e componentes de processos metabólicos contendo nucleobases (BP). Enquanto que para as análises de TI, os GOs mais representativos foram, em ordem de representação: atividade de transferase ((MF), processos metabólicos de proteínas (BP), atividade catalítica (MF), componentes do citoplasma (CC), componentes de processos metabólicos contendo nucleobases (BP), atividade de peptidase (MF) e componentes da mitocôndria (CC).

As tabelas contendo as principais informações das proteínas identificadas neste experimento podem ser encontradas em Anexo 4.

A identificação de proteínas envolvidas em distintos processos biológicos apenas reforça a proposta de que a ubiquitinação é uma modificação pós-traducional bastante abrangente no sentido de regulação de processos celulares. Mas principalmente a identificação de proteínas com conhecida interação com Ub em outros organismos, traz confiabilidade aos nossos resultados. Exemplos destas proteínas são proteínas com domínio de ligação com Ub, como UFM (TcCLB. 507275.24) por exemplo. Diversas subunidades do proteassomo foram identificadas, sugerindo a existência da via de degradação de proteínas mediada pelo proteassomo de forma dependente de Ub em *T. cruzi*, corroborando dados já publicados por nosso grupo (CARDOSO et al., 2008, 2011). Também foram identificadas várias subunidades ribossomais e diversas chaperonas, indicando o envolvimento da ubiquitinação no controle da expressão e no enovelamento de proteínas recém formadas, mecanismos já verificados em outros organismos. (KRIEGENBURG; ELLGAARD; HARTMANN-PETERSEN, 2012; STAVREVA et al., 2006).

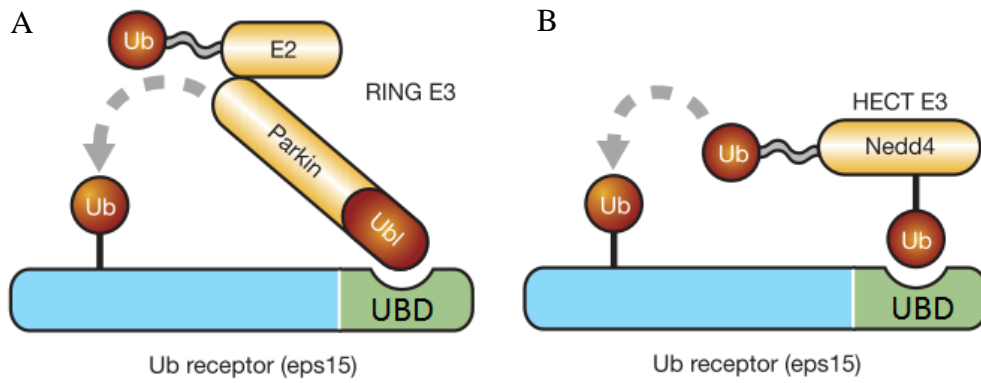
Comparando as proteínas identificadas nos ensaios de afinidade com Ub de *T. cruzi* e as proteínas identificadas como modificadas por Ub, foram identificadas 16 proteínas compartilhadas nas duas análises (Tabela 4.8.1).

**Table 4.4 Lista das proteínas que possuem afinidade à Ub e são modificadas pela mesma.**

<b>ID</b>	<b>Proteína</b>	<b>GO</b>	<b>Sítio Ub</b>
TcCLB.508693.50	amidinotransferase	C:cytoplasm	_SSEK(g)LLDVVCSPELNIPK_
TcCLB.510187.20	tyrosine aminotransferase	F:binding	_TK(g)AILMNNPSNPCGSNFSR_
TcCLB.506925.300	cyclophilin a,PPIase,rotamase,peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	P:protein folding	_HVVFGQVLEGIEVVK(g)AMEAVGSQTGK_
TcCLB.507609.60	myo-inositol-1-phosphate synthase	P:biosynthetic process	_GVHDTADNLLAAVK(g)R_
TcCLB.510755.89	kinetoplastid membrane protein-11	C:cytoplasm	_AK(g)FAELLEQQK_
TcCLB.511211.160	heat shock protein 70 (hsp70), putative	P:response to stimulus;response to stress	_GETK(g)TFNPEEVSSMVLK_
TcCLB.509617.20	paraflagellar rod protein 3, putative (PAR3)	C:motile cilium	_ADLEDAEAMK(g)R_
TcCLB.509237.130	cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	P:protein metabolic process;proteolysis	_VEGVVQK(g)QATVPPEVLER_
TcCLB.508971.50	ubiquitin-protein ligase-like	P:protein metabolic process	_DSFAQLSK(g)LK_
TcCLB.508323.100	i 6 autoantigen	C:cytoskeleton	_FK(g)LSSIEEATDSAR_
TcCLB.506563.40	beta-tubulin	P:transport	_MSTK(g)EVDEQMLNVQNK_
TcCLB.504797.80	glycosyl hydrolase	F:hydrolase activity	_EFYFDGGTGIVHESPGK(g)TR_
TcCLB.504423.30	hypothetical protein, conserved	--	_K(g)LAICGDTPLAALLIK_
TcCLB.506135.9	heat shock 70 kDa protein, putative	P:response to stimulus;response to stress	_QATK(g)DAGTIAGMEVLR_
TcCLB.509401.20	cysteine peptidase cathepsin L-like	P:proteolysis	_AFK(g)WIVDR_
TcCLB.507689.30	glutamamyl carboxypeptidase,metallo-peptidase, clan MH, family M18	P:proteolysis	_NK(g)ANLWATLPDGGGVTK_

Existe um mecanismo conhecido como ubiquitinação acoplada, no qual uma proteína alvo do sistema possui um domínio de ligação com Ub (UBD). Algumas enzimas Ub ligases (E3) possuem um domínio semelhante à Ub em sua estrutura, como por exemplo a parkina, uma E3 envolvida na doença de Parkinson (TASHIRO et al., 2003), desta forma o UBD presente na proteína alvo aproxima a mesma do domínio Ub-like da E3, a qual media a modificação da mesma pela Ub (Figura 4.8.4A). Outra forma de ubiquitinação acoplada é através da ubiquitinação de um alvo com UBD através de uma E3 também ubiquitinada. Desta forma, a E3 ubiquitinada atrai a proteína alvo com UBD e realiza a modificação da mesma (Figura 4.8.4B) (HAGLUND; STENMARK, 2006; WOELK et al., 2006). Observando a tabela 4.8.1, é possível verificar a existência de uma E3 (ubiquitin-protein ligase-like - TcCLB.508971.50) que, como esperado, interage com a Ub e também é ubiquitinada, podendo ser uma das enzimas E3 responsáveis pelo mecanismo de ubiquitinação acoplada descrito acima.





**Figure 4.8.4 Representação esquemática de dois exemplos de ubiquitinação acoplada.**

Em A está representada a ubiquitinação mediada por uma E3 que possui um domínio de Ub-like, o qual se liga ao domínio de ligação com Ub (UBD) e promove a ubiquitinação do alvo. Em B está representada a ubiquitinação mediada por uma E3 ubiquitinada, ligando-se ao sítio UBD da proteína alvo e promovendo sua ubiquitinação.

## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho gerou ferramentas importantes para o estudo da biologia do *T. cruzi*. Com os métodos estabelecidos, hoje é possível realizar o cultivo de *T. cruzi* em meio quimicamente definido, abrindo novas possibilidades de ensaios como testes de drogas, marcações metabólicas, avaliação do metabolismo entre outros, além de gerar dados mais padronizáveis e reprodutíveis, sem interferência de componentes de origem animal que variam muito de acordo com o lote utilizado, como soro, infuso e fígado, etc.

Novas questões sobre o metabolismo de *T. cruzi* surgiram a partir do presente trabalho, como o baixo consumo de glicose, a alta produção de uracila e o alto consumo de ácido linoleico pelo parasita quando cultivado em meio definido, resultados que abriram novas perspectivas para elucidação dos processos metabólicos do parasita.

