

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ELICIANE CEVOLANI MATTOS

**Interação Parasita-Célula hospedeira:
Modificação de proteínas de *Trypanosoma cruzi*
durante adesão à matriz extracelular**

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
14/11/2013

ELICIANE CEVOLANI MATTOS

**Interação Parasita-Célula hospedeira:
Modificação de proteínas de *Trypanosoma cruzi*
durante adesão à matriz extracelular**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências Biológicas
(Bioquímica).*

Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de
Biblioteca e Documentação do Conjunto das
Químicas da USP.

Mattos, Eliciane Cevolani

M444i Interação parasita-célula hospedeira : modificação de proteínas
de *Trypanosoma cruzi* durante adesão à matriz extracelular /
Eliciane Cevolani Mattos. -- São Paulo, 2013.
1v. (Paginação irregular)

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Alves, Maria Julia Manso

1. Fosforilação de proteína : Bioquímica 2. Bioquímica :
Trypanosoma I. T. II. Alves, Maria Julia Manso, orientador.

574.19245

CDD

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus passos...

À minha amada mãe Madalena C. Mattos por todo apoio e amor durante esses anos de distância. Por nossas longas conversas ao telefone. Por ser um grande exemplo de pessoa lutadora e vencedora, por me dar tanta força. Ao meu pai Rui Mattos por todo o carinho e todo o esforço me ajudando sempre. Eu amo muito vocês. Aos meus irmãos, cunhada e meus queridos sobrinhos pelo carinho e amor.

Ao Rubens D. M. Magalhães por tudo (é tanta coisa pra agradecer!), pelo amor, companheirismo e pela força. Você é muito importante para mim, amo você demais.

À minha orientadora Dra. Maria Júlia M. Alves por contribuir fortemente para meu amadurecimento científico e pessoal, pelos conselhos, conversas e apoio durante esses cinco anos. Por ser um grande exemplo a seguir.

Ao Prof. Dr. Walter Colli por me dar a satisfação de dividir um pouco de seu conhecimento comigo, por toda a ajuda com a escrita de artigos e cartas em inglês.

Ao querido Prof. Dr. Ivan Schumacher pela ajuda com os experimentos, pela amizade e pelas valiosas conversas regadas de “stefânias”...

Ao querido Roberto Zangrandi (Robertinho), pela enorme paciência, por sempre me ouvir, pelos milhões de parasitas e por me ajudar tanto com meus experimentos. Por ser um exemplo de alegria acima de tudo. Pela amizade e pelos deliciosos e carinhosos cafés.

À “mamãe” Célia A. L. Braga (Celinha), por todos os conselhos, por sempre ouvir meus desabafos e choros, pela ajuda no biotério e nos monoclonais e pela nossa amizade.

Às minhas grandes amigas e doutoras Denise A. Berti e Mariana L. Duarte por todos os conselhos, pela força, pelas grandes conversas e por serem tão pacientes em ouvir sempre os meus desabafos.

Ao meu amigo Florêncio Freitas, por todas as conversas e pela agradável companhia nos nossos almoços.

Ao Carlos Gomes (Charles) pela amizade e pelo bom humor exemplar e contagiante.

À amiga Dra. Swiany S. Lima pela nossa amizade, por me ouvir sempre pacientemente e por toda a ajuda.

Ao Dr. Raphael Queiroz por todas as conversas, caronas e ajuda com experimentos.

Ao Dr. J. Pedro Angeli pela amizade, por todas as conversas e pelas caronas.

À Dra. Chrislaine Soares e Milton Pereira pela ajuda e pelas discussões científicas.

Aos Profs. Ricardo Giordano e Deborah Schetman e todos os alunos do lab 1020 por toda ajuda e aos demais colegas de IQ-USP.

Aos amigos da Vila do Chaves (conjunto das kitnets) por toda ajuda, companhia de finais de semana, pelas maravilhosas conversas, pelos cafés e churrascos.

Aos colegas da Secretaria de Pós-graduação pela ajuda e paciência com minhas infinitas perguntas.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado direto concedida e a FAPESP pelo suporte financeiro do projeto.

A todos aquele que tenha me esquecido, peço desculpas... muito obrigada!

*“...é que tem mais chãõ nos meus olhos,
do que cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos,
do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração
do que medo na minha cabeça.”*

Cora Coralina

RESUMO

Mattos, E.C. **Interação parasita-célula hospedeira: Modificação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* durante adesão a matriz extracelular.** 2013. Número de páginas: 151. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A doença de Chagas foi inicialmente descrita em 1090 e após mais de 100 anos de investigações sobre essa doença, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos ativados no parasita durante sua adesão e invasão à célula hospedeira. Glicoproteínas de massa molecular de 85kDa localizadas na membrana do parasita foram identificadas como principais elementos responsáveis pela interação com o hospedeiro. Essas proteínas também são capazes de se ligar a elementos da matriz extracelular (ECM) da célula hospedeira e esse evento parece ser crucial para modulação da adesão e invasão do parasita e consequente avanço da infecção. Embora diferentes elementos tenham sido identificados no hospedeiro como componentes da via de resposta a adesão ao parasita, as modificações induzidas pela sua ligação ao hospedeiro é ainda pouco conhecida. Modificações pós-traducionais de proteínas, incluindo a fosforilação, têm sido utilizadas por diferentes organismos na transdução de sinais extracelulares. Dessa forma, a identificação de proteínas diferencialmente fosforiladas durante a adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* a ECM, fibronectina e laminina foi o objetivo dessa tese. Tripomastigotas foram incubados com ECM, fibronectina-, laminina- ou BSA- previamente aderidos em placas de cultura de células. Em seguida, os parasitas foram coletados e suas proteínas extraídas e separadas por 2D-PAGE. Os géis de eletroforese foram corados com Pro-Q Diamond (para identificação de proteínas fosforiladas) e posteriormente com coomassie colloidal (identificação de proteínas totais). Os *spots* com diferença significativa na coloração com Pro-Q Diamond ($p < 0,05$) foram

identificados por LC-MS/MS. 54 *spots* foram diferencialmente fosforilados durante a adesão dos parasitas a ECM, dos quais 39 sofreram um aumento da intensidade de fosforilação e 15 uma redução. Já dos 43 *spots* diferencialmente fosforilados durante incubação com laminina, 16 aumentaram a fosforilação enquanto 27 sofreram redução da intensidade de fosforilação. Por fim, após incubação com fibronectina, dos 50 *spots* selecionados, 15 *spots* sofreram aumento da intensidade de fosforilação e 35 sofreram redução. Após identificação dos *spots*, as modificações por fosforilação/desfosforilação de proteínas de função desconhecida (*hypothetical proteins*), proteínas do citoesqueleto, proteínas do choque térmico (HSPs) e proteínas componentes do proteassomo do parasita foram as mais evidentes. A validação por *immunoblotting* de algumas proteínas identificadas indicou que a desfosforilação de proteínas do citoesqueleto junto com a fosforilação de proteínas do choque térmico são os principais eventos durante a resposta do parasita a adesão a ECM e a seus elementos. Além disso, a desfosforilação de ERK 1/2 observada indicou uma inativação dessa proteína em parasitas aderidos a fibronectina e laminina. Os resultados obtidos nessa tese sugerem uma provável relação entre modificações de proteínas do citoesqueleto e HSPs com a capacidade de internalização dos parasitas na célula hospedeira.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, matriz extracelular, fosforilação, citoesqueleto, proteínas do choque térmico.

ABSTRACT

Mattos, E.C. **Parasite-host cell interaction: Modifications of *Trypanosoma cruzi* proteins during the adhesion to extracellular matrix.** 2013. Number of pages .151. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The Chagas disease was firstly described in 1909. After more than 100 years of investigation about this sickness much less is known about the mechanism triggered in the parasite during the adhesion and invasion to the host cell. 85kDa glycoproteins were identified as the major element responsible for the attachment to the host. In addition, these proteins are able to binding to extracellular matrix elements and host cytoskeletal proteins and it event appears to be an essential step in host cell invasion by *T. cruzi*. Although downstream signal modifications have been studied in host cells upon parasite binding, the molecular changes induced on the parasite by ligand binding are largely unknown. Since post-translational modification of proteins by phosphorylation is one of the most important mechanisms employed by organisms to transduce external signals, identification of proteins modified upon adhesion of *T. cruzi* trypomastigotes to ECM, laminin and fibronectin of the host cell was pursued. Trypomastigotes (Y strain) were incubated with ECM, laminin-, fibronectin- or BSA-coated surfaces, followed by 2D-PAGE stained with Pro-Q Diamond (phosphorylated protein detection) followed by colloidal coomassie stain (total protein identification). Proteins with significant differences in Pro-Q Diamond stain ($p < 0.05$) were identified by LC-MS/MS. 54 spots were differentially phosphorylated during parasite adhesion to ECM, in which 39 spots have increased their phosphorylation level and 15 have decreased their phosphorylation. From the 43 spots presenting modification to the phosphorylation on incubation with laminin, 16 corresponded to cases of increase of

phosphorylation and 27 to cases of dephosphorylation. After incubation with fibronectin: from the 50 spots selected, 15 corresponded to increase of phosphorylation and 35 to dephosphorylation. The results show phosphorylation/dephosphorylation modifications of unknown proteins, parasite cytoskeletal proteins (alpha and beta tubulin and paraflagellar-rod proteins), heat shock proteins and proteasome proteins. The validation by immunoblotting of proteins and their phosphorylation intensities indicates that cytoskeletal protein dephosphorylation in addition to heat shock proteins phosphorylation are the most important event during the trypomastigotes adhesion to the ECM. Looking for downstream signaling, dephosphorylation of ERK1/2 was also shown in trypomastigotes adhered to fibronectin or laminin, suggesting its inactivation. Thereby, those results suggest a possible correlation between cytoskeletal proteins and HSPs modification and the ability of parasite to internalize into host cells.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, extracellular matrix, phosphorylation, parasite cytoskeleton, heat shock proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas..... | 22 |
| Figura 2. Três formas de vida do <i>T. cruzi</i> : tripomastigota, amastigota e epimastigota, respectivamente..... | 24 |
| Figura 3. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 25 |
| Figura 4. Organização estrutural da matriz extracelular e modelos de fibronectina e laminina..... | 32 |
| Figura 5. Organização estrutural de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> | 39 |
| Figura 6. Padronização da eletroforese bidimensional para extratos de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> | 57 |
| Figura 7. Padronização do tempo de incubação de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> com a matriz extracelular (ECM)..... | 58 |
| Figura 8. Perfil de proteínas fosforiladas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados com ECM ou BSA (controle) durante 120 min..... | 59 |
| Figura 9. Proteínas diferencialmente modificadas durante adesão de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> a ECM..... | 60 |
| Figura 10. Número de <i>spots</i> diferencialmente modificadas durante adesão de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> a ECM por 120 min..... | 64 |
| Figura 11. Caracterização do anticorpo monoclonal obtido, nomeado 2/55..... | 67 |
| Figura 12. Identificação dos epítomos de HSP60 e predição da estrutura e localização do peptídeo selecionado..... | 68 |
| Figura 13. Identificação dos epítomos de HS85 e predição da estrutura e localização do peptídeo selecionado..... | 69 |
| Figura 14. Identificação dos epítomos de GRP78 e predição da estrutura e localização do peptídeo selecionado..... | 70 |
| Figura 15. Reatividade dos anticorpos anti-HSPs obtidos..... | 71 |
| Figura 16. Proteínas do choque térmico são diferencialmente fosforiladas na adesão de tripomastigotas a ECM..... | 72 |
| Figura 17. Validação do aumento da fosforilação de HSPs por <i>immunoblotting</i> | 73 |
| Figura 18. Proteínas do citoesqueleto são diferencialmente fosforiladas durante 120 min de adesão de tripomastigotas a ECM..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19. Redução da expressão de tubulina durante a adesão a matriz extracelular..... | 76 |
| Figura 20. Redução da poliglutamilação de tubulina durante a adesão a matriz extracelular..... | 77 |
| Figura 21. Redução da fosforilação e possível expressão de proteínas do <i>paraflagellar rod</i> durante a adesão a matriz extracelular..... | 79 |
| Figura 22. Mudança na distribuição de proteínas do <i>paraflagellar rod</i> fosforiladas de tripomastigotas incubados com BZ3..... | 80 |
| Figura 23. Perfil de proteínas fosforiladas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados com fibronectina, laminina ou BSA durante 120 min..... | 82 |
| Figura 24. Proteínas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> modificadas por fosforilação/desfosforilação durante adesão a fibronectina ou laminina por 120min..... | 84 |
| Figura 25. Proteínas diferencialmente modificadas durante adesão de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> a ECM..... | 90 |
| Figura 26. Variação da fosforilação de α -tubulina durante incubação de tripomastigotas com fibronectina ou laminina por 120 min..... | 94 |
| Figura 27. Localização sub-celular de α -tubulina de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> durante incubação fibronectina ou laminina por 120 min..... | 95 |
| Figura 28. Variação da fosforilação de proteínas do <i>paraflagellar rod</i> durante incubação de tripomastigotas com fibronectina ou laminina por 120 min..... | 97 |
| Figura 29. Localização sub-celular de proteínas do <i>paraflagellar rod</i> (PAR) de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> durante incubação fibronectina ou laminina por 120 min..... | 98 |
| Figura 30. Fosforilação de ERK 1/2 ao longo da incubação de tripomastigotas com fibronectina ou laminina..... | 100 |
| Figura 31. Variação na localização sub celular de pERK 1/2 ao longo da incubação de tripomastigotas com fibronectina e laminina..... | 101 |
| Figura 32. Representação esquemática das principais proteínas identificadas no fosfoproteoma de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> aderidos a ECM, fibronectina ou laminina..... | 130 |
| Tabela 1. Identificação das proteínas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> modificadas durante adesão a ECM por 120 min..... | 62 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 2. Identificação das proteínas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> diferencialmente fosforiladas durante adesão a fibronectina..... | 85 |
| Tabela 3. Identificação das proteínas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> diferencialmente fosforiladas durante adesão a laminina..... | 88 |
| Tabela 4. Peptídeos com resíduos de aminoácidos fosforilados identificados por análise dos espectros pelo programa Mascot..... | 91 |
| Tabela 5. Proteínas modificadas por fosforilação/desfosforilação durante adesão a ECM, fibronectina ou laminina..... | 108 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE: eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (*two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*)

ANOVA: análise de Variância (*analysis of variance*)

ATP/ADP: adenosil trifosfato/ adenosil bifosfato (*adenosil triphosphate/ adenosil biphosphate*)

BSA: albumina de soro bovino (*bovinum serum albumin*)

BZ3: (3-(3,5-dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonicacid-(4-(thiazol-2-ylsulfamyl)-phenyl)-amide)

CAMK2: proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase)

cAMP: adenosina monofosfato cíclico (*cyclic monophosphate adenosine*)

Cdk1: quinase dependente de ciclina 1 (*cyclin dependente kinase 1*)

CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CK18: citoqueratina 18 (*cytokeratin 18*)

CK2: caseína quinase 2 (*casein kinase 2*)

CKI: caseína quinase I (*casein kinase I*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: dimetil sulfóxido (*dimethyl sulfoxide*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (*desoxyribonucleic acid*)

DTT: ditioneitol (*dithiothreitol*)

ECM: matriz extracelular (*extracellular matrix*)

EF2: fator de alongação 2 (*elongation factor 2*)

EGF: fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*)

EGTA: ácido etileno glicol tetracético (*ethylene glycol tetracetic acid*)

EHS: Engelbreth-Holm-Swarm

eIF5A: fator de iniciação eucariótico 5A (*eukaryotic initiation fator 5A*)

ERK 1/2: quinase regulada por fator externo (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*)

FcaBP: proteína flagelar ligadora de cálcio (*flagellar calcium-binding protein*)

GAPDH: Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (*glyceraldehy 3-phosphate dehydrogenase*)

Gp: glicoproteína (*glycoprotein*)

GRP78: proteína regulada por glicose 78 (*glucose regulated protein 78*).

HDAC6: desacetilase de histona 6 (*histone deacetylase 6*)

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HSP: proteína do choque térmico (*heat shock protein*)

IgG: imunoglobulina G (*immunoglobulin G*)

kDa: Quilo Daltons (*kilo Daltons*)

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida – Espectrometria de massas (*Liquid-Chromatography Mass Spectrometry*)

Mab: anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody*)

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen activated protein kinase*)

MEM: meio essencial mínimo (*Minimum essential medium Eagle*)

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro (*messenger ribonucleic acid*)

NO: óxido Nítrico (*nitric oxide*)

PAR/ PRF: *paraflagellar rod*

PBS: tampão fosfato (*phosphate buffered saline*)

PFA: para-formaldeído (*paraformadehyde*)

PKA: proteína quinase A (*protein kinase A*)

PKC: proteína quinase C (*protein kinase C*)

PKs: proteínas quinases (*proteins kinases*)

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila (*phenylmethysulphonyl fluoride*)

PP1: proteína fosfatase 1 (*protein phosphatase 1*)

Ppp1cc: subunidade catalítica gamma de Serina/treonina proteína fosfatase PP1 (*Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit*)

PPP2A: proteína fosfatase 2A (*protein phosphatase 2A*)

PT1b: proteína tirosina fosfatase 1b (*protein tyrosine phosphatase 1b*)

PT2A: proteína tirosina fosfatase 2A (*protein tyrosine phosphatase 2A*)

PTMs: modificações pós traducionais (*post-translational modifications*)

RE: retículo endoplasmático (*endoplasmatic reticulum*)

RNAi: ácido ribonucleico de interferência (*interference ribonucleic acid*)

RPMI: meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

SAPA: *shed acute phase antigen*

SDS-PAGE: Gel de eletroforese de policrilamida e dodecyl sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide gel electrophoresis*)

Ser: serina (*serine*)

SFB: soro fetal bovino (*bovine fetal serum*)

SILAC: cultivo celular com aminoácidos contendo isótopos estáveis (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)

Sirt2: sirtuína 2 (*sirtuin 2*)

TBS: tampão Tris (*tris buffered saline*)

TBS-T: tampão tris com Tween 20 (*tris buffered saline with Tween 20*).

TcMAPK2: proteína quinase de *Trypanosoma cruzi* ativada por mitógeno (*T. cruzi mitogen activated protein kinase*)

TGF- β : fator de transformação β (*transforming growth factor β*)

Thr: treonina (*threonin*)

TrKC: tirosina quinase C (*tyrosin kinase C*)

TRIS: Tris (Hidroximetil) aminometano

TrKA: tirosina quinase A (*tyrosin kinase A*)

TS: transialidase (*trans sialidase*)

WHO: Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1. A Doença de Chagas..... | 21 |
| 1.2. O agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i> | 23 |
| 1.3. Interação <i>Trypanosoma cruzi</i> – célula hospedeira..... | 25 |
| 1.3.1. Atuação da Superfamília gp85 /Trans-sialidases de <i>T. cruzi</i> | 27 |
| 1.3.2. A matriz extracelular..... | 30 |
| 1.3.3. Interação <i>T. cruzi</i> – matriz extracelular..... | 32 |
| 1.3.4. Atuação das Fosfatases e quinases..... | 36 |
| 1.3.5. Envolvimento do citoesqueleto em cascatas de sinalização..... | 38 |
| 2. OBJETIVOS | 41 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 3.1. Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 43 |
| 3.2. Incubação do parasita com ECM e seus elementos: laminina e fibronectina..... | 43 |
| 3.3. Obtenção de extrato protéico celular..... | 44 |
| 3.4. Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)..... | 44 |
| 3.5. Sequenciamento por Espectrometria de Massas..... | 45 |
| 3.6. Produção de anticorpo monoclonal..... | 47 |
| 3.7. Desenvolvimento de Peptídeos para obtenção de anticorpos policlonais..... | 49 |
| 3.8. Incorporação de ³⁵ S - Metionina e imunoprecipitação de Tubulina..... | 50 |
| 3.9. Imunoprecipitação e <i>Immunoblotting</i> | 51 |
| 3.10. Imunofluorescência..... | 53 |
| 3.11. Tratamento de tripomastigotas com inibidor de fosfatase..... | 54 |
| 4. RESULTADOS | 56 |
| Parte I – Resposta do parasita a adesão a matriz extracelular..... | 56 |

| | |
|---|------------|
| 4.1. Padronização de condições experimentais: tempo de incubação de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> com a matriz extracelular e eletroforese bidimensional dos extratos..... | 56 |
| 4.2. Adesão de tripomastigotas à matriz extracelular induz mudanças no perfil de fosforilação de proteínas..... | 58 |
| 4.3. Obtenção de anticorpos para validação das proteínas identificadas..... | 65 |
| 4.3.1. Obtenção de anticorpo monoclonal anti proteínas do <i>paraflagellar rod</i> | 66 |
| 4.3.2. Obtenção de anticorpos policlonais anti proteínas do choque térmico..... | 67 |
| 4.4. Adesão de tripomastigotas a ECM induz aumento na fosforilação de proteínas envolvidas no enovelamento proteico..... | 71 |
| 4.5. Adesão de tripomastigotas a matriz extracelular induz redução da expressão, fosforilação e poliglutamilação de α -tubulina..... | 74 |
| 4.6. A fosforilação de proteínas do <i>paraflagellar rod</i> está envolvida com a estabilidade do flagelo?..... | 78 |
| Parte II – Resposta do parasita a adesão a fibronectina e laminina..... | 81 |
| 4.7. Adesão de tripomastigotas a fibronectina ou laminina induz desfosforilação de α -tubulina..... | 81 |
| 4.8. Modificação no padrão de fosforilação de proteínas de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> durante adesão a elementos da matriz extracelular: fibronectina e laminina-1..... | 92 |
| 4.9. Proteínas do <i>Paraflagellar rod</i> são desfosforiladas em tripomastigotas incubados com fibronectina ou laminina-1..... | 96 |
| 4.10. A sinalização via ERK pode estar envolvida com a resposta de tripomastigotas à adesão a fibronectina ou laminina..... | 99 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 103 |
| 5.1. As mudanças no perfil de proteínas fosforiladas em <i>T. cruzi</i> induzidas pela adesão a ECM ou a seus elementos isolados..... | 104 |
| 5.2. Interação de tripomastigotas com a ECM afeta a fosforilação de proteínas do choque térmico..... | 109 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.3. | Interação de tripomastigotas à ECM, laminina e fibronectina induzem modificações no citoesqueleto de <i>T. cruzi</i> | 116 |
| 5.4. | Interação de tripomastigotas à ECM induz modificações de tubulina..... | 117 |
| 5.5. | Modificações pós-traducionais de tubulina..... | 120 |
| 5.6. | A atuação do flagelo como receptor de sinais extracelulares..... | 122 |
| 5.7. | Participação de ERK 1/2 na sinalização ativada em tripomastigotas aderidos a fibronectina e laminina..... | 126 |
| 6. | CONCLUSÃO | 129 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 132 |
| 8. | ANEXO | 148 |
| 8.1. | Anexo I Súmula curricular..... | 148 |
| 8.2. | Anexo II – Artigos publicados durante o doutorado..... | 151 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Doença de Chagas

A doença de Chagas, bem como seu agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, foram inicialmente descritos em 1909, pelo cientista Carlos Chagas, muito embora os primeiros casos da doença tenham ocorrido há milhões de anos. O DNA de *T. cruzi* foi encontrado em múmias do Norte do Chile e sul do Peru com cerca de 9000 anos e evidências do inseto vetor *Triatoma infestans* em tempos pre-Colombianos indicaram uma introdução gradual da transmissão doméstica (Coura & Viñas, 2010).

Cerca de 7-8 milhões de pessoas no mundo estão infectadas, concentrando-se principalmente na América Latina, onde a doença é considerada endêmica, havendo mais de 15000 mortes ao ano e cerca de 100 milhões de pessoas sob o risco de aquisição da doença (WHO, 2013). Milhares de casos também têm sido relatados em Portugal, Espanha, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália, provavelmente devido à imigração de indivíduos de regiões endêmicas (Clayton, 2010) e a transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados (Figura 1).

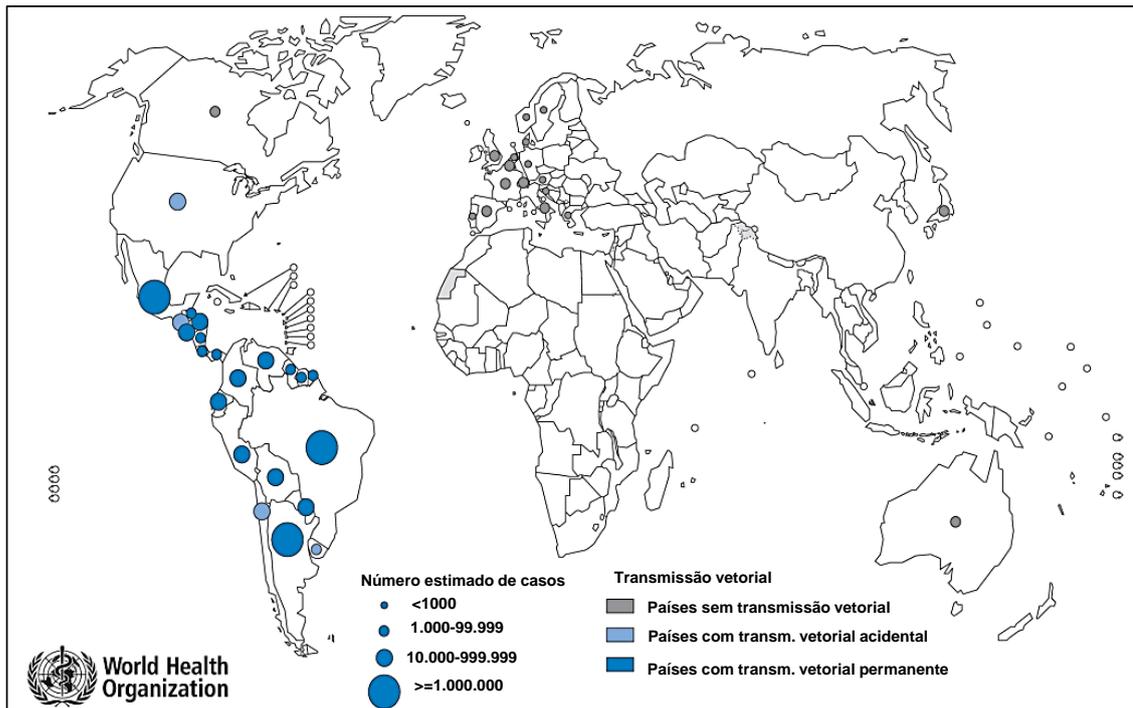


Figura 1. Distribuição global da doença de Chagas. Número de casos estimados da doença de Chagas em diferentes países, apresentando ou não o inseto vetor.

http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png

No Brasil, a transmissão vetorial pelo inseto *Triatoma infestans* foi considerada erradicada em 2006. Enquanto que em 1970, 100.000 novos casos foram relatados, em 2007 foram apenas 10 (Petherick, 2010). A transmissão oral, porém, tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Em regiões da Amazônia brasileira, a ocorrência dos primeiros casos registrados foi dada a partir da ingestão de alimentos contaminados com o vetor ou suas fezes contendo as formas metacíclicas do parasita (Coura, *et al.*, 2002).

A doença de Chagas é incluída, junto com a leishmaniose e a tripanossomíase africana, na categoria de doenças negligenciadas, recebendo pouco investimento governamental em pesquisa básica e em infraestrutura para tratamento da doença (Boutayeb, 2007, Reddy, *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da doença é caracterizado por uma fase aguda, na qual os sintomas aparecem poucos dias após a infecção, ou uma fase crônica, em que os

sintomas surgem após um período de latência de cerca de 10 a 30 anos. Na fase aguda podem aparecer sinais característicos como o chagoma e o sinal de Romaña, febre durante períodos prolongados, além de outros sintomas, havendo, entretanto, um grande número de pacientes assintomáticos. Na fase crônica é estimado que cerca de 25-30% dos pacientes infectados apresentam danos irreversíveis ao coração e ao trato digestório, resultando no elevado número de mortes anuais pela doença (WHO, 2013).

Atualmente, o tratamento de pacientes infectados se dá pela droga beznidazol, efetiva principalmente sobre a fase aguda (Rassi, *et al.*, 2000), mas a eficácia varia de acordo com a cepa do protozoário analisado (Andrade, *et al.*, 1992). As medidas profiláticas empregadas se baseiam na erradicação do inseto vetor, o que não é totalmente eficiente, principalmente quando o programa é descontinuado periodicamente.

Estudos voltados para a elucidação do processo de invasão celular, assim como a identificação de vias potenciais para servirem de alvo para quimioterápicos são fundamentais para o desenvolvimento de medidas para o tratamento da doença de Chagas.

1.2. O agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado e heteroxênico, que necessita de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (inseto vetor, triatomídeo pertencente à família Reduviidae, conhecido popularmente como barbeiro). *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastidae, caracterizada pela presença de uma mitocôndria única com uma rede complexa de DNA, denominada cinetoplasto.

O parasita apresenta basicamente três formas distintas durante seu ciclo de vida de acordo com sua morfologia: amastigota (forma caracteristicamente intracelular, capaz de se dividir e que apresenta um flagelo incipiente), epimastigota (forma não infectiva, extracelular flagelada, capaz de se multiplicar) e tripomastigota sanguínea ou metacíclica (formas infectivas, flageladas e incapazes de se dividir, presentes no hospedeiro vertebrado ou no invertebrado) (Figura 2).

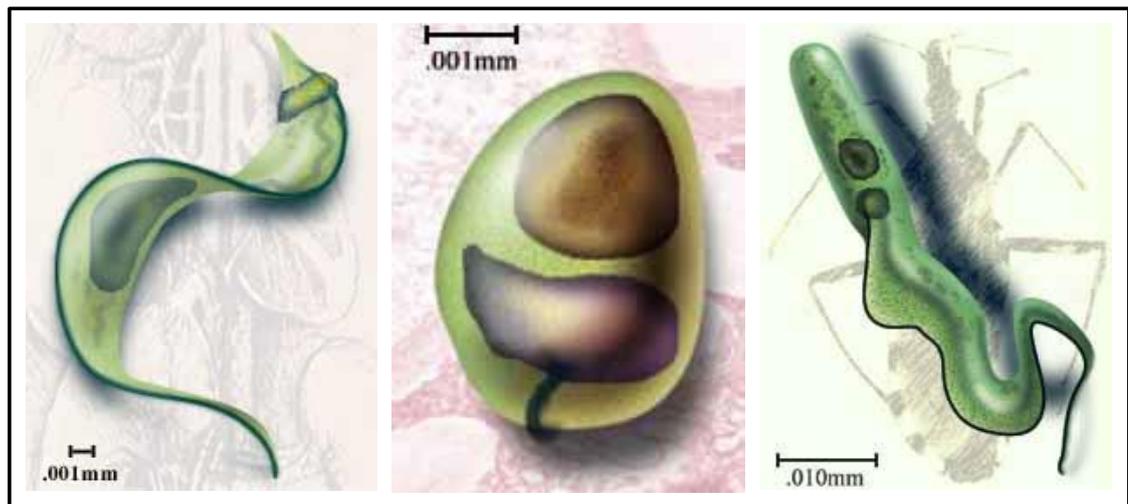


Figura 2. Três formas de vida do *T. cruzi*: tripomastigota, amastigota e epimastigota, respectivamente. (<http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html#tryp>).

A transmissão pode ocorrer de várias maneiras, tais como vetorial, oral, congênita, e por transfusões sanguíneas. A transmissão vetorial ocorre após o inseto vetor eliminar com as fezes a forma tripomastigota metacíclica na pele do hospedeiro, após o repasto de sangue. Os tripomastigotas penetram pela lesão na pele devido à picada do inseto e invadem as células, onde são encontrados inicialmente nos vacúolos parasitóforos (compartimentos derivados de membrana plasmática e de lisossomos). Posteriormente, os parasitas escapam do vacúolo e se diferenciam nas formas amastigotas, que se replicam no citoplasma e se diferenciam para as formas tripomastigotas, que são eliminadas pela lise celular, podendo infectar células vizinhas ou migrar pela corrente sanguínea. Na corrente sanguínea,

as formas tripomastigota podem ser ingeridas pelo inseto. No barbeiro, o parasita se diferencia em epimastigota, que se replica no intestino médio e se diferencia em tripomastigota metacíclico na porção final do intestino, podendo ser liberada novamente e iniciar novas infecções (figura 3). É importante ressaltar que, além das formas clássicas de vida do parasita, as formas epimastigota intracelular em células de mamíferos (Tonelli, *et al.*, 2004) e amastigota-like no inseto vetor (Souza, *et al.*, 2010) foram recentemente identificadas como componentes do ciclo de vida do *T. cruzi*.

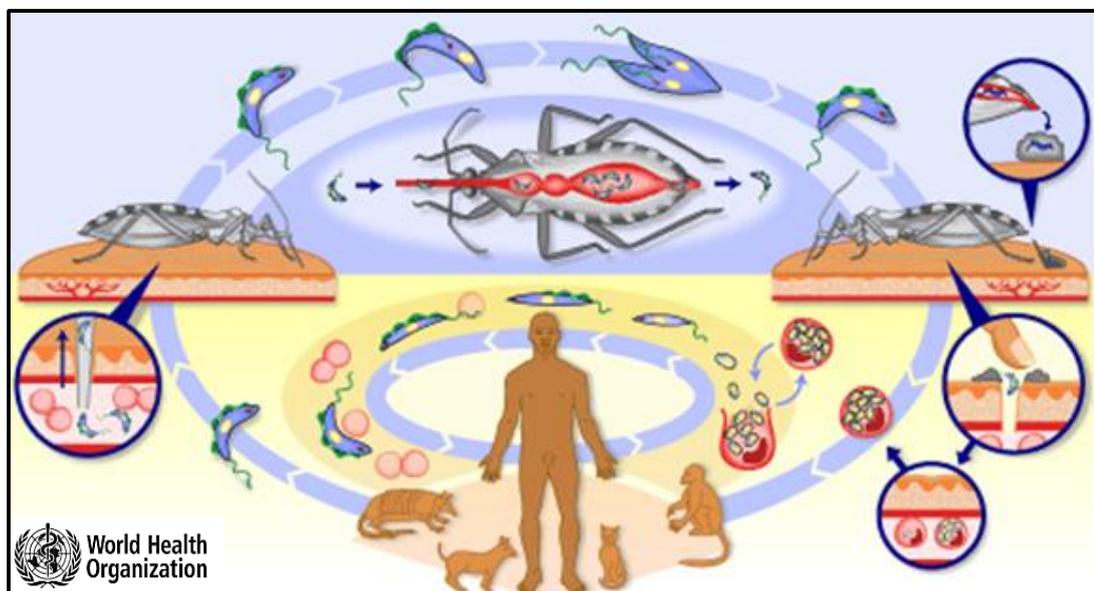


Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.
(<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>).