Vários resultados inéditos em *T. cruzi* surgiram deste trabalho, como a aplicação do método de proteômica quantitativa de alta acuraria por marcação isotópica - SILAC, o que nos possibilitou descobrir novas proteínas moduladas durante a metaciclo gênese de *T. cruzi*. Além disso, este é o primeiro trabalho em larga escala de proteômica de alvos ubiquitinados em *T. cruzi*.

Conseguimos quantificar com sucesso mais de 3 mil proteínas ao longo da metaciclo gênese. Comparando os pontos da metaciclo gênese, 7 proteínas apresentaram modulação em formas estressadas de 1,5 vezes para mais ou para menos, 3 proteínas mostraram-se moduladas em aderidos por 12 horas, 20 proteínas em aderidos 48 horas e 412 para tripomastigotas metacíclicos. A maioria dos dados encontrados neste trabalho corroboram o trabalho já publicado pelo nosso grupo de proteômica quantitativa de *T. cruzi* pelo método *label-free*, trazendo mais confiabilidade aos resultados obtidos.

Com relação ao proteoma ubiquitinado de *T. cruzi*, conseguimos identificar 138 sítios di-glicina em 107 proteínas, com 4 sítios quantificados com qualidade em todas as fases da diferenciação. O repertório de proteínas envolvidas na ubiquitinação de proteínas em *T. cruzi* aumentou com os dados gerados a partir de cromatografia de afinidade com a Ub recombinante solúvel de *T. cruzi*. Desta forma, temos em mão uma lista de proteínas modificadas por Ub e outras lista das proteínas que interagem com o sistema, dados cruciais para um melhor entendimento desta via neste parasita.

Todas estas informações, em conjunto, auxiliam no melhor entendimento da biologia do parasita e de sua diferenciação para formas infectivas, e abrem perspectivas promissoras para futuras investigações neste sentido.

## 6. REFERÊNCIAS

AJIOKA, J.; SWINDLE, J. The calmodulin-ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 57, n. 1, p. 127–36, jan. 1993.

AJIOKA, J.; SWINDLE, J. The calmodulin-ubiquitin (CUB) genes of *Trypanosoma cruzi* are essential for parasite viability. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 78, n. 1-2, p. 217–25, jun. 1996.

ANDERSON, S. J.; KRASSNER, S. M. Axenic culture of *Trypanosoma cruzi* in a chemically defined medium. **The Journal of parasitology**, v. 61, n. 1, p. 144–5, fev. 1975.

ANNOURA, T. et al. SUMOylation of paraflagellar rod protein, PFR1, and its stage-specific localization in *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37183, jan. 2012.

ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. **Current biology : CB**, v. 10, n. 4, p. R132–4, 24 fev. 2000.

ARÉVALO, J.; PANEBRA, A.; SANTA CRUZ, C. Relevance of hemin for in vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of protozoology**, v. 32, n. 3, p. 553–5, ago. 1985.

ARIYANAYAGAM, M. Ovothiols and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 189–198, jul. 2001.

ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H. Diamine auxotrophy may be a universal feature of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 84, n. 1, p. 111–21, jan. 1997.

ASHER, G. et al. 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. **Molecular cell**, v. 17, n. 5, p. 645–55, 4 mar. 2005.

AVILA, A R. et al. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 117, n. 2, p. 169–77, out. 2001.

AVILA, H. A.; SIMPSON, L. Organization and complexity of minicircle-encoded guide RNAs in *Trypanosoma cruzi*. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 1, n. 9, p. 939–47, nov. 1995.

AVILA, J. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: Defined Medium for Continuous Cultivation of Virulent Parasites. **Experimental parasitology**, v. 48, p. 27–35, 1979.

AVILA, J. L.; PÉREZ-KEPP, R.; BRETaña, A. A minimal medium for the cultivation of infective *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of general microbiology**, v. 129, n. 2, p. 285–91, fev. 1983.

AZEVEDO, H. P. DE; ROITMAN, I. Growth of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* in an HX25-modified defined medium. **Journal of parasitology**, v. 63, n. 3, p. 485, 1977.

- BABOSHINA, O. V.; HAAS, A. L. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2823–31, 2 fev. 1996.
- BACIK, J.-P. et al. Crystal structure of the human ubiquitin-activating enzyme 5 (UBA5) bound to ATP: mechanistic insights into a minimalistic E1 enzyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 26, p. 20273–80, 25 jun. 2010.
- BAKER, R. T.; BOARD, P. G. The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 5, p. 1035–40, 11 mar. 1991.
- BARRETO, J. C. Chagas' disease. **British journal of anaesthesia**, v. 51, n. 12, p. 1189, dez. 1979.
- BARRIO, A. B.; VAN VOORHIS, W. C.; BASOMBRÍO, M. A. Trypanosoma cruzi: attenuation of virulence and protective immunogenicity after monoallelic disruption of the cub gene. **Experimental parasitology**, v. 117, n. 4, p. 382–9, dez. 2007.
- BAYER, P. et al. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. **Journal of molecular biology**, v. 280, n. 2, p. 275–86, 10 jul. 1998.
- BAYONA, J. C. et al. SUMOylation pathway in Trypanosoma cruzi: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 10, n. 12, p. M110.007369, dez. 2011.
- BECK, J. T.; ULLMAN, B. Nutritional requirements of wild-type and folate transport-deficient Leishmania donovani for pterins and folates. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 43, n. 2, p. 221–30, dez. 1990.
- BEERS, E. P.; CALLIS, J. Utility of polyhistidine-tagged ubiquitin in the purification of ubiquitin-protein conjugates and as an affinity ligand for the purification of ubiquitin-specific hydrolases. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21645–9, 15 out. 1993.
- BELGAREH-TOUZÉ, N. et al. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 5, p. 791–6, out. 2008.
- BELLARE, P. et al. Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 12, n. 2, p. 292–302, fev. 2006.
- BENIRSCHKE, R. C. et al. Molecular basis for the association of human E4B U box ubiquitin ligase with E2-conjugating enzymes UbcH5c and Ubc4. **Structure (London, England : 1993)**, v. 18, n. 8, p. 955–65, 11 ago. 2010.
- BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 416–22, 15 jul. 2005.
- BHATTACHARYYA, S. et al. Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 2, p. 122–33, fev. 2014.

- BIENKO, M. et al. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 310, n. 5755, p. 1821–4, 16 dez. 2005.
- BIRSA, N. et al. K27 ubiquitination of the mitochondrial transport protein Miro is dependent on serine 65 of the Parkin ubiquitin ligase. **The Journal of biological chemistry**, 26 mar. 2014.
- BOHNSACK, R. N.; HAAS, A. L. Conservation in the mechanism of Nedd8 activation by the human AppBp1-Uba3 heterodimer. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26823–30, 18 jul. 2003.
- BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 4, p. 1349–58, abr. 1988.
- BOTELHO-MACHADO, C. et al. Characterization and mRNA expression analysis of PI31, an endogenous proteasome inhibitor from *Schistosoma mansoni*. **Parasitology research**, v. 107, n. 5, p. 1163–71, out. 2010.
- BOUTET, S. C. et al. Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 349–62, 27 jul. 2007.
- BREITSCHOPF, K. et al. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. **The EMBO journal**, v. 17, n. 20, p. 5964–73, 15 out. 1998.
- BREMM, A.; FREUND, S. M. V; KOMANDER, D. Lys11-linked ubiquitin chains adopt compact conformations and are preferentially hydrolyzed by the deubiquitinase Cezanne. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 8, p. 939–47, ago. 2010.
- BRETT, M.; MÜLLER-NAVARRA, D. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. **Freshwater Biology**, v. 38, n. 3, p. 483–499, dez. 1997.
- BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1–9, set. 2006.
- BRIONES, M. R. S. et al. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 104, n. 2, p. 219–232, 1999.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 111, n. 1, p. 95–105, nov. 2000.
- BRUN, R.; SCHÖNENBERGER. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. **Acta tropica**, v. 36, n. 3, p. 289–92, set. 1979.
- BÚA, J. et al. Characterisation of a cyclophilin isoform in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS microbiology letters**, v. 200, n. 1, p. 43–7, 12 jun. 2001.