1.3. Interação *Trypanosoma cruzi* – célula hospedeira

Durante a invasão da forma tripomastigota de *T. cruzi*, eventos que ocorrem na célula hospedeira são fundamentais para a infecção, tais como o aumento de cálcio citosólico (Moreno, *et al.*, 1994), pulsos do nucleotídeo cíclico, cAMP (Rodriguez, *et al.*, 1999), ativação de proteína tirosina quinase (Yoshida, *et al.*, 2000), de fosfatidil-3-quinase (Woolsey, *et al.*, 2003), recrutamento de lisossomos (Fernandes & Andrews, 2012) ou ação de tirosina fosfatases, mostrada pela redução

da fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas (Zhong, *et al.*, 1998) ou pelo bloqueio da infecção pelo tratamento da célula hospedeira com inibidores de tirosina fosfatase (Gallo, *et al.*, 2011). Há ainda o envolvimento de proteínas estruturais e de metabolismo na célula hospedeira, que contribuem para o desenvolvimento intracelular do parasita (Caradonna, *et al.*, 2012, Genovesio, *et al.*, 2011, Nagajyothi, *et al.*, 2012).

Eventos importantes também ocorrem no parasita durante sua adesão à célula hospedeira e são essenciais para sua internalização e multiplicação, contribuindo para o desenvolvimento da infecção. Embora o conhecimento sobre as vias ativadas no parasita seja ainda reduzido, são característicos a ativação de proteínas quinases (Favoreto, *et al.*, 1998, Yoshida, *et al.*, 2000), o aumento de cálcio intracelular (Docampo & Moreno, 1996) e a participação de fosfatases durante a invasão (Araya, *et al.*, 2008, Gallo, *et al.*, 2011). Também a liberação de óxido nítrico (NO) tanto pela célula hospedeira quanto pelo parasita parece estar envolvida com a infecção (Carvalho, *et al.*, 2012).

A complexidade dos eventos é acentuada, pelas diferenças existentes entre as cepas e as formas infectivas do parasita (tripomastigota metacíclica ou sanguícola) devido ao seu repertório de moléculas e pela capacidade do parasita de invadir praticamente todas as células *in vitro* e *in vivo*, embora posteriormente no mamífero sua detecção se restrinja a alguns órgãos, (revisado por Maeda, *et al.*, 2012).

Entre os eventos estudados até o momento, a interação entre as glicoproteínas de superfície de tripomastigotas de *T. cruzi* com a matriz extracelular e o citoesqueleto do hospedeiro parece ser crucial para o sucesso da invasão do parasita.

1.3.1. Atuação da Superfamília gp85 /Trans-sialidases de *T. cruzi*

As glicoproteínas pertencentes à superfamília gp85/trans-sialidase (TS) são encontradas na superfície celular do *T. cruzi*, assim como no meio extracelular, quando eliminadas como moléculas solúveis ou em vesículas (revisto em Torrecilhas, *et al.*, 2012). Seu envolvimento com o processo de infecção de mamíferos pelo *T. cruzi* está bem estabelecido na literatura, como por exemplo a gp83 e Tc85 em tripomastigotas sanguíneas, a gp82 e gp90 em tripomastigotas metacíclicas, além das trans-sialidases.

O papel da transialidase (TS) na invasão do parasita é complexo (revisto em Rubin & Schenkman, 2012). Além de sua atividade enzimática de transferência de ácido siálico de uma macromolécula para as glicoproteínas do parasita, a enzima foi implicada na saída do parasita do vacúolo parasitóforo para o citoplasma da célula hospedeira, no processo de adesão independente de atividade enzimática, como lectina (Todeschini, *et al.*, 2004) ou como ligante de TrKA e TrKC (tirosina quinase A e C, respectivamente) em células epiteliais e neuronais (Weinkauff, *et al.*, 2011). No caso específico da Tc85, seu envolvimento foi mostrado inicialmente pela inibição parcial da invasão da célula hospedeira pelo parasita por um anticorpo monoclonal anti-Tc85 (mAbH1A10) (Alves *et al.*, 1986).

A superfamília gp85/TS foi inicialmente dividida em quatro grupos de acordo com a presença de domínios ou motivos estruturais conservados (Asp Box, SAPA, VTxNVxLYNR, também denominado VTV ou FLY) (Pereira, *et al.*, 1991, Colli, 1993, Cross & Takle, 1993, Frasch, 1994, Schenkman & Eichinger, 1994). Após o sequenciamento do genoma da cepa CL Brener do parasita em 2005 foram identificados 1430 genes membros dessa superfamília, sendo 693 pseudogenes (El-

Sayed, *et al.*, 2005) e uma nova distribuição em 8 grupos foi proposta, sendo os grupos I a IV idênticos à distribuição anterior (Freitas, *et al.*, 2011). O grupo I é o único formado por proteínas com atividade de trans-sialidase. Grupo II é constituído pelas glicoproteínas localizadas na superfície do parasita, como Tc85. Grupo III apresenta as proteínas de superfície associadas ao flagelo do parasita e os demais grupos (IV a VIII) apresentam os membros cuja função ainda não foi evidenciada (Freitas, *et al.*, 2011, Mattos, *et al.*, 2013). Na análise desses oito novos grupos, 328 genes codificam proteínas que apresentam o motivo VTxNVxLYNR, conservado (Freitas, *et al.*, 2011), incluindo toda as proteínas do grupo II, que engloba as glicoproteínas de membrana com capacidade de ligação a elementos da matriz extracelular (Marroquin-Quelopana, *et al.*, 2004, Tonelli, *et al.*, 2010, Mattos *et al.*, 2013, Nde, *et al.*, 2012) e a elementos do citoesqueleto da célula hospedeira (Magdesian, *et al.*, 2001), como Tc85-11, uma proteína recombinante da Tc85.

A importância da molécula de Tc85-11 na adesão de tripomastigotas à célula hospedeira foi reconhecida em experimentos de ligação: 1. proteínas recombinantes foram capazes de se ligar a células epiteliais (LLC-MK2) fixadas de maneira dependente de laminina (Giordano, *et al.*, 1994, 1999); 2. peptídeos sintéticos que cobriam toda a sequência da molécula e modelagem molecular localizaram o sítio de ligação a laminina no domínio amino-terminal da Tc85-11 (Marroquin-Quelopana, *et al.*, 2004); 3. a proteína recombinante denominada Tc85-1, correspondente à porção mais próxima do C-terminal da Tc85-11 e reconhecida pelo anticorpo monoclonal H1A10, contem outro(s) sítio(s) de ligação à célula hospedeira; 4. peptídeos sintéticos que cobriam toda a sequência de Tc85-1, mostraram que o motivo FLY consistia em um sítio de ligação a citoqueratinas (18, 8 e 20) e vimentina (Tonelli, *et al.*, 2010).

A presença de CK18 (citoqueratina 18) na superfície de células e seu papel como receptor de *T. cruzi* foi sugerido por diferentes experimentos: anticorpos anti-CK18 ou a proteína Tc85-11 levaram à completa inibição da adesão da sequência FLY às células epiteliais e a uma inibição de 60% na ligação de tripomastigotas à célula (Magdesian, *et al.*, 2001); *beads* recobertos com o peptídeo FLY se ligam à superfície de células epiteliais, levando a uma diminuição na fosforilação de CK18 intracelular, assim como a uma reorganização dos filamentos intermediários do citoesqueleto, sugerindo que essa interação possa facilitar a invasão e multiplicação do parasita intracelular (Magdesian, *et al.*, 2007). O papel de CK18 na superfície das células foi questionado, uma vez que células *knockdown*, expressando quantidades mínimas de CK18, foram normalmente infectadas pelo parasita, mas o seu papel na infectividade foi reforçado, uma vez que essas células apresentaram um número reduzido de amastigotas intracelulares (Claser, *et al.*, 2008). É importante ainda ressaltar que utilizando técnicas de *phage display*, fagos expressando o peptídeo FLY ligam-se *in vivo* preferencialmente à vasculatura do coração, bexiga e esôfago e, em menor quantidade, à vasculatura do endotélio de musculatura esquelética, sugerindo que FLY se liga preferentemente a células endoteliais que expressam vimentina e citoqueratinas em sua superfície (Tonelli, *et al.*, 2010). Esses dados indicam o papel fundamental de citoqueratinas/ vimentina, incluindo a CK18, no desenvolvimento do parasita, seja na sua adesão ou na sua diferenciação e multiplicação na célula hospedeira.

É interessante observar que a gp82, presente na superfície de tripomastigotas metacíclicos, liga-se a mucina e a um receptor não caracterizado na célula hospedeira, mas não a laminina, diferentemente do clone Tc85-11. A comparação da estrutura primária dessas duas moléculas mostra grande variabilidade nessas

regiões, como esperado, e maior conservação na região do FLY (Cortez, *et al.*, 2012, Mattos, *et al.*, 2013), reforçando a complexidade do repertório de moléculas entre os tripomastigotas envolvidas no processo de invasão comentado acima.

Outros membros da família, de diferentes massas moleculares, como gp83 (Villalta, *et al.*, 2009) foram implicados na invasão, inclusive com capacidade de se ligar a laminina e a outros elementos da ECM (revisto em Nde, *et al.*, 2012), reforçando ainda mais a importância dessa superfamília gênica e da ligação entre ECM e o parasita para a ativação de vias responsáveis pela capacidade invasiva de *T. cruzi*.

1.3.2. A matriz extracelular

A matriz extracelular consiste em uma rede de macromoléculas responsável por preencher os espaços intercelulares garantindo resistência, organização, comunicação/sinalização e transporte entre as células de um tecido (Alberts, *et al.*, 2004). Basicamente, a ECM é composta por dois grupos de macromoléculas, as proteínas fibrosas e os glicosaminoglicanos. Esse último geralmente está associado a outras proteínas, formando os proteoglicanos. Proteínas fibrosas são divididas em proteínas de função estrutural, como colágeno e elastina, e proteínas com capacidade adesiva, como fibronectina e laminina (Kadler, 1995, Kielty, *et al.*, 2002). A seguir, as principais proteínas da ECM serão destacadas resumidamente:

O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular, atuando como um suporte estrutural, ligando-se a diferentes elementos de ECM (Kadler, 1995), seguido da elastina, responsável pela flexibilidade dos tecidos e capaz de controlar diferentes funções celulares pela interação com moléculas adesivas ou com fatores de crescimento. A fibronectina apresenta um motivo de ligação a

heparina (Ruoslahti, 1988) e o domínio funcional FN III (muito similar ao domínio encontrado em trans-sialidases, que inclui o motivo RGD (Arg-Gly-Asp), responsável pela ligação a integrina (Ruoslahti, 1996) (figura 4B). Laminina, vitronectina, trombospondina e tenascina também apresentam o motivo RGD. Laminina é o principal constituinte das membranas basais e é responsável pela força tênsil dos tecidos. Essa molécula é composta por três subunidades (α , β e γ), que interagem com outras moléculas de laminina e com outros elementos da matriz extracelular (Cognato & Yurchenco, 2000) (figura 4C).

Em tecidos epiteliais, a exemplo de outros tecidos, há uma camada fina e flexível de matriz extracelular especializada, denominada lâmina basal, composta principalmente por colágeno tipo IV, laminina, entacina e o proteoglicano perlecan. A lâmina basal determina a polaridade das células e contribui para o controle da diferenciação e metabolismo celular, sendo um dos principais exemplos de organização da matriz extracelular com funções bastante conhecidas (figura 4A).

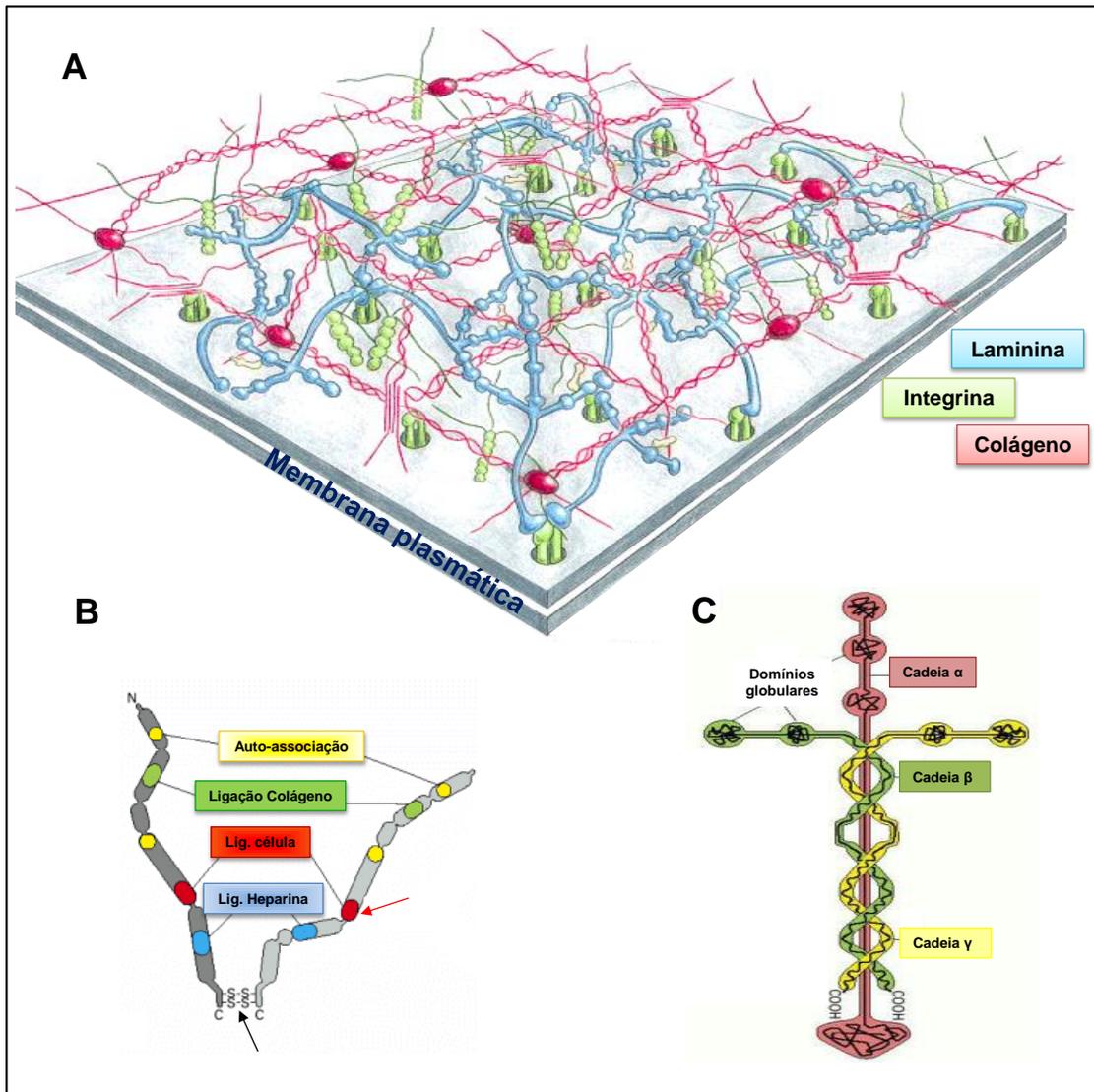


Figura 4. Organização estrutural da matriz extracelular e modelos de fibronectina e laminina. A) Imagem ilustrativa de uma lâmina basal. B) Esquema ilustrativo da estrutura tridimensional de duas moléculas de fibronectina unidas por pontes dissulfeto, indicadas pela seta preta. A seta vermelha indica a localização do motivo RGD. C) Esquema ilustrativo da estrutura tridimensional das três subunidades de laminina formando a estrutura encontrada na matriz extracelular. As imagens foram adaptadas do livro texto Alberts, *et al.*, 2004).

1.3.3. Interação *T. cruzi* – matriz extracelular

Embora o conhecimento dos mecanismos ativados por elementos da matriz extracelular em células de mamíferos esteja bastante avançado (revisado por Kim, *et al.*, 2011), pouco é conhecido sobre as vias ativadas em *T. cruzi* durante sua adesão a ECM (Nde, *et al.*, 2012, Mattos, *et al.*, 2013) ou a seus elementos como laminina-1 (Giordano, *et al.*, 1999), colágeno (Velge, *et al.*, 1988), fibronectina

(Ouaisi, *et al.*, 1984), heparan sulfato (Calvet, *et al.*, 2003; Oliveira, *et al.*, 2008; Bambino-Medeiros, *et al.*, 2011), galectin-3 (Moody, *et al.*, 2000) ou trombospondina (Johnson, *et al.*, 2012).

O primeiro relato da interação entre *T. cruzi* e elementos da matriz extracelular foi feito por Ouaisi e colaboradores em 1986, mostrando que uma glicoproteína de 85kDa localizada na superfície do parasita ligou-se a fibronectina (Ouaisi, *et al.*, 1986 (b)). O pré tratamento de tripomastigotas com fibronectina ou com um peptídeo contendo a sequência RGD resultou em uma inibição *in vitro* e *in vivo* da invasão do parasita a célula hospedeira (Ouaisi, *et al.*, 1986 (a), Calvet, *et al.*, 2004) indicando que fibronectina e principalmente seu motivo RDG pode ser um sítio de reconhecimento do parasita, contribuindo para sua capacidade de invasão.

A interação entre glicoproteínas de mesma massa molecular de *T. cruzi*, com laminina também foi descrita. Experimentos utilizando anticorpos anti-laminina foram responsáveis por inibir parcialmente a invasão de tripomastigotas à célula hospedeira, ressaltando a importância dessa molécula de ECM para a invasão pelo parasita (Giordano, *et al.*, 1994). A proteína Tc85 foi reconhecida como um ligante de laminina, sendo essa ligação independente de carboidratos (Giordano, *et al.*, 1994). O clone Tc85-11 se liga fortemente a laminina, mas não a fibronectina ou gelatina (Giordano, *et al.*, 1999) e a sequência de aminoácidos responsável por essa ligação foi determinada por ensaios de inibição *in vitro* pela utilização de peptídeos sintéticos que cobriam toda a estrutura primária de Tc85. Verificou-se, pelo modelamento dessa proteína, que o sítio de ligação a laminina se encontra na região do β -propeller na porção N-terminal do modelo da Tc85-11 (Marroquin-Quelopana, *et al.*, 2004). Os sete peptídeos com alta afinidade a laminina são bastante conservados entre as glicoproteínas do grupo II das gp85/Trans-sialidades, mas não

entre os demais grupos, indicando que a relação descrita entre essas glicoproteínas e a capacidade invasiva de *T. cruzi* pode ser devida à presença de sítios conservados de ligação à laminina (Mattos, *et al.*, 2013). O silenciamento de laminina gama 1 em células de mamíferos resultou em redução da ligação do parasita à célula hospedeira e em uma redução na multiplicação dos amastigotas intracelulares, reforçando a importância de laminina para o sucesso da infecção pelo parasita (Nde *et al.*, 2006). É interessante observar que, embora não descritas no modelo inseto-*T. cruzi*, proteínas “laminin –like” presentes na glândula salivar do inseto vetor podem atuar como receptores para *Phytomonas*, um parasita de plantas pertencente à família Trypanosomatidae (Dias, *et al.*, 2012).

Outros elementos da matriz extracelular também estão envolvidos na ligação a *T. cruzi*. A análise de redes de interações de proteínas relacionadas com a matriz extracelular, envolvendo ligantes de gp83 (membro das gp85/TS) indicaram que laminina e trombospondina são requeridas pelo parasita para sua internalização (Nde, *et al.*, 2012). Nessa rede, Galectina-3 liga-se a mucinas de 45kDa e 30kDa presentes na superfície do parasita, (Moody, *et al.*, 2000, Kleshchenko, *et al.*, 2004), sendo responsável pela interação entre a laminina da célula hospedeira e o parasita, facilitando a infecção. Em células de mamífero, o silenciamento de galectina-3 reduz a adesão de tripomastigotas à célula hospedeira (Nde, *et al.*, 2006) confirmando o papel de galectina-3 no processo. Nesse contexto, postulou-se que a liberação de gp83 na superfície da célula hospedeira, por ação da glicosilfosfatidilinositol fosfolipase do parasita, e a consequente ativação de vias de sinalização envolvendo MAPK e PKC na célula hospedeira, seriam responsáveis pelo aumento de infecção (Villalta, *et al.*, 1998, 1999; Nde, *et al.*, 2006), a exemplo da hipótese formulada para o

papel de vesículas contendo Tc85 liberadas pelo *T. cruzi* (revisto em Tordecilhas *et al.*, 2012).

Dentro da interação *T. cruzi*- ECM, há que se considerar ainda o papel de enzimas, como Oligopeptidase C e Tc80POP, que degradam a matriz extracelular (Grellier, *et al.*, 2001; Cazzulo, 2002; de Souza, *et al.*, 2010). Também há a participação de proteinases que se ligam à heparina (*Heparin binding protein* – HBP), localizadas na membrana flagelar, relacionadas com vias de sinalização envolvidas na internalização do parasita (Oliveira-Jr, *et al.*, 2012). Como resultado da atuação do parasita sobre a matriz extracelular, observou-se a redução nos níveis de fibronectina e reorganização das moléculas de laminina extracelulares em cultura de cardiomiócitos infectados, sugerindo a modulação de ECM durante a invasão do parasita (Calvet, *et al.*, 2009). Foi demonstrado que o pré tratamento de amastigotas com heparina ou heparan-sulfato inibe a invasão de cardiomiócitos (Bambino-Medeiros, *et al.*, 2011).

A resposta do parasita a elementos que se ligam à ECM também deve ser considerada, tais como a resposta a TGF – β (Araujo-Jorge, *et al.*, 2008; Ferrão, *et al.*, 2012). É sugerido que o *T. cruzi* pode apresentar em sua superfície moléculas “TGF- β -like” capazes de atuar como agonistas, ligando-se a receptores na membrana plasmática da célula hospedeira e contribuindo para a invasão do parasita a células epiteliais (Ming, *et al.* 1995).

Parte das interações descritas acima envolvem membros do assim chamado grupo da Tc85 do parasita. Dessa forma, é importante aprofundar os efeitos desencadeados pela interação dessas proteínas com os elementos da matriz extracelular e a ativação de vias desencadeadas no parasita, ressaltando-se as

mediadas por quinases/fosfatases responsáveis pela adesão e invasão a célula hospedeira.

1.3.4. Atuação das Fosfatases e quinases

Durante o complex ciclo de vida do *T. cruzi*, o parasita é exposto a diferentes condições ambientais devendo responder adequadamente a cada uma delas para garantir sua sobrevivência. Dentro das respostas desencadeadas, as modificações pós-traducionais de proteínas (PTMs) merecem destaque.

PTMs são altamente eficientes na regulação de vários processos celulares pelo controle da atividade de proteínas chave. A fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina em células de mamíferos é um evento bastante frequente e é uma das modificações pós-traducionais mais estudada. Em *T. cruzi*, cepa CL Brener, foram identificados 86 e 190 genes que codificam fosfatases (Brenchley, *et al.*, 2007) e quinases (Parsons, *et al.*, 2005), respectivamente. 2% do genoma do parasita corresponde a quinases, ressaltando a importância da fosforilação na regulação de processos celulares em *T. cruzi*. Para citar um exemplo, a fosforilação de trans-sialidases por proteínas quinases A (PKA) foi relacionada com a regulação de tráfego intracelular, *turnover* de proteínas, além da atividades enzimática (Bao, *et al.*, 2010). O papel das proteínas fosfatases também foi relacionado com a regulação do ciclo de vida de kinetoplastídeos (Szoor, *et al.*, 2006) e com a invasão do hospedeiro, como citado acima. O inibidor de PT1b, BZ3 (Gallo, *et al.*, 2011) e oligonucleotídeos anti senso para calcineurina B demonstraram a atuação de PT1 e PT2A nos eventos de adesão do parasita (Araya *et al.*, 2008).

Como esperado, a análise do fosfoproteoma em dois tripanosomatídeos tomados como exemplo mostra um grande número de proteínas modificadas: 119

proteínas fosforiladas na forma epimastigota de *T. cruzi*, envolvidas em diferentes processos celulares, tais como metabolismo, reprodução celular, desenvolvimento, diferenciação e morte celular, comunicação celular, resposta a estímulos e locomoção, sendo 6 proteínas quinase e fosfatase (Nakayasu, *et al.*, 2009); 491 proteínas modificadas por fosforilação em *T. brucei*, sendo que parte está envolvida na resposta a variações de peróxido de hidrogênio, indicando uma regulação fosforilativa pela modificação do potencial redox da célula (Nett, *et al.*, 2009(b)).

A análise das proteínas diferencialmente fosforiladas durante a diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* revelaram que 84,1% dos sítios de fosforilação encontrados consistem em resíduos de serina, 14,9% em resíduos de treonina e apenas 1% em resíduos de tirosina (Marchini, *et al.*, 2011). Em geral, embora as porcentagens possam variar, serina e treonina são os resíduos preferencialmente fosforilados, como também mostrados para as 491 fosfoproteínas da forma tripomastigota sanguíneo de *T. brucei* (Nett, *et al.*, 2009 (b)) ou nas 445 prováveis fosfoproteínas de leishmania (Hem *et al.*, 2010).

Em *T. brucei*, com 176 PKs anotadas das quais 44 foram identificadas como fosforiladas, sugerem que as modificações na fosforilação de quinases, como esperado, sejam importantes para o controle de vias de sinalização celular em tripanossomos. A análise do fosfoproteoma comparativo das formas procíclica e sanguínea de promastigotas de *T. brucei* pela técnica de SILAC (*Stable Isotope Labeling by Aminoacids in Cell culture*) indicou que o controle da fosforilação de proteínas, incluindo a fosforilação em resíduos de tirosina, pode estar diretamente relacionada com a diferenciação do parasita e a capacidade de adaptação aos respectivos ambientes habitados por ele. Entre as proteínas com variação nas intensidades de fosforilação ressaltaram-se as proteínas flagelares, quinases e

fosfatases, proteínas envolvidas em processos metabólicos, além de uma grande quantidade de proteínas hipotéticas (Urbaniak *et al.*, 2013).

Em resumo, as cascatas ativadas durante o reconhecimento e a invasão da célula hospedeira pelo parasita ainda são pouco conhecidas, mas como esperado, a importância da fosforilação de proteínas nesse processo é inquestionável.

1.3.5. Envolvimento do citoesqueleto em cascatas de sinalização

Foi recentemente proposto em diferentes organismos que moléculas do citoesqueleto podem apresentar não somente função estrutural, mas podem ter também um papel na transmissão de sinais extracelulares, atuando como elemento direto em vias de sinalização (Oberholzer, *et al.*, 2011). De fato, as proteínas do citoesqueleto, proteínas do choque térmico (HSPs) assim como inúmeras proteínas hipotéticas estão bastante representadas entre as proteínas fosforiladas encontradas nos diferentes fosfoproteomas de alguns tripanosomatídeos (Nakayasu *et al.*, 2009; Marchini, *et al.*, 2011; Nett, *et al.*, 2009 (b), Hem *et al.*, 2010; Oberholzer *et al.*, 2011; Urbaniak *et al.*, 2013), indicando que a fosforilação/desfosforilação dessas proteínas pode ser crucial para o controle de sua atividade no parasita.

O citoesqueleto de microtúbulos submembranares e um único flagelo são os dois componentes que formam estrutura dos tripanosomatídeos. Na região submembranar há um “espartilho” subpelicular formado pelo alinhamento de microtúbulos, compostos por unidades de α - e β -tubulinas alternadas. No interior do flagelo há uma segunda organização de microtúbulos denominada “9+2”, compondo o axonema. Há ainda no flagelo uma estrutura bastante rígida, que forma um filamento extra-axonemal, denominado de *paraflagellar rod*. Toda a estrutura flagelar

se conecta ao corpo do parasita com o auxílio de outros elementos do citoesqueleto do parasita (Gull, 1999) (figura 5).

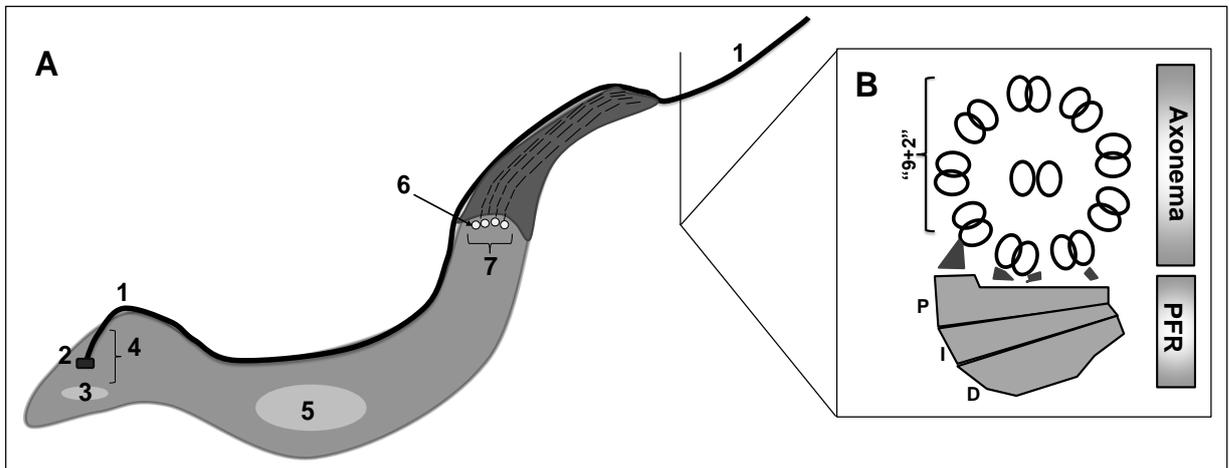


Figura 5. Organização estrutural de tripomastigotas de *T. cruzi*. A) Organização da estrutura do parasita formada basicamente pelo citoesqueleto e um flagelo. 1) Flagelo; 2) Corpo basal do flagelo; 3) Cinetoplasto; 4) "Flagellar pocket" (região que envolve a única porção do flagelo inserida no citoplasma do parasita); 5) Núcleo; 6) Microtúbulos subpeliculares; 7) Espartilho subpelicular. B) Visão transversal da disposição dos componentes estruturais do flagelo. Axonema formado por microtúbulos organizados em duplas cuja organização é denominada "9+2". Paraflagellar rod (PRF) formada por três organizações distintas de suas proteínas compondo 3 sub-regiões. Cada uma é nomeada de proximal (P), intermediária (I) e distal (D) de acordo com sua proximidade com o axonema. Figura (B) adaptada de Portman & Gull, 2010.

Dessa forma, a organização minuciosa das proteínas do citoesqueleto de *T. cruzi* e a atuação das mesmas em diferentes processos celulares sugerem um papel variado dessas proteínas inclusive na resposta a fatores externos. Nesse contexto, é importante analisar a importância das modificações por fosforilação/desfosforilação dessas proteínas do citoesqueleto como mediadores de diferentes vias de sinalização ativadas em *T. cruzi* durante adesão a ECM e seus elementos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a interação entre o parasita e diferentes moléculas do hospedeiro vertebrado, o presente trabalho teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente fosforiladas durante a adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* a ECM e seus elementos isolados: fibronectina e laminina.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar o padrão de fosforilação das proteínas da forma tripomastigotas de *T. cruzi* na etapa de adesão a matriz extracelular total (ECM) e a seus elementos: laminina e fibronectina;
- 2) Identificar as proteínas de *T. cruzi* modificadas por fosforilação/desfosforilação após a etapa de adesão a ECM e seus elementos;
- 3) Desenvolver anticorpos para a validação de algumas proteínas encontradas;
- 4) Confirmar e validar a variação da fosforilação das proteínas previamente identificadas;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi da cepa Y foi mantido em cultura de tecidos, por infecção de células LLC-MK2 (Andrews & Colli, 1982). Cinco dias após infecção, os parasitas liberados no meio extracelular foram centrifugados, ressuspensos em meio MEM acrescido de 2% de SFB e utilizados nos experimentos posteriores.

3.2. Incubação do parasita com ECM e seus elementos: laminina e fibronectina

As proteínas isoladas laminina e fibronectina foram adquiridas comercialmente. A matriz extracelular foi obtida a partir de extratos de tumor EHS, como descrito por Kleinman, *et al.*, 1986. A manutenção da linhagem celular EHS, em animais C57BL/6 foi realizada seguindo as normas do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* do *National Institute of Health* (NIH publicação 8523). O protocolo utilizado para tal foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Química da USP (Certificado número 07/2012), o qual segue as normas do Conselho Nacional de Cuidados e Experimentação animal.

As proteínas isoladas foram aderidas em placas de 8 poços (2,5µg de proteína por poço em tampão NaHCO₃ 0,2M, pH 9,5) por incubação durante 12-14h a 4°C. Posteriormente, os poços foram lavados 5 vezes com PBS, e incubados com 10% de albumina por 2h a 37°C. Em seguida, os poços foram novamente lavados 5 vezes com PBS. No caso da matriz extracelular, 1mL (com concentração de 4µg/µL) foi previamente aderido a garrafas de 25cm². Por fim, aos poços e às garrafas foram adicionados 1x 10⁹ parasitas (em meio MEM contendo 2% de SFB), os quais foram incubados a 37°C durante 5min - 2h em 5% CO₂. Após o tempo de incubação, os

parasitas foram coletados, lavados 3 vezes com PBS, e o *pellet* de parasitas foi utilizado para extração de proteínas totais. A incubação de tripomastigotas com albumina bovina (BSA) foi utilizada como controle.

3.3. Obtenção de extrato protéico celular

Para obtenção dos extratos protéicos, 1×10^9 parasitas em contato com os elementos acima citados foram rompidos pela adição de 350 μ l de *DeStreak Rehydration solution* (GE Healthcare Life Science), complementado com inibidores de fosfatases (5mM NaF, 2mM Na_3VO_4 e 50 μ M β - Glicerofosfato de Sódio) e proteases (*Protease Inhibitor Cocktail* (SIGMA-ALDRICH) e 1mM PMSF), sonicados (10min em pulso contínuo), seguido de centrifugação a 20.000 x g por 5min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes (Laemmli, 1970) para verificação da qualidade dos extratos, que foram posteriormente submetidos a 2D-PAGE. Todos as incubações foram realizadas em triplicatas.

3.4. Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)

A análise das proteínas totais foi realizada em gel bidimensional, utilizando-se o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare Life Science). Para a primeira dimensão foram utilizadas fitas de IPG (immobilized pH) de 7cm ou 13cm com gradiente de pH linear de 4 a 7 (ou 3-10 para os primeiros géis realizados). Após esta separação, as fitas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% convencional. O gel foi corado por PRO Q[®] - Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen), para visualização das

proteínas fosforiladas, e, posteriormente, por coomassie coloidal para visualização das proteínas totais.

A visualização das proteínas fosforiladas foi feita pelo scanner Typhoon Trio (GE Healthcare Life Science) e a visualização das proteínas totais pelo ImageScanner III (GE Healthcare). A análise da variação de fosforilação entre as proteínas do parasita foi realizada pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare).

Para a determinação dos *spots* com intensidade significativa de fosforilação foram consideradas alterações de volume normalizado dos *spots* com 5% de significância ($p < 0,05$) no teste estatístico de ANOVA (*analysis of variance*). Pelo programa também foi possível estimar os valores de ponto isoelétrico e massa molecular de cada proteína, considerando-se o padrão de migração horizontal durante a focalização isoelétrica em fitas com gradiente linear de pH de 4 a 7, e os padrões de migração vertical do padrão de massa molecular, (Broad Range, Molecular weight marker, Bio-Rad), através de uma correlação em centímetros.

3.5. Sequenciamento por Espectrometria de Massas

Após a análise dos géis, os *spots* foram enumerados, cortados e tratados como segue:

1- Remoção do corante: Os segmentos de gel contendo as proteínas foram descorados duas vezes em solução contendo 50% v/v de metanol e 2,5% de ácido acético, posteriormente foram desidratados duas vezes em 100% Acetonitrila durante 5 minutos. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel foi evaporado à temperatura ambiente em evaporador.