- BURNETT, B.; LI, F.; PITTMAN, R. N. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 23, p. 3195–205, 1 dez. 2003.
- BUTLER, P. L.; MALLAMPALLI, R. K. Cross-talk between remodeling and de novo pathways maintains phospholipid balance through ubiquitination. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6246–58, 26 fev. 2010.
- CALLIS, J.; LING, R. Preparation, characterization, and use of tagged ubiquitins. **Methods in enzymology**, v. 399, p. 51–64, jan. 2005.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93–100, 1964.
- CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 79, n. 3, p. 297–308, jan. 1984.
- CANO, M. I. et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 71, n. 2, p. 273–8, maio 1995.
- CAPELLUTO, D. G. et al. Purification and some properties of serine hydroxymethyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 3, p. 712–9, fev. 2000.
- CARDOSO, J. et al. Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis. **Parasitology research**, v. 103, n. 4, p. 941–51, set. 2008.
- CARDOSO, J. et al. Analysis of proteasomal proteolysis during the in vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21027, jan. 2011.
- CARRILLO, C. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. **FEBS letters**, v. 454, n. 3, p. 192–6, 9 jul. 1999.
- CAZZULO, J. J. Protein and amino acid catabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 79, n. 3, p. 309–20, jan. 1984.
- CAZZULO, J. J. et al. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 329–43, set. 1985.
- CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 13, p. 3153–61, out. 1992.
- CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Biological chemistry**, v. 378, n. 1, p. 1–10, jan. 1997.

**CDC - DPDx - Trypanosomiasis, American.** Disponível em:  
<<http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>>.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, 1909.

CHANDRASEKHARAN, M. B.; HUANG, F.; SUN, Z.-W. Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 39, p. 16686–91, 29 set. 2009.

CHEN, Z. J. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. **Immunological reviews**, v. 246, n. 1, p. 95–106, mar. 2012.

CHENG, T. et al. Histidine-rich proteins in prokaryotes: metal homeostasis and environmental habitat-related occurrence. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 10, p. 1423–9, out. 2013.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–9, abr. 1987.

CHUNG, S. H.; GILLESPIE, R. D.; SWINDLE, J. Analyzing expression of the calmodulin and ubiquitin-fusion genes of *Trypanosoma cruzi* using simultaneous, independent dual gene replacements. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 63, n. 1, p. 95–107, jan. 1994.

CHUNG, S. H.; SWINDLE, J. Linkage of the calmodulin and ubiquitin loci in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 15, p. 4561–9, 11 ago. 1990.

CHUNG, S.; SWINDLE, J.; AVE, M. Linkage of the calmodulin and ubiquitin loci in *Vall1g*. v. 18, n. 15, p. 4561–4569, 1990.

CHUNG, W.-L. et al. Ubiquitylation is required for degradation of transmembrane surface proteins in trypanosomes. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 9, n. 10, p. 1681–97, set. 2008.

CICCARELLI, A. et al. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 7, p. 959–65, jul. 2007.

CIECHANOVER, A. et al. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 3, p. 1365–8, mar. 1980.

CIECHANOVER, A.; BEN-SAADON, R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. **Trends in cell biology**, v. 14, n. 3, p. 103–6, mar. 2004.

CIECHANOVER, A.; HOD, Y.; HERSHKO, A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 81, n. 4, p. 1100–5, 28 abr. 1978.

- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93–101, dez. 2007.
- CLIFFE, L. J. et al. Two thymidine hydroxylases differentially regulate the formation of glucosylated DNA at regions flanking polymerase II polycistronic transcription units throughout the genome of *Trypanosoma brucei*. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 12, p. 3923–35, jul. 2010.
- CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–27, set. 1985.
- CONTRERAS, V. T. et al. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1213–20, dez. 2002.
- COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–72, dez. 2008.
- CREEK, D. J. et al. Metabolomic analysis of trypanosomatid protozoa. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 181, n. 2, p. 73–84, fev. 2012a.
- CREEK, D. J. et al. Stable isotope-assisted metabolomics for network-wide metabolic pathway elucidation. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 20, p. 8442–7, 16 out. 2012b.
- CREEK, D. J. et al. Metabolomics guides rational development of a simplified cell culture medium for drug screening against *Trypanosoma brucei*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2768–79, jun. 2013.
- CROSS, G. A. M.; KLEIN, R. A.; BAKER, J. R. *Trypanosoma cruzi*: growth, amino acid utilization and drug action in a defined medium. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 69, n. 4, p. 513–514, 1975.
- CROSS, G. A. M.; KLEIN, R. A.; LINSTEA, P. J. D. Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture : L-threonine as a precursor for acetate. **Medical Research Council Biochemical Parasitology Unit**, p. 311–313, 1975.
- CROSS, G. A. M.; MANNING, J. C. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi - defined and defined media. **Parasitology**, v. 67, p. 315–331, 1973.
- CRUZ, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: role of  $\delta$ -amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. **PLoS one**, v. 7, n. 12, p. e51804, jan. 2012.
- CUNNINGHAM, M. L. et al. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5515, p. 285–7, 13 abr. 2001.
- CURTO, M. DE L. Á. et al. Cloning and expression of transgenes using linear vectors in *Trypanosoma cruzi*. **International journal for parasitology**, 20 abr. 2014.



- DAL VECHIO, F. H. et al. Peptides that activate the 20S proteasome by gate opening increased oxidized protein removal and reduced protein aggregation. **Free radical biology & medicine**, v. 67, p. 304–13, fev. 2014.
- DALLAGIOVANNA, B. et al. Trypanosoma cruzi: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 1, p. 7–16, set. 2001.
- DAMMER, E. B. et al. Polyubiquitin linkage profiles in three models of proteolytic stress suggest the etiology of Alzheimer disease. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10457–65, 25 mar. 2011.
- DANIELSEN, J. M. R. et al. Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 10, n. 3, p. M110.003590, mar. 2011.
- DC-RUBIN, S. S. C.; SCHENKMAN, S. Trypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 10, p. 1522–30, out. 2012.
- DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of Trypanosoma cruzi. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 205–12, 1986.
- DE DIEGO, J. L. et al. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during Trypanosoma cruzi remodeling. **Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1053–62, 30 jan. 2001.
- DE GODOY, L. M. et al. Quantitative Proteomics of Trypanosoma cruzi During Metacyclogenesis. **Proteomics**, v. 12, p. 1–10, 4 jul. 2012.
- DE SOUSA, M. A. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi using DEAE-cellulose columns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 3, p. 317–33, 1983.
- DE SOUZA, W. Cell biology of Trypanosoma cruzi. **International review of cytology**, v. 86, p. 197–283, jan. 1984.
- DE SOUZA, W. A short review on the morphology of Trypanosoma cruzi: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 17–36, jan. 1999.
- DE SOUZA, W.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; GONZÁLEZ-ROBLES, A. The cell surface of Trypanosoma cruzi: cytochemistry and freeze-fracture. **Journal of cell science**, v. 33, p. 285–99, out. 1978.
- DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 67–124, 2009.
- DELOIA, J. A. et al. Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. **Gynecologic oncology**, v. 126, n. 3, p. 448–54, set. 2012.

- DEMARTINO, G. N. et al. Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 6, p. 3112–8, 9 fev. 1996.
- DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 28, n. 1, p. 1–110, fev. 1934.
- DIAS, J. C. P. Globalização , iniquidade e doença de Chagas Globalization , inequity and Chagas disease. p. 13–22, 2007.
- DIETRICH, P. et al. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene**, v. 125, n. 1, p. 103–7, 15 mar. 1993.
- DONALDSON, K. M. et al. Ubiquitin signals protein trafficking via interaction with a novel ubiquitin binding domain in the membrane fusion regulator, Vps9p. **Current biology : CB**, v. 13, n. 3, p. 258–62, 4 fev. 2003.
- DORES, M. R.; TREJO, J. Atypical regulation of G protein-coupled receptor intracellular trafficking by ubiquitination. **Current opinion in cell biology**, v. 27, p. 44–50, abr. 2014.
- DREXLER, D. M.; REILY, M. D.; SHIPKOVA, P. A. Advances in mass spectrometry applied to pharmaceutical metabolomics. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2645–53, mar. 2011.
- EDELMANN, M. J. et al. Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. **The Biochemical journal**, v. 418, n. 2, p. 379–90, 1 mar. 2009.
- EGER, I.; SOARES, M. J. Endocytosis in *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa: Kinetoplastea) epimastigotes: visualization of ingested transferrin-gold nanoparticle complexes by confocal laser microscopy. **Journal of microbiological methods**, v. 91, n. 1, p. 101–5, out. 2012.
- EKANAYAKE, D.; SABATINI, R. Epigenetic regulation of polymerase II transcription initiation in *Trypanosoma cruzi*: modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by O-linked thymine DNA glucosylation. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 11, p. 1465–72, nov. 2011.
- ELETR, Z. M.; WILKINSON, K. D. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1843, n. 1, p. 114–28, jan. 2014.
- ELIAS, M. C. et al. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 79–90, 15 jan. 2001.
- ELLISON, M. J.; HOCHSTRASSER, M. Epitope-tagged ubiquitin. A new probe for analyzing ubiquitin function. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 31, p. 21150–7, 5 nov. 1991.
- EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 409–15, 15 jul. 2005.

ERALES, J.; COFFINO, P. Ubiquitin-independent proteasomal degradation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1843, n. 1, p. 216–21, jan. 2014.

FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4693, p. 1485–7, 22 mar. 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual review of microbiology**, v. 46, p. 695–729, jan. 1992.

FIGUEIREDO, R. C. B. Q. et al. Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. **Parasitology**, v. 129, n. Pt 4, p. 431–8, out. 2004.

FIGUEIREDO, R. C.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1213–8, dez. 2000.

FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E.; BERG, K. A.; WILK, S. A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. **Journal of neurochemistry**, v. 63, n. 4, p. 1578–81, out. 1994.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–9, jan. 1987.

FINLEY, D.; CIECHANOVER, A.; VARSHAVSKY, A. Ubiquitin as a central cellular regulator. **Cell**, v. 116, n. 2 Suppl, p. S29–32, 2 p following S32, 23 jan. 2004.

FRAGOSO, S. P. et al. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 126, n. 1, p. 113–7, jan. 2003.

FRAGOSO, S. P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 55, n. 1-2, p. 127–34, out. 1992.

FREEMONT, P. S. The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 684, p. 174–92, 11 jun. 1993.

GALLO, G. et al. Biochemical characterization of a protein tyrosine phosphatase from *Trypanosoma cruzi* involved in metacyclogenesis and cell invasion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 408, n. 3, p. 427–31, 13 maio 2011.

GATTI, M. et al. A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 11, n. 13, p. 2538–44, 1 jul. 2012.

GAUNT, M. W. et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936–9, 27 fev. 2003.

GAVIN, J. M. et al. Mechanistic studies on activation of ubiquitin and di-ubiquitin-like protein, FAT10, by ubiquitin-like modifier activating enzyme 6, Uba6. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 19, p. 15512–22, 4 maio 2012.

GEIGER, T. et al. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 383–5, maio 2010.

GIANNECCHINI, M. et al. Uptake and utilization of nucleosides for energy repletion. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 4, p. 797–808, abr. 2005.

GIESE, V. et al. Trypanosoma cruzi: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 6, p. 598–601, set. 2008.

GOITIA AULAR, M.; DE BOISO, J. F. Cultivo de Trypanosoma cruzi (cepa Elpidio Padrón) en un medio semidefinido Efecto de algunas variaciones en la composición y condiciones del mismo. **Acta científica venezolana**, v. 33, n. 6, p. 488–96, jan. 1982.

GOLDKNOPF, I. L.; BUSCH, H. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 3, p. 864–8, mar. 1977.

GOLDSTEIN, G. et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 1, p. 11–5, jan. 1975.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate Trypanosoma cruzi differentiation. **Experimental parasitology**, v. 66, n. 2, p. 205–12, ago. 1988.

GONZÁLEZ, J. et al. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 5, p. 1909–18, 1 nov. 1996.

GRANT, P. T.; FULTON, J. D. The catabolism of glucose by strains of Trypanosoma rhodesiense. **The Biochemical journal**, v. 66, n. 2, p. 242–50, jun. 1957.

GRILLARI, J.; KATINGER, H.; VOGLAUER, R. Aging and the ubiquitinome: traditional and non-traditional functions of ubiquitin in aging cells and tissues. **Experimental gerontology**, v. 41, n. 11, p. 1067–79, nov. 2006.

GROLL, M. et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 463–71, 3 abr. 1997.

GROSSMAN, S. R. et al. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5617, p. 342–4, 11 abr. 2003.

- GRY, M. et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 365, jan. 2009.
- GUALDRÓN-LÓPEZ, M. et al. Ubiquitination of the glycosomal matrix protein receptor PEX5 in *Trypanosoma brucei* by PEX4 displays novel features. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1833, n. 12, p. 3076–92, dez. 2013.
- GUERZONI, M. E. et al. Increased cellular fatty acid desaturation as a possible key factor in thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian journal of microbiology**, v. 43, n. 6, p. 569–76, jun. 1997.
- GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; COCCONCELLI, P. S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 147, n. Pt 8, p. 2255–64, ago. 2001.
- HAAS, A. L.; BRIGHT, P. M.; JACKSON, V. E. Functional diversity among putative E2 isozymes in the mechanism of ubiquitin-histone ligation. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 26, p. 13268–75, 15 set. 1988.
- HAAS, A. L.; ROSE, I. A. The Mechanism of Ubiquitin Activating. v. 257, n. 17, p. 10329–10337, 1982.
- HAGER, K. M. et al. Endocytosis of a cytotoxic human high density lipoprotein results in disruption of acidic intracellular vesicles and subsequent killing of African trypanosomes. **The Journal of cell biology**, v. 126, n. 1, p. 155–67, jul. 1994.
- HAGLUND, K.; DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **The EMBO journal**, v. 24, n. 19, p. 3353–9, 5 out. 2005.
- HAGLUND, K.; STENMARK, H. Working out coupled monoubiquitination. **Nature cell biology**, v. 8, n. 11, p. 1218–9, nov. 2006.
- HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach: A Practical Approach**. 2nd. ed. Oxford: Oxford University Press, 1990.
- HAMMOND-MARTEL, I.; YU, H.; AFFAR, E. B. Roles of ubiquitin signaling in transcription regulation. **Cellular signalling**, v. 24, n. 2, p. 410–21, fev. 2012.
- HAN, J. et al. Mass spectrometry-based technologies for high-throughput metabolomics. **Bioanalysis**, v. 1, n. 9, p. 1665–84, dez. 2009.
- HATAKEYAMA, S. et al. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 35, p. 33111–20, 31 ago. 2001.
- HELLIWELL, S. B.; LOSKO, S.; KAISER, C. A. Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. **The Journal of cell biology**, v. 153, n. 4, p. 649–62, 14 maio 2001.
- HENRIQUEZ, D. A. et al. Mechanisms of protein degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Biological research**, v. 26, n. 1-2, p. 151–7, jan. 1993.

HERNEBRING, M. et al. Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28. **Scientific reports**, v. 3, p. 1381, jan. 2013.

HERSHKO, A. et al. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 4, p. 1783–6, abr. 1980.