2- Redução e alquilação: Os fragmentos de gel foram reidratados e reduzidos em 10mM Ditioneitol (DTT) à temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente alquilados com 50 mM iodoacetamida, no escuro, por mais 30 minutos. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos foram lavados em 25 mM Bicarbonato de Amônio e posteriormente desidratados em 100% acetonitrila. A acetonitrila foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi evaporado à temperatura ambiente em evaporador.

3- Digestão das proteínas: Os fragmentos de gel foram reidratados com 30 µL de solução contendo 0,4µg de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amônio e mantidos a 37°C por 16 horas.

4- Extração dos peptídeos: Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com uma lavagem de 10 minutos com 5% v/v de ácido fórmico; e duas vezes com a solução 50% v/v acetonitrila e 5% v/v ácido fórmico; as soluções contendo os peptídeos extraídos do gel foram submetidas a secagem em evaporador à temperatura ambiente, por 2-3 horas. Os peptídeos foram ressuspensos em 0,1% (v/v) ácido fórmico e sequenciados.

Os peptídeos foram sequenciados em espectrômetro de massas ESI- Quad-TOF acoplado a um sistema de UPLC no Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CNPEM/ABTLuS, Campinas.

A separação dos peptídeos foi realizada usando-se uma coluna de fase reversa C18. Os peptídeos foram eluídos pela adição de um gradiente H₂O/Acetonitrila. Durante a corrida, o fluxo utilizado foi de 0,6µL.min⁻¹.

Os espectros de massas das amostras dos diferentes tratamentos foram processados através do programa ProteinLynx V 2.1 (Waters) e analisados no programa MASCOT MS/MS Ions Search (<http://www.matrixscience.com>). Os

parâmetros utilizados para a identificação de proteínas no MASCOT foram: 1) Instrument: ESI-QUAD-TOF; 2) Database: *T.cruzi*; 3) Enzyme: Trypsin; 4) Fixed modification: Carbamidomethyl (C); 5) Variable modifications: Oxidation (M); phosphorylation (ST); phosphorylation (Y); 6) Peptide tol.: $\pm 0.1\text{Da}$; 7) MS/MS tol.: $\pm 0.1\text{ Da}$; 8) Peptide charge: 1+; 2+ and 3+.

3.6. Produção de anticorpo monoclonal

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as recomendações presentes no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* do *National Institute of Health* (NIH publicação 8523). O protocolo utilizado para tal foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Química da USP (Certificado número 17/2011), o qual segue as normas do Conselho Nacional de Cuidados e Experimentação animal.

Para a obtenção de anticorpos anti-proteínas do *paraflagellar rod* (anti-PAR), camundongos BALB/c foram imunizados por injeções intraperitoneais de 50 μg de extratos de citoesqueleto do trypomastigotas de *T. cruzi* cepa Y, realizadas em quatro doses idênticas em intervalos de uma semana. Os extratos de citoesqueleto foram preparados como descrito por Robinson & Gull, 1991. Resumidamente, os *pellets* de parasita foram lavados 3 vezes com PBS, solubilizados em tampão de lise (1% Nonidet-P40; 50mM HEPES pH 6,9; 5mM EGTA; 2mM MgCl_2 ; 2mM Azida sódica; inibidores de protease como descritos anteriormente) e incubados por 5 min no gelo. Após esse tempo, o lisado foi transferido lentamente para um tubo contendo Sacarose 30%, seguido de centrifugação por 10.000 x g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação o *pellet* de citoesqueleto obtido foi solubilizado em PBS e utilizado para inóculo nos camundongos.

O protocolo de fusão das células de mieloma com os linfócitos extraídos do baço dos animais imunizados foi realizado de acordo com Galfrè & Milstein, 1981, exceto pela adição de 35% de polietilenoglicol (MM 4000, SIGMA ALDRICH). As células de mieloma utilizadas foram P3U1, resistentes a 8-azoguanina, derivadas de camundongos BALB/c. Quatro a cinco dias após a última imunização, os animais foram sacrificados para remoção do baço, que foi levemente macerado em PBS. Posteriormente as células de baço foram centrifugadas a $2.000 \times g$ por 10 min, ressuspensas em meio RPMI e utilizadas para fusão com o mieloma.

Após a fusão, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e foram monitoradas até o crescimento celular. Os hibridomas foram mantidos de acordo com a literatura (Köhler & Milstein, 1975), em meio de cultura RPMI-HT (100 μ M Hipoxantina, 16 μ M Timidina, SIGMA-ALDRICH) a 37°C em 5% CO₂.

O monitoramento da produção de anticorpos por cada híbrido foi feita por ensaios de imunofluorescência. Os híbridos positivos foram expandidos para crescimento em garrafas de 25cm². Através da seleção por imunofluorescência, o clone 2/55 apresentou perfil de reconhecimento de proteínas do flagelo e foi utilizado para as demais etapas. Finalmente, após expansão e caracterização do hibridoma selecionado, as células foram inoculadas em animais BALB/C de maneira intraperitoneal para a obtenção de ascite. Cinco a sete dias após inoculação, os animais foram sacrificados e todo o líquido intraperitoneal foi coletado (ascite), além do soro, por punção cardíaca. Ambos os materiais obtidos foram utilizados para titulação por *dotblot*. Para isso, 50 μ g de extrato total de tripomastigotas de *T. cruzi* foram utilizados em cada ponto, sendo testadas cinco diluições distintas de ascite e soro. Por fim, o soro apresentou melhor título e foi utilizado para os demais experimentos. Para garantir a especificidade do clone obtido, foram realizados

experimentos de imunoprecipitação e sequenciamento por LC-MS/MS das bandas obtidas após SDS-PAGE.

3.7. Desenvolvimento de Peptídeos para obtenção de anticorpos policlonais

Após a identificação de algumas proteínas diferencialmente expressas ou modificadas durante a adesão a ECM, nova etapa de validação das modificações foi necessária. Para tanto, visando reduzir o reconhecimento da proteína do hospedeiro, utilizou-se como estratégia a seleção de peptídeos antigênicos para produção de anticorpos. Inicialmente a sequência de cada proteína foi obtida pelo UniProt (<http://www.uniprot.org>), utilizando-se o *UniProt entry* obtido para cada *spot* sequenciado. Em seguida, as sequências foram utilizadas para predição de epítomos pelo programa *BCPREDS: B-cell epitope prediction server* (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/>). Esse programa identifica sequências de 20 aminoácidos com capacidade antigênica para apresentação a células B. A capacidade antigênica é determinada a partir do valor de *Score*, cujo valor máximo igual a 1 indica o peptídeo com maior capacidade antigênica. Em seguida todos os peptídeos selecionados foram utilizados para alinhamento utilizando-se o programa BLAST contra banco de sequências protéicas de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rhesus monkey*. Por fim, foram selecionadas apenas as sequências da proteína do parasita contendo pouca ou nenhuma identidade com as sequências das respectivas proteínas nos três organismos. Para verificação da localização de cada peptídeo selecionado na estrutura predita da proteína, foram utilizados modelos obtidos a partir do *PSI- The Protein Model Portal* (<http://www.proteinmodelportal.org/>). Esse programa cria modelos a partir da comparação da sequência dos resíduos de

aminoácidos de interesse (proteína de *T. cruzi*) com outras sequências de proteínas com estrutura tridimensional já desvendada.

A partir das análises realizadas, apenas um peptídeo de cada proteína estudada, com alta capacidade antigênica, que não alinharam com sequências dos três organismos citados e que apresentaram localização superficial no modelo protéico foram selecionados. Os peptídeos foram sintetizados em colaboração com a Profa. Maria Juliano da Unifesp e os anticorpos policlonais produzidos em coelho foram obtidos pelo Centro de Biotecnologia da UFRGS.

3.8. Incorporação de ³⁵S - Metionina e imunoprecipitação de Tubulina

Para análise da velocidade de síntese proteica de tubulina durante a incubação de tripomastigotas com ECM foram realizados ensaios de incorporação metabólica de ³⁵S-metionina. Inicialmente os parasitas foram ressuspensos em meio MEM sem metionina, contendo 5% de SFB e incubados por 20min a 37°C e 5%CO₂. Em seguida, foram adicionados aos parasitas 500µCi de ³⁵S- metionina para cada 1x10⁹ parasitas, seguida de nova incubação. 1x10⁹ parasitas marcados foram incubados com 1mL de ECM em garrafas de 25cm² durante os tempos de 5, 30, 60 e 120 min. Após os tempos de incubação, os parasitas foram coletados e os precipitados foram lavados 2 x com PBS acrescido dos inibidores de protease e fosfatase descritos previamente. Finalmente, os precipitados foram congelados para posterior imunoprecipitação de α-tubulina, como descrito no item 3.9. Após a imunoprecipitação, as amostras foram separadas em SDS-PAGE 10%. O gel foi corado com comassie R250 e descorado em solução descorante (50% metanol; 15% ácido acético). Em seguida o gel de poliacrilamida foi seco utilizando-se o secador Gel Dryer (Bio-rad), exposto a filme de raio X a -80°C por 30 dias e revelado

como descrito abaixo. Os experimentos de incorporação metabólica de ³⁵S-metionina foram realizados em triplicatas biológicas.

3.9. Imunoprecipitação e *Immunoblotting*

Extratos de 1×10^9 parasitas, provenientes das respectivas incubações com ECM, fibronectina, laminina ou BSA (controle) foram ressuspensos com 500 μ L de tampão de lise (50mM Tris-HCl; 150mM NaCl and 1% CHAPS, adicionado de inibidores de protease e fosfatase). Para a imunoprecipitação das proteínas identificadas nos experimentos com ECM, optou-se por ressuspender o extrato em tampão RIPA (50mM Tris-HCl pH7,4; 150mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Deoxicolato de sódio; 1% de Triton-100), para que houvesse maior rendimento durante a extração. Após o precipitado ser ressuspendido, o mesmo foi sonificado por 15min em banho de gelo e centrifugado a $20.000 \times g$ por 7 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a aproximadamente 50 μ L de resina Protein A- Sepharose 4 fast flow (GE Healthcare Life Science) e incubados por 30-60 min a 4°C, para a redução de ligações inespecíficas entre a resina e o extrato. Em seguida, a amostra foi centrifugada, e o sobrenadante foi adicionado a novos 50 μ L de resina, acrescidos de 3-5 μ L do respectivo anticorpo (anti- α -tubulina, anti-PAR, por exemplo) e incubados por 14-16 h a 4°C sob agitação branda. Após a incubação, o material foi centrifugado, o sobrenadante coletado (*non-bound*) e a resina foi exaustivamente lavada com Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Posteriormente, a resina foi ressuspensa em 50 μ L de Laemmli Buffer (60 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5% β -mercaptoetanol; 0,01% Azul de Bromofenol) e a amostra foi utilizada para SDS-PAGE e *immunoblotting*.

As proteínas separadas nos géis unidimensionais ou bidimensionais foram transferidas para membranas de nitrocelulose em uma voltagem constante (80V) por 120 min. A membrana de nitrocelulose foi inicialmente incubada com solução de bloqueio (5% de albumina ou 5% leite desnatado diluídos em solução de TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, contendo 0,1% Tween 20) por 60 min. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos de interesse. Anticorpos anti-pS, pT, pY (mistura de anticorpos anti-serina, treonina e tyrosina fosforiladas foram diluídos 1:2000 em TBS-T contendo 1% albumina por 14-16 h. O mesmo procedimento foi feito com os anticorpos correspondentes a cada proteína imunoprecipitada (*loading control*). Os anticorpos utilizados foram: anti- α -tubulina, 1:4000 (SIGMA-ALDRICH); anti-PAR, 1:2000; anti-pERK 1/2, 1:2000 (Cell Signaling); anti-GAPDH, 1:200 (Invitrogen); anti-HSP60, 1:1000 ou 1:2000; anti-HSP85, 1:1000 ou 1:2000 e anti-GRP78, 1:1000 ou 1:2000.

Após o tempo de incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 x com TBS contendo 0,1% Tween 20, e incubada com os respectivos anticorpos secundários conjugados a peroxidase por 60 min. Logo após, as membranas foram novamente lavadas com TBS contendo 0,1% Tween 20, e reveladas por quimioluminescência. As auto-radiografias foram escaneadas pelo ImageScanner III (GE Healthcare) para posterior análise densitométrica.

A análise das moléculas do citoesqueleto solúveis e polimerizadas foi feita a partir de precipitados congelados de tripomastigotas (incubados com fibronectina, laminina ou BSA) ressuspendidos em Tampão de homogeneização (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0,25 M Sacarose, além dos inibidores de protease e fosfatase já descritos) e ultracentrifugados a 110.000 x g por 40min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e nomeado Fração solúvel (S). O precipitado foi

ressuspendido em tampão RIPA e nomeado fração insolúvel/polimerizada (INS), como descrito na literatura (Wolf & Sahyoun, 1986). Ambas as frações foram imunoprecipitadas utilizando-se 5µL de anticorpo anti- α -tubulina; ou 5µL de anti-PAR Mab e submetidos a SDS-PAGE e *immunoblotting* com a mistura de anticorpos anti-pS, pT, pY, além dos anticorpos referentes a cada proteína. A identificação de cada banda foi verificada pela utilização de anticorpos específicos anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase.

A detecção de ERK1/2 fosforilada em *immunoblotting* de extratos de tripomastigotas foi realizada como descrito anteriormente utilizando-se anticorpos anti-ERK1/2 fosforilada (Cell Signaling) e anti-GAPDH (Invitrogen).

A análise densitométrica das bandas foi realizada pelo programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A razão mostrada em cada figura foi calculada a partir da intensidade relativa de fosforilação de cada proteína (HSP60, HSP85, GRP78, α -tubulin, PAR e ERK1/2) para cada tratamento (ECM, fibronectina ou laminina) e em alguns casos foi dividida pela intensidade relativa de fosforilação de cada proteína para o tratamento com BSA (controle). Cada intensidade relativa de fosforilação foi calculada a partir da razão entre a intensidade da proteína fosforilada (obtida a partir do *immunoblotting* utilizando anti pS, pT e pY) e a intensidade da proteína total. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a validação estatística foi realizada a partir do Teste T de *Student*, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

3.10. Imunofluorescência

Para os experimentos de imunofluorescência, os parasitas incubados com ECM, fibronectina, laminina ou BSA (controle) foram fixados com 2% *p*-formaldeído

(PFA) por 15 min e adicionados a lamínulas. As lamínulas contendo os parasitas foram incubadas com TBS- 0,1% Triton X-100 para permeabilização dos parasitas (duas vezes por 5min), seguido de bloqueio com TBS- 0,1% Triton X-100-1% BSA por 1h à temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos: anti-pS, pT and pY; anti- α -tubulina; anti-PAR; anti-pER1/2. A visualização das proteínas foi realizada com anticorpos específicos anti-IgG conjugados a Alexa-Fluor 555 (Molecular Probes) e Alexa-Fluor 488. Os núcleos foram corados com 20 μ g/mL of 4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI-Invitrogen). As imagens foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse E600 e foram deconvoluídas utilizando-se o programa Huygens Essential image processing.

Seis campos contendo aproximadamente 40 parasitas foram fotografados e as modificações contadas manualmente. A validação estatística foi realizada a partir do Teste T de Student, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

3.11. Tratamento de tripomastigotas com inibidor de fosfatase

Diante da grande desfosforilação observada para as proteínas do citoesqueleto do parasita frente a ECM, fibronectina e laminina, o perfil da fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* foi avaliado na presença de BZ3 (3-(3,5-dibromo-4-hydroxy-benzoyl)-2-ethyl-benzofuran-6-sulfonicacid-(4-(thiazol-2-ylsulfamyl)-phenyl)-amide), um inibidor de proteína tirosina fosfatase 1B. Para tanto, tripomastigotas foram incubados com 1 μ M BZ3 por 60 min a 37°C em 5% CO₂, segundo a literatura (Gallo *et al.*, 2011). Posteriormente, os parasitas foram lavados e 1) fixados com 2% PFA, para ensaios de imunofluorescência; 2) congelados e utilizados posteriormente para ensaios de imunoprecipitação de proteínas do *paraflagellar rod* como descrito anteriormente.

4.RESULTADOS

Parte I – Resposta do parasita a adesão a matriz extracelular

4.1. Padronização de condições experimentais: tempo de incubação de tripomastigotas de *T. cruzi* com a matriz extracelular e eletroforese bidimensional dos extratos

Para a determinação das melhores condições para eletroforese bidimensional, três diferentes formas de inserção do extrato protéico a fitas de 7 cm, com intervalo de pH de 3-10 foram testadas: *cup loading* pela extremidade ácida ou básica da fita ou pela reidratação. O método de *cup loading* permite que o extrato seja inserido à fita em uma das extremidades da mesma durante a focalização isoelétrica, a extremidade com menor valor de pH (extremidade ácida, pH3,0) ou a com maior valor de pH (extremidade básica, pH 10,0). Esse método não foi eficiente para os extratos de tripomastigotas de *T. cruzi*, cuja extração foi feita utilizando o reagente DeStreak (Figura 6A e C). O método de inserção do extrato durante a reidratação foi mais eficiente e foi escolhido para as demais focalizações isoelétricas (figura 6B). Nessa última condição, os *spots* ficaram bem delimitados (sem a presença de linhas horizontais), mas foi verificado que as proteínas do parasita se encontravam basicamente entre os valores de pH 4,0 a pH 7,0 e, por isso, uma fita com esse intervalo de pH foi testada. Como observado na figura 6D, a melhor separação das proteínas do parasita foi observada para fitas de intervalo de pH de 4,0 – 7,0, com tamanho de 13 cm, a qual foi utilizada para os demais resultados de eletroforese bidimensional apresentados.

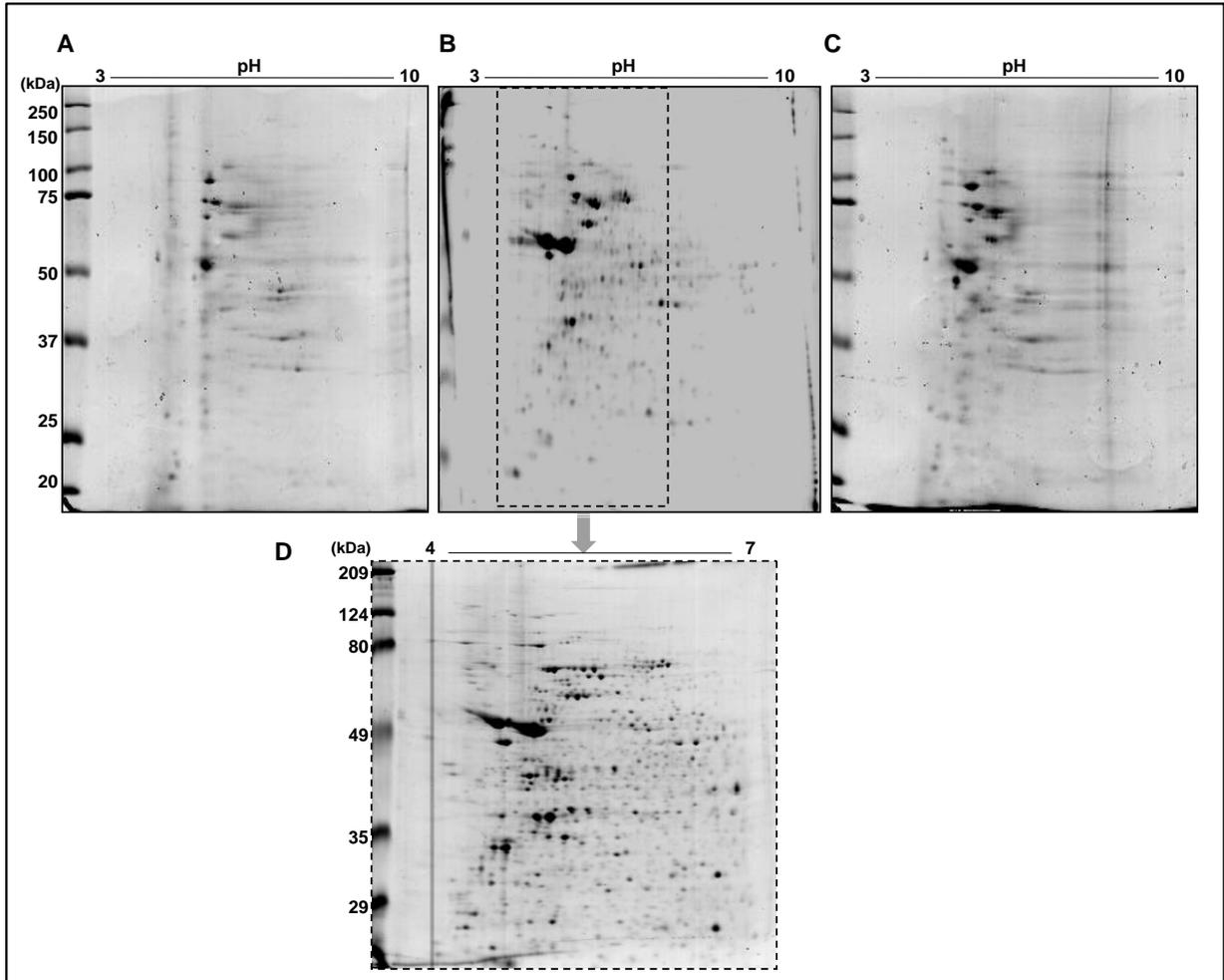


Figura 6. Padronização da eletroforese bidimensional para extratos de tripomastigotas de *T. cruzi*. A) Inserção do extrato de tripomastigotas nas fitas pelo método de *cup loading* pela extremidade com pH 3,0. B) Inserção do extrato durante a reidratação das fitas. C) Inserção do extrato nas fitas pela extremidade com pH 10,0. D) Inserção do extrato durante a reidratação de fitas de 13cm com pH 4,0 – 7,0. À esquerda encontram-se os marcadores de massa molecular em kDa.

Para se verificar o melhor tempo de incubação de tripomastigotas com ECM foram analisados os tempos de 30 min e 120 min de incubação. Em comparação com o tempo zero, verificaram-se modificações mais intensas no período de 120 min, tanto para o perfil de proteínas fosforiladas quanto para o perfil de proteínas totais. Dessa forma, o tempo de 120 min foi escolhido para as demais incubações. A figura 7 ilustrativa, mostra uma região selecionada do gel cujos *spots*, abaixo de 80 kDa, variam progressivamente ao longo do tempo.

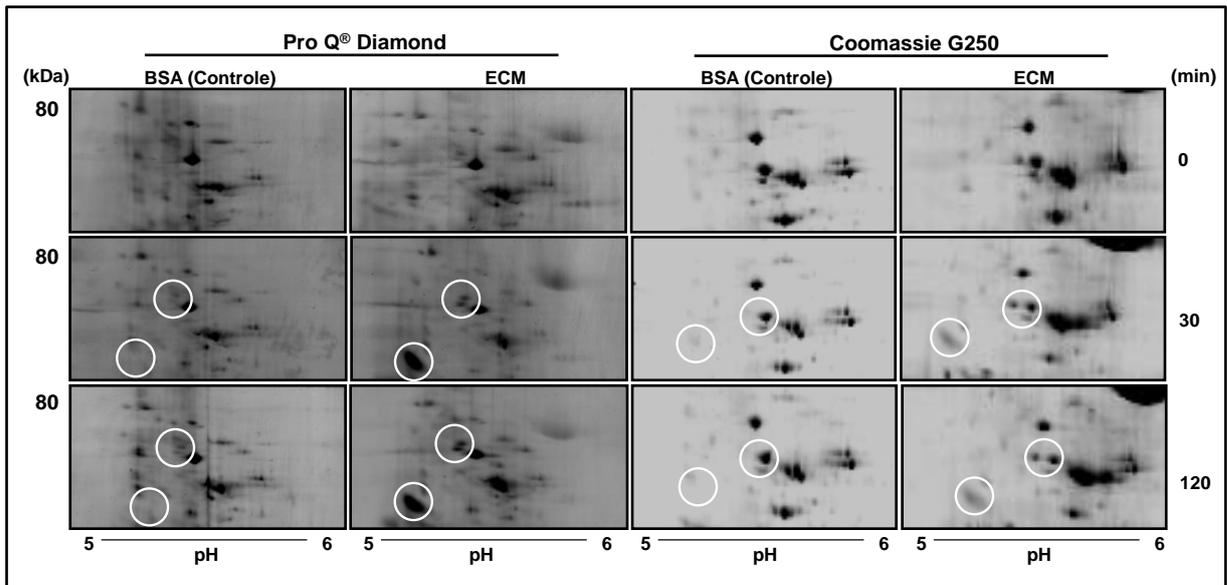


Figura 7. Padronização do tempo de incubação de tripomastigotas de *T. cruzi* com a matriz extracelular (ECM). Região do gel selecionada para ilustrar a variação acumulativa da fosforilação ou quantidade total dos spots indicados dentro dos círculos brancos. À esquerda encontra-se a posição do marcador de 80kDa.

Após esses testes preliminares, estabeleceu-se que o tempo de 120 min de incubação de tripomastigotas com ECM ou seus elementos seria utilizado para a análise por eletroforese 2D utilizando fitas de 13cm e com intervalo de pH de 4,0 a 7,0.

4.2. Adesão de tripomastigotas à matriz extracelular induz mudanças no perfil de fosforilação de proteínas

Experimentos de imunofluorescência com anticorpos anti resíduos de serina, treonina e tirosina fosforilados (anti-pS, pT, pY) foram utilizados para se verificar a distribuição de proteínas fosforiladas em tripomastigotas de *T. cruzi* incubados com ECM (ou BSA, como controle) durante 120 min. Para os parasitas incubados com ECM, verificou-se uma distribuição “pontilhada” das proteínas fosforiladas, havendo uma concentração de proteínas marcadas na região posterior do parasita (assim como observado para as incubações com laminina, figura 23), e uma ausência de marcação na região entre o flagelo e o corpo do parasita (também observado em

parasitas incubados com fibronectina durante o mesmo tempo de incubação (figura 23). Com isso, foi sugerido que fosforilação/desfosforilação de proteínas é um dos componentes da resposta do parasita à adesão a ECM (figura 8).

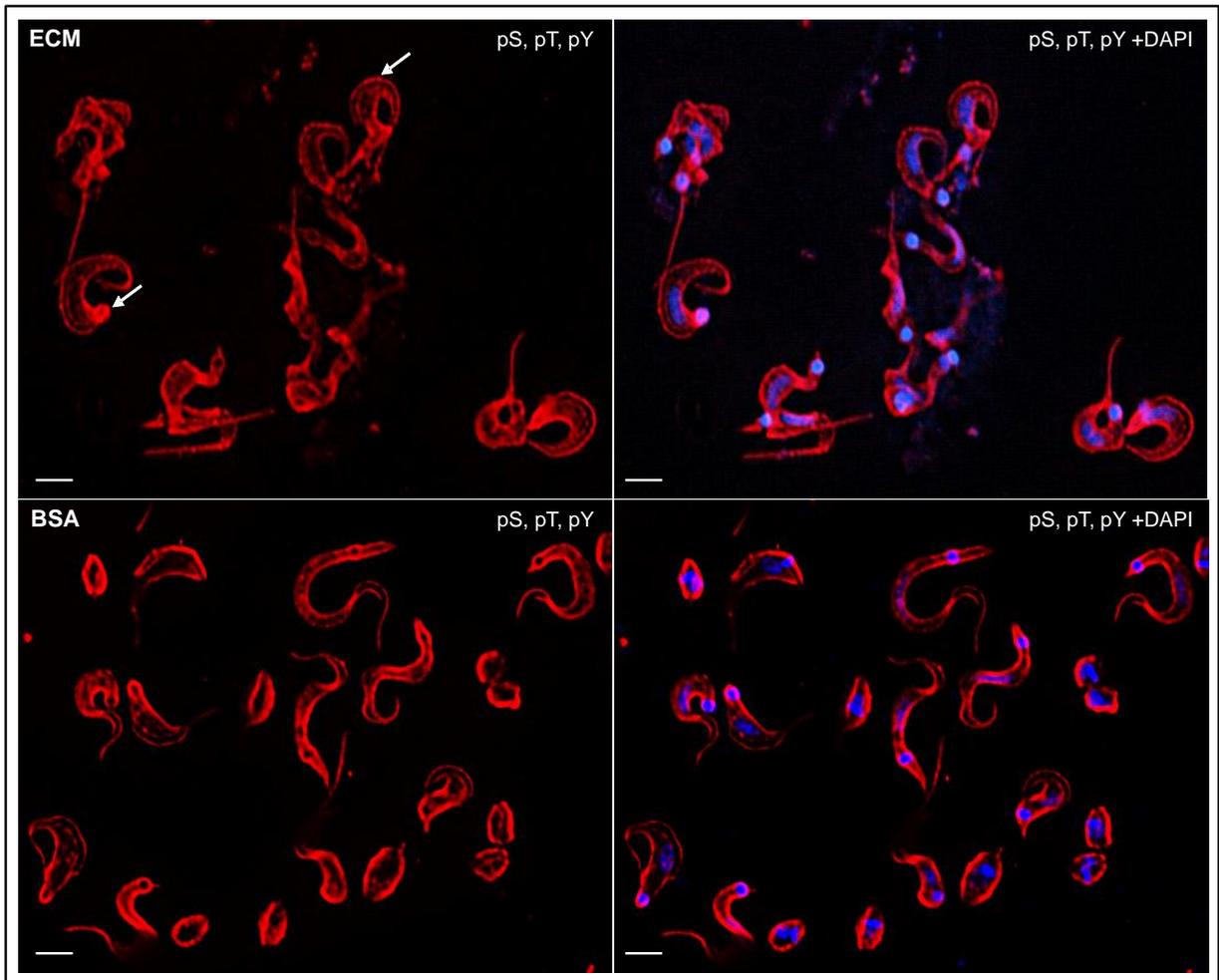


Figura 8. Perfil de proteínas fosforiladas de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados com ECM ou BSA (controle) durante 120 min. A localização das proteínas fosforiladas é mostrada pela reatividade com anticorpos anti- pS, pT e pY (vermelho); núcleo e cinetoplastos são indicados pela coloração por DAPI (azul). As setas brancas indicam modificações também observadas para tripomastigotas incubados com fibronectina e laminina. Barras brancas representam 3,4 μ m.

Diante das modificações visualizadas nos ensaios de imunofluorescência, foram realizados géis bidimensionais para se identificar possíveis alvos protéicos modificados por fosforilação, possivelmente responsáveis pelo perfil apresentado na figura 8. A análise dos géis corados com Pro Q Diamond mostrou 54 *spots* diferencialmente marcados (figura 9A). Também foi observada após a coloração

com coomassie G250, uma variação de alguns spots de proteínas dos parasitas incubados com ECM, sugerindo que poderá haver também variações quantitativas de algumas proteínas do parasita após a incubação com ECM (figura 9B).

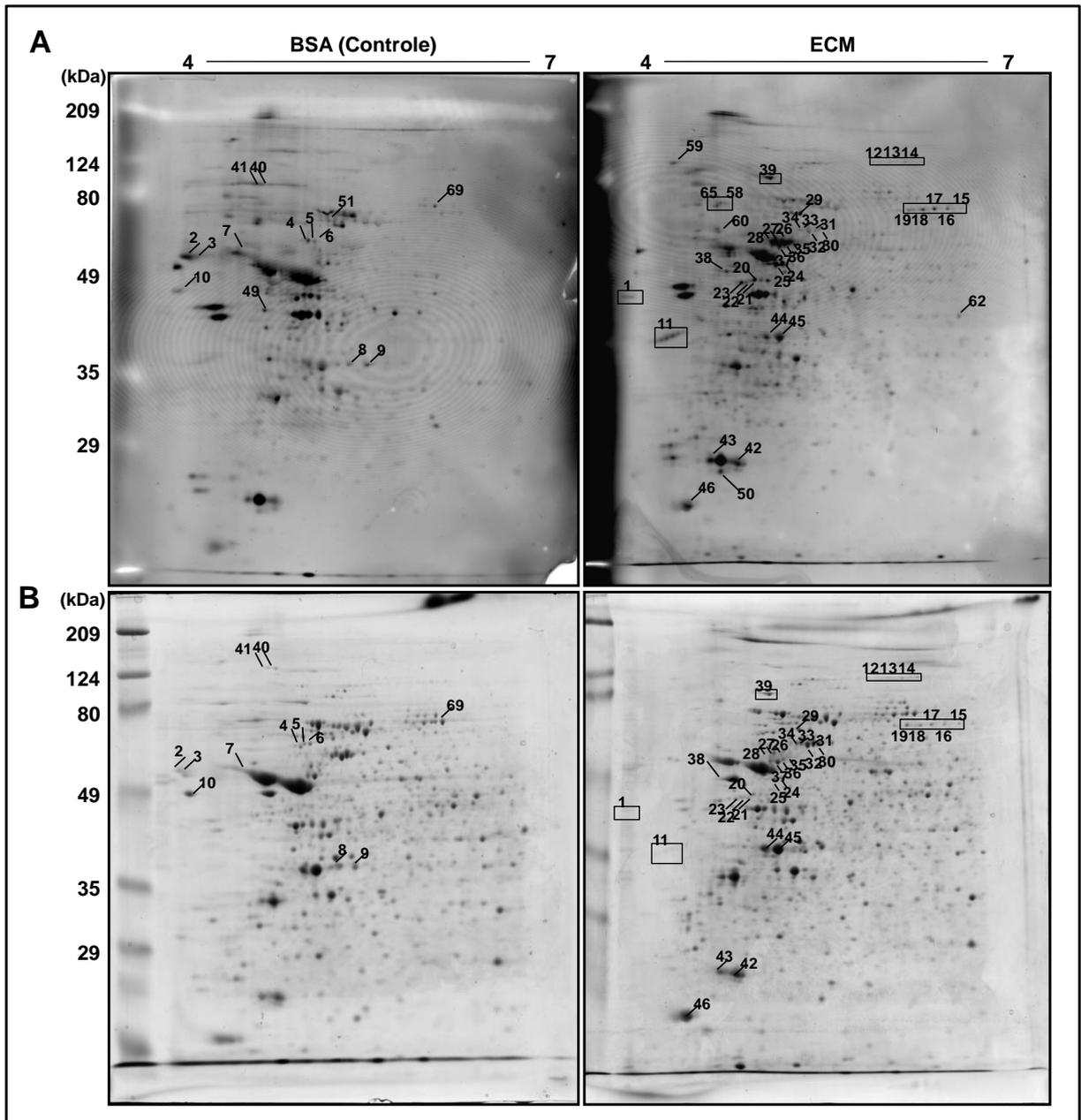


Figura 9. Proteínas diferencialmente modificadas durante adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* a ECM. A) Perfil de proteínas fosforiladas de extratos de tripomastigotas incubados com BSA (controle) ou ECM durante 120 min, obtido por coloração dos géis bidimensionais com Pro Q Diamond. B) Perfil de proteínas totais de extratos de tripomastigotas, obtido por coloração por coomassie coloidal G250. O números indicam os spots com diferença de intensidade significativa entre amostras controle (BSA) e ECM. À esquerda encontram-se os marcadores de massa molecular em kDa.

Os *spots* selecionados após análise dos géis bidimensionais foram enumerados, removidos dos géis, submetidos à digestão por tripsina e sequenciamento por LC-MS/MS. As proteínas foram identificadas utilizando o banco de dados de Kinetoplastidae: TriTrypDB. As proteínas diferencialmente fosforiladas selecionadas para as análises seguintes estão indicadas na tabela 1.