HERSHKO, A. et al. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 13, p. 8206–14, 10 jul. 1983.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 659–88, table of contents, out. 2001.

HICKE, L. Protein regulation by monoubiquitin. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 3, p. 195–201, mar. 2001.

HICKE, L.; DUNN, R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 19, p. 141–72, jan. 2003.

HICKE, L.; SCHUBERT, H. L.; HILL, C. P. Ubiquitin-binding domains. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 8, p. 610–21, ago. 2005.

HIRANO, S. et al. Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIP in endosomal protein sorting. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 3, p. 272–7, mar. 2006.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin and intracellular protein degradation. **Current opinion in cell biology**, v. 4, n. 6, p. 1024–31, dez. 1992.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annual review of genetics**, v. 30, n. 93, p. 405–39, jan. 1996.

HOCHSTRASSER, M. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. **Nature cell biology**, v. 2, n. 8, p. E153–7, ago. 2000.

HOEGE, C. et al. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. **Nature**, v. 419, n. 6903, p. 135–41, 12 set. 2002.

HOELLER, D. et al. E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. **Molecular cell**, v. 26, n. 6, p. 891–8, 22 jun. 2007.

HOFFLIN, J. M. et al. Laboratory-acquired Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 437–40, jan. 1987.

HOFMANN, K.; BUCHER, P. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. **Trends in biochemical sciences**, v. 21, n. 5, p. 172–3, maio 1996.

HOFMANN, R. M.; PICKART, C. M. In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 30, p. 27936–43, 27 jul. 2001.

HOOK, S. S. et al. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13425–30, 15 out. 2002.

HOPPE, T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: “one size” doesn’t fit all. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 4, p. 183–7, abr. 2005.

HORAK, J.; WOLF, D. H. Glucose-induced monoubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose transporter is sufficient to signal its internalization. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 10, p. 3083–8, maio 2001.

HOUGH, R.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 17, p. 8303–13, 15 jun. 1987.

HUANG, D. T. et al. Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. **Nature**, v. 445, n. 7126, p. 394–8, 25 jan. 2007.

HUIBREGTSE, J. M. et al. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. March, p. 2563–2567, 1995.

HUNTER, K. J.; QUESNE, S. A. LE; FAIRLAMB, A. H. Identification and Biosynthesis of N1,N9-Bis(Glutathionyl)Aminopropylcadaverine (Homotrypanothione) in *Trypanosoma Cruzi*. **European Journal of Biochemistry**, v. 226, n. 3, p. 1019–1027, dez. 1994.

HUSNJAK, K. et al. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 481–8, 22 maio 2008.

IRIGOÍN, F. et al. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 6, p. 733–42, 15 set. 2008.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–42, 15 jul. 2005.

IWAI, K. Synthesis and analysis of linear ubiquitin chains. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 832, p. 229–38, jan. 2012.

IYER, N. G. et al. p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7386–91, 11 maio 2004.

JACKSON, Y. et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, p. e592, jan. 2010.

- JEON, H. B. et al. A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 357, n. 3, p. 731–6, 8 jun. 2007.
- JIN, J. et al. Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1135–8, 28 jun. 2007.
- KAMBAMPATI, R.; LAUHON, C. T. Evidence for the transfer of sulfane sulfur from IscS to ThiI during the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in Escherichia coli tRNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 15, p. 10727–30, 14 abr. 2000.
- KAO, A.-L. et al. E3-independent ubiquitination of AtMAPR/MSBP1. **Phytochemistry**, v. 78, p. 7–19, jun. 2012.
- KERSCHER, O.; FELBERBAUM, R.; HOCHSTRASSER, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 159–80, jan. 2006.
- KIDDER, G. W.; DUTTA, B. N. The Growth and Nutrition of Crithidia fasciculata. **Journal of General Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 621–638, 1 jun. 1958.
- KIM, D.-Y. et al. Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 25, n. 5, p. 1523–40, maio 2013.
- KIM, W. et al. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. **Molecular cell**, v. 44, n. 2, p. 325–40, 21 out. 2011.
- KIMBREL, E. A; KUNG, A. L. The F-box protein beta-TrCp1/Fbw1a interacts with p300 to enhance beta-catenin transcriptional activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 19, p. 13033–44, 8 maio 2009.
- KIRCHHOFF, L. V et al. Ubiquitin genes in trypanosomatidae. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 25, p. 12698–704, 5 set. 1988.
- KIRCHMAIER, A. L. Ub-family modifications at the replication fork: Regulating PCNA-interacting components. **FEBS letters**, v. 585, n. 18, p. 2920–8, 16 set. 2011.
- KIRKPATRICK, D. S. et al. Proteomic identification of ubiquitinated proteins from human cells expressing His-tagged ubiquitin. **Proteomics**, v. 5, n. 8, p. 2104–11, maio 2005.
- KOEGL, M. et al. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 635–44, 5 mar. 1999.
- KOMANDER, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 5, p. 937–53, out. 2009.
- KOMANDER, D.; BARFORD, D. Structure of the A20 OTU domain and mechanistic insights into deubiquitination. **The Biochemical journal**, v. 409, n. 1, p. 77–85, 1 jan. 2008.



- KRAMER, L. B. et al. UEV-1 is an ubiquitin-conjugating enzyme variant that regulates glutamate receptor trafficking in *C. elegans* neurons. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e14291, jan. 2010.
- KRAVTSOVA-IVANTSIV, Y.; SOMMER, T.; CIECHANOVER, A. The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 52, n. 1, p. 192–8, 2 jan. 2013.
- KRIEGENBURG, F.; ELLGAARD, L.; HARTMANN-PETERSEN, R. Molecular chaperones in targeting misfolded proteins for ubiquitin-dependent degradation. **The FEBS journal**, v. 279, n. 4, p. 532–42, fev. 2012.
- KUEHN, L.; DAHLMANN, B. Structural and functional properties of proteasome activator PA28. **Molecular biology reports**, v. 24, n. 1-2, p. 89–93, mar. 1997.
- KULATHU, Y.; KOMANDER, D. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 8, p. 508–23, 23 ago. 2012.
- KUNDRAT, L.; REGAN, L. Identification of residues on Hsp70 and Hsp90 ubiquitinated by the cochaperone CHIP. **Journal of molecular biology**, v. 395, n. 3, p. 587–94, 22 jan. 2010.
- KWON, N. S.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 34, p. 20496–501, 5 dez. 1989.
- LABUSCHAGNE, C. F. et al. Serine, but Not Glycine, Supports One-Carbon Metabolism and Proliferation of Cancer Cells. **Cell reports**, v. 7, n. 4, p. 1248–58, 7 maio 2014.
- LAKE, M. W. et al. Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 325–9, 15 nov. 2001.
- LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annual review of biochemistry**, v. 58, p. 913–49, jan. 1989.
- LARSON, E. T. et al. The crystal structure and activity of a putative trypanosomal nucleoside phosphorylase; reveal it to be a homodimeric uridine phosphorylase. **Journal of molecular biology**, v. 396, n. 5, p. 1244–59, 12 mar. 2010.
- LAYFIELD, R. et al. Purification of poly-ubiquitinated proteins by S5a-affinity chromatography. **Proteomics**, v. 1, n. 6, p. 773–7, jun. 2001.
- LEE, I.; SCHINDELIN, H. Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 268–78, 25 jul. 2008.
- LEE, S. et al. Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 3, p. 264–71, mar. 2006.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. W. **Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the AMNH ; v. 163, article 3**New York : American Museum of Natural History, , 1979.

Disponível em: <<http://digitallibrary.amnh.org/dspace/handle/2246/1282>>. Acesso em: 9 jan. 2014

LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1305–17, out. 2009.

LEY, V. et al. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, n. 2, p. 649–59, 1 ago. 1988.

LI, J. et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. **Nature medicine**, v. 6, n. 1, p. 49–55, jan. 2000.