Tabela 1. Identificação das proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi* modificadas durante adesão a ECM por 120 min.

| Spot ID | Proteína | Uniprot # | Score - Mascot | No. Peptídeos identificados | % cobertura da sequência | Teórico | | Δ fosforilação | Δ Expressão |
|---------|--|-----------|----------------|-----------------------------|--------------------------|---------|------|-----------------------|--------------------|
| | | | | | | MW(Da) | pI | | |
| 1 | heat shock protein 85, putative | Q4CQS6 | 101 | 3 | 5 | 81132 | 5,07 | + | + |
| 2 | hypothetical protein, conserved | Q4E2Q5 | 631 | 27 | 47 | 46041 | 8,59 | - | - |
| 3 | hypothetical protein, conserved | Q4E2Q5 | 100 | 7 | 16 | 46041 | 8,59 | - | - |
| 4 | chaperonin containing t-complex protein, putative | Q4DWG6 | 509 | 36 | 37 | 60004 | 5,05 | - | 0 |
| 5 | glucose-regulated protein 78, putative | Q4D620 | 372 | 28 | 34 | 71386 | 5,09 | - | 0 |
| 6 | glucose-regulated protein 78, putative | Q4D620 | 570 | 34 | 35 | 71386 | 5,09 | - | 0 |
| 7 | alpha tubulin, putative | Q8T9X5 | 156 | 13 | 25 | 50395 | 4,94 | - | 0 |
| 8 | hypothetical protein, conserved | Q4CYV9 | 180 | 9 | 25 | 34407 | 5,24 | - | 0 |
| 9 | alpha tubulin, putative | Q8T9X5 | 491 | 27 | 35 | 50395 | 4,94 | - | 0 |
| 10 | calreticulin, putative | Q4DDX3 | 781 | 30 | 44 | 46354 | 4,77 | - | - |
| 11 | kinesin, putative | Q4DRD6 | 30 | 1 | 0 | 134783 | 8,94 | + | + |
| 12 | hypothetical protein, conserved | Q4DND9 | 42 | 4 | 3 | 98849 | 5,87 | + | 0 |
| 13 | hypothetical protein, conserved | Q4DIS9 | 181 | 17 | 17 | 98933 | 5,8 | + | 0 |
| 14 | hypothetical protein, conserved | Q4DIS9 | 120 | 17 | 19 | 98933 | 5,8 | + | 0 |
| 16 | stress-induced protein sti1, putative | Q4DYD9 | 38 | 6 | 11 | 63641 | 6,23 | + | + |
| 17 | hypothetical protein, conserved | Q4DK32 | 145 | 13 | 22 | 57993 | 6,48 | + | + |
| 18 | hypothetical protein, conserved | Q4DK32 | 384 | 30 | 32 | 57993 | 6,48 | + | + |
| 19 | hypothetical protein, conserved | Q4DK32 | 148 | 16 | 29 | 57993 | 6,48 | + | + |
| 20 | ATPase beta subunit, putative | Q4DTX7 | 330 | 20 | 36 | 55924 | 5,27 | - | 0 |
| 21 | heat shock protein 85, putative | Q4CQS6 | 403 | 18 | 19 | 81132 | 5,07 | + | 0 |
| 22 | ATPase beta subunit, putative | Q4DTX7 | 230 | 12 | 20 | 55924 | 5,27 | + | 0 |
| 23 | glucose-regulated protein 78, putative | Q4D620 | 444 | 22 | 28 | 71386 | 5,09 | + | 0 |
| 24 | hypothetical protein, conserved | Q4CUL2 | 30 | 1 | 1 | 111915 | 7,13 | + | + |
| 25 | hypothetical protein, conserved | Q4DVF8 | 538 | 29 | 49 | 42902 | 5,3 | + | + |
| 26 | chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor, groELprotein, heat shock protein 60 | Q4DYP5 | 188 | 9 | 18 | 59357 | 5,38 | + | + |
| 27 | chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor, groELprotein, heat shock protein 60 | Q4DYP5 | 460 | 18 | 36 | 59357 | 5,38 | + | 0 |
| 28 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative | Q4DGN8 | 24 | 2 | 1 | 50491 | 5,16 | + | + |
| 29 | hypothetical protein, conserved | Q4CYL3 | 662 | 39 | 32 | 94120 | 4,85 | + | 0 |

| | | | | | | | | | |
|----|--|--------|------|----|----|--------|-------|---|---|
| 30 | chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor,groELprotein,heat shock protein 60 | Q4DYP5 | 1223 | 36 | 44 | 59357 | 5,38 | + | 0 |
| 31 | trans-sialidase (pseudogene), putative | - | 19 | 3 | 1 | 85652 | 10,27 | + | 0 |
| 32 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H/F, putative | Q4DGN8 | 56 | 4 | 1 | 50491 | 5,16 | + | 0 |
| 33 | chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor,groELprotein,heat shock protein 60 | Q4DYP5 | 335 | 18 | 32 | 59357 | 5,38 | + | 0 |
| 34 | chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor,groELprotein,heat shock protein 60 | Q4DYP5 | 984 | 29 | 40 | 59375 | 5,38 | + | 0 |
| 35 | paraflagellar rod component, putative | Q4DWL5 | 324 | 22 | 25 | 68744 | 5,25 | + | + |
| 36 | ATPase beta subunit, putative | Q4DTX7 | 1468 | 45 | 52 | 55924 | 5,27 | + | 0 |
| 37 | ATPase beta subunit, putative | Q4DTX7 | 867 | 28 | 51 | 55924 | 5,27 | + | 0 |
| 38 | calreticulin, putative | Q4DDX3 | 546 | 39 | 40 | 46354 | 4,77 | + | 0 |
| 39 | heat shock protein 85, putative | Q4CQS6 | 667 | 34 | 29 | 81132 | 5,07 | + | + |
| 40 | heat shock 70 kDa protein, putative | Q4CU95 | 177 | 4 | 10 | 41002 | 6,19 | - | - |
| 41 | heat shock 70 kDa protein, putative | Q4CU95 | 41 | 2 | 2 | 41002 | 6,19 | - | - |
| 42 | eukaryotic translation initiation factor 1A, putative | Q4DPQ3 | 71 | 4 | 22 | 17813 | 5,66 | + | 0 |
| 43 | eukaryotic initiation factor 5a, putative | Q4E4N4 | 207 | 8 | 36 | 18118 | 4,82 | + | 0 |
| 44 | beta tubulin, putative | Q4DQP2 | 567 | 20 | 19 | 50352 | 4,7 | + | 0 |
| 45 | beta tubulin, putative | Q4DQP2 | 492 | 22 | 19 | 50352 | 4,7 | + | 0 |
| 46 | beta tubulin, putative | Q4DQP2 | 732 | 51 | 30 | 50352 | 4,7 | + | + |
| 47 | kinesin, putative | Q4DRD6 | 27 | 1 | 0 | 134783 | 8,94 | 0 | + |
| 48 | myosin heavy chain MYA2-related, putative | Q4DC79 | 35 | 2 | 0 | 141435 | 9,09 | 0 | + |
| 49 | hypothetical protein, conserved | Q4DBH2 | 110 | 6 | 18 | 38831 | 4,83 | - | 0 |
| 50 | beta tubulin, putative | Q4DQP2 | 188 | 17 | 19 | 50352 | 4,7 | + | 0 |
| 51 | heat shock protein, putative | Q4DI67 | 205 | 11 | 13 | 94038 | 5,28 | - | 0 |
| 58 | heat shock 70 kDa protein, putative | Q4CU95 | 34 | 2 | 7 | 41002 | 6,19 | + | 0 |
| 59 | heat shock protein 85, putative | Q4CQS6 | 286 | 23 | 16 | 81132 | 5,07 | + | 0 |
| 60 | alpha tubulin, putative | Q4CLA1 | 134 | 7 | 11 | 50395 | 4,94 | + | 0 |
| 62 | arginine kinase, putative | Q4CWA5 | 460 | 32 | 45 | 40458 | 6,29 | + | 0 |
| 65 | heat shock 70 kDa protein, putative | Q4CU95 | 46 | 1 | 2 | 41002 | 6,19 | + | 0 |
| 69 | chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor,groELprotein,heat shock protein 60 | Q4DYP5 | 599 | 31 | 23 | 59357 | 5,38 | - | 0 |

Foram identificados 39 *spots* com aumento da fosforilação, dos quais 12 têm aparentemente uma variação quantitativa após coloração géis corados com coomassie G 250, indicando um possível controle da expressão dessas proteínas mediado por ECM. 15 *spots* sofreram redução da fosforilação (figura 10A).

Entre as proteínas identificadas (figura 10B), a maioria consiste em proteínas relacionadas com eventos de enovelamento protéico (20 *spots*, 37%) incluindo proteínas do choque térmico (*heat shock proteins* – HSPs) e chaperoninas; proteínas constituintes do citoesqueleto como tubulinas e proteínas do *paraflagellar rod* (11 *spots*, 20%) e proteínas com função desconhecida (13 *spots*, 24%). De uma maneira geral, proteínas com função desconhecida vêm sendo identificadas nos diferentes proteomas e fosfoproteomas de tripanosomatídeos descritos em literatura (Nakayasu *et al.*, 2009; Marchini *et al.*, 2011; Nett *et al.*, 2009 (b), Hem *et al.*, 2010; Oberholzer *et al.*, 2011; Urbaniak *et al.*, 2013).

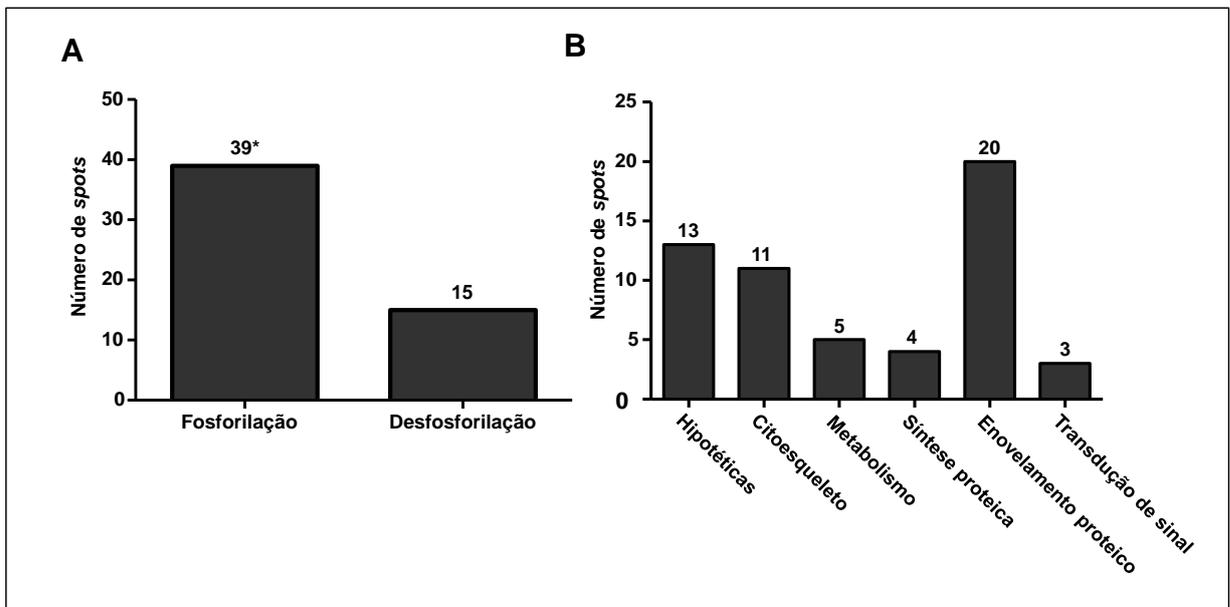


Figura 10. Número de *spots* diferencialmente modificadas durante a adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* a ECM por 120 min. A) Número total de proteínas diferencialmente fosforiladas. * dos 39 *spots* com aumento da fosforilação, 12 também sofreram aumento da expressão. B) Distribuição funcional das proteínas identificadas.

A fosforilação de proteínas envolvidas em síntese proteica também foi observada, como é o caso do *eukaryotic translation initiation factor 1A, putative* e do *eukaryotic initiation factor 5a, putative*, sugerindo que as variações na intensidade total observada para algumas proteínas podem estar relacionadas com o controle da atividade desses fatores. Proteínas relacionadas com transdução de sinal, como a calreticulina também foram moduladas durante adesão do parasita a ECM. A calreticulina está envolvida no controle de múltiplos processos celulares, atuando no enovelamento de proteínas quando localizada no retículo endoplasmático e atua em eventos de transdução de sinal principalmente por ser responsável por manter a homeostase de cálcio intracelular. Em *T. cruzi*, a calreticulina pode ser translocada para a membrana plasmática, sendo capaz de inativar componentes C1 do complemento da célula hospedeira e inibir a atuação de lectinas sobre o parasita (Ramirez, *et al.*, 2012).

Nas proteínas envolvidas em processos metabólicos, destaca-se ATPase beta subunit. Essa proteína foi classificadas no grupo de proteínas com alta capacidade antigênica em promastigotas de *Leishmania infantum* (Dea-Ayuela, *et al.*, 2006). Além disso, ATPases bombeadoras de cálcio foram encontradas na membrana do flagelo de *T. brucei* (Oberholzer, *et al.*, 2011).

Embora as proteínas identificadas e modificadas por fosforilação, incluindo um membro da trans-sialidase, tenham uma grande variedade de funções, as proteínas relacionadas ao enovelamento proteico e proteínas do citoesqueleto foram as mais numerosas e por isso selecionadas para os próximos estudos.

4.3.Obtenção de anticorpos para validação das proteínas identificadas

4.3.1. Obtenção de anticorpo monoclonal anti proteínas do paraflagellar rod

A ausência de um anticorpo disponível comercialmente capaz de identificar essas proteínas foi a motivação principal para o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal no laboratório. Após as etapas de clonagem e seleção das células de hibridoma, descritas previamente, obteve-se um anticorpo monoclonal altamente específico capaz de reconhecer três proteínas constituintes do *paraflagellar rod* (figura 11A), com massas moleculares aproximadas entre 67 a 70kDa, identificadas por sequenciamento por espectrometria de massa como *Paraflagellar rod protein putative*, *paraflagellar rod protein 3 putative* e *69kDa paraflagellar rod protein putative* (figura 11C). A redução da fosforilação foi encontrada para essa última proteína. O anticorpo obtido, nomeado Mab-PAR, foi altamente específico para o reconhecimento das proteínas do parasita visto que nenhuma banda foi identificada nesse intervalo de massa após imunoprecipitação utilizando extratos da célula hospedeira LLCMK2 (figura 11B). Ambos as fontes de anticorpos, ascite e soro foram bastante eficientes no reconhecimento das proteínas citadas, incluindo em diluições maiores do anticorpo (figura 11D).

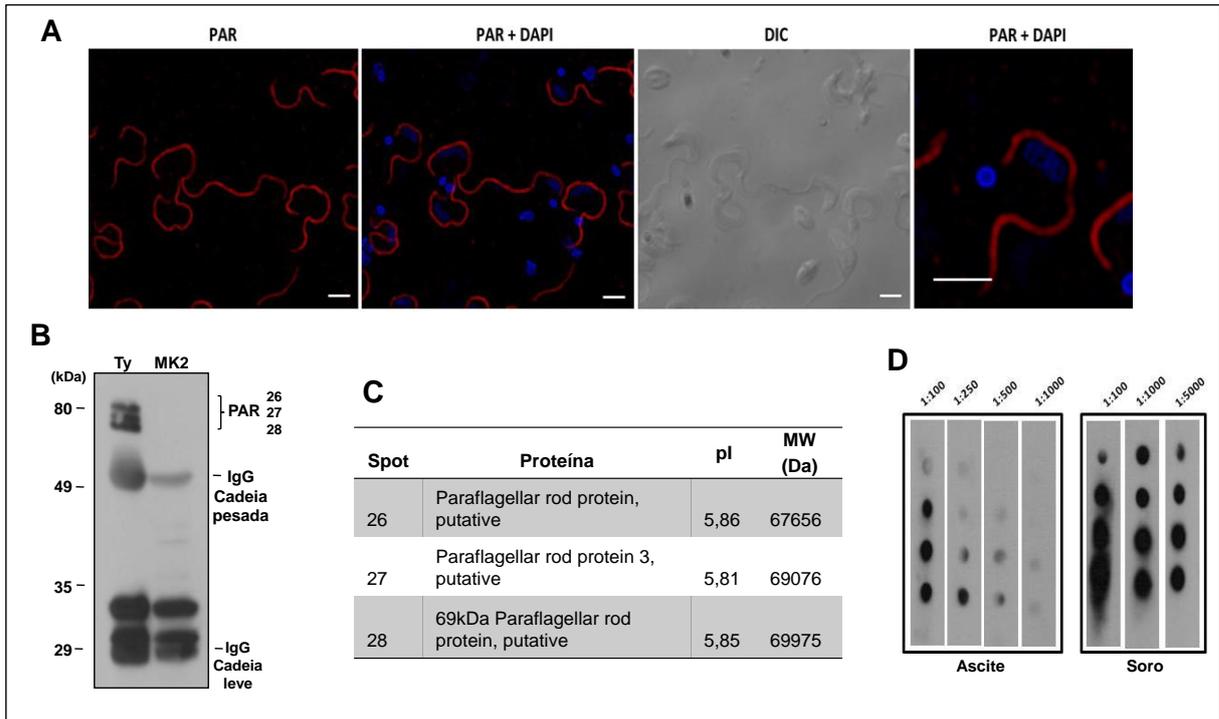


Figura 11. Caracterização do anticorpo monoclonal obtido, nomeado 2/55. A) Imunofluorescência de tripomastigotas de *T. cruzi* indicando a localização flagelar das proteínas reconhecidas pelo anticorpo 2/55. B) Imunoprecipitação utilizando o anticorpo 2/55 de três bandas de massas moleculares entre 69 e 80kDa. C) Resultado do sequenciamento por LC-MS/MS das três bandas observadas em B. pI e MW representam ponto isoelétrico e massas moleculares teóricas obtidos a partir de anotações do Uniprot. D) Titulação por *dot blot* das fontes de anticorpos obtidos de animais inoculados com hibrodoma, ascite e soro. Foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 50 e 100µg de extrato total de tripomastigotas.

4.3.2. Obtenção de anticorpos policlonais anti-proteínas do choque térmico

Frente à baixa reatividade de anticorpos disponíveis comercialmente com as proteínas do parasita de interesse para estudo das modificações pós-traducionais, fez-se necessária a obtenção de anticorpos policlonais contra essas proteínas do parasita. Para a seleção do melhor peptídeo para a produção dos anticorpos, foi realizada uma sequência de análises *in silico* da sequência de cada uma das proteínas selecionadas (Q4DYP5, Q4CQS6 e Q4D620), como descrito previamente no item 3.7.

Para a proteína HSP60 (Q4DYP5) foram obtidas oito sequências de 20 resíduos de aminoácidos com grande capacidade antigênica predita pelo programa

BCPRED (valores de *score* próximos de 1, o cut off foi 0,9 e valor máximo foi de 1) (figura 12A e B). A sequência CIATGTNPIDMKRGM DRAVG foi selecionada como alvo para produção de anticorpos por não apresentar nenhuma homologia com HSP60 de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Rhesus monkey*. Sua localização na predição da estrutura proteica está indicada na figura 12C.

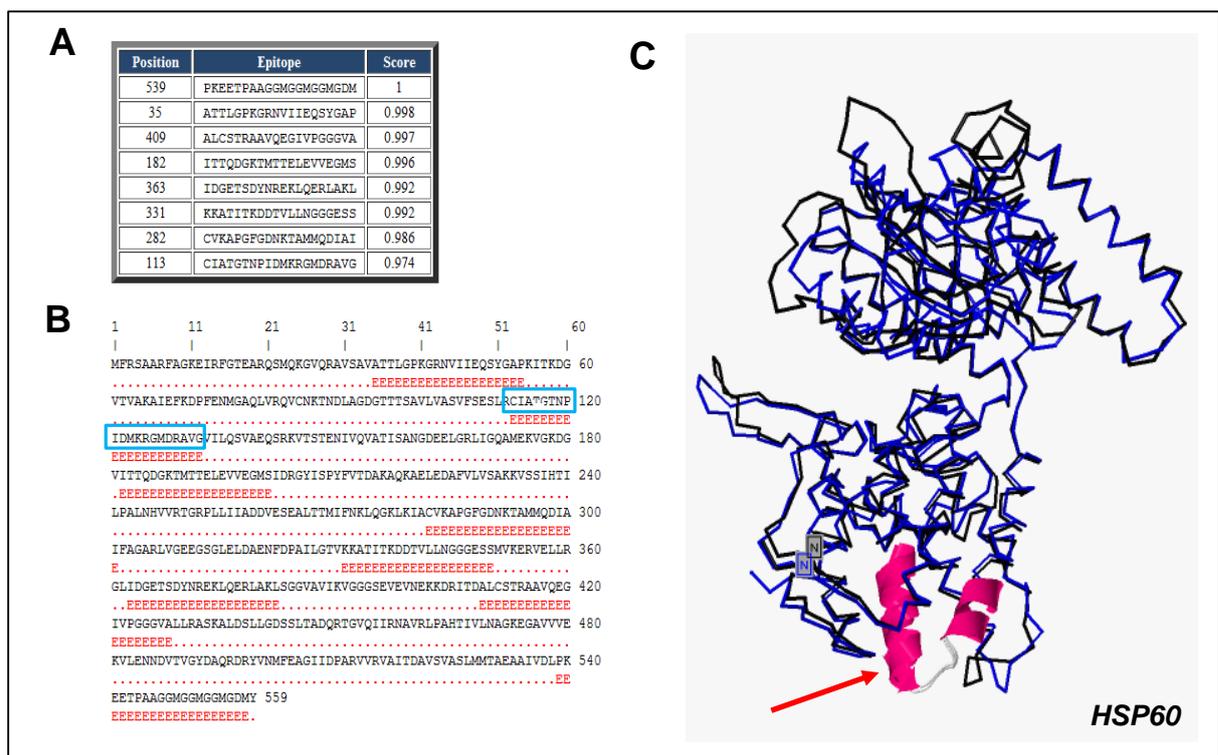


Figura 12. Identificação dos epítopos de HSP60 e predição da estrutura e localização do peptídeo selecionado. A) Epítopos selecionados pelo programa BCPRED, indicando sua localização na sequência proteica (position) a sequência do epítipo e o valor de *score* (valor máximo e ideal equivale a 1). B) Localização dos epítopos na sequência da proteína HSP60. Em azul o peptídeo selecionado. C) Predição da estrutura da proteína HSP60. A seta vermelha indica a localização e estrutura do peptídeo selecionado para síntese e produção de anticorpos policlonais.

Utilizando os mesmos critérios, a sequência peptídica selecionada para a proteína HSP85 (Q4CQS6) EDEAAAKNEEGEEPKEVEEV, com valor de *score* igual a 1 (figura 13A e B), enquanto que para a proteína GRP78 (Q4D620), o peptídeo selecionado foi MQFLDDNPADKEEYDEARD (figura 14A e B).

Todos os três peptídeos selecionados se apresentam localizados na superfície do modelo de cada estrutura protéica indicando uma provável facilidade de reconhecimento pelo anticorpo produzido (Figuras 12C, 13C e 14C).

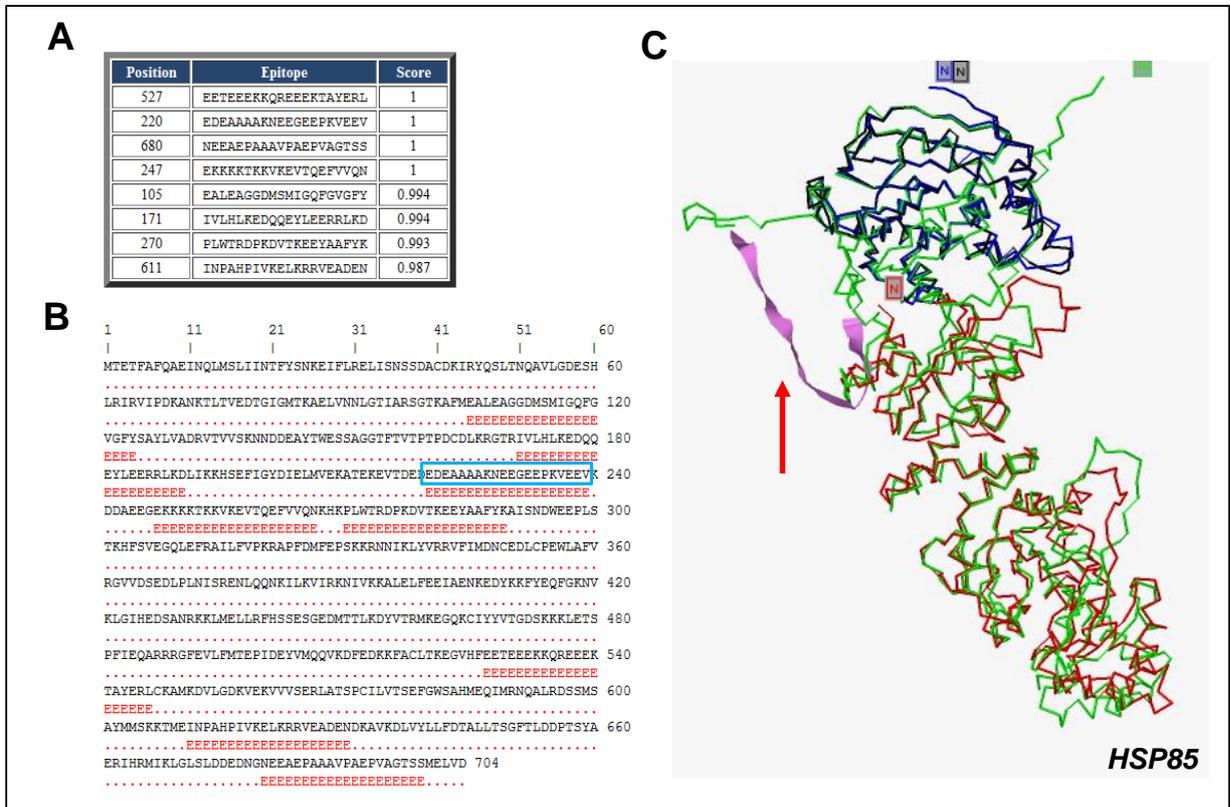


Figura 13. Identificação dos epítomos de HS85 e predição da estrutura e localização do peptídeo selecionado. A) Epítomos selecionados pelo programa BCPRED indicando sua localização na sequência proteica (position) a sequência do epítomo e o valor de score (valor máximo e ideal equivale a 1). B) Localização dos epítomos na sequência da proteína HSP85. Em azul o peptídeo selecionado. C) Predição da estrutura da proteína HSP85. A seta vermelha indica a localização e estrutura do peptídeo selecionado para síntese e produção de anticorpos policlonais.

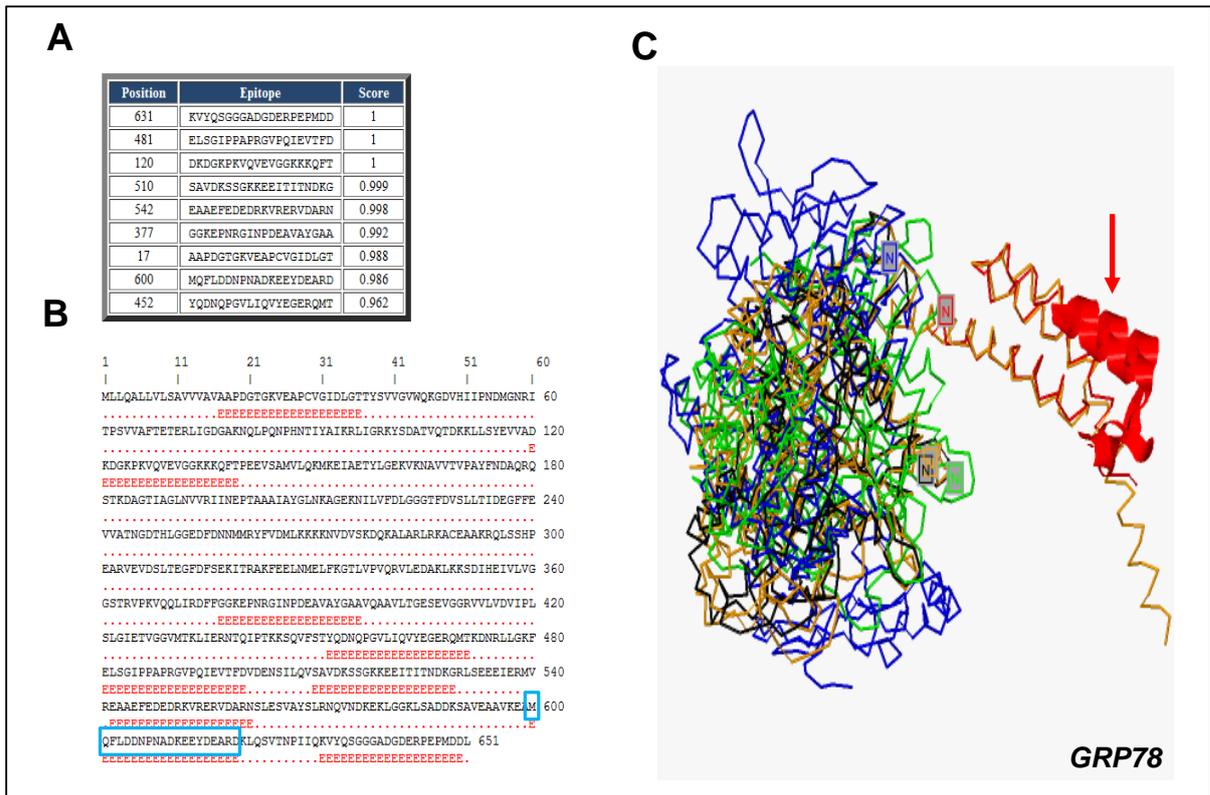


Figura 14. Identificação dos epítomos de GRP78 e predição da estrutura e localização do peptídeo selecionado. A) Epítomos selecionados pelo programa BCPRED indicando sua localização na sequência proteica (position) a sequência do epítomo e o valor de *score* (valor máximo e ideal equivale a 1). B) Localização dos epítomos na sequência da proteína GRP78. Em azul o peptídeo selecionado. C) Predição da estrutura da proteína GRP78. A seta vermelha indica a localização e estrutura do peptídeo selecionado para síntese e produção de anticorpos policlonais.

Os anticorpos obtidos foram testados para verificar suas especificidades. Os resultados de imunofluorescência indicam uma localização citoplasmática para a proteína HSP60, com maior marcação na região posterior do parasita. A proteína HSP85 apresentou predominantemente uma localização no flagelo do parasita, e a proteína GRP78, uma localização próximo à superfície do parasita (figura 15A). Os ensaios de *immunoblotting* indicaram boa especificidade dos anticorpos produzidos, exceto para o anticorpo anti GRP78, o qual reconheceu diferentes bandas de massas moleculares menores. Além disso, verificou-se que os três anticorpos produzidos não reconhecem proteínas da célula LLCMK2 com massa molecular igual à da proteína de *T. cruzi* (figura 15B, canaletas 2). Apesar da aparente localização flagelar de HSP85 e da localização próxima à membrana para GRP78,

as três proteínas com a massa molecular esperada foram detectadas na fração solúvel de extratos de tripomastigotas de *T. cruzi* (figura 15C).

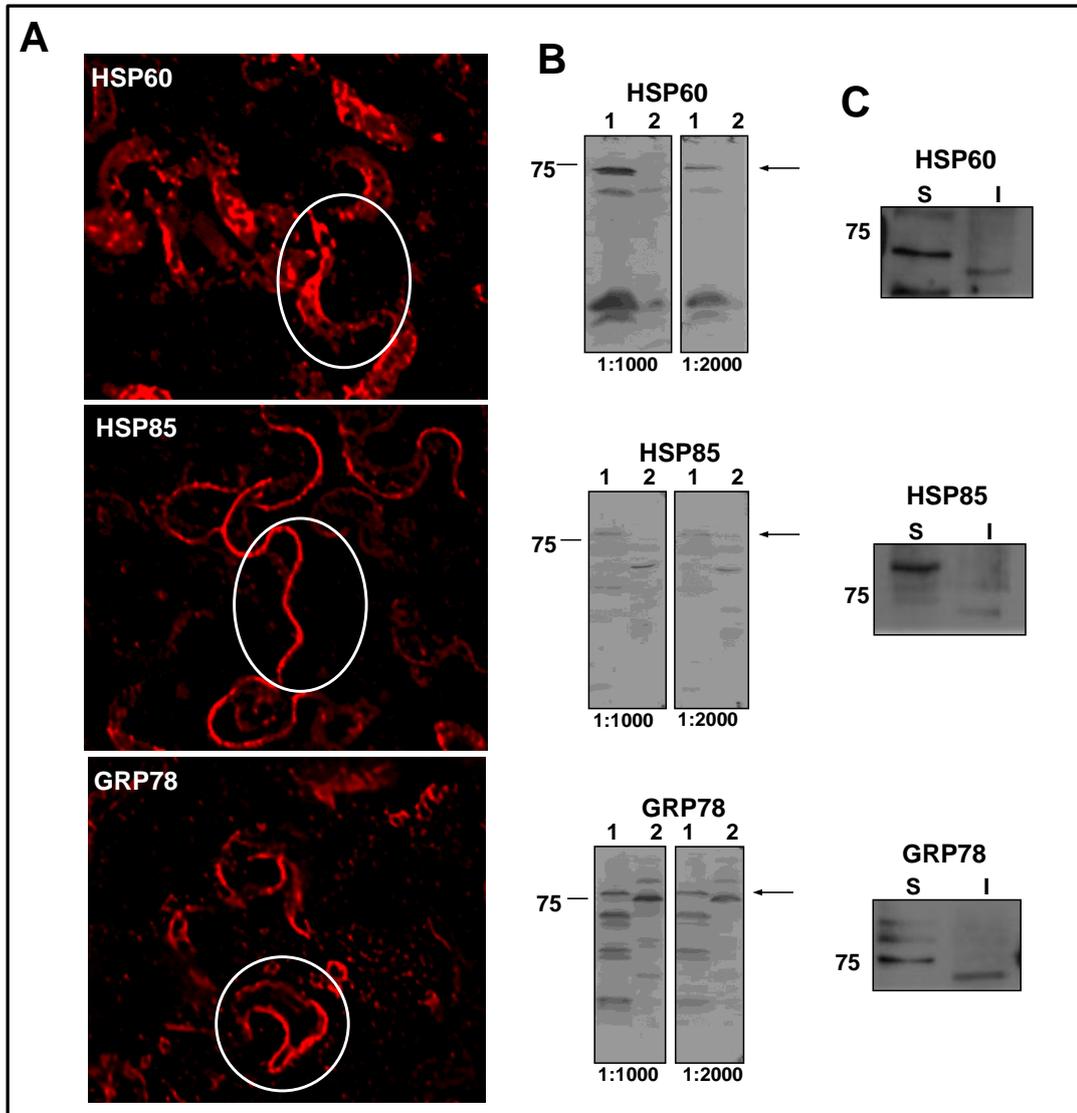


Figura 15. Reatividade dos anticorpos anti-HSP obtidos. A) Imunofluorescência utilizando os anticorpos policlonais obtidos. B) Immublotting de extratos totais de tripomastigotas (canaleta 1) e células LLCMK2 (canaleta 2). Exceto para o anticorpo anti GRP78, os demais apresentam alta especificidade pela proteína do parasita. C) Immunoblotting de fracionamento celular de extratos de tripomastigotas: Frações solúvel (S) e insolúvel (I).

4.4. Adesão de tripomastigotas a ECM induz aumento na fosforilação de proteínas envolvidas no enovelamento proteico

Modificação no nível de fosforilação de proteínas relacionadas com o enovelamento de proteínas foi o principal evento ocorrido no parasita como resposta a adesão a ECM. Nesse grupo de proteínas resalta-se a chaperonina HSP60, *Glicose regulated protein 78* (GRP78) e HSP85, indicadas na figura 16A. Todas elas pertencem à família de proteínas do choque térmico, ou *Heat Shock Proteins* (HSPs) (Ritossa, 1962; Tissières, *et al.*, 1974). HSPs compreendem um subgrupo de chaperonas que atuam, principalmente, na manutenção da homeostase celular, sendo moduladas por diferentes fatores externos (Neckers & Tatu, 2008).

Nota-se que para esse grupo de proteínas (20 *spots* identificados) houve uma predominância no aumento da fosforilação, em alguns casos acompanhado de aumento dos níveis protéicos (7 *spots* com variação na intensidade nas imagens provenientes de coloração com coomassie coloidal G250) (figura 16B, tabela 1).

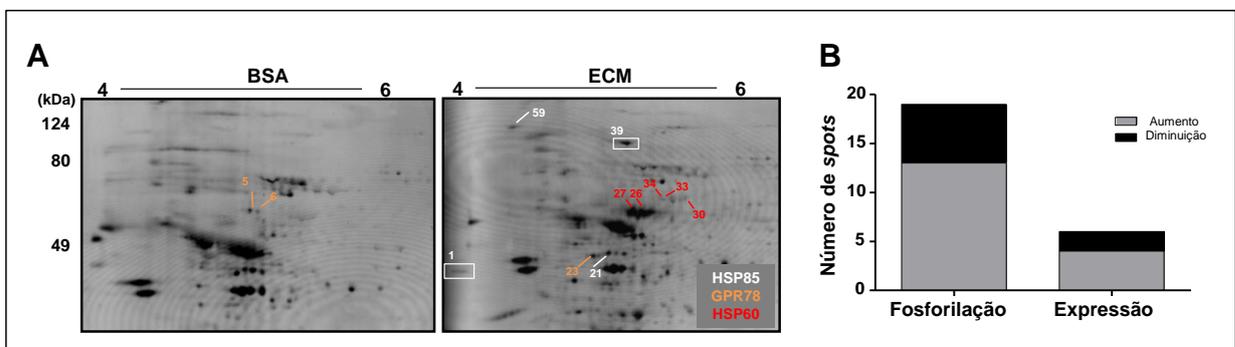


Figura 16. Proteínas do choque térmico são diferencialmente fosforiladas na adesão de tripomastigotas a ECM. A) Gel bidimensional representativo indicando os *spots* com variação na intensidade de fosforilação em extratos de tripomastigotas incubados com ECM por 120 min. No gel são indicados os *spots* referentes às três proteínas selecionadas para a validação. B) Gráfico dos 20 *spots* identificados como proteínas envolvidas em enovelamento proteico com variações na intensidade de fosforilação e de expressão.

Após a obtenção dos anticorpos, novos experimentos de *immunoblotting* foram realizados para validar as modificações por fosforilação encontradas com o corante Pro Q Diamond, específico para fosfoproteínas (figura 17A e B). Apesar da intensidade de fosforilação para cada metodologia empregada estar em uma escala

de variação diferente, é possível notar que, os resultados obtidos por *immunoblotting* (figura 17C e D) e por coloração por Pro Q Diamond são equivalentes, confirmando que todas as HSPs analisadas apresentam um aumento em sua intensidade de fosforilação durante o período de adesão de tripomastigotas a ECM.

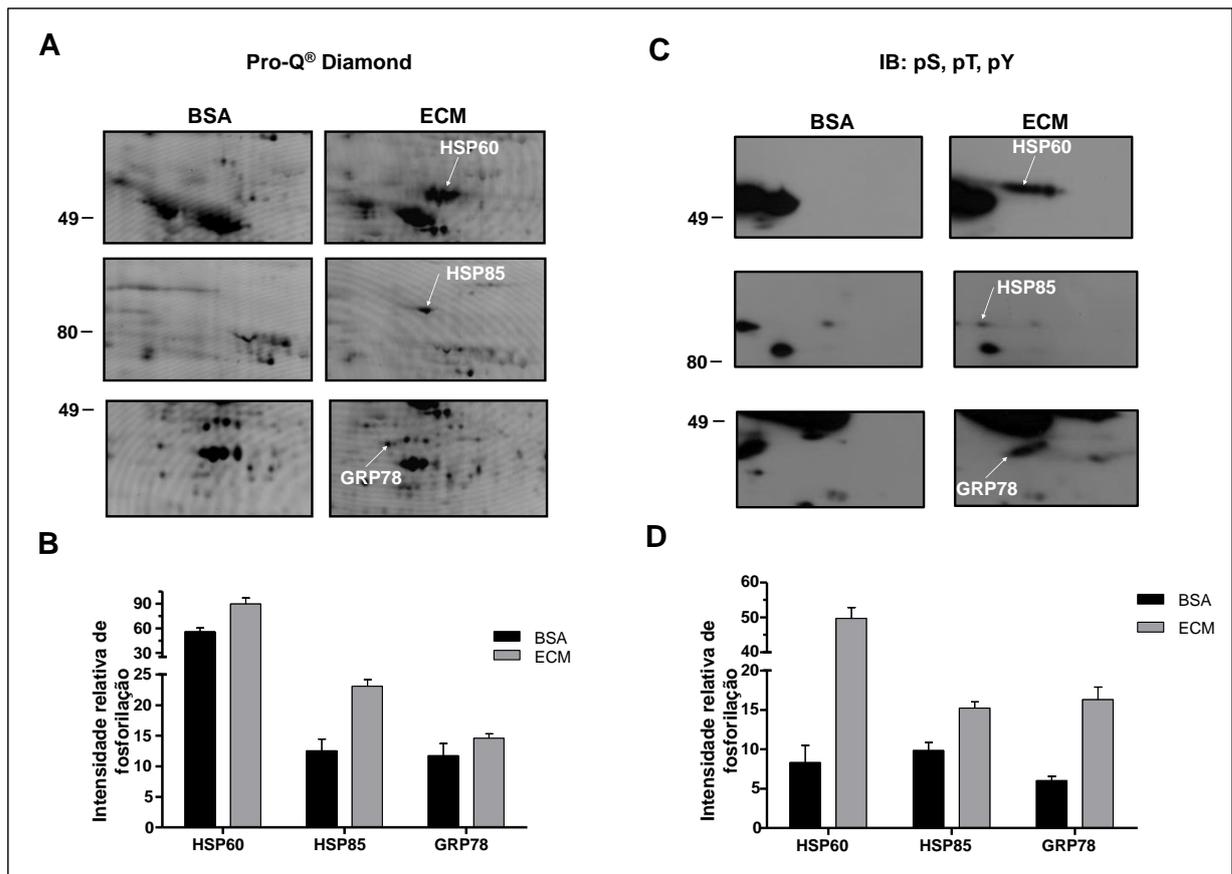


Figura 17. Validação do aumento da fosforilação de HSPs por *immunoblotting*. A) Gel representativo dos spots referentes a HSP60, HSP85 e GRP78. As setas brancas indicam os *spots*. B) Quantificação da intensidade relativa de fosforilação de cada um dos *spots* identificados em A. C) *Immunoblotting* representativo utilizando anticorpos anti- pS, pT, pY. As setas brancas indicam as respectivas proteínas. D) Quantificação da intensidade relativa de fosforilação dos resultados obtidos por *immunoblotting* (normalizados de acordo com a intensidade total de cada proteína, utilizando os anticorpos produzidos) (C). Todos os experimentos apresentados foram realizados em triplicata.

Assim, foi possível atribuir o aumento da fosforilação de proteínas de choque térmico com um dos principais componentes da resposta a de *T. cruzi* a adesão a ECM.

4.5. Adesão de tripomastigotas a matriz extracelular induz redução da expressão, fosforilação e poliglutamilação de α -tubulina

Entre as proteínas constituintes do citoesqueleto moduladas durante a adesão à matriz extracelular, destacaram-se as isoformas α e β de tubulina. Foram identificados 10 *spots* com variação na fosforilação durante a incubação com ECM, dos quais oito podem sofrer um aumento na fosforilação (sendo 4 com aumento da intensidade total) e dois uma redução (um com redução também na intensidade total). Entre os 10 *spots* identificados, o *spot* 7, referente à α -tubulina, apresentou uma grande redução da fosforilação (figura 18A e B), observada nos géis corados com ProQ Diamond, e pela grande redução nos níveis proteicos observada através das imagens obtidas por coloração com coomassie coloidal G250 (figura 9).

Proteínas do *paraflagellar rod* também aparentaram uma redução da fosforilação, observada para o *spot* 35 (figura 18A e B). Entretanto, devido à sua localização muito próxima a *spots* referentes à HSP60, cujo aumento de fosforilação foi muito intenso, a modificação do *spot* referente à proteína do *paraflagellar rod* teve que ser validado por imunoprecipitação.

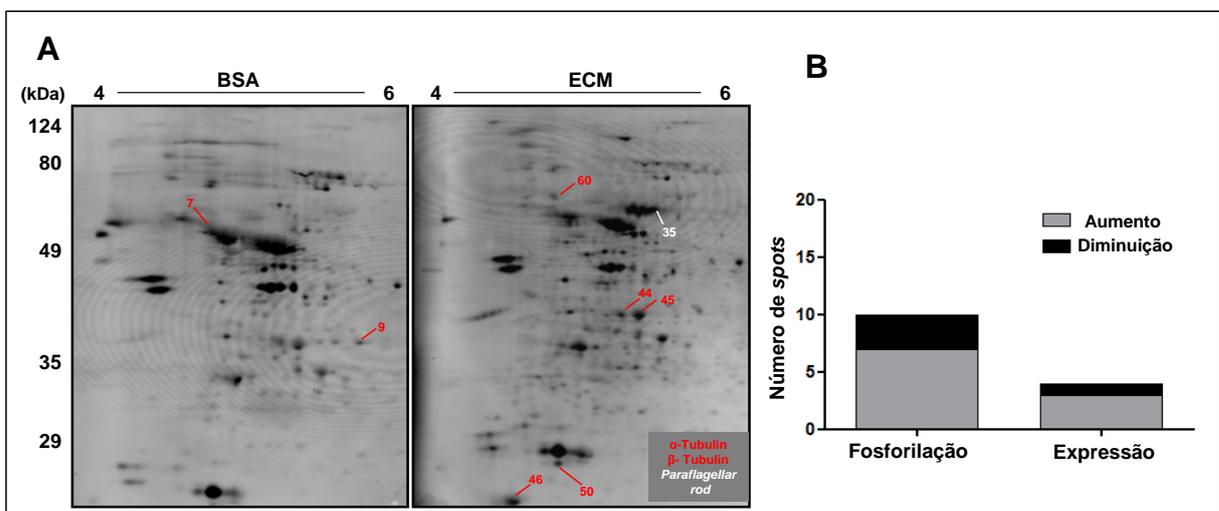


Figura 18. Proteínas do citoesqueleto são diferencialmente fosforiladas na adesão de tripomastigotas a ECM. A) Gel bidimensional representativo indicando os *spots* com variação na intensidade de fosforilação em extratos de tripomastigotas incubados com ECM por 120 min. No gel

são indicados os *spots* referentes à tubulina e proteína do *paraflagellar rod*, selecionados para a validação. B) Gráfico dos 10 de *spots* identificados como proteínas do citoesqueleto com variações na intensidade de fosforilação e expressão. As massas moleculares são mostradas à esquerda em kDa.

Para validar a redução nos níveis de fosforilação e da intensidade da proteína observados para o *spot* 7 referente à α -tubulina, foram realizados experimentos de *immunoblotting* a partir de 2D-PAGE (figura 19A e B) e de imunoprecipitações de tubulina (figura 19C e D). Verificou-se que para ambos os experimentos há uma grande redução nos níveis de α -tubulina total e fosforilada durante a adesão à matriz extracelular (19A e B). É importante ressaltar que a redução dos níveis protéicos observada para a tubulina pode ser proveniente da redução da expressão da proteína ou do aumento da degradação da mesma. Com o intuito de verificar a taxa de expressão de α -tubulina ao longo do tempo de incubação com a matriz, foram realizados experimentos de monitoramento de síntese protéica através da incorporação de metionina marcada (^{35}S -L-methionine) seguido de imunoprecipitação de α -tubulina. Foi verificada uma grande redução da incorporação de metionina marcada para amostras de parasitas incubados com ECM, indicando que a redução na expressão de α -tubulina também é um dos principais eventos desencadeados no parasita durante sua adesão a ECM (figura 19E e F).

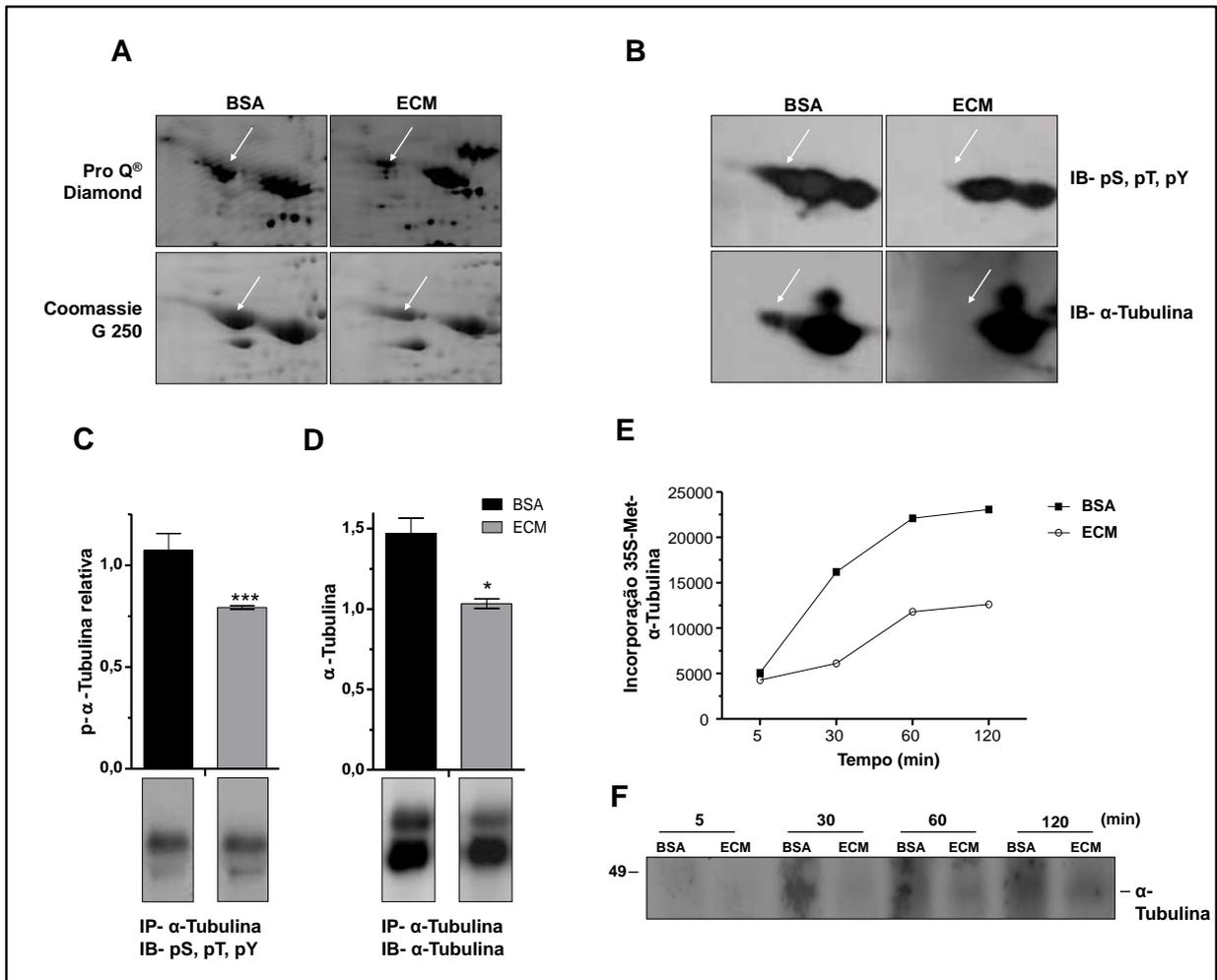


Figura 19. Redução da expressão de tubulina durante a adesão a matriz extracelular. A) 2D-PAGE de extratos de tripomastigotas incubados com BSA ou matriz extracelular (ECM) por 2h corados com ProQ, para visualização de proteínas fosforiladas, e coomassie coloidal, para visualização de proteínas totais. B) *Immunoblotting* representativo de extratos de tripomastigotas incubados com BSA (BSA, controle) ou matriz extracelular (ECM) por 2h, utilizando anticorpos anti serina, treonina e tirosina fosforilados (pS, pT, pY) e anti- α -tubulina (controle de quantidade de proteína aplicada). As setas brancas representam o *spot* referente à α -tubulina. C) e D) Quantificação do *immunoblotting* obtido após imunoprecipitação de α -tubulina (fosforilada e total, C e D, respectivamente) de extratos de tripomastigotas incubados com BSA ou ECM por 2h. *** representam $p < 0,001$ e * representa $p < 0,05$. E) e F) Perfil de síntese de α -tubulina durante a incubação e tripomastigotas a BSA ou ECM, monitorados por ensaios de incorporação de ³⁵S-metionina e imunoprecipitação de tubulina. Todos os experimentos apresentados foram realizados em triplicatas biológicas.

Além da fosforilação de resíduos de serina, treonina ou tirosina, tubulina pode sofrer outros tipos de modificações pós-traducionais, como a acetilação do resíduo de lisina 40, a adição de vários radicais glutamílicos a resíduos de glutamato na porção C-terminal da cadeia e a adição ou remoção de resíduos de tirosina a extremidade C-terminal da proteína, entre outras (Wloga & Gaertig, 2010; Hammond, *et al.*,

2008). Diante da redução da expressão de tubulina ao longo da adesão a ECM, foi essencial verificar as variações das modificações pós-traducionais de tubulina ao longo dessa adesão.

Para tanto, *immunoblottings* para verificar a existência de modificações de tubulina por tiossinação (representada com Y), acetilação da lisina 40 (representada com k40), além de poliglutamilação (polyE) foram realizados. Foi possível observar que apenas a poliglutamilação sofreu uma redução de 45% após 120 min de adesão a ECM, indicando o envolvimento dessa modificação pós-traducional como ponto importante na resposta a adesão ou ainda uma maior degradação de moléculas de tubulina poliglutamilada como resposta a adesão a matriz extracelular (figura 20).

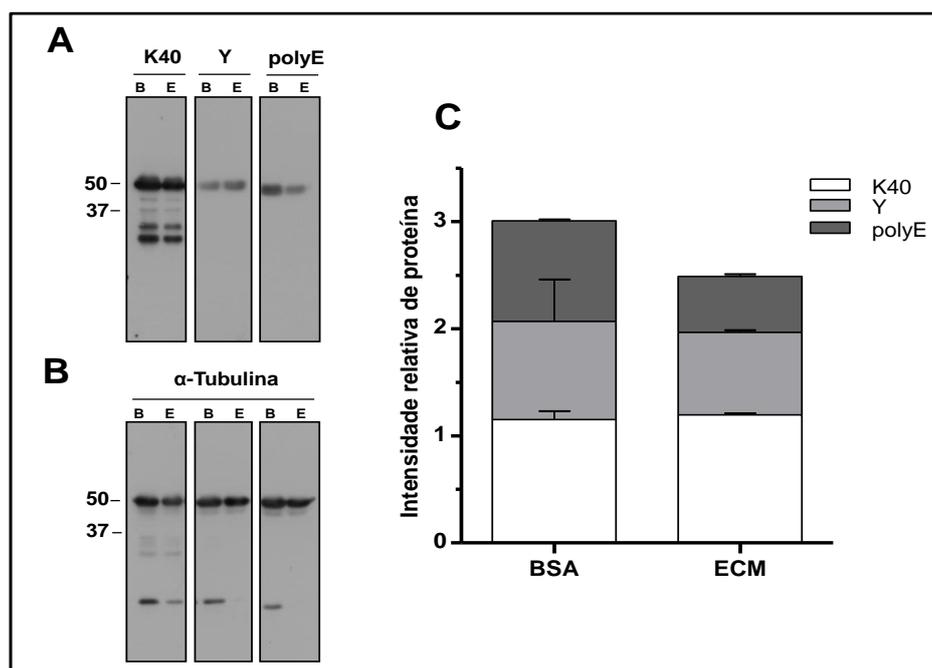


Figura 20. Redução da poliglutamilação de tubulina durante a adesão a matriz extracelular. A) *Immunoblotting* representativo de extratos de tripomastigotas incubados com BSA (B, controle) ou matriz extracelular (E) por 2h. Foram utilizados anticorpos anti-acetilação de lisina 40 (K40), tiossinação da porção C-terminal (Y) e poliglutamilação da porção C-terminal (polyE). B) *Immunoblotting* representativo de extratos de tripomastigotas incubados com BSA (B, controle) ou matriz extracelular (E) por 2h, utilizando anticorpo anti- α -tubulina (controle de quantidade de proteína aplicada). C) Quantificação dos resultados apresentados em A e B. A intensidade relativa da proteína corresponde à razão da intensidade da banda apresentada em A sobre a apresentada em B. Os resultados foram obtidos a partir de duas repetições biológicas.

Dessa forma, foi possível notar a partir dos resultados obtidos que a adesão do parasita à matriz extracelular resulta em uma mudança direta sobre o citoesqueleto do parasita. Especificamente, a expressão de tubulina parece ser reduzida, seguindo de redução também da quantidade de fosforilação e poliglutamilação da mesma.

É importante ressaltar que há uma grande correlação entre modificações de citoesqueleto e alterações na movimentação e estabilidade do flagelo que pode estar relacionada com a capacidade de adesão e invasão à célula hospedeira. As polimodificações em tubulinas constituintes dos microtúbulos do axonema são principais responsáveis pela estabilidade de cílios e flagelos (Wloga & Gaertig, 2010; Hammond, *et al.*, 2008). Diante disso, foi levantada a possibilidade de que a adesão de tripomastigotas a ECM de alguma forma poderia levar também a mudanças no flagelo do parasita.

4.6. A fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* está envolvida com a estabilidade do flagelo?

No intuito de se validar se a adesão a ECM pode alterar os níveis de fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod*, foram realizados experimentos de imunoprecipitação utilizando o anticorpo monoclonal Mab-PAR (descrito a seguir no item 4.8) e *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-pS, pT, pY e Mab-PAR. Verificou-se uma pequena redução nos níveis de fosforilação da proteína do *paraflagellar rod* de aproximadamente 69kDa (aproximadamente 22%), assim como uma provável redução de cerca de 15% nos níveis totais dessa proteína (figura 21A e B). Diferentemente da tubulina, as modificações observadas para as proteínas do *paraflagellar rod* foram menos acentuadas, embora significativas.

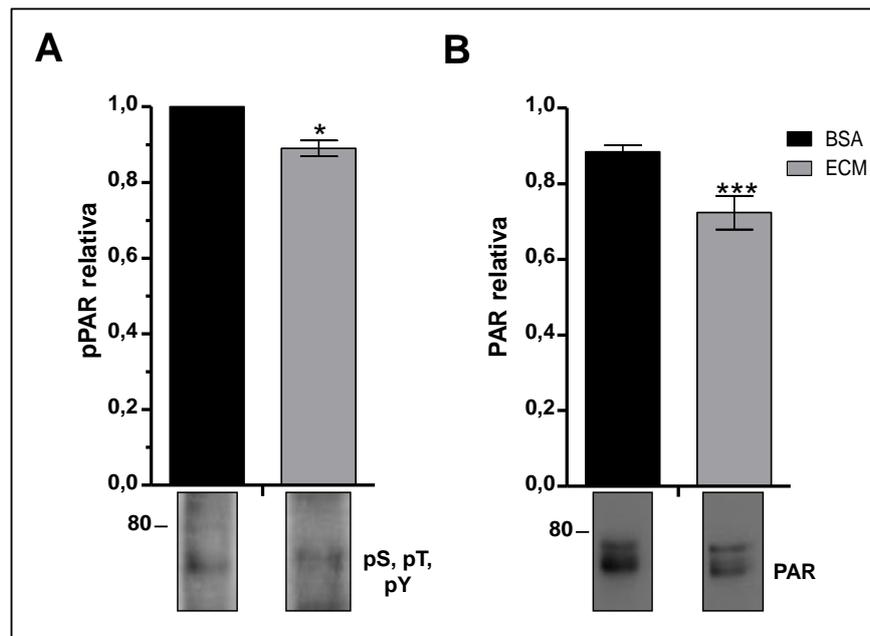


Figura 21. Redução da fosforilação e possível expressão de proteínas do *paraflagellar rod* durante a adesão a matriz extracelular. A) Redução da fosforilação relativa de proteínas do *paraflagellar rod* em tripomastigotas de *T. cruzi* após 120 minutos de incubação com ECM. B) Redução dos níveis das proteínas do *paraflagellar rod* total durante 120 min de adesão a ECM. * representa $p < 0,05$ e *** representa $p < 0,001$, quando os valores experimentais foram comparados com o controle (BSA), utilizando-se test T de Student.

Com esses dados, pode-se sugerir que em parasitas incubados com ECM a redução nos níveis de fosforilação é acompanhada com uma redução nos níveis de proteína total, indicando uma possível relação entre fosforilação e estabilidade de proteínas do *paraflagellar rod*.

Para verificar essa possibilidade tripomastigotas foram tratados com o inibidor de fosfatase BZ3 e a localização de proteínas do *paraflagellar rod* foi avaliada. Verificou-se que, na presença do inibidor, há o aparecimento de “pontos” de proteínas do *paraflagellar rod* no citoplasma do parasita (figura 22A), não encontrados em parasitas controle (tratados com DMSO), no qual cerca de 100% de proteínas do *paraflagellar rod* estão localizadas no flagelo. Esses dados indicam que um aumento da fosforilação dessas proteínas pode resultar em uma redução da mesma no flagelo, com um conseqüente aumento de sua localização citosólica (provável aumento de sua solubilidade). Dessa maneira, observou-se uma maior eficiência de extração dessas proteínas em parasitas incubados com BZ3, com um

aumento também dos níveis dessa proteína fosforilada, como já esperado para um tratamento com inibidor de fosfatase (figura 22B e C). A atuação de BZ3 na diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* e a atuação na redução da capacidade infectiva desse parasita foram previamente descritas por Gallo e colaboradores (Gallo *et al.*, 2011).

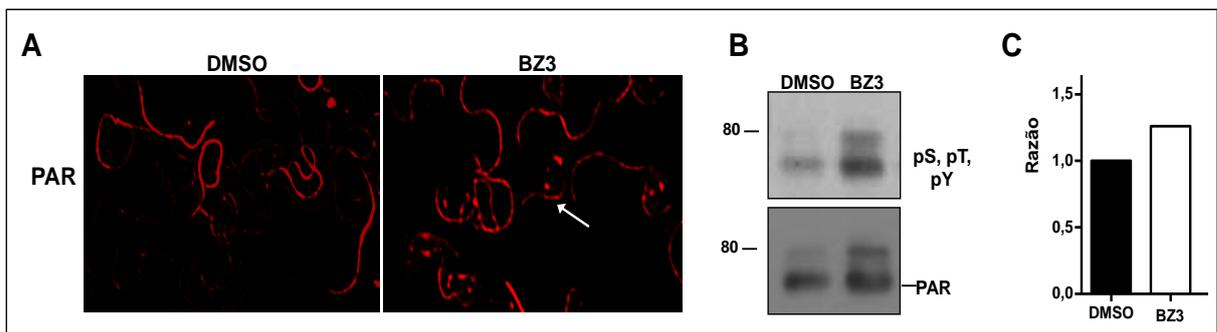


Figura 22. Mudança na distribuição de proteínas do paraflagellar rod fosforiladas de tripomastigotas incubados com BZ3. A) Localização subcelular de proteínas do paraflagellar rod após 60 min de tratamento de tripomastigotas de *T. cruzi* com o inibidor de fosfatase BZ3 ou com o controle (DMSO). A seta branca indica o aparecimento de proteínas do paraflagellar rod no citoplasma de tripomastigotas. B) Gel representativo de extratos de tripomastigotas tratados com BZ3 ou DMSO por 60 minutos. C) Quantificação da intensidade relativa de proteínas do paraflagellar rod fosforiladas representadas em B. Para os experimentos apresentados foram realizadas duplicatas biológicas.

Esses dados ainda preliminares corroboram a hipótese de que fosforilação de *paraflagellar rod* pode estar diretamente envolvida com a estabilidade e atuação adequada do flagelo. Além disso, esses dados também sugerem que as modificações no citoesqueleto do parasita em adição à fosforilação de proteínas do choque térmico constituem a principal resposta do parasita à adesão a ECM.

Diante desses resultados e como uma das propostas desta tese era relacionar as modificações por fosforilação de proteínas de *T. cruzi* após a adesão a elementos de matriz extracelular envolvendo membros da família gp85, nela incluída especificamente a Tc85, foi-se verificar se a interação do parasita com laminina ou fibronectina, também levaria a mudanças no citoesqueleto.

Parte II – Resposta do parasita a adesão a fibronectina e laminina

4.7. Modificação no padrão de fosforilação de proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi* durante adesão a elementos da matriz extracelular: fibronectina e laminina-1

As diferenças no perfil de fosforilação das proteínas de tripomastigotas durante adesão a fibronectina ou laminina-1 foram primeiramente detectadas por ensaios de imunofluorescência, comparando-se com parasitas incubados com BSA e utilizando-se uma mistura de anticorpos anti-resíduos de serina, treonina e tirosina fosforilados (figura 23).

Nos parasitas incubados com fibronectina, foi possível observar uma ausência de marcação na região entre o flagelo e o corpo do parasita. Na incubação com laminina, a principal característica dos parasitas foi o grande aumento da coloração da região posterior (figura 23A). Os parasitas contendo as modificações foram quantificados e os valores comparados com o controle (BSA). Durante a incubação com fibronectina, foi notado um aumento de aproximadamente três vezes nas modificações visualizadas, ao passo que para laminina, o aumento nas modificações foi de 2,5 vezes (figura 23B). Essas alterações no perfil de fosforilação das proteínas durante adesão de tripomastigotas a elementos da ECM podem indicar tanto um aumento da fosforilação das proteínas presentes naquela região quanto migração de proteínas fosforiladas ao longo do parasita, sugerindo que diferentes vias de sinalização podem ser ativadas no parasita ou há diferenças temporais entre as respostas.

É importante ressaltar que diferentemente da resposta do parasita na adesão à ECM, em que toda a população de tripomastigotas sofreu uma mudança no perfil

de fosforilação de proteínas, para os parasitas incubados com fibronectina ou laminina apenas uma porção dos mesmos foi modificada. Também é importante considerar que algumas modificações verificadas durante a adesão à ECM foram igualmente vistas nas incubações com fibronectina ou laminina, já exploradas no item 4.2.

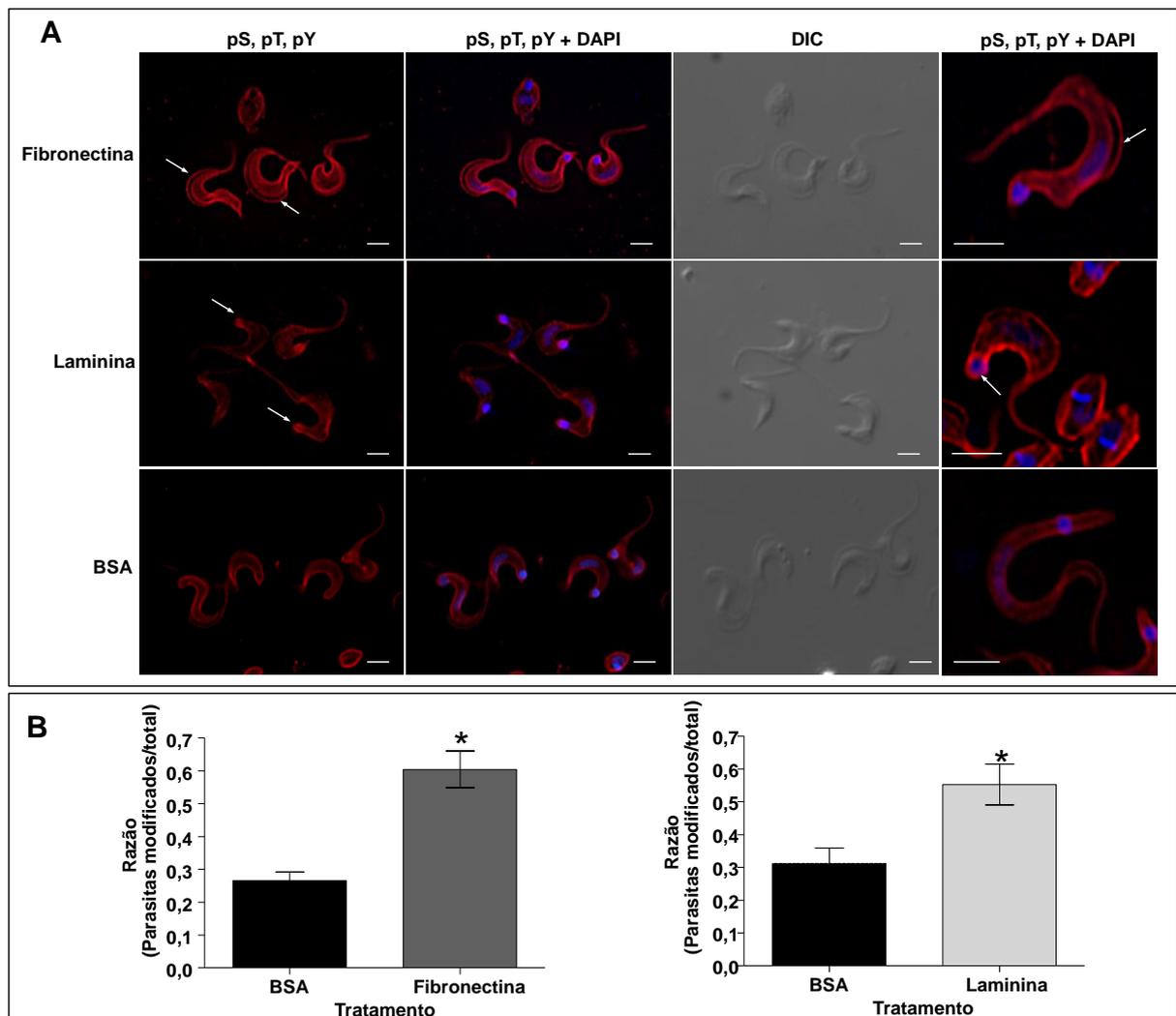


Figura 23. Perfil de proteínas fosforiladas de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados com fibronectina, laminina ou BSA durante 120 min. A) Localização das proteínas fosforiladas mostrada pela reatividade com anticorpos anti- pS, pT e pY. (vermelho), núcleo e cinetoplastos são indicados pela coloração por DAPI (azul) e imagens de microscopia de contraste de interferência (DIC) também são mostradas. B) Quantificação das modificações ocorridas no parasita durante os tratamentos com fibronectina ou laminina quando comparados com BSA. As modificações são indicadas pelas setas brancas. As barras brancas representam 3,2 μ m. Foram examinados seis campos com aproximadamente 40 parasitas. Os asteriscos representam $p < 0,001$ quando os valores experimentais foram comparados com o controle, utilizando-se test T de Student.