LI, W. et al. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. **PloS one**, v. 3, n. 1, p. e1487, jan. 2008.

LICCHESI, J. D. F. et al. An ankyrin-repeat ubiquitin-binding domain determines TRABID's specificity for atypical ubiquitin chains. **Nature structural & molecular biology**, v. 19, n. 1, p. 62–71, jan. 2012.

LIM, K.-L.; LIM, G. G. Y. K63-linked ubiquitination and neurodegeneration. **Neurobiology of disease**, v. 43, n. 1, p. 9–16, jul. 2011.

LING, R. et al. Histidine-tagged ubiquitin substitutes for wild-type ubiquitin in *Saccharomyces cerevisiae* and facilitates isolation and identification of in vivo substrates of the ubiquitin pathway. **Analytical biochemistry**, v. 282, n. 1, p. 54–64, 15 jun. 2000.

LIU, S.; CHEN, Z. J. Expanding role of ubiquitination in NF- $\kappa$ B signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 6–21, jan. 2011.

LOIS, L. M.; LIMA, C. D. Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. **The EMBO journal**, v. 24, n. 3, p. 439–51, 9 fev. 2005.

LOMBARDO, M. E.; ARAUJO, L. S.; BATLLE, A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 8, p. 1263–71, ago. 2003.

LOPEZ, A. D. et al. Proteasomal degradation of Sfp1 contributes to the repression of ribosome biogenesis during starvation and is mediated by the proteasome activator Blm10. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 5, p. 528–40, 1 mar. 2011.

LOPITZ-OTSOA, F. et al. Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs). **Journal of proteomics**, v. 75, n. 10, p. 2998–3014, 6 jun. 2012.

LORICK, K. L. et al. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11364–9, 28 set. 1999.

LOUNTOS, G. T.; TROPEA, J. E.; WAUGH, D. S. Structure of the Trypanosoma cruzi protein tyrosine phosphatase TcPTP1, a potential therapeutic target for Chagas' disease. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 187, n. 1, p. 1–8, jan. 2013.

LOVE, K. R. et al. Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 11, p. 697–705, nov. 2007.

LYAPINA, S. et al. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5520, p. 1382–5, 18 maio 2001.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 14, n. 3, p. 119–24, mar. 1998.

MAGARACI, F. et al. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in Leishmania species and Trypanosoma cruzi. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 22, p. 4714–27, 23 out. 2003.

MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 2, p. 50–2, fev. 2000.

MANNING-CELA, R.; JAISHANKAR, S.; SWINDLE, J. Life-Cycle and Growth-Phase-Dependent Regulation of the Ubiquitin Genes of Trypanosoma cruzi. **Archives of medical research**, v. 37, n. 5, p. 593–601, 2006.

MARÍN, I. et al. Parkin and relatives: the RBR family of ubiquitin ligases. **Physiological genomics**, v. 17, n. 3, p. 253–63, 19 maio 2004.

MATSUMOTO, M. et al. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. **Proteomics**, v. 5, n. 16, p. 4145–51, nov. 2005.

MCCULLOUGH, J. et al. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. **Current biology : CB**, v. 16, n. 2, p. 160–5, 24 jan. 2006.

MCNICOLL, F. et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in Leishmania infantum. **Proteomics**, v. 6, n. 12, p. 3567–81, jun. 2006.

MEANS, A. R. The Year in Basic Science: calmodulin kinase cascades. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 22, n. 12, p. 2759–65, dez. 2008.

MEIERHOFER, D. et al. Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 10, p. 4566–76, out. 2008.

MELLORS, A.; SAMAD, A. The acquisition of lipids by African trypanosomes. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 5, n. 8, p. 239–44, ago. 1989.

MENEZES, J. P. B. et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with Leishmania amazonensis or Leishmania major. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, 28 abr. 2013.

- MEYER, H.; DE SOUZA, W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. **The Journal of protozoology**, v. 23, n. 3, p. 385–90, ago. 1976.
- MEYER, H. H.; WANG, Y.; WARREN, G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. **The EMBO journal**, v. 21, n. 21, p. 5645–52, 1 nov. 2002.
- MICHELLE, C. et al. What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? **Journal of molecular evolution**, v. 68, n. 6, p. 616–28, jun. 2009.
- MICHELS, P. A M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1763, n. 12, p. 1463–77, dez. 2006.
- MILLER, J.; MCLACHLAN, A. D.; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **The EMBO journal**, v. 4, n. 6, p. 1609–14, jun. 1985.
- MIRANDA, K. et al. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 86, n. 5, p. 373–84, maio 2000.
- MIZES, M. A. Protocols in Molecular Parasitology - Culturing and Biological Cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: HYDE, J. E. (Ed.). **Methods in Molecular Biology - Protocols in Molecular Parasitology**. Totowa, NJ: Human Press Inc, 1993. v. 21p. 15–28.
- MIZUNO, E. et al. STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 9, p. 3675–89, set. 2003.
- MOGK, A.; SCHMIDT, R.; BUKAU, B. The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 4, p. 165–72, abr. 2007.
- MOREIRA, W.; LEBLANC, E.; OUELLETTE, M. The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite *Leishmania*. **Free radical biology & medicine**, v. 46, n. 3, p. 367–75, 1 fev. 2009.
- MORO, A. et al. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. **The EMBO journal**, v. 14, n. 11, p. 2483–90, 1 jun. 1995.
- MORRIS, J. C. et al. Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 453–8, 1 maio 2001.
- MUHICH, M. L.; BOOTHROYD, J. C. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. **Molecular and cellular biology**, v. 8, n. 9, p. 3837–46, set. 1988.

- MUKHOPADHYAY, D.; RIEZMAN, H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 315, n. 5809, p. 201–5, 12 jan. 2007.
- MULLALLY, J. E.; CHERNOVA, T.; WILKINSON, K. D. Doa1 is a Cdc48 adapter that possesses a novel ubiquitin binding domain. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 3, p. 822–30, fev. 2006.
- MURATANI, M.; TANSEY, W. P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 3, p. 192–201, mar. 2003.
- NA, C. H.; PENG, J. Analysis of ubiquitinated proteome by quantitative mass spectrometry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 893, p. 417–29, jan. 2012.
- NAKAYASU, E. S. et al. Evaluation of selected binding domains for the analysis of ubiquitinated proteomes. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, n. 8, p. 1214–23, ago. 2013.
- NARE, B. et al. PTR1-dependent synthesis of tetrahydrobiopterin contributes to oxidant susceptibility in the trypanosomatid protozoan parasite *Leishmania major*. **Current genetics**, v. 55, n. 3, p. 287–99, jun. 2009.
- NARE, B.; HARDY, L. W.; BEVERLEY, S. M. The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13883–91, 23 maio 1997.
- NATHAN, J. A. et al. Why do cellular proteins linked to K63-polyubiquitin chains not associate with proteasomes? **The EMBO journal**, v. 32, n. 4, p. 552–65, 20 mar. 2013.
- NICASTRO, G. et al. Understanding the role of the Josephin domain in the PolyUb binding and cleavage properties of ataxin-3. **PLoS one**, v. 5, n. 8, p. e12430, jan. 2010.
- NIELSEN, M. L. et al. Iodoacetamide-induced artifact mimics ubiquitination in mass spectrometry. **Nature methods**, v. 5, n. 6, p. 459–60, jun. 2008.
- NIJMAN, S. M. B. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 773–86, 2 dez. 2005.
- NOSEI, C.; AVILA, J. L. Serine hydroxymethyltransferase activity in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and American *Leishmania* spp. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 81, n. 3, p. 701–4, jan. 1985.
- NUNES, L. R. et al. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 188, n. 2, p. 157–68, 1 abr. 1997.
- O'DALY, J. A.; RODRIGUEZ, MA. B. Protein and nucleotide contamination of bovine liver catalase used in culture medium explains growth of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 1–2, 1987.

OCHS, D. E. et al. Maxicircle genomic organization and editing of an ATPase subunit 6 RNA in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 76, n. 1-2, p. 267–78, 1996.

OHI, M. D. et al. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. **Nature structural biology**, v. 10, n. 4, p. 250–5, abr. 2003.

OLSEN, J. V et al. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 4, n. 12, p. 2010–21, dez. 2005.

ONG, H. B. et al. Dissecting the metabolic roles of pteridine reductase 1 in *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10429–38, 25 mar. 2011.

ONG, S.-E. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 5, p. 376–386, 20 maio 2002.

ONG, S.-E.; KRATCHMAROVA, I.; MANN, M. Properties of <sup>13</sup>C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). **Journal of proteome research**, v. 2, n. 2, p. 173–81, 2003.

ONG, S.-E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature chemical biology**, v. 1, n. 5, p. 252–62, out. 2005.

**Organização estrutural - Atlas Didático - O ciclo de vida do Trypanosoma cruzi - LabSpace - The Open University**. Disponível em:

<<http://labspace.open.ac.uk/mod/resource/view.php?id=459544>>.

ORLOWSKI, M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. **Biochemistry**, v. 29, n. 45, p. 10289–97, 13 nov. 1990.

OSHIKAWA, K. et al. Proteome-wide identification of ubiquitylation sites by conjugation of engineered lysine-less ubiquitin. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 2, p. 796–807, 3 fev. 2012.

OSSAREH-NAZARI, B. et al. Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. **The Journal of cell biology**, v. 204, n. 6, p. 909–17, 17 mar. 2014.

OUNI, I.; FLICK, K.; KAISER, P. Ubiquitin and transcription: The SCF/Met4 pathway, a (protein-) complex issue. **Transcription**, v. 2, n. 3, p. 135–139, jan. 2011.

PAHO, P. H. O. **Enfermedad de Chagas: transmisión por el principal vector**. Disponível em:

<[http://new.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/CD/Chagas/int\\_trans\\_vector\\_chagas\\_800.jpg](http://new.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/CD/Chagas/int_trans_vector_chagas_800.jpg)>.

PAHO, P. H. O. Reunión Sudamericana de Iniciativa Subregionales de Prevención , Control y Atención de la Enfermedad de Chagas. p. 29–31, 2012.

- PAOLINI, R.; KINET, J. P. Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors. **The EMBO journal**, v. 12, n. 2, p. 779–86, fev. 1993.
- PECK, R. F. et al. The LAMP-like protein p67 plays an essential role in the lysosome of African trypanosomes. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 4, p. 933–46, maio 2008.
- PELLÉ, R. et al. The African trypanosome cyclophilin A homologue contains unusual conserved central and N-terminal domains and is developmentally regulated. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 181–191, maio 2002.
- PENG, J. et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 921–6, ago. 2003.
- PENG, J. Evaluation of proteomic strategies for analyzing ubiquitinated proteins. **BMB reports**, v. 41, n. 3, p. 177–83, 31 mar. 2008.
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual review of biochemistry**, v. 70, p. 503–33, jan. 2001.
- PICKART, C. M.; COHEN, R. E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 3, p. 177–87, mar. 2004.
- PORNILLOS, O. et al. Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. **The EMBO journal**, v. 21, n. 10, p. 2397–406, 15 maio 2002.
- QIAN, S.-B. et al. CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 551–5, 23 mar. 2006.
- RAASI, S. et al. Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 8, p. 708–14, ago. 2005.
- RABBANI, A.; AKRABAWI, S.; DAGHIR, N. J. Effect of dietary folic acid deficiency on serine-glycine interconversion and the activity of liver serine hydroxymethyl transferase in the chick. **Poultry science**, v. 52, n. 5, p. 1962–7, set. 1973.
- RAIBORG, C.; STENMARK, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature**, v. 458, n. 7237, p. 445–52, 26 mar. 2009.
- RAMANATHAN, H. N.; ZHANG, G.; YE, Y. Monoubiquitination of EEA1 regulates endosome fusion and trafficking. **Cell & bioscience**, v. 3, n. 1, p. 24, jan. 2013.
- RAMÍREZ, J. D. et al. Contemporary cryptic sexuality in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular ecology**, v. 21, n. 17, p. 4216–26, set. 2012.
- RANGEL-ALDAO, R. et al. Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemistry international**, v. 17, n. 2, p. 337–44, ago. 1988.
- RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 3, p. 663–70, 1 fev. 2003.

REYES-TURCU, F. E.; WILKINSON, K. D. Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. **Chemical reviews**, v. 109, n. 4, p. 1495–508, abr. 2009.

ROBINSON, P. A.; ARDLEY, H. C. Ubiquitin-protein ligases. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 22, p. 5191–4, 15 out. 2004.

SADEH, R. et al. The N-terminal domain of MyoD is necessary and sufficient for its nuclear localization-dependent degradation by the ubiquitin system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 41, p. 15690–5, 14 out. 2008.

SAEKI, Y. et al. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. **The EMBO journal**, v. 28, n. 4, p. 359–71, 18 fev. 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, dez. 1977.

SATO, M. et al. Fertilization-induced K63-linked ubiquitylation mediates clearance of maternal membrane proteins. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 6, p. 1324–31, mar. 2014.

SCALBERT, A. et al. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. **Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society**, v. 5, n. 4, p. 435–458, dez. 2009.

SCHEEL, H.; TOMIUK, S.; HOFMANN, K. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 21, p. 2845–52, 1 nov. 2003.

SCHEFFNER, M. et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495–505, 5 nov. 1993.

SCHELTEMA, R. A. et al. The potential of metabolomics for Leishmania research in the post-genomics era. **Parasitology**, v. 137, n. 9, p. 1291–302, ago. 2010.

SCHLESINGER, D. H.; GOLDSTEIN, G. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. **Nature**, v. 255, n. 5507, p. 423–4, 29 maio 1975.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14–21, 2010.

SCHULMAN, B. A.; HARPER, J. W. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 5, p. 319–31, maio 2009.

SEYFRIED, N. T. et al. Systematic approach for validating the ubiquitinated proteome. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 11, p. 4161–9, 1 jun. 2008.



- SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual review of microbiology**, v. 49, p. 117–43, jan. 1995.
- SHARP, P. M.; LI, W. H. Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats. **Journal of molecular evolution**, v. 25, n. 1, p. 58–64, jan. 1987.
- SHIBA, Y. et al. GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 8, p. 7105–11, 20 fev. 2004.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 6, p. 845–52, mar. 2012.
- SHIMAMURA, M.; HAGER, K. M.; HAJDUK, S. L. The lysosomal targeting and intracellular metabolism of trypanosome lytic factor by *Trypanosoma brucei brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 115, n. 2, p. 227–37, jul. 2001.
- SHLOMAI, J. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 623–47, set. 2004.
- SILVA, A. M.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; COOMBS, G. H. Metabolic variation during development in culture of *Leishmania donovani* promastigotes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 12, p. e1451, dez. 2011.
- SILVA, R. G.; SCHRAMM, V. L. Uridine phosphorylase from *Trypanosoma cruzi*: kinetic and chemical mechanisms. **Biochemistry**, v. 50, n. 42, p. 9158–66, 25 out. 2011.
- SLAGSVOLD, T. et al. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19600–6, 20 maio 2005.
- SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 77, n. 6, p. 461–8, jan. 1991.
- SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Cytochemical analysis at the fine-structural level of trypanosomatids stained with phosphotungstic acid. **The Journal of protozoology**, v. 26, n. 4, p. 551–7, nov. 1979.
- SOUZA, W. DE. Kinetoplastid Biology and Disease From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids : dreams and reality . v. 21, p. 1–21, 2002.
- STAMENOVA, S. D. et al. Ubiquitin binds to and regulates a subset of SH3 domains. **Molecular cell**, v. 25, n. 2, p. 273–84, 26 jan. 2007.
- STAVREVA, D. A et al. Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 13, p. 5131–45, jul. 2006.
- STEVERDING, D. Ubiquitination of plasma membrane ectophosphatase in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology research**, v. 98, n. 2, p. 157–61, jan. 2006.