Da mesma forma como realizado para ECM, para analisar as proteínas diferencialmente fosforiladas responsáveis pelo perfil observado por imunofluorescência, foram realizados experimentos de adesão do parasita a fibronectina ou laminina em placas de oito poços. O tempo de incubação de 120 min também foi escolhido, tal como mostrado para incubações com ECM. O fosfoproteoma de parasitas incubados com fibronectina e laminina indicou 50 e 43 proteínas diferencialmente fosforiladas, respectivamente (figura 24A), quando comparados com o controle, estatisticamente significativa (ANOVA; $p < 0,05$). A digestão trípica para os *spots* selecionados foi realizada da mesma maneira como para o tratamento com ECM. Proteínas também foram identificadas utilizando-se o banco de dados de Kinetoplastidae: TriTrypDB. As proteínas diferencialmente fosforiladas estão indicadas em vermelho na figura 24B.

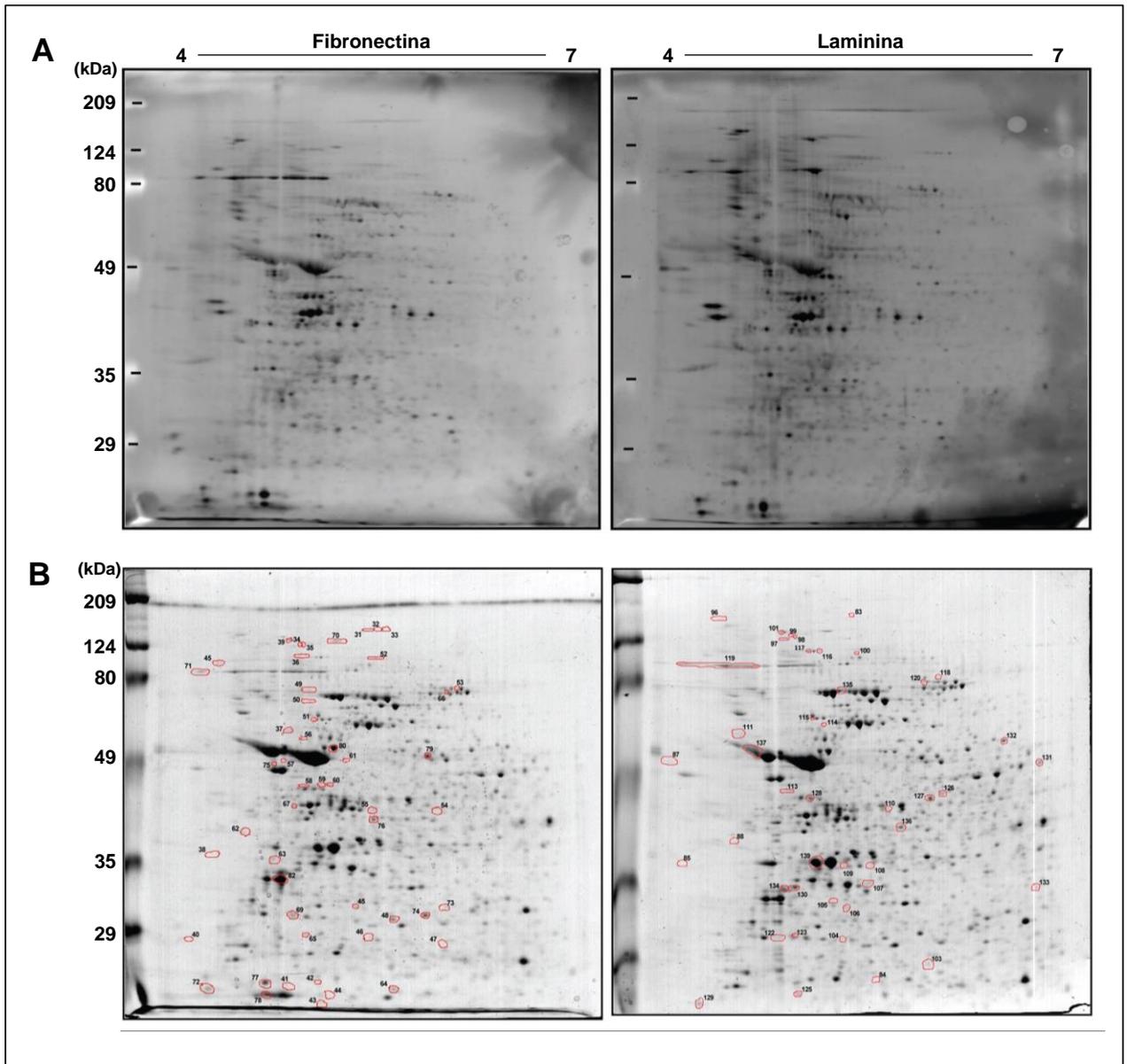


Figura 24. Proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi* modificadas por fosforilação/desfosforilação durante adesão a fibronectina ou laminina por 120 min. A) Proteínas fosforiladas identificadas por coloração com Pro Q Diamond. B) Perfil de proteínas totais do parasita incubado com fibronectina ou laminina obtido a partir de coloração com coomassie coloidal. As massas moleculares são mostradas à esquerda em kDa. Os spots com variação significativa ($p < 0,05$) na fosforilação estão circulado em vermelho.

Dos 50 spots com variação na fosforilação durante incubação com fibronectina, 35 foram desfosforilados (total ou parcialmente) e 15 sofreram aumento em seu nível de fosforilação (aumento ou aparecimento), como pode ser observado na tabela 2 e figura 25C. Apenas quatro spots não foram inseridos na tabela devido à ausência de alinhamento com sequências do banco de dados utilizado.

Tabela 2. Identificação das proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi* diferencialmente fosforiladas durante adesão a fibronectina.

| Spot ID | Proteína | Uniprot # | Score – Mascot | No. Peptídeos Identificados | Cobert. sequência (%) | Teórico | | Experimental | | Intensidade fosforilação | | ANOVA |
|---------|---|-----------|----------------|-----------------------------|-----------------------|---------|---------|--------------|---------|--------------------------|--------------|----------|
| | | | | | | pI | MW (Da) | pI | MW (Da) | Controle | Fibronectina | |
| 33 | GPI anchor biosynthesis protein, putative | Q4CZK3 | 29 | 1 | 1 | 9,41 | 67.768 | 5,87 | 123.670 | 3,61 | 0 | 3,62E-03 |
| 35 | hypothetical protein, conserved | Q4DCU5 | 99 | 8 | 8 | 4,89 | 120.565 | 6,41 | 89.290 | 8,04 | 0 | 2,64E-04 |
| 36 | lipophosphoglycan biosynthetic protein, putative | Q4DW89 | 39 | 5 | 4 | 5,26 | 86.969 | 5,33 | 104.329 | 6,20 | 3,27 | 8,73E-03 |
| 37 | alpha tubulin | Q27352 | 74 | 1 | 3 | 4,9 | 50.324 | 5,43 | 110.065 | 12,19 | 0 | 7,13E-05 |
| 39 | hypothetical protein, conserved | Q4D1U0 | 314 | 25 | 21 | 5,02 | 152.658 | 4,61 | 33.899 | 2,40 | 3,19 | 1,80E-02 |
| 40 | beta tubulin | P08562 | 69 | 3 | 7 | 4,69 | 50.225 | 5,26 | 113.690 | 0 | 3,19 | 1,02E-02 |
| 41 | I/6 autoantigen, putative | Q4DFL2 | 278 | 8 | 41 | 5,19 | 23.439 | 4,46 | 20.192 | 0 | 5,23 | 1,84E-03 |
| 42 | hypothetical protein, conserved | Q4D0B5 | 52 | 3 | 11 | 5,23 | 28.401 | 5,19 | 15.564 | 124,12 | 0 | 6,04E-08 |
| 43 | hypothetical protein, conserved | Q4CNF7 | 75 | 2 | 9 | 5,5 | 26.379 | 5,38 | 17.318 | 0 | 4,21 | 3,85E-03 |
| 44 | alpha tubulin | Q27352 | 44 | 3 | 6 | 4,9 | 50.324 | 5,48 | 9.911 | 5,07 | 0 | 1,17E-03 |
| 45 | hypothetical protein, conserved | Q4E246 | 110 | 11 | 11 | 4,64 | 102.819 | 5,53 | 10.328 | 8,50 | 2,04 | 4,10E-02 |
| 46 | hslvu complex proteolytic subunit-like, putative | Q4D729 | 105 | 5 | 23 | 6,77 | 23.038 | 4,75 | 98.558 | 3,23 | 0 | 5,23E-03 |
| 47 | leucine-rich repeat protein, putative | Q4CLM9 | 48 | 9 | 35 | 5,82 | 26.926 | 5,78 | 20.734 | 6,09 | 0 | 6,42E-04 |
| 48 | adenylate kinase, putative | Q4D6Z4 | 607 | 20 | 74 | 5,49 | 29.437 | 5,79 | 19.607 | 2,77 | 3,26 | 1,26E-02 |
| 49 | major paraflagellar rod protein | Q01530 | 164 | 19 | 28 | 5,85 | 69.961 | 6,25 | 25.085 | 2,44 | 10,04 | 1,26E-02 |
| 51 | heat shock protein 70 | Q56UI2 | 125 | 13 | 21 | 5,06 | 71.444 | 5,47 | 86.248 | 5,95 | 3,98 | 5,06E-03 |
| 52 | heat shock protein, putative | Q4DI67 | 156 | 12 | 15 | 5,28 | 94.038 | 5,38 | 68.097 | 1,87 | 2,22 | 3,87E-02 |
| 53 | major paraflagellar rod protein | Q01530 | 133 | 14 | 23 | 5,85 | 69.961 | 5,82 | 101.197 | 3,17 | 0 | 5,59E-03 |
| 54 | asparagine synthetase A, putative | Q4CRM4 | 83 | 8 | 20 | 5,83 | 39.305 | 6,35 | 85.685 | 2,77 | 3,52 | 1,16E-02 |
| 55 | hypothetical protein, conserved | Q4CVX7 | 111 | 8 | 20 | 5,28 | 41.120 | 6,38 | 48.335 | 6,09 | 0 | 6,43E-04 |
| 56 | heat shock protein 60 kDa Hsc70-interacting protein (Hip), putative | Q95046 | 168 | 9 | 18 | 5,38 | 59.602 | 5,80 | 45.036 | 4,48 | 0 | 1,75E-03 |
| 57 | | Q4DAT6 | 175 | 9 | 17 | 4,83 | 48.233 | 5,38 | 77.674 | 1,74 | 2,01 | 3,98E-02 |
| 58 | beta tubulin 1.9 | Q8STF3 | 383 | 17 | 34 | 4,74 | 50.352 | 5,20 | 56.552 | 45,23 | 3,16 | 1,03E-02 |
| 59 | proteasome regulatory ATPase subunit 2, putative | Q4D0B9 | 61 | 1 | 2 | 5,51 | 49.245 | 5,50 | 52.144 | 3,22 | 0 | 5,29E-03 |
| 60 | heat shock protein 85, putative | Q4CQS6 | 164 | 12 | 19 | 5,07 | 81.132 | 6,00 | 60.729 | 2,15 | 0 | 2,14E-02 |
| 61 | vacuolar ATP synthase subunit B, putative | Q4CXR7 | 30 | 2 | 4 | 5,43 | 55.847 | 5,59 | 48.028 | 20,85 | 8,08 | 4,88E-04 |

| | | | | | | | | | | | | |
|----|---|--------|------|----|----|------|---------|------|---------|-------|------|----------|
| 62 | nucleoside hydrolase, putative | Q4DUW5 | 179 | 14 | 41 | 4,66 | 40.052 | 5,62 | 57.348 | 0 | 3,53 | 7,21E-03 |
| 63 | hypothetical protein, conserved | Q4DX47 | 147 | 8 | 28 | 4,86 | 29.114 | 4,91 | 38.460 | 2,47 | 1,94 | 4,41E-02 |
| 64 | alpha tubulin | Q27352 | 201 | 9 | 13 | 4,9 | 50.324 | 5,08 | 32.570 | 8,07 | 0 | 2,61E-04 |
| 65 | proteasome beta 3 subunit, putative | Q4DHA9 | 36 | 1 | 4 | 5 | 22.819 | 5,98 | 10.748 | 3,94 | 0 | 2,70E-03 |
| 66 | major paraflagellar rod protein | Q01530 | 435 | 28 | 35 | 5,85 | 69.961 | 5,34 | 16.021 | 1,80 | 3,11 | 3,86E-02 |
| 67 | hypothetical protein, conserved | Q4DBH2 | 84 | 5 | 14 | 4,83 | 38.831 | 6,33 | 84.712 | 2,04 | 0 | 2,58E-02 |
| 68 | hypothetical protein, conserved | Q4D5L9 | 63 | 2 | 7 | 5,21 | 29.124 | 5,34 | 41.282 | 8,36 | 0 | 2,33E-04 |
| 69 | 14-3-3 protein | Q6B9P3 | 358 | 15 | 45 | 4,99 | 30.060 | 5,75 | 20.487 | 1,96 | 0 | 3,14E-02 |
| 70 | hypothetical protein, conserved flagellar radial spoke component, putative | Q4DZS2 | 319 | 21 | 22 | 5,17 | 102.109 | 5,32 | 18.262 | 2,53 | 1,88 | 4,89E-02 |
| 71 | hypothetical protein, conserved | Q4DE57 | 195 | 13 | 22 | 4,3 | 67.897 | 5,59 | 112.818 | 2,93 | 2,01 | 3,34E-02 |
| 72 | elongation factor 2 | Q6IWF6 | 105 | 5 | 7 | 5,79 | 95.084 | 4,67 | 10.748 | 2,01 | 0 | 2,70E-02 |
| 74 | thiol transferase Tc52 Hsc70-interacting protein (Hip), putative | A2TEK0 | 124 | 7 | 11 | 5,74 | 51.017 | 6,44 | 26.806 | 3,20 | 2,58 | 1,61E-02 |
| 75 | asparagine synthetase A, putative eukaryotic initiation factor 5a, putative | Q4DAT6 | 415 | 18 | 35 | 4,83 | 48.233 | 6,31 | 23.567 | 3,09 | 2,80 | 1,47E-02 |
| 76 | beta tubulin 1.9 | Q4CRM4 | 303 | 17 | 49 | 5,83 | 39.305 | 5,27 | 51.981 | 3,37 | 0 | 3,48E-04 |
| 77 | major paraflagellar rod protein | Q4E4N4 | 186 | 7 | 55 | 4,82 | 18.118 | 5,84 | 42.532 | 0 | 2,98 | 1,09E-02 |
| 78 | ATPase beta subunit, putative | Q8STF3 | 296 | 10 | 18 | 4,74 | 50.352 | 4,99 | 11.171 | 1,79 | 2,74 | 3,39E-02 |
| 79 | activated protein kinase C receptor, putative | Q01530 | 794 | 41 | 48 | 5,85 | 69.961 | 5,00 | 9.911 | 15,67 | 0 | 3,26E-05 |
| 80 | ATPase beta subunit, putative | Q4DTX7 | 1205 | 29 | 64 | 5,27 | 55.924 | 6,24 | 59.520 | 2,21 | 3,40 | 2,14E-02 |
| 81 | activated protein kinase C receptor, putative | Q4DTN2 | 900 | 29 | 77 | 5,73 | 35.522 | 5,59 | 59.983 | 2,77 | 3,52 | 1,16E-02 |

A maioria das proteínas apresentaram função desconhecida (*hypothetical protein*) (11 *spots*; 23,9%), havendo também proteínas de citoesqueleto (10 *spots*), proteínas de metabolismo (oito *spots*) e envolvidas em vias de transdução de sinal (sete *spots*). Proteínas envolvidas em processos de enovelamento protéico (quatro *spots*) e em síntese e degradação de proteínas (cinco *spots*) também foram detectadas (figura 25B).

Após tratamento com laminina, dos 43 *spots* analisados, 27 mostraram redução no nível de fosforilação (desfosforilação total ou parcial), enquanto 16 *spots* foram fosforilados (aumento ou surgimento) (tabela 3 e figura 25A). Entre os *spots* identificados, 13 *spots* (34,2%) correspondem a proteínas de função desconhecida, 11 são componentes do citoesqueleto, sete pertencem ao metabolismo, quatro estão envolvidos em síntese e degradação protéica, três em enovelamento protéico e duas em processos de transdução de sinal (figura 25B).

Tabela 3. Identificação das proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi* diferencialmente fosforiladas durante adesão a laminina.

| Spot ID | Proteína | Uniprot # | Score - Mascot | No. Peptídeos Identificados | Cobert. sequência (%) | Teórico | | Experimental | | Intensidade Fosforilação | | ANOVA |
|---------|---|-----------|----------------|-----------------------------|-----------------------|---------|---------|--------------|---------|--------------------------|------------|----------|
| | | | | | | pI | MW (Da) | pI | MW (Da) | Controle | Laminina-1 | |
| 83 | dynein light chain, putative | Q4CZW3 | 23 | 1 | 3 | 6,61 | 29.584 | 5,83 | 122.394 | 6,12 | 0 | 6,34E-04 |
| 84 | proteasome alpha 2 subunit, putative | Q4DAW6 | 45 | 2 | 11 | 5,74 | 25.266 | 6,01 | 9.952 | 2,83 | 2,66 | 2,08E-01 |
| 85 | hypothetical protein, conserved | Q4D4S4 | 31 | 3 | 10 | 4,61 | 27.136 | 4,59 | 29.195 | 7,91 | 3,32 | 6,37E-03 |
| 87 | hypothetical protein, conserved | Q4CPU7 | 64 | 1 | 3 | 4,33 | 38.005 | 4,52 | 53.217 | 2,23 | 1,90 | 3,21E-02 |
| 88 | nucleoside hydrolase, putative | Q4DUW5 | 177 | 14 | 41 | 4,66 | 40.052 | 6,36 | 33.777 | 0 | 2,23 | 2,69E-02 |
| 96 | hypothetical protein, conserved | Q4E246 | 200 | 16 | 17 | 4,64 | 102.819 | 4,88 | 119.436 | 0 | 1,98 | 4,84E-02 |
| 97 | hypothetical protein, conserved | Q4DCU5 | 39 | 5 | 5 | 4,89 | 120.565 | 5,34 | 104.329 | 8,10 | 0 | 2,57E-04 |
| 99 | hypothetical protein, conserved | Q4CZW1 | 29 | 1 | 2 | 8,99 | 39.756 | 5,42 | 105.666 | 9,74 | 0 | 1,44E-04 |
| 100 | hypothetical protein, conserved | Q4DRF1 | 102 | 9 | 11 | 5,44 | 90.788 | 5,38 | 106.835 | 1,83 | 0 | 3,77E-02 |
| 101 | hypothetical protein, conserved | Q4DCU5 | 908 | 40 | 41 | 4,89 | 120.565 | 5,87 | 96.026 | 9,51 | 0 | 1,55E-04 |
| 103 | proteasome beta 7 subunit, putative | Q4D579 | 29 | 3 | 7 | 5,61 | 24.766 | 6,39 | 11.982 | 0 | 2,39 | 2,41E-02 |
| 104 | heat shock protein HSP70 | Q26936 | 89 | 7 | 11 | 5,42 | 71.495 | 5,77 | 15.975 | 25,50 | 7,59 | 5,72E-04 |
| 105 | alpha tubulin | Q27352 | 120 | 4 | 9 | 4,9 | 50.324 | 5,70 | 22.438 | 1,99 | 2,37 | 3,39E-02 |
| 106 | alpha tubulin | Q27352 | 120 | 4 | 9 | 4,9 | 50.324 | 5,80 | 20.932 | 2,68 | 1,82 | 4,91E-02 |
| 107 | dihydrolipoamide acetyltransferase, putative | Q4DYI5 | 287 | 8 | 31 | 6,62 | 28.304 | 5,95 | 25.458 | 1,75 | 2,36 | 4,68E-02 |
| 108 | alpha-tubulin | Q26973 | 119 | 8 | 18 | 5,49 | 47.498 | 5,97 | 28.856 | 3,23 | 2,21 | 2,61E-02 |
| 109 | hypothetical protein, conserved | Q4DRY8 | 59 | 3 | 8 | 5,25 | 37.324 | 5,77 | 28.856 | 6,56 | 3,33 | 8,27E-03 |
| 110 | hypothetical protein Tc00.1047053504013.20 | Q4D6P7 | 36 | 1 | 2 | 6,4 | 28.805 | 6,09 | 40.871 | 3,04 | 1,94 | 4,72E-02 |
| 111 | alpha tubulin | Q27352 | 78 | 2 | 4 | 4,9 | 50.324 | 5,02 | 61.200 | 7,43 | 0 | 3,40E-04 |
| 113 | beta tubulin 1.9 | Q8STF3 | 383 | 17 | 34 | 4,74 | 50.352 | 5,37 | 45.110 | 12,90 | 1,98 | 3,25E-02 |
| 114 | heat shock protein 60 kDa chaperonin containing T-complex protein, putative | Q95046 | 87 | 2 | 4 | 5,38 | 59.602 | 5,63 | 64.503 | 70,29 | 0 | 3,36E-07 |
| 115 | hypothetical protein, conserved | Q4DWG6 | 63 | 5 | 8 | 5,05 | 60.004 | 5,55 | 66.635 | 2,38 | 0 | 1,51E-02 |
| 116 | hypothetical protein, conserved | Q4DCU5 | 164 | 12 | 11 | 4,89 | 120.565 | 5,59 | 97.363 | 0 | 3,49 | 7,43E-03 |
| 117 | hypothetical protein, conserved | Q4DCU5 | 105 | 9 | 8 | 4,89 | 120.565 | 5,52 | 96.858 | 5,21 | 0 | 1,07E-03 |
| 118 | paraflagellar rod protein 3, putative | Q4D634 | 1076 | 53 | 68 | 5,81 | 69.076 | 6,46 | 84.162 | 1,80 | 2,48 | 4,29E-02 |
| 119 | heat shock protein 85, putative | Q4CQS6 | 907 | 39 | 41 | 5,07 | 81.132 | 5,60 | 85.670 | 3,62 | 2,38 | 1,72E-02 |
| 120 | paraflagellar rod protein 3, putative | Q4D634 | 1076 | 53 | 68 | 5,81 | 69.076 | 6,44 | 82.627 | 11,55 | 2,38 | 2,62E-02 |

| | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------------|--------|------|----|----|------|--------|------|--------|-------|-------|----------|
| 122 | 14-3-3 protein | Q6B9P3 | 68 | 3 | 13 | 4,99 | 30.060 | 5,30 | 16.158 | 1,94 | 0 | 3,08E-02 |
| 123 | 14-3-3 protein | Q6B9P3 | 146 | 12 | 37 | 4,99 | 30.060 | 5,42 | 16.481 | 4,33 | 19,69 | 1,96E-03 |
| 125 | hypothetical protein, conserved | Q4CS20 | 206 | 10 | 48 | 5,01 | 23.120 | 5,44 | 7.906 | 5,21 | 0 | 1,07E-03 |
| 126 | glycyl-tRNA synthetase, putative | Q4D0Z5 | 46 | 2 | 6 | 5,96 | 37.314 | 6,49 | 44.455 | 4,38 | 3,65 | 5,71E-03 |
| 127 | pyruvate kinase 2, putative | Q4E1U3 | 562 | 19 | 30 | 7,11 | 55.380 | 6,40 | 43.379 | 2,12 | 0 | 2,25E-02 |
| 128 | ATPase beta subunit, putative | Q4DTX7 | 209 | 7 | 14 | 5,27 | 55.924 | 5,53 | 43.522 | 23,53 | 2,24 | 2,75E-02 |
| 129 | phosphoglycerate kinase, putative | Q4D193 | 412 | 21 | 52 | 6,19 | 44.783 | 4,72 | 6.592 | 0 | 11,48 | 1,53E-04 |
| 130 | aminopeptidase, putative | Q4DZJ3 | 452 | 20 | 41 | 6,06 | 56.769 | 5,42 | 24.663 | 3,83 | 0 | 2,96E-03 |
| 131 | hypothetical protein, conserved | Q4E1W3 | 178 | 11 | 32 | 5,6 | 37.492 | 7,20 | 52.637 | 8,05 | 2,18 | 3,49E-02 |
| 132 | phosphoglycerate kinase, putative | Q4D193 | 412 | 18 | 53 | 6,19 | 44.783 | 6,94 | 59.336 | 0 | 2,26 | 3,39E-02 |
| 133 | ribosomal protein P0 | Q4E3A4 | 340 | 18 | 34 | 4,91 | 35.221 | 7,17 | 24.663 | 1,73 | 2,31 | 3,65E-02 |
| 135 | paraflagellar rod componente | O00930 | 960 | 46 | 59 | 5,19 | 69.144 | 5,76 | 77.552 | 3,92 | 1,95 | 4,73E-02 |
| 137 | alpha tubulin | Q8T9X5 | 1252 | 36 | 39 | 4,94 | 50.395 | 5,14 | 55.854 | 1,93 | 2,78 | 3,36E-02 |

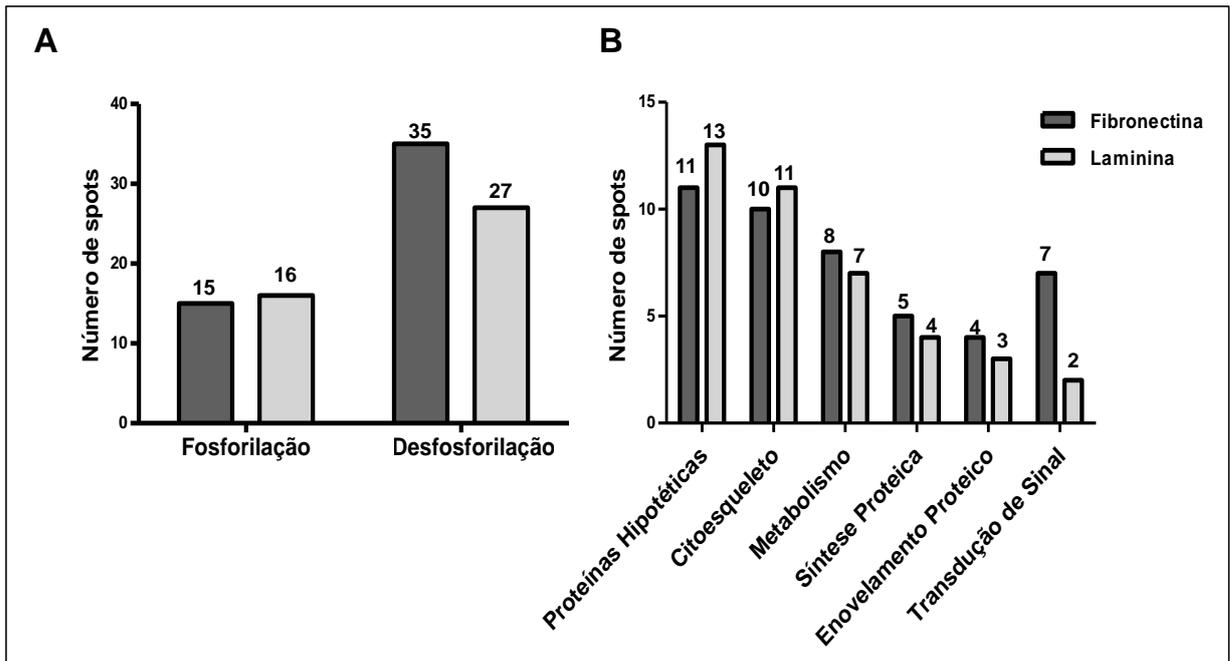


Figura 25. Proteínas diferencialmente modificadas durante adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* a ECM. A) Número total de proteínas diferencialmente fosforiladas durante 120 min de adesão de tripomastigotas a fibronectina e laminina. B) Distribuição funcional das proteínas identificadas.

Considerando os dois tratamentos, 20 *spots* sequenciados com variações distintas no perfil de fosforilação correspondem a proteínas com função ainda não anotada em bancos de dados. Dessas proteínas, apenas duas (Q4DCU5 e Q4E246) são comuns aos parasitas tratados com fibronectina e laminina (tabelas 2 e 3).

A maioria dos *spots* identificados que apresenta uma grande variação no perfil de fosforilação durante adesão a fibronectina e laminina corresponde a proteínas do citoesqueleto do parasita (23,9% e 23,7%, respectivamente) (figura 25B), ressaltando-se proteínas do *paraflagellar rod*, α - e β -tubulina. Proteínas do choque térmico (HSP70, HSP60, HSP85) também foram modificadas por fosforilação durante a adesão a laminina e fibronectina, além de pelo menos uma das proteínas das subunidades do proteassomo.

A análise dos espectros obtidos após sequenciamento identificou quatro peptídeos fosforilados apresentados na tabela 4. A proteína HSP85, também modificada em tripomastigotas incubados com ECM, apresenta o resíduo de

treonina 216 fosforilada tanto para o tratamento com fibronectina quanto com laminina, indicando que esse resíduo de aminoácido pode ser um importante sítio de fosforilação controlado durante a adesão de tripomastigotas a elementos de ECM. Sítios de fosforilação em duas proteínas de função ainda desconhecida também foram identificados (tabela 4).

Tabela 4. Peptídeos com resíduos de aminoácidos fosforilados identificados por análise dos espectros pelo programa Mascot.

| spot ID | Proteína | Tratamento | Sequência peptídica |
|----------------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| 42 | hypothetical protein, conserved | Fibronectina | M.PI S PAEAFEER.H |
| 60 | heat shock protein 85, putative | Fibronectina | K.ATEKEV T DEDEDEAAAAK.N |
| 100 | hypothetical protein, conserved | Laminina | R.RG S PTLES AKPFAFR.E |
| 119 | heat shock protein 85, putative | Laminina | K.ATEKEV T DEDEDEAAAAK.N |

Alguns *spots* diferencialmente fosforilados foram exclusivos para cada um dos tratamentos. EF2 (*elongation factor 2* - Q6IWF6), por exemplo, é desfosforilado após incubação de tripomastigotas com fibronectina. Quando fosforilada em Thr¹⁶⁹, EF2 inibe a tradução, um fenômeno relacionado à metaciclogênese de *T. cruzi* (Tonelli, *et al.*, 2011).

Além de proteínas do *paraflagellar rod* e tubulinas, outras proteínas componentes do citoesqueleto e flagelo do parasita também foram modificados durante adesão a pelo menos um dos elementos analisados. Componentes do *flagellar radial spoke*, dineínas ou o antígeno I/6 são exemplos de proteínas estruturais identificadas. Embora o antígeno I/6, responsável pela ligação entre os filamentos do microtúbulo, sofra um aumento significativo da fosforilação em parasitas incubados com fibronectina, a atuação de sua fosforilação nas funções do microtúbulo ainda é desconhecida. A desfosforilação de dineínas e de componentes

do *radial spoke* é observada durante a adesão a laminina ou fibronectina, respectivamente.

Dineinas são responsáveis por processos de motilidade intracelular (King, 2000) e são essenciais para a movimentação do flagelo e a consequente viabilidade das formas infectivas de *T. brucei* (Broadhead *et al.*, 2006). Em *Chlamydomonas*, o *radial spoke*, um componente do arranjo “9+2” do flagelo, apresenta um papel importante na atividade das dineinas que contribuem para a movimentação do flagelo, um processo regulado por fosforilação dependente de cAMP (King, 2000; Yang *et al.*, 2006). Outras proteínas componentes da matriz ou da superfície do flagelo também foram modificadas durante adesão a laminina e fibronectina. Fosfoglicerato quinase e piruvato quinase foram diferencialmente fosforiladas durante adesão a laminina.

Esses dados indicam que a modificação (fosforilação/desfosforilação) de proteínas do citoesqueleto do parasita é um evento principal na resposta do parasita a adesão a fibronectina e laminina, assim como ocorre para adesão a ECM.

4.8. Adesão de tripomastigotas a fibronectina ou laminina induz desfosforilação de α -tubulina

Analisando os 12 *spots* identificados como α - ou β - tubulina com diferentes número de acesso no Uniprot, que sofreram variação nos níveis de fosforilação em resposta a fibronectina ou laminina, foram notados que todos os *spots* de tubulina analisados tiveram significantes valores de *score*, porcentagem de cobertura da sequência e número de peptídeos identificados, indicando alta confiabilidade na identificação das proteínas.

Em geral, a adesão de tripomastigotas a fibronectina resulta em significativa desfosforilação de α -tubulina (*spots* 37, 44, 64), e β -tubulina 1.9 (*spot* 58), como indicado na tabela 2. A isoforma de β -tubulina 1.9 (Q8STF3), um exemplo de proteína modificada por fosforilação durante adesão a fibronectina, difere da isoforma β -tubulina (P08562) por quatro resíduos de aminoácidos (S²⁷⁴, D²⁸⁸, L²⁸⁹ e A³⁰⁶, que mudam para T, E, V e R na isoforma β -Tubulina 1.9) foi previamente descrita em outras análises proteômicas de *T. cruzi* (Nakayasu *et al.*, 2009).

Desfosforilação de α -tubulina (*spot* 111) e β -tubulina 1.9 (*spot* 113) também foram observadas durante a adesão de tripomastigotas a laminina. Em contrapartida, alguns outros *spots* de α - ou β -tubulinas apresentaram um pequeno aumento em seus níveis de fosforilação durante a incubação a fibronectina (*spots* 40, 78) ou laminina (*spots* 105, 137), como observado nas tabelas 2 e 3.

Um número considerável de *spots* de α - e β - tubulina com baixa massa molecular também foram identificados (Tabelas 2 e 3), um resultado também observado para outros tripanosomatídeos (Drummelsmith *et al.*, 2003; Parodi-Talice *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2006). Vale ressaltar que os *spots* de baixa massa molecular não foram resultado de manipulação inadequada, uma vez que, durante todo o experimento, foram adicionados inibidores de protease, e dessa forma, podem ter sido gerados por proteólise *in vivo*.

A prevalência de eventos de desfosforilação de α -tubulina durante a adesão a fibronectina e laminina foi confirmada por experimentos de imunoprecipitação. Extratos de tripomastigotas previamente incubados com fibronectina, laminina ou BSA durante os tempos de 5, 30 60 e 120 min foram imunoprecipitados com anticorpos anti- α -tubulina, seguido de *immunoblotting* utilizando-se a mistura de anticorpos anti-pS, pT, pY. A desfosforilação de α -tubulina é claramente observada

após 60 min de incubação de tripomastigotas com laminina, resultando de uma redução para aproximadamente 65% de fosforilação após 120 min de incubação (figura 26A e B). Resultados similares foram obtidos após 120 min de incubação de tripomastigotas com fibronectina.

A desfosforilação de α -tubulina não foi associada exclusivamente a nenhuma fração particular de tubulina, uma vez que a desfosforilação foi observada tanto na fração solúvel quanto na polimerizada do citoesqueleto, embora uma pequena porção da fração solúvel tenha sofrido uma maior desfosforilação (figura 26C e D). Dessa forma, pode-se concluir que a desfosforilação observada para ambas as frações de tubulina contribuem para o evento total observado na figura 26A e B.

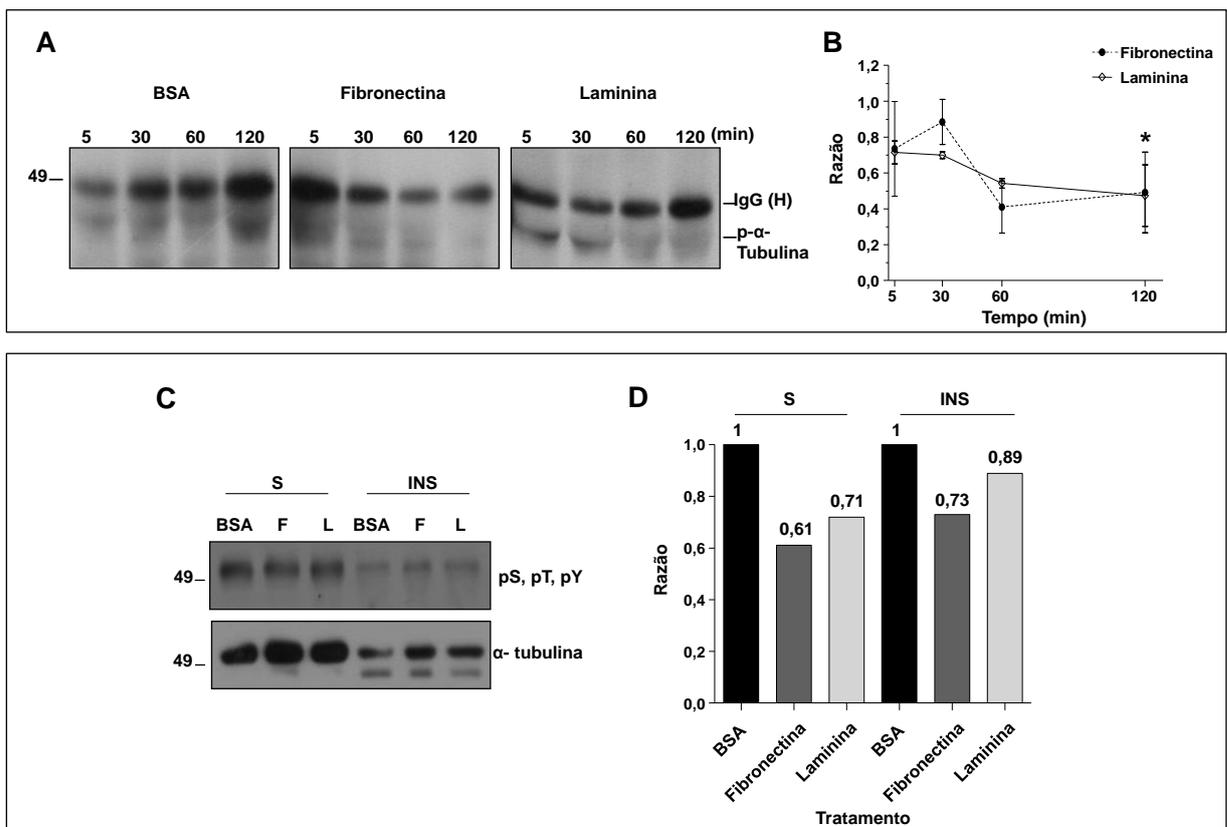


Figura 26. Variação da fosforilação de α -tubulina durante a incubação de tripomastigotas com fibronectina ou laminina por 120 min. (A) *Immunoblotting* representativo de α -tubulina fosforilada, imunoprecipitada com anticorpos anti- α -tubulina durante os diferentes tempos indicados. (B) Quantificação de três experimentos independentes como descritos em (A); Asteriscos representam uma desfosforilação significativa entre os tempos de cinco e 120 minutos. As comparações foram feitas utilizando-se test t de Student com valor de $p < 0,001$ e indicam a desfosforilação progressiva ao longo da incubação. (C) *Immunoblotting* representativo das frações solúvel ou polimerizada de α -

tubulina imunoprecipitada (fosforilada – pS, pT, pY – ou total) em tripomastigotas incubados com ASB (albumina de soro bovino), fibronectina (F) ou laminina (L). (D) Cálculo da razão de fosforilação relativa ao controle (BSA) nos experimentos mostrados em (C); Razão: Intensidade relativa de α -tubulina fosforilada no tratamento/controle; À esquerda, 49 representa o padrão de massa molecular em kDa.

Apesar da desfosforilação expressiva observada para α -tubulina, nenhuma modificação no perfil de distribuição de α -tubulina no citoesqueleto do parasita foi observada por imunofluorescência, durante 120min de incubação (Figura 27).

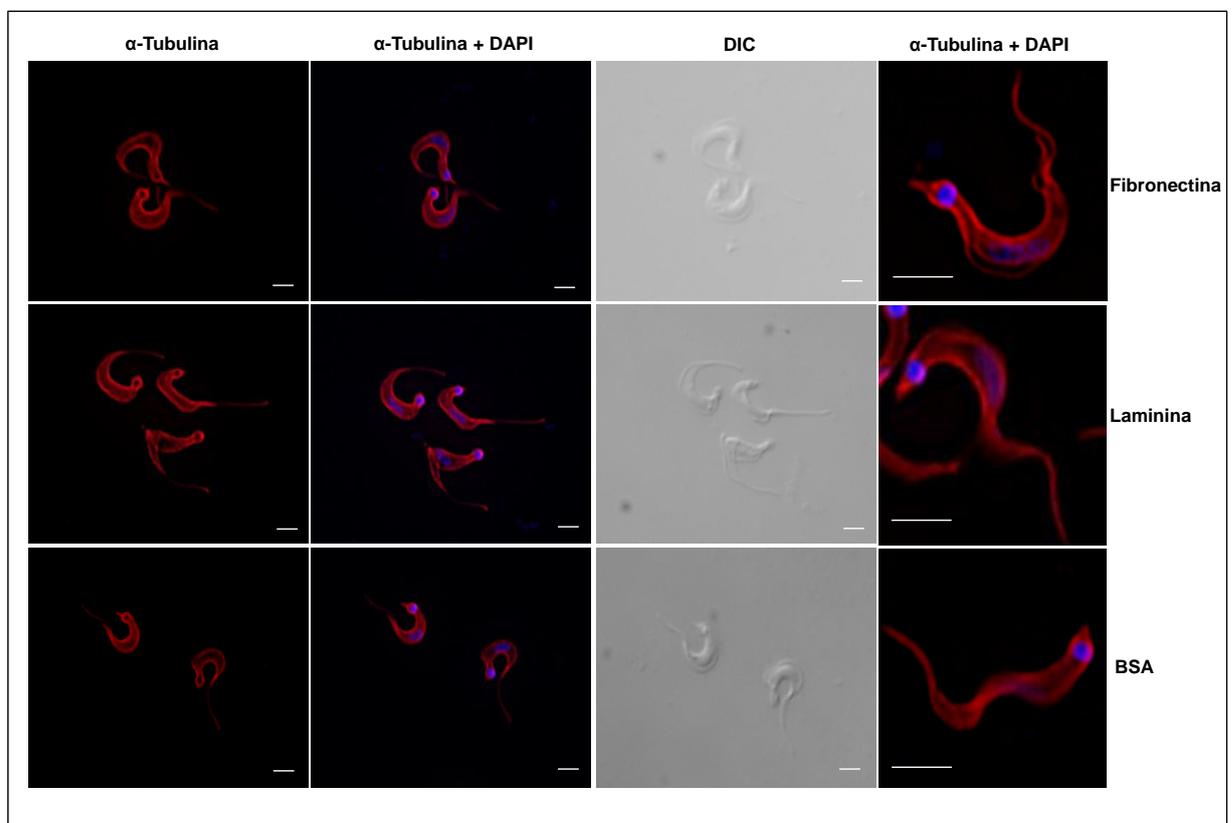


Figura 27. Localização sub-celular de α -tubulina de tripomastigotas de *T. cruzi* durante incubação com fibronectina ou laminina por 120 min. Localização de α -tubulina mostrada em vermelho; núcleo e cinetoplastos são indicados pela coloração por DAPI (azul) e imagens de microscopia de contraste de interferência (DIC) também são mostradas. Barras brancas representam 3,2 μ m.

Esses resultados sugerem que a desfosforilação de tubulina possivelmente não está correlacionada com o remodelamento dos microtúbulos, mas talvez envolvidos na interação de moléculas de tubulina com outras proteínas.

4.9. Proteínas do *Paraflagellar rod* são desfosforiladas em tripomastigotas incubados com fibronectina ou laminina-1

Proteínas do *Paraflagellar rod* apresentaram uma variação significativa dos níveis de fosforilação após incubação de tripomastigotas com fibronectina ou laminina. Assim como para tubulina, altos valores de Score, porcentagem de cobertura e número de peptídeos sequenciados indicaram alto grau de confiabilidade na identificação das proteínas do *paraflagellar rod* (tabelas 2 e 3).

Oito *spots* foram identificados como diferentes proteínas componentes do *paraflagellar rod*. Dois dos oito *spots* (*spots* 79 e 53) apresentaram uma grande redução na intensidade de fosforilação após tratamento de tripomastigotas com fibronectina, embora o *spot* 49 tenha sofrido um aumento na intensidade de fosforilação (tabela 2). Em tripomastigotas incubados com laminina, uma menor redução da fosforilação para as proteínas do *paraflagellar rod* foram encontradas (*spots* 118 e 135 da tabela 3). Como já citado, eventos de fosforilação e desfosforilação foram predominantemente encontrados em proteínas do *paraflagellar rod* com massa molecular de aproximadamente 69kDa. Apesar dessa prevalência, modificações por fosforilação de outros componentes do *paraflagellar rod* também podem ter ocorrido porém não identificados pela possível limitação da identificação pelos anticorpos.

Experimentos de imunoprecipitação e *immunoblotting* utilizando os anticorpos anti-pS, pT, pY e o anticorpo monoclonal (Mab-PAR) indicado acima, confirmaram uma redução progressiva da fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* em tripomastigotas incubados com fibronectina e laminina no intervalo de 5 a 120 min (figura 28A e B). De maneira similar aos resultados obtidos para tubulina, foi verificada uma redução na fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* dependente

do tempo de incubação. Após 120 min de incubação verificou-se uma redução da fosforilação de 30% e 40% para parasitas incubados com fibronectina ou laminina, respectivamente (figura 28A e B).

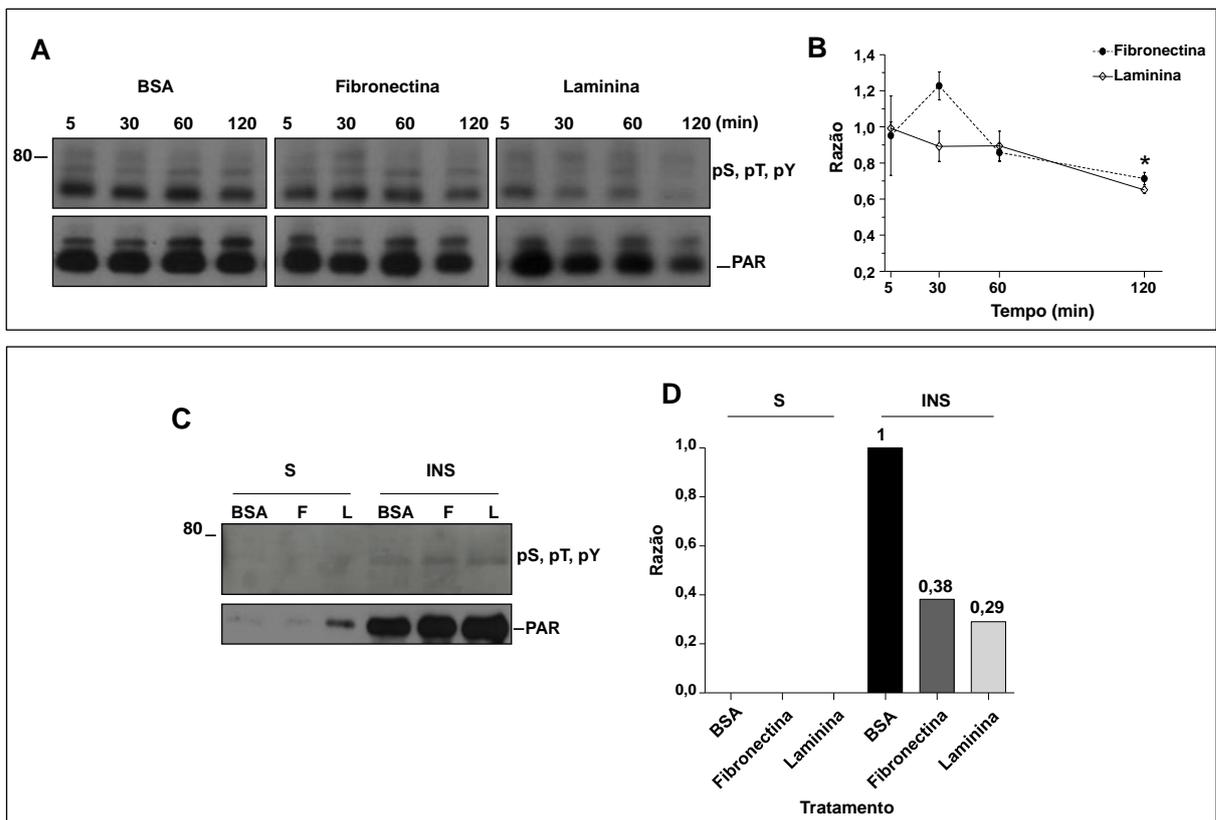


Figura 28. Variação da fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* durante incubação de tripomastigotas com fibronectina ou laminina por 120 min. (A) *Immunoblotting* representativo de α -tubulina fosforilada, imunoprecipitada com anticorpos anti- α -tubulina durante os diferentes tempos indicados. (B) Quantificação de três experimentos independentes como descritos em (A); Asteriscos representam uma desfosforilação significativa entre os tempos de cinco e 120 minutos. As comparações foram feitas utilizando-se test t de Student com valor de $p < 0,001$ e indicam a desfosforilação progressiva ao longo da incubação. (C) *Immunoblotting* representativo das frações solúvel ou polimerizada de α -tubulina imunoprecipitada (fosforilada – pS, pT, pY – ou total) em tripomastigotas incubados com BSA, fibronectina (F) ou laminina (L). (D) Cálculo da razão de fosforilação relativa ao controle (BSA) nos experimentos mostrados em (C); Razão: Intensidade relativa de α -tubulina fosforilada no tratamento/controle; À esquerda, 80 representa a massa molecular em kDa.

A análise dos níveis de fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* em frações solúveis e insolúveis de extratos proteicos de tripomastigotas indicou que toda a desfosforilação dessas proteínas ocorre em sua porção polimerizada (fração insolúvel) após 120 min de incubação com laminina e fibronectina. Além disso, em

immunoblottings utilizando os anticorpos Mab-PAR essas proteínas são praticamente exclusivas da fração insolúvel e não como formas livres no citoplasma do parasita (fração solúvel) (figura 28C e D).

Adicionalmente, para analisar se a redução na fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* pode induzir alguma mudança fenotípica do parasita (figura 29), foram realizados experimentos de imunofluorescência com parasitas fixados com 2% PFA após 120 min de incubação com fibronectina ou laminina, utilizando o anticorpo Mab-PAR. Nenhuma mudança morfológica ou na localização sub-celular de proteínas do *paraflagellar rod* foi encontrada em comparação com BSA (controle), assim como observado para tubulina.

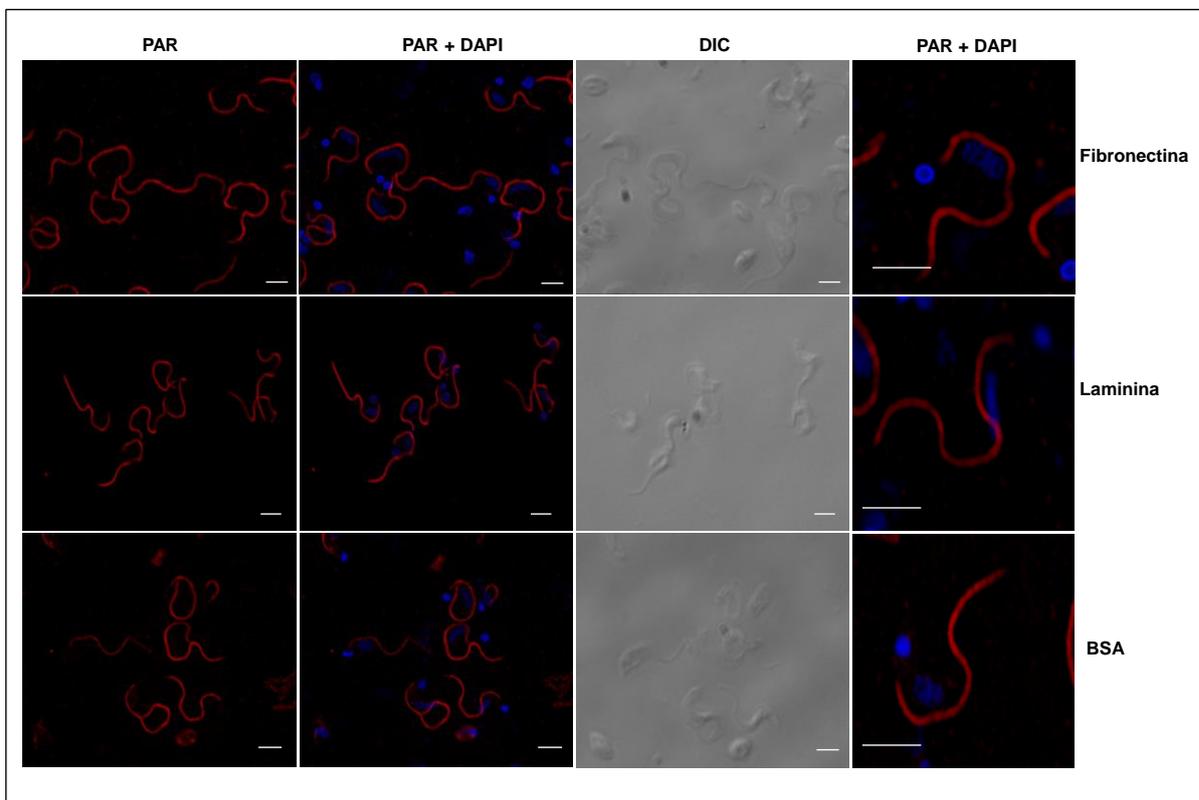


Figura 29. Localização sub-celular de proteínas do *paraflagellar rod* (PAR) de tripomastigotas de *T. cruzi* durante incubação com fibronectina ou laminina por 120 min. Localização das proteínas do *paraflagellar rod* mostrada em vermelho; núcleo e cinetoplastos são indicados pela coloração por DAPI (azul) e imagens de microscopia de contraste de interferência (DIC) também são mostradas. Barras brancas representam 3,2µm.

Esses resultados, em adição aos obtidos para tubulina, indicam que a desfosforilação dessas proteínas não está envolvida com nenhuma alteração visível na dinâmica do citoesqueleto do parasita, não ocorrendo nenhuma modificação morfológica. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos para parasitas incubados com o inibidor de fosfatase BZ3. Após 60 min de incubação de tripomastigotas com esse inibidor, grande quantidade de proteínas do *paraflagellar rod* foi encontrada no citoplasma do parasita indicando que a fosforilação dessas proteínas pode ser responsável pelo controle de sua estabilidade no flagelo, o que poderia contribuir para uma maior capacidade infectiva do parasita.

4.10. A sinalização via ERK pode estar envolvida com a resposta de tripomastigotas à adesão a fibronectina ou laminina

A via de transdução de sinal mediada pela proteínas MAPK (Quinase ativadas por mitógenos – *Mitogen activated kinase*) e em particular a sinalização mediada por ERK (quinase regulada por sinais extracelulares – *extracellular signal-regulated kinase*) apresenta um papel fundamental no controle de diversos processos celulares, incluindo os induzidos por receptores de fibronectina (Meng *et al.*, 2009) e laminina (Givant-Horwitz *et al.*, 2004; Weeks *et al.*, 1990) em células de mamíferos.

A sinalização mediada por ERK $\frac{1}{2}$ também foi verificada em tripanosomatídeos, tais como *T. cruzi* (Marchini *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2010), *T. brucei* (Nett, *et al.*, 2009 (b)) e *Leishmania* (Rotureau *et al.*, 2009). Dessa maneira, foi-se verificar a participação dessa proteína na resposta do parasita à adesão a fibronectina ou laminina no intervalo de tempo de 5 a 120 min.

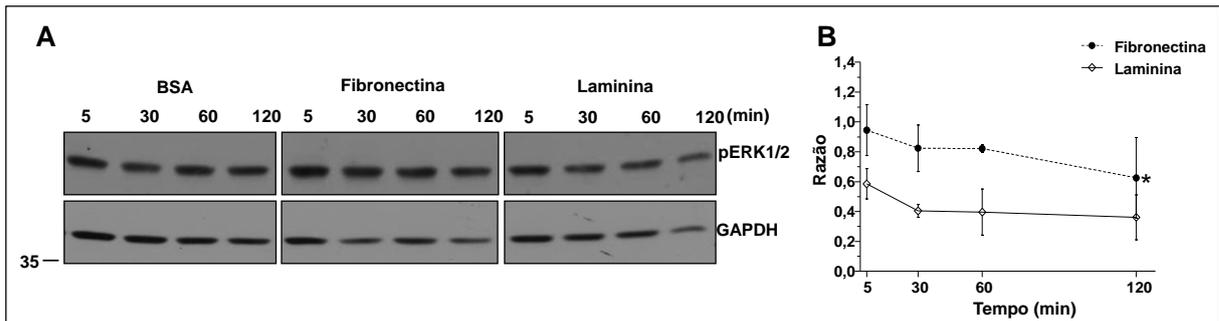


Figura 30. Fosforilação de ERK 1/2 ao longo da incubação de tripomastigotas com fibronectina ou laminina. A) *Immunoblotting* representativo de ERK 1/2 fosforilada em extratos de tripomastigotas de *T. cruzi* incubados com fibronectina ou laminina nos tempos indicados. GAPDH representa o controle de quantidade de proteína para cada canaleta. B) Quantificação das variações na intensidade de fosforilação relativa de ERK 1/2 em comparação com o controle, representadas em B. Razão representa a divisão entre a intensidade de fosforilação relativa para ERK 1/2 no tratamento sobre o controle para cada um dos tempos indicados. À esquerda, 35 representa padrão de massa molecular.

Após 60 e 120 min de incubação de tripomastigotas com fibronectina houve uma redução na fosforilação de ERK 1/2 em comparação com o controle (BSA) (figura 30A e B). A desfosforilação de ERK 1/2 em parasitas incubados com laminina foi mais acentuada, havendo uma redução de 40% na fosforilação da mesma já nos primeiros 5 minutos de incubação (figura 30A e B). Esses dados indicam que embora a desfosforilação de ERK 1/2 seja comum a ambos os tratamentos estudados, a resposta parece ocorrer em diferentes tempos, indicando uma diferença entre as cinéticas de sinalização mediada por fibronectina e laminina.

Resultados de imunofluorescência utilizando-se anticorpos anti ERK 1/2 fosforilada indicam uma predominância de sua localização no flagelo de tripomastigotas, com uma mudança no perfil de marcação dessa proteína ao longo do tempo de incubação do parasita com fibronectina ou laminina. Nota-se a perda da marcação homogênea ao longo do flagelo (figura 31), para uma marcação fragmentada (em pontos ao longo do flagelo). Também percebe-se uma redução bastante considerável já após cinco minutos de incubação com a laminina, como visto para os resultados de *immunoblotting* descritos acima (figura 30). A redução na marcação de pERK 1/2 nos parasitas incubados com fibronectina também deve ser

ressaltada, principalmente após 60 min de incubação, reforçando também os resultados obtidos por *immunoblotting*. A localização de ERK 1/2 fosforilada no flagelo de tripomastigotas (Rotureau *et al.*, 2009), assim como em outros flagelos, como nas caudas de espermatozóides (Almog *et al.*, 2008) foi previamente descrita.

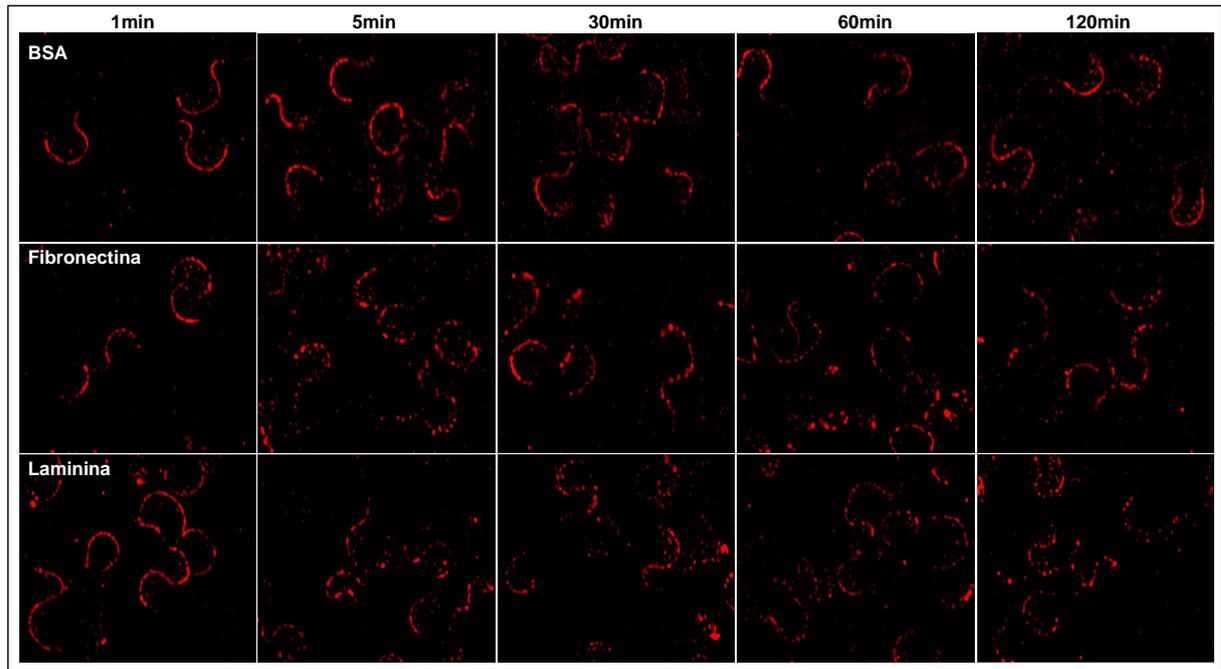


Figura 31. Variação no perfil de pERK 1/2 ao longo da incubação de tripomastigotas com fibronectina e laminina. pERK 1/2 está indicada em vermelho. O perfil de localização de ERK 1/2 fosforilada no flagelo é modificado entre os tempos de 1 a 120 min de incubação de tripomastigotas de *T. cruzi* com fibronectina e laminina.

Dessa forma, pode-se concluir que a desforilação das proteínas do citoesqueleto, tubulina e proteínas do paraflagellar rod, assim como a desfosforilação de ERK 1/2 são um evento comum para a resposta desencadeada no parasita durante a adesão a fibronectina e laminina. Além disso, a desfosforilação das proteínas do citoesqueleto pelos elementos fibronectina e laminina também pode ser verificada na resposta a ECM.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Apesar do grande avanço no entendimento do processo de infecção durante os mais de 100 anos após a descoberta da doença de Chagas, os mecanismos desencadeados no parasita durante a adesão à célula hospedeira ou à matriz extracelular são ainda pouco compreendidos (revisto em Alves & Mortara, 2010, Maeda, *et al.*, 2012). Nosso laboratório e outros vem se empenhando em identificar as vias de sinalização desencadeadas em tripomastigotas de *T. cruzi* durante seu contato com o hospedeiro, como a ligação entre glicoproteínas de superfamília gp85/trans-sialidase (TS) e elementos da matriz extracelular (ECM), tais como fibronectina, laminina e galectina, cruciais para a modulação da adesão e invasão do parasita.

A publicação do genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005), as análises *in silico* de quinomas e fosfomas de alguns tripanosomatídeos (Parsons *et al.*, 2005, Naula *et al.*, 2005, Urbaniak, *et al.*, 2012, Brenchley, *et al.*, 2007), assim como os proteomas comparativos de diferentes formas de vida de *T. cruzi* e *T. brucei* (Atwood *et al.*, 2005, Paba *et al.*, 2004, Parodi-Talice *et al.*, 2007), permitiram o avanço no conhecimento dos componentes de vias de sinalização presentes nos parasitas. Estratégias de fosfoproteoma utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massas são utilizadas atualmente para o entendimento da atuação dos eventos de fosforilação/desfosforilação de proteínas de *T. cruzi* mediado pelo contato com diferentes fatores externos. As análises proteômicas ou fosfoproteômicas em *T. cruzi* são fundamentais, dada a expressão constitutiva dos seus genes, com regulação a nível pós-transcricional e pós-traducional (Schwede *et al.*, 2012).

Dessa forma, essa tese teve como objetivo identificar e validar por fosfoproteoma os principais alvos proteicos modificados por

fosforilação/desfosforilação de tripomastigotas de *T. cruzi* aderidos a ECM ou a seus elementos isolados. Assim, mostramos pela primeira vez que eventos de fosforilação de proteínas do choque térmico e de desfosforilação de proteínas do citoqueleto são iniciados em *T. cruzi* durante a adesão a ECM, fibronectina ou laminina.

5.1. As mudanças no perfil de proteínas fosforiladas em *T. cruzi* induzidas pela adesão a ECM ou a seus elementos isolados

A primeira especulação sobre a resposta do parasita ao contato com ECM foi a partir dos resultados obtidos por imunofluorescência utilizando anticorpos capazes de identificar proteínas fosforiladas. Evidências de que a adesão do parasita a ECM, fibronectina ou laminina induzem mudanças em nível de fosforilação de proteínas são vistas nas figuras 8 e 23. As principais diferenças observadas na localização sub celular de fosfoproteínas em tripomastigotas indicam que fibronectina e laminina induzem modificações específicas e distintas, mas ambas as modificações são encontradas em parasitas incubados com ECM. Sugere-se que elementos isolados podem induzir respostas diferentes no parasita, a nível temporal e de receptores diferentes, que possivelmente fazem parte de uma rede complexa de sinalização ativada pelo contato do parasita com ECM. Esses dados são os primeiros descritos na literatura, e contribuíram para o avanço no, ainda reduzido, conhecimento sobre a resposta do parasita ao contato com a matriz extracelular.

Além da análise da distribuição de proteínas fosforiladas observado por imunofluorescência indicar modificações no parasita, era fundamental a identificação das proteínas responsáveis pelos perfis observados. As imagens de géis de eletroforese bidimensional corados com corante específico para a detecção de resíduos fosforilados indicaram um quadro de aumento na fosforilação total de

proteínas de tripomastigotas incubados com ECM, ao passo que em parasitas incubados com fibronectina ou laminina a desfosforilação foi predominante. A complexidade e a variedade dos componentes da matriz extracelular, incluindo elementos mais abundantes em comparação com os níveis de fibronectina e laminina, podem sugerir uma diferença entre as vias de sinalização ativadas por ECM total ou por seus elementos isolados.

A análise das proteínas identificadas entre os tratamentos utilizados sugere o envolvimento de diferentes vias de sinalização. Observou-se que dentre as proteínas únicas identificadas (não considerando as repetições em cada tratamento) 86 % corresponde a proteínas específicas para cada tratamento, o que pode ser explicado por diferentes receptores para as diferentes moléculas envolvidas, além de diferenças na magnitude e na duração de cada estímulo.

Apenas 14% das proteínas identificadas foram comuns para os três tratamentos, a maioria sendo componentes do citoesqueleto (como tubulinas, proteínas do *paraflagellar rod*) e proteínas do choque térmico (HSP85, HSP70, HSP60, entre outras). As proteínas hipotéticas foram detectadas em grande número nos três fosfoproteomas realizados, com diferentes números de acesso. Um número considerável de proteínas desconhecidas também foi descrita na literatura, como na análise do fosfoproteoma da forma epimastigota de *T. cruzi*, correspondendo a 68 das 119 fosfoproteínas identificadas (cerca de 57%) (Nakayasu *et al.*, 2009). Em *T. brucei*, a maioria das fosfoproteínas encontradas também consistiu de proteínas ainda com função desconhecida, o que ressalta o envolvimento dessas proteínas em vias de sinalização reguladas por fosforilação (Nett *et al.*, 2009 (b)). Uma vez que ainda não é possível classificar e, conseqüentemente, concluir sobre a participação dessas proteínas durante a adesão, elas se apresentam como importantes alvos

para estudos futuros. Essas proteínas desconhecidas estão presentes em grande número nos fosfoproteomas de diferentes tripanosomatídeos (Nakayasu *et al.*, 2009; Marchini *et al.*, 2011; Nett *et al.*, 2009 (b), Hem *et al.*, 2010; Oberholzer *et al.*, 2011; Urbaniak *et al.*, 2013), sugerindo que diferentes vias de sinalização, ainda não descritas em outros organismos, podem ocorrer nesses parasitas.

Proteínas associadas com o controle da expressão proteica foram encontradas com diferentes níveis de fosforilação em parasitas incubados com os diferentes tratamentos. A fosforilação de eIF5A foi um evento comum na resposta do parasita à incubação com ECM e fibronectina (tabela 5). PTMs no fator *eukaryotic initiation factor 5a* (eIF5A) podem interferir em sua atividade, reduzindo a síntese proteica (Park, *et al.*, 2010). O controle da fosforilação/desfosforilação de eIF5A está relacionada com o controle da taxa de tradução proteica em *T. cruzi* e está diretamente relacionada com o controle do desenvolvimento do parasita (Chung *et al.*, 2013). O fator *elongation factor 2* (EF2) foi desfosforilado durante a adesão de tripomastigotas a fibronectina. Sabe-se, pela literatura, que a fosforilação de eEF2, pode inativar esse fator, reduzindo a expressão de algumas proteínas (Kaul, *et al.*, 2011), indicando que a desfosforilação do mesmo durante a adesão a fibronectina pode estar relacionado com o controle da síntese proteica em tripomastigotas.

Proteínas envolvidas em transdução de sinal também foram moduladas durante adesão do parasita a ECM, como a trans-sialidase, produto de um pseudogene, e calreticulina, já descritas no item 4.2. Em parasitas aderidos a fibronectina, 14% das proteínas diferencialmente fosforiladas estão relacionadas com elementos de vias de transdução de sinal, enquanto que na adesão a laminina e ECM, apenas 5 e 6 % respectivamente, desse grupo de proteínas foi identificado. A proteína 14-3-3, por exemplo, modificada durante a adesão de tripomastigotas a

fibronectina e laminina, liga-se a proteínas pelos resíduos de serina ou treonina fosforilados, sendo capaz de interagir com diversas proteínas quinases, fosfatases e proteínas estruturais. Células superexpressando a subunidade 14-3-3 *tau* apresentam uma maior capacidade de adesão a tenascina, um componente da matriz extracelular similar à fibronectina. A 14-3-3 pode alterar a adesão celular por atuação sobre o citoesqueleto da célula (Martins D *et al.*, 2003).

Também proteínas metabólicas como piruvato quinase, adenilato quinase e fosfoglicerato quinase foram diferencialmente fosforiladas nos parasitas incubados com ECM, fibronectina ou laminina. A fosforilação de ATPase subunidade beta (citada anteriormente) também foi um evento comum na resposta do parasita à incubação com ECM e fibronectina (tabela 5). Piruvato quinase, que sofre uma redução de sua fosforilação durante a adesão a laminina, é uma enzima metabólica que pode se associar ao microtúbulo. A isoforma M1 dessa enzima pode desestabilizar o microtúbulo, de maneira dependente de fosfoenolpiruvato. Em espermatozoides a produção de uma isoforma de piruvato quinase com alta afinidade pelos microtúbulos pode indicar uma participação dessa enzima na dinâmica celular (Gupta & Bamezai, 2010). Fosfoglicerato quinase, localizada na superfície do flagelo de *T. brucei*, onde atua como receptora de sinais extracelulares e na sinalização dependente de nucleotídeos (Oberholzer, *et al.*, 2011) sofre uma redução na fosforilação durante a adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* a laminina. Por sua vez a adenilato quinase sofre um pequeno aumento da fosforilação em parasitas incubados com fibronectina. Na literatura ressalta-se uma provável fosforilação da adenilato quinase putativa de *T. brucei* (Tb09.211.0350), nos resíduos Ser¹³⁴ e Ser¹³⁶ pela análise *in silico*, utilizando-se os programas *NetPhos* e *Scansite* (Nett *et al.*, 2009 (b)).

Apesar dos papéis específicos de cada uma das proteínas acima citadas, nota-se uma grande correlação das mesmas com o citoesqueleto do parasita, indicando que diferentes vias de sinalização parecem convergir na modulação da estabilidade e funcionamento do citoesqueleto de *T. cruzi*, o que parece ser o principal ponto da sinalização desencadeada no parasita durante sua adesão a ECM.

Modificações por fosforilação de proteínas do choque térmico ocorrem durante adesão a ECM, fibronectina ou laminina. Uma tendência dessas proteínas serem fosforiladas durante a adesão a ECM e desfosforiladas durante a adesão a fibronectina ou laminina pode ser verificada na tabela 5. A desfosforilação de proteínas do citoesqueleto do parasita também foi um evento comum aos tratamentos testados. Observa-se que a adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* a ECM ou a seus elementos isolados resulta em um aumento da fosforilação das proteínas HSPs bem como uma redução na fosforilação de proteínas do citoesqueleto do parasita. Provavelmente esses são os eventos principais desencadeados no parasita como resposta à adesão a ECM, podendo ser uma etapa de preparação do parasita para o encontro com a célula hospedeira.

Tabela 5. Proteínas modificadas por fosforilação/desfosforilação durante adesão a ECM, fibronectina ou laminina.

| Proteína | Δ fosforilação (trat. - BSA) | | |
|--|-------------------------------------|----------|--------------|
| | ECM | Laminina | Fibronectina |
| heat shock protein 85, putative | + | - | - |
| heat shock protein 60 | + | - | - |
| heat shock protein 70, putative | - | - | - |
| heat shock protein, putative | - | 0 | + |
| chaperonin contain t-complex protein, putative | - | - | 0 |
| paraflagellar rod components, putative | - | - | - |
| beta tubulina, putative | + | - | - |
| alpha tubulina, putative | - | - | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| ATPase beta subunit, putative | + | - | + |
| eukaryotic initiation factor 5a, putative | + | 0 | + |

5.2. Interação de tripomastigotas com a ECM afeta a fosforilação de proteínas do choque térmico

Proteínas do choque térmico foram primeiramente descritas em *Drosophila* submetidas a altas temperaturas (Ritossa, 1962; Tissières, 1974) e compreendem um subgrupo das chaperonas cuja expressão é constitutiva ou induzida por um fator ambiental, e não somente por temperatura. Elas atuam na formação e rompimento de interações não covalentes responsáveis pela organização estrutural de algumas macromoléculas, sendo as principais responsáveis pela manutenção de um ambiente celular funcional e proteção contra estresses ambientais (Giambiagi-de Marval, *et al.*, 1996)

As proteínas do choque térmico são classificadas de acordo com as massas moleculares, apresentando funções variadas: HSP20 está envolvida com estabilização de proteínas de citoesqueleto; HSP40 é substrato de HSP70; as famílias de HSP60, 70 e 90 estão envolvidas em enovelamento protéico, ao passo que a família de HSP100 está relacionada a rompimento de agregados protéicos.

HSP70 e 90 atuam como monômeros ou dímeros e HSP60 agrupam-se em dois anéis heptaméricos. HSP90 liga-se a proteínas previamente enoveladas e por isso tem papel fundamental no controle funcional da proteína (Neckers & Tatu, 2008). Em células de mamíferos, HSP90 forma complexos com outras chaperonas. Geralmente, dímeros de HSP90 interagem com HSP70 e outras co-chaperonas que atuam modulando a atividade ATPásica da proteína, impedindo sua ligação com o substrato. Muitos desses substratos constituem elementos de vias de sinalização

celular, como proteínas quinase e fatores de transcrição (revisado por Neckers & Tatu, 2008).

HSPs estão envolvidas na virulência de diversos microrganismos (revisado por Daily, *et al.*, 2007). Em geral, tem sido mostrada a participação dessas proteínas nos processos de conversão entre os estágios celulares ou ainda na capacidade infectiva do parasita. Em *Plasmodium falciparum*, por exemplo, o aumento nos níveis de expressão de HSPs em parasitas obtidos de amostras de pacientes está diretamente relacionado com sucesso da infecção (Daily, *et al.*, 2007).

Algumas proteínas do choque térmico, sua atuação em diferentes organismos, assim como sua possível atuação na resposta de *T. cruzi* à adesão a ECM, inferidos pelos resultados descritos acima, estão apresentados abaixo.

HSP100

A família de HSP100 é composta pelas chaperonas capazes de ressolubilizar agregados proteicos quando associada a outras chaperonas como HSP70 e HSP40. Essas proteínas pertencem à Superfamília AAA+ (*ATPase associated with various cellular activities*) (Neuvald, *et al.*, 1999, Hanson & Whiteheart, 2005). Além da atuação citada como chaperonas, também podem atuar em outros eventos celulares, como replicação e reparo de DNA e regulação do citoesqueleto (revisado por Zolkiewski *et al.*, 2012).

A expressão de HSP100 é crucial para a infectividade de *Leishmania major*, contribuindo para a sobrevivência do parasita dentro da célula hospedeira (Hubel, 1997, Krobitsch and Clos, 1999, Reiling, *et al.*, 2006). Em *Listeria monocytogenes*, a proteína ClpC ATPase, membro da família HSP100 atua no escape do parasita do

compartimento fagossomal do macrófago, contribuindo para a virulência da bactéria (Rouquette, *et al.*, 1998). ClpE, outra componente da família de HSP100 também está envolvida na virulência de *Listeria* (Nair, *et al.*, 2000). ClpC modula a expressão de alguns genes envolvidos com fatores de virulência diretamente relacionados com adesão e invasão (Nair, *et al.*, 2000). Em *Salmonella typhimurium* (Hensel *et al.*, 1995) e *Staphylococcus aureus* (Mei, *et al.*, 1997) também essa proteína é relacionada com virulência e sobrevivência na célula hospedeira.

Embora a modificação por fosforilação dessa proteína não tenha sido identificada nos resultados obtidos, a fosforilação de HSP70 observada em parasitas aderidos a ECM pode afetar a interação entre essas HSPs, podendo indicar uma regulação indireta da função celular de HSP100 em parasitas aderidos a ECM.

HSP60 e 70

Proteínas do choque térmico de 60kDa (HSP60) estão envolvidas no enovelamento de proteínas mitocondriais e na formação dos complexos proteicos na matriz mitocondrial. HSP70 atua no enovelamento de proteínas ligando ou desligando do substrato de acordo com a ligação a ATP ou ADP respectivamente (revisado por Jensen & Johnson, 1999), podendo também atuar na translocação de proteínas entre os compartimentos celulares (Matlack, *et al.*, 1998).

Em *T. cruzi*, os genes que codificam HSP70 foram encontrados em *tandem* (Requena, 1993) e os genes *hsp60* são polimórficos, também arranjados em *tandem* e divididos em três grupos distintos (Giambiagi-DeMarval, 1996). HSP60 está localizada próximo à mitocôndria e ao cinetoplasto de tripanosomatídeos (Olson, *et al.*, 1994). Em *Leishmania*, essa proteína foi encontrada em frações mitocondriais de extratos desse parasita, sendo localizada na matriz mitocondrial (Schlüter, *et al.*,

2000). Em *T. brucei*, HSP60 foi encontrada em frações do *flagelar pocket*, sendo reconhecida por soro de animais imunizados com esse extrato (Radwanska, *et al.*, 2000).

Em *T. cruzi*, três membros de HSP60 e oito membros de HSP70 foram identificados, alguns deles induzidos por calor. HSP70 apresenta uma localização citoplasmática em epimastigotas e o tratamento com calor induz a sua translocação para o núcleo. Também é encontrada na membrana plasmática de todas as três formas do parasita após o choque térmico (Giambiagi-DeMarval, 1996). No caso da HSP60, imunoeletromicroscopia de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos indicaram sua localização próximo à mitocôndria e ao cinetoplasto, com uma localização na membrana plasmática após o choque térmico.

Em *Toxoplasma gondii*, HSP70 atua na fuga da resposta pro-inflamatória, contribuindo para aumento da infectividade (Dobbin, *et al.*, 2002). HSP70/40 também contribui para a capacidade invasiva de *Salmonella* (Zhang, *et al.*, 2001). O envolvimento de HSP60 com a capacidade de invasão à célula hospedeira foi descrito para *Actinobacillus* (Takaya, *et al.*, 2004).

Dados obtidos nesse trabalho em adição aos dados de literatura, que indicam a interação entre HSP70 e o citoesqueleto, sugerem que a diminuição da fosforilação de HSP70 em parasitas aderidos a ECM pode afetar sua interação com moléculas de tubulina, interferindo na função do microtúbulo. Além disso, a variação na fosforilação de HSP60 e sua localização predominante na região posterior do parasita (incluindo a região do *flagelar pocket*) mostrado na figura 15, também sugerem uma relação entre HSPs e proteínas do citoesqueleto, e uma provável participação dessas proteínas em vias de sinalização semelhantes ou sobrepostas. Modificações por fosforilação/desfosforilação de HSP60 mitocondrial e HSP70

também foram identificadas em outro trabalho durante a resposta de epimastigotas de *T. cruzi* a TGF- β (Ferrão, *et al.*, 2012), um fator que pode estar ligado a elementos da matriz extracelular.

GRP78

Glicose regulated protein 78 (GRP78) é uma chaperona de retículo endoplasmático (RE), pertencente à família de HSP70, caracterizada por apresentar um domínio ATPase e outro de ligação ao substrato (Minamino, *et al.*, 2010), pela ligação a resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de regiões desenoveladas da cadeia polipeptídica nascente no RE (Hendershot, *et al.*, 1996). No RE, além de atuar no enovelamento de proteínas, GRP78 também participa do controle de agregação protéica. Sua localização não é exclusivamente no RE, podendo ser deslocada para a membrana plasmática sob condições de resistência a drogas ou transformações celulares (Delpino, *et al.*, 2002; Ni, *et al.*, 2011). Na superfície celular, GRP78 pode atuar como receptor de α -macroglobulina ativada, por exemplo. Essa proteína também pode se translocar para a mitocôndria, onde atua no controle da homeostase mitocondrial principalmente sob condições de estresse no RE (Sun, *et al.*, 2006). Em *T. cruzi*, o gene que codifica GRP78 foi clonado e a proteína expressa se mostrou altamente antigênica. (Tibbetts, *et al.*, 1994).

A participação de GRP78 nos eventos de adesão e invasão de parasitas ao hospedeiro ainda é pouco conhecida, porém sua atuação no controle da motilidade celular já foi descrita. Em espermatozoides maduros, foram localizadas HSP60 e GRP78 (Lachance, *et al.*, 2010). A análise proteômica de espermatozoides com motilidade reduzida provenientes de homens com um tipo de infertilidade mostrou que GRP78 foi uma das proteínas diferencialmente expressas em relação a

espermatozoides normais, indicando que essa proteína pode estar envolvida de alguma forma com o controle da motilidade dos espermatozoides (Shen *et al.*, 2013).

É importante ressaltar também que GRP78 pode atuar na ativação da degradação de ECM. Em células tumorais humanas *knockdown* para GRP78 verificou-se uma redução na degradação de ECM, e uma redução na fosforilação de ERK 1/2, que foi responsável pela redução na ativação de metaloproteases que degradam ECM (Li, *et al.*, 2012).

Frente ao grande aumento na fosforilação de GRP78 em parasitas aderidos a ECM (tabela 1), pode-se sugerir uma provável correlação entre PTMs dessa proteína e o controle da atividade da mesma tanto na manutenção da motilidade do parasita quanto na ativação de mecanismos de degradação de ECM, que podem facilitar a infecção.

HSP90

HSP90 é uma das chaperonas com maior número de substratos (“proteínas clientes”), incluindo proteínas envolvidas em transdução de sinais, em mecanismos regulatórios e na resposta imune. São substratos de HSP90 proteínas quinases, fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto e outros fatores responsáveis pela resposta da célula a inúmeros fatores externos (revisado por Pearl & Prodrômio, 2006). Diante da sua atividade no controle de proteínas envolvidas em inúmeros processos celulares, HSP90 é altamente estudada. Muitos inibidores para essa proteína têm sido utilizados com bastante sucesso para o combate de doenças como câncer e doenças neurológicas (Sydor, *et al.*, 2006).

Em *L. brasiliensis* o aumento da infectividade está associado a um aumento na expressão de HSP90 (Smejkal, *et al.*, 1988). Em *Leishmania donovani*, HSP90

está envolvida no processo de diferenciação da forma presente no inseto para a de mamíferos. Inibição com geldanamicina impede crescimento das fomas promastigotas em cultura, e a superexpressão de HSP90 nessas condições restauram sua capacidade de crescimento (Wiesgigl & Clos 2001). Em *Trypanosoma cruzi*, HSP90 também está relacionada com a proliferação da forma epimastigota, e sua inibição interrompe a diferenciação da forma tripomastigota sanguínea para epimastigota (Graefe, *et al.*, 2002), com modificações morfológicas do tripomastigota tratado com esse inibidor. Em *Plasmodium falciparum* HSP90 está associada com o crescimento dentro dos eritrócitos humanos (Banumathy, *et al.*, 2003) e em *Toxoplasma gondii*, HSP90 apresenta mudança na localização sub celular regulada pela estágio de desenvolvimento do parasita (Echeverria, *et al.*, 2005)

Em *T. cruzi*, HSP85, componente da família de proteínas HSP90, foi encontrada no flagelo e apresentou-se como principal elemento da via de resposta a ECM, contribuindo diretamente na adesão do parasita à célula hospedeira (figura 15). HSP84, outro componente da família de HSP90, foi identificada como componente da superfície do flagelo de *T. brucei* (Oberholzer, *et al.*, 2011). Assim, nota-se uma localização desses membros da família de HSP90 no flagelo de tripanosomatídeos.

HSP90 está associada com microtúbulos ciliares em protozoários (Williams & Nelsen, 1997) e está envolvida no controle da motilidade de cílios em camundongos (Takashi, *et al.*, 2005). Em células epiteliais humanas, a inibição de HSP90 e do proteasomo resultam em aumento nos níveis de tubulina acetilada, sendo que HSP90 pode estar envolvida na prevenção de agregação (Ryhänen, *et al.*, 2011) e no controle de sua degradação e desnaturação de tubulina (Weis, *et al.*, 2009).

Pode-se notar uma correlação direta entre a participação de HSP90 no controle de modificações pós-traducionais e da estabilidade de tubulina e o envolvimento desse evento na manutenção da movimentação do parasita mediada pelo flagelo.

Em células tumorais, HSP90 α pode ser eliminada para o meio extracelular via exossomos, contribuindo para a migração e invasão dessas células pela ativação de metaloproteases que degradam matriz extracelular (Sims, *et al.*, 2011). Dessa forma, assim como ocorre para GRP78, HSP90 também pode estar envolvida diretamente na degradação de ECM pelo parasita, facilitando seu mecanismo infectivo.

5.3. Interação de tripomastigotas à ECM, laminina e fibronectina induzem modificações no citoesqueleto de *T. cruzi*

Além de tubulina e proteínas do *paraflagellar rod*, outros componentes do citoesqueleto e do flagelo do parasita foram modificados por fosforilação/desfosforilação durante sua adesão a ECM (20% do total de *spots* identificados), fibronectina (23,9%) e laminina (23,7%), como dineínas, proteínas do *flagelar radial spoke*, I/6, miosina e kinesina.

As dineínas flagelares formam um complexo motor responsável pelo batimento em forma de onda do flagelo, permitindo a movimentação das células em solução. As dineínas citoplasmáticas estão relacionadas com processos de tráfego intracelular de vesículas e de outras partículas. A fosforilação da cadeia leve de dineína determina o deslizamento sobre os microtúbulos do axonema, controlando a motilidade celular em *Chlamydomonas*, sendo que a fosforilação de dineína dependente de cAMP é controlada pelo sistema do *flagelar radial spoke* (King, 2000). Nesse organismo, o *flagelar radial spoke* permite a transmissão de sinais do

centro do par de microtúbulos do axonema aos braços de dineína através de interações mecânicas (Yang, *et al.*, 2006). Trabalhos da literatura sugerem que ciclos de fosforilação/desfosforilação em proteínas flagelares e do citoesqueleto controlam o batimento do flagelo e a montagem e estabilidade da estrutura do *flagelar radial spoke* (Piperno, *et al.*, 1981). Assim, a desfosforilação de dineína em tripomastigotas aderidos a laminina pode estar relacionada com o controle da motilidade dessa forma do parasita.

I/6 é uma proteína associada aos microtúbulos, responsável pela ligação entre eles. Em *T. brucei*, a associação entre I/6 e os microtúbulos são responsáveis pela grande organização do citoesqueleto do parasita (Detmer, *et al.*, 1997). Embora o efeito da fosforilação de I/6 ainda não tenha sido relatado, a fosforilação dessa proteína foi descrita em parasitas aderidos a fibronectina, o que pode estar relacionado com as modificações no citoesqueleto e consequente controle da motilidade do parasita. Como predito, proteínas do paraflagellar rod e tubulinas foram identificadas no proteoma de todos os estágios de *T. cruzi* (Parodi-Talice, *et al.*, 2007, Atwood, *et al.*, 2005, Paba, *et al.*, 2004) e apresentaram modificações significativas por PTMs, observadas nesse trabalho. Embora nenhuma modificação na arquitetura dos microtúbulos ou do *paraflagellar rod* tenha sido evidenciada em parasitas incubados com ECM, fibronectina ou laminina com a metodologia empregada (figuras 27 e 29), as modificações por fosforilação observadas no fosfoproteoma podem ser importantes para o controle da afinidade com outras proteínas pertencentes a diferentes cascatas de sinalização.

5.4. Interação de tripomastigotas à ECM induz modificações de tubulina

Os microtúbulos formam um arranjo dinâmico com atuação fundamental em vários processos biológicos. O crescimento ou encurtamento do microtúbulo ocorre pela adição ou remoção de heterodímeros de α - e β -tubulina. Ambas as subunidades podem sofrer inúmeras modificações pós-traducionais, a maioria delas após a polimerização do microtúbulo. As modificações: acetilação, tirosinação/detirosinação, glicilação, glutamilação (Wloga & Gaertig, 2010) já foram bem caracterizadas. O papel da fosforilação de tubulina porém, parece ainda ser pouco entendido. A fosforilação de α - e β -tubulinas já foi descrita (Faruki *et al.*, 2000; Mitsopoulos *et al.*, 2003), incluindo a fosforilação em resíduos de Ser¹⁷² de β -tubulina presente na forma de dímeros não polimerizados pela quinase Cdk1 e inibindo a adição do dímero no microtúbulo (Fourest-Lieuvain *et al.* 2006).

Os sítios de fosforilação de tubulina ainda não foram identificados em *T. cruzi*. A proteína serina-treonina quinase CK2 foi descrita como capaz de se associar fortemente a heterodímeros de α/β - tubulinas podendo fosforilar tanto α quanto β tubulina *in vitro* (Casas, *et al.*, 2002; De Lima, *et al.*, 2006). Em *T. brucei*, um sítio de fosforilação de β -tubulina foi identificado (GLSVPELTQQMFDAK) (Nett, *et al.*, 2009 (b)), mas a função dessa fosforilação é desconhecida (MacRae 1997; Faruki *et al.*, 2000; Mitsopoulos *et al.*, 2003; Hammond *et al.*, 2010). Em células tumorais humanas, a fosforilação no resíduo Ser¹⁶⁵ em α -tubulina pela quinase PKC α induz aumento na polimerização do microtúbulo e na motilidade celular (Abeyweera *et al.*, 2009). Em leveduras, mutações no resíduo Ser¹⁷² em β -tubulina também resultaram em alterações na dinâmica do microtúbulo e na divisão celular (Caudron, *et al.*, 2010). Além disso, em linfócitos T, a fosforilação de α - tubulina em resíduos de tirosina foi encontrada apenas em frações não polimerizadas de tubulina, podendo

estar relacionada com o controle da polimerização de tubulina (Ley, *et al.*, 1994), a exemplo de outras células.

Muito pouco se sabe sobre a atuação de fosfatases sobre as funções dos microtúbulos. Mutagênese sítio dirigida em genes da fosfatase Ppp1cc leva a defeitos na espermatogênese com alta fosforilação das isoformas α e β de tubulina, resultando em uma desordem na organização dos microtúbulos (Henderson *et al.*, 2011). Em microtúbulos de neurônios a isoforma β III-tubulina e Tau (*axonal microtubule associated protein*) são preferencialmente desfosforiladas por fosfatase 2A (Sontag, *et al.*, 1999). Em *T. cruzi*, a associação entre proteína fosfatase (PP2A) com α -tubulina, miosina e actina foram relatadas, sugerindo uma participação na transformação de tripomastigotas a amastigotas e no encurtamento do flagelo (González, *et al.*, 2003). A possibilidade de que a desfosforilação de tubulina observada em parasitas incubados com ECM, fibronectina e laminina, possa afetar a motilidade ou a afinidade de ligantes do parasita a receptores da célula hospedeira está sendo investigada. Deve-se notar ainda que redução nos níveis de mRNA de α e β -tubulina ocorrem durante a metaciclogênese ou no crescimento estacionário de epimastigotas (Parodi-Talice, *et al.*, 2007). Uma correlação inversa entre níveis de mRNA de tubulina e níveis de subunidades de tubulinas livres foram descritas, sendo mais abundantes em tripomastigotas e amastigotas do que em epimastigotas. Esses dados indicam um mecanismo de auto-regulação que controla a estabilidade de mRNAs, reduzindo a estabilidade e a meia-vida de mRNAs de α -tubulina e não de β -tubulina (da Silva *et al.*, 2006). Pelos dados obtidos, em tripomastigotas aderidos a ECM, a redução na incorporação de ^{35}S -metionina de fato indica uma provável redução na síntese de α -tubulina. Entretanto, a degradação da mesma não deve ser descartada. Muito embora a redução da fosforilação de tubulina pareça

estar envolvida com a estabilidade do microtúbulo, a redução na síntese proteica mediada pela ligação a ECM ainda não é entendida, necessitando de maiores investigações.

5.5. Modificações pós-traducionais de tubulina

A acetilação do resíduo de Lisina 40 é a única modificação que ocorre no interior da molécula. Essa modificação é encontrada em microtúbulos estáveis e mutações dessa lisina não induzem nenhuma modificação fenotípica (Hammond *et al.*, 2008). Duas enzimas são conhecidas por remover o grupo acetil, HDAC6 e Sirt2, porém nenhuma enzima com atividade de “acetilase” foi descrita até então (Hubbert, *et al.*, 2002; Matsuyama, *et al.*, 2002; North, *et al.*, 2003). Sabe-se que apesar da acetilação não ser essencial para a sobrevivência do organismo, ela está diretamente envolvida com o tráfego de moléculas mediado pelo citoesqueleto (Bulinski 2007; Reed *et al.*, 2006). A acetilação de alfa tubulina foi descrita em todas as formas de vida de *T. brucei* (Gull, 1999) e de *T. cruzi* (Souto-Padron, *et al.*, 1993). Tubulina acetilada foi encontrada no flagelo e nos microtúbulos subpeliculares nesses dois organismos, sendo mais abundante em epimastigotas e tripomastigotas do que em amastigotas (Gull, 1999; Souto-Padron, *et al.*, 1993). Essa modificação não foi alterada em parasitas aderidos a ECM.

A detirosinação de tubulina ocorre através da atuação de carboxipeptidases que removem o resíduo de tirosina da porção C-terminal de α -tubulina (Verhey & Gaertig *et al.*, 2007; Westermann & Weber 2003). A tirosinação, catalisada pela tubulina tirosina-ligase, ocorre em heterodímeros de tubulina livres e estão envolvidas em processos de tumorigenese (Lafanechere, *et al.*, 1998) e regulação

da organização neuronal (Erck, *et al.*, 2005). Essa modificação também não foi encontrada em tripomastigotas aderidos a ECM.

A poliglutamilação ocorre em resíduos de glutamato nas cadeias C-terminais de α e β -tubulina. As enzimas responsáveis pela glutamilação de tubulina, as tubulina glutamilases, contem o domínio tubulina tirosina ligase-*like*. Essa modificação é essencial para interação entre o microtúbulo e algumas proteínas associadas.

A poliglutamilação de tubulina está diretamente envolvida com estabilidade da movimentação de cílios e flagelos. Poliglutamilação e poliglicilação na região C-terminal de tubulina, são encontradas no microtúbulo estável e estão envolvidas com a formação e funcionamento adequados da estrutura do axonema (Pathak, *et al.*, 2007; Janke, *et al.*, 2007), além do transporte de componentes estruturais e de membrana em flagelos e cílios (transporte intraflagelar) (Scholey, 2003). A poliglutamilação contribui para o deslizamento correto dos braços de dineína sobre os microtúbulos.

Em *C. elegans*, a perda da função da deglutamilase CCPP-1 resulta em alteração no transporte intraflagelar, contribuindo para uma degradação progressiva do cílio, uma vez que a estabilidade do microtúbulo é reduzida (O'Hagan, *et al.*, 2011). Além disso, em *Chlamydomonas*, mutantes que não expressam a poliglutamilase não apresentam nenhuma alteração na estrutura do axonema, porém apresentam uma redução na velocidade de movimentação do organismo em meio líquido (Kubo *et al.*, 2010; Kubo *et al.*, 2012). Vale ressaltar que resultados similares também foram encontrados em cílios de *Tetrahymena*, em que a indução da glutamilação de β -tubulina altera a movimentação dos braços de dineína sobre os microtúbulos em axonemas *in vitro* (Suryavanshi, *et al.*, 2010).

Dessa forma, nota-se pelos resultados obtidos, que a adesão do parasita à matriz extracelular resulta em uma redução na poliglutamilação de tubulina. Esse processo pode estar relacionado com o controle da estabilidade flagelar, visto que em diferentes organismos, variações nos níveis de glutamilação de tubulina alteram a estabilidade de cílios e flagelos. Essa redução pode induzir uma mudança direta sobre o citoesqueleto do parasita, o que poderia contribuir para sua adesão e invasão da célula hospedeira.

5.6. A atuação do flagelo como receptor de sinais extracelulares

Além do papel relacionado à motilidade, tem sido atribuído ao flagelo um papel nas interações com o hospedeiro, na morfogênese do parasita, na divisão celular e na evasão do sistema imune do hospedeiro (Ralston, *et al.*, 2009, Gull, 2003). Vários exemplos na literatura apontam para o papel de flagelos e de cílios como uma antena capaz de captar e transduzir o sinal extracelular para o interior da célula (Berbari, *et al.*, 2009).

Proteínas localizadas no flagelo já identificadas estão envolvidas com a movimentação celular, como proteínas quinases (CKI e PKA) e fosfatases (PP1 e PPP2A) associadas ao axonema flagelar, as quais modulam o deslizamento dos braços de dineína ao longo dos microtúbulos (Porter & Sale, 2000, Elam, *et al.*, 2009). Enzimas glicolíticas presentes no flagelo de *Chlamydomonas* (Pan, *et al.*, 2011), assim como de espermatozóides de mamíferos (Pazour, *et al.*, 2005), são associadas à necessidade energética para o batimento flagelar. Além disso, a presença de fosfoglicerato quinase e mutase foram relacionadas com a desmontagem do flagelo em *Chlamydomonas* (Pan, *et al.*, 2011) e também foi encontrada na matriz do flagelo de *T. brucei* (Oberholzer, *et al.*, 2011), que

apresenta uma grande concentração de proteínas fosforiladas em resíduos tirosina (Nett *et al.*, 2009 (a)). Em resumo, a variação na fosforilação de proteínas localizadas no flagelo parece ser um evento importante para o controle de diferentes processos em organismos flagelados.

Em protistas, canais de íons localizados no flagelo, assim como receptores do tipo quinase (Christensen, *et al.*, 2003, Ogura & Takahashi, 1976, Pan, *et al.*, 2000) controlam sua motilidade. Em metazoários, elementos localizados na membrana do flagelo, como canais iônicos e receptores acoplados a proteína G podem receber sinais extracelulares que controlam desenvolvimento e reprodução do organismo (Badano, *et al.*, 2006, Pan, *et al.*, 2005). A análise da interação entre *T. congolense* e células endoteliais de aorta bovina demonstraram que a adesão é mediada exclusivamente pelo flagelo, com o desenvolvimento de pequenas protruções em sua superfície que fazem uma conexão, mediada por ácido siálico, com a membrana da célula hospedeira (Hemphill & Ross, 1995). Em *T. brucei*, estudos recentes demonstram a ocorrência de vias de sinalização mediadas por nucleotídeos cíclicos (Paindavoine, *et al.*, 1992, Oberholzer, *et al.*, 2007(a)) e cálcio no flagelo (Ralston, *et al.*, 2009), além da presença de proteínas sensoras de cálcio, como calmodulina e *flagellar calcium-binding protein* (FCaBP), (Hill, 2003, Broadhead, *et al.*, 2006, Maldonado, *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que para esse parasita, o flagelo pode atuar como uma plataforma para a ativação de respostas a fatores externos (Portman, *et al.*, 2008; Oberholzer *et al.*, 2007 (b); revisado em Lopes *et al.*, 2010). Além disso, experimentos com RNAi para calmodulina resultaram em falha na montagem da estrutura do *paraflagellar rod* e alteração na formação do axonema em *T. brucei* (Ginger, *et al.*, 2013). No caso de *T. cruzi*, a análise do proteoma de epimastigotas indicou que proteína do *paraflagellar rod* pode ser fosforilada em um

sítio conservado de fosforilação por CAMK2, levando à suposição de que sua fosforilação também deve ser controlada por cálcio e isso poderia estar relacionado com o controle da motilidade do parasita (Nakayasu, *et al.*, 2009).

As proteínas identificadas a partir do proteoma da matriz e da membrana do flagelo de *T. brucei* estão relacionadas com a captação de sinais extracelulares e o desencadeamento de uma resposta intraflagelar específica, confirmando uma função receptora para o flagelo de tripanosomatídeos. Na membrana do flagelo desse parasita foram identificados receptores quinase e EGF-*like*, canais de cálcio, além de algumas proteínas com funções metabólicas (adenilato quinase e fosfoglicerato quinase). Na matriz flagelar, várias proteínas envolvidas na transdução de sinais foram identificadas, como MAPK, Proteínas Quinase A, proteínas relacionadas ao transporte intraflagelar e ao sistema de ubiquitinação de proteínas. As proteínas identificadas tanto na membrana do flagelo quanto na matriz estão relacionadas com o controle de uma grande variedade de eventos no parasita, tais como divisão, diferenciação e motilidade (Oberholzer *et al.*, 2011). Como relatado acima, proteínas da família de HSP90 foram encontradas como componentes do flagelo em *T. brucei* (HSP84, Oberholzer, *et al.*, 2011) e em *T. cruzi* (HSP85, figura 15).

Análises proteômicas dos estágios tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* identificaram várias proteínas do citoesqueleto, incluindo as pertencentes ao *paraflagellar rod*. Há uma redução nos níveis dessas proteínas do *paraflagellar rod* durante a diferenciação de tripomastigota a amastigota devido ao encurtamento e desaparecimento do flagelo, embora a concentração de tubulina tenha se mantido constante, com um pequeno aumento apenas nas formas tripomastigotas (Paba, *et al.*, 2004). Como ocorre para tubulina, a função dos ciclos de

fosforilação/desfosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* ainda é desconhecida. A estrutura do *paraflagellar rod* é restrita a cinetoplastídeos, eugenóides e dinoflagelados. Ela é composta basicamente por PRF 1 (ou PAR3) e PRF2 (PAR2) (Saborio, *et al.*, 1989; Fouts, *et al.*, 1998). A fosforilação de uma das proteínas do *paraflagellar rod* foi descrita em uma região consenso de CAMK2 (RxxS/T), no proteoma de epimastigotas de *T. cruzi* (Nakayasu, *et al.*, 2009; Marchini, *et al.*, 2011). Além disso, sequências dessas proteínas contendo resíduos de serina e treonina fosforiladas foram descritas para *T. brucei* (Nett, *et al.*, 2009 (b)).

Além do seu papel na motilidade flagelar (Broadhead *et al.*, 2006, Rocha *et al.*, 2010), o *paraflagellar rod* pode estar envolvido na captação de sinais externos e transmissão pelo flagelo ou pelo corpo do parasita (Portman e Gull, 2010). As modificações descritas para as proteínas do *paraflagellar rod* durante a adesão de tripomastigotas a ECM do hospedeiro podem estar envolvidas nesse processo. Esse fato é reforçado pela participação de ERK 1/2 no mesmo processo e pela sua localização no flagelo (Bao, *et al.*, 2010), junto com outras fosfatases e quinases. Proteínas do *paraflagellar rod*, assim como HSP70, de tripanosomatídeos desencadeiam alta resposta imunogênica em diferentes organismos (Egui, *et al.*, 2012, Carrillo, *et al.*, 2008, Morell, *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que as modificações nos níveis de fosforilação de proteínas do *paraflagellar rod* podem afetar diretamente a estabilidade do flagelo. Isso foi confirmado pelo tratamento de tripomastigotas com o inibidor BZ3, o qual induziu a formação de aglomerados citoplasmáticos de proteínas do *paraflagellar rod*. A desfosforilação observada para proteínas do *paraflagellar rod* nos tratamentos testados não induziu mudanças significativas na distribuição dessas proteínas, visto a reduzida magnitude do evento.

5.7. Participação de ERK 1/2 na sinalização ativada em tripomastigotas aderidos a fibronectina e laminina

Devido à metodologia empregada, proteínas menos abundantes e aquelas com pequenas diferenças