- SWINDLE, J. et al. The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO journal**, v. 7, n. 4, p. 1121–7, abr. 1988.
- TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annual review of biochemistry**, v. 53, p. 749–90, jan. 1984.
- TAKAGI, M. et al. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4504–10, nov. 1997.
- TAR, K. et al. Proteasomes associated with the Blm10 Activator Protein Antagonize Mitochondrial Fission Through Degradation of the Fission Protein Dnm1. **The Journal of biological chemistry**, 6 mar. 2014.
- TASHIRO, M. et al. NMR structure of ubiquitin-like domain in PARKIN: gene product of familial Parkinson's disease. **Journal of biomolecular NMR**, v. 25, n. 2, p. 153–6, fev. 2003.
- TAYEH, M. A.; MARLETTA, M. A. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 33, p. 19654–8, 25 nov. 1989.
- TAYLOR, G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. **Current opinion in structural biology**, v. 6, n. 6, p. 830–7, dez. 1996.
- TEIXEIRA, S. M. R.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, n. 1, p. 148–58, jan. 2003.
- THROWER, J. S. et al. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. **The EMBO journal**, v. 19, n. 1, p. 94–102, 4 jan. 2000.
- TIBBETTS, A. S.; APPLING, D. R. Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. **Annual review of nutrition**, v. 30, p. 57–81, 21 ago. 2010.
- TIETZ, A.; LINDBERG, M.; KENNEDY, E. P. A new pteridine-requiring enzyme system for the oxidation of glyceryl ethers. **The Journal of biological chemistry**, v. 239, p. 4081–90, dez. 1964.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, set. 1979.
- TOZZI, M. G. et al. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. **The FEBS journal**, v. 273, n. 6, p. 1089–101, mar. 2006.
- TRIPODI, K. E. J. et al. Functional characterization of front-end desaturases from trypanosomatids depicts the first polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway from a parasitic protozoan. **The FEBS journal**, v. 273, n. 2, p. 271–80, jan. 2006.

- TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472–81, 1 maio 2001.
- UDESCHI, N. D. et al. Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K- $\epsilon$ -GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 12, n. 3, p. 825–31, mar. 2013a.
- UDESCHI, N. D. et al. Large-scale identification of ubiquitination sites by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 8, n. 10, p. 1950–60, out. 2013b.
- ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20365–9, 1 set. 1995.
- USTRELL, V. et al. PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. **The EMBO journal**, v. 21, n. 13, p. 3516–25, 1 jul. 2002.
- VAN WIJK, S. J. L.; TIMMERS, H. T. M. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 4, p. 981–93, abr. 2010.
- VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 2, p. 223–40, jun. 1995.
- VASILESCU, J. et al. Proteomic Analysis of Ubiquitinated Proteins from Human MCF-7 Breast Cancer Cells by Immunoaffinity Purification and Mass Spectrometry research articles. p. 2192–2200, 2005.
- VERMA, R. et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5593, p. 611–5, 18 out. 2002.
- VICKERMAN, K.; TETLEY, L. Recent ultrastructural studies on trypanosomes. **Annales de la Société belge de médecine tropicale**, v. 57, n. 4-5, p. 441–57, jan. 1977.
- VIJAY-KUMAR, S.; BUGG, C. E.; COOK, W. J. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 194, n. 3, p. 531–44, 5 abr. 1987.
- VINCENT, I. M. et al. Untargeted metabolomics reveals a lack of synergy between nifurtimox and eflornithine against *Trypanosoma brucei*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p. e1618, jan. 2012.
- WAGNER, S. et al. Ubiquitin binding mediates the NF- $\kappa$ B inhibitory potential of ABIN proteins. **Oncogene**, v. 27, n. 26, p. 3739–45, 12 jun. 2008.
- WAGNER, S. A et al. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 10, n. 10, p. M111.013284, out. 2011.

- WALDEN, H. et al. The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. **Molecular cell**, v. 12, n. 6, p. 1427–37, dez. 2003.
- WANG, C. et al. Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. **Nature structural biology**, v. 8, n. 1, p. 47–51, jan. 2001.
- WANG, J. et al. Pterin and folate reduction by the *Leishmania tarentolae* H locus short-chain dehydrogenase/reductase PTR1. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 342, n. 2, p. 197–202, 15 jun. 1997.
- WANG, J. et al. Conformational transition associated with E1-E2 interaction in small ubiquitin-like modifications. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 30, p. 20340–8, 24 jul. 2009a.
- WANG, T. et al. Evidence for bidentate substrate binding as the basis for the K48 linkage specificity of otubain 1. **Journal of molecular biology**, v. 386, n. 4, p. 1011–23, 6 mar. 2009b.
- WANG, X. et al. Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. **The Journal of cell biology**, v. 177, n. 4, p. 613–24, 21 maio 2007.
- WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC genomics**, v. 10, p. 255, jan. 2009.
- WEBSTER, P.; RUSSELL, D. G. The flagellar pocket of trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 9, n. 6, p. 201–206, 1993.
- WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. March, p. 169–178, 2001.
- WELCHMAN, R. L.; GORDON, C.; MAYER, R. J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 8, p. 599–609, ago. 2005.
- WENDEL, S. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? **Acta Tropica**, v. 115, n. 1, p. 28–34, 2010.
- WENZEL, D. M. et al. UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. **Nature**, v. 474, n. 7349, p. 105–8, 2 jun. 2011.
- WERTZ, I. E. et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 694–9, 5 ago. 2004.
- WHITBY, F. G. et al. Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 52, p. 34983–91, 25 dez. 1998.
- WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases. 2010.

WILKINSON, K. D.; URBAN, M. K.; HAAS, A. L. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 255, n. 16, p. 7529–32, 25 ago. 1980.

WINBORN, B. J. et al. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26436–43, 26 set. 2008.

WIŚNIEWSKI, J. R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 359–62, maio 2009.

WIŚNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; MANN, M. Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 12, p. 5674–8, dez. 2009.

WOELK, T. et al. Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. **Nature cell biology**, v. 8, n. 11, p. 1246–54, nov. 2006.

WOLF, D. H.; HILT, W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1695, n. 1-3, p. 19–31, 29 nov. 2004.

WÜLFING, C.; LOMBARDERO, J.; PLÜCKTHUN, A. An Escherichia coli protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2895–901, 28 jan. 1994.

XU, C. et al. An improved workflow for identifying ubiquitin/ubiquitin-like protein conjugation sites from tandem mass spectra. **Proteomics**, v. 13, n. 17, p. 2579–84, set. 2013.

XU, G.; PAIGE, J. S.; JAFFREY, S. R. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 868–73, ago. 2010.

XU, P. et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 133–45, 3 abr. 2009.

XU, P. et al. Stable isotope labeling with amino acids in Drosophila for quantifying proteins and modifications. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 9, p. 4403–12, 7 set. 2012.

YAO, T.; COHEN, R. E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 403–7, 26 set. 2002.

YE, Y. et al. Dissection of USP catalytic domains reveals five common insertion points. **Molecular bioSystems**, v. 5, n. 12, p. 1797–808, dez. 2009.

YOUNG, P. et al. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5461–7, 6 mar. 1998.

ZAISS, D. M. et al. The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. **FEBS letters**, v. 457, n. 3, p. 333–8, 3 set. 1999.

ZHANG, Y. et al. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 24, p. 13354–9, 21 nov. 2000.

ZHANG, Y. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. **Genes & development**, v. 17, n. 22, p. 2733–40, 15 nov. 2003.

ZHAO, J. et al. Parkin is recruited to the centrosome in response to inhibition of proteasomes. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 19, p. 4011–9, 1 out. 2003.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–4, nov. 2009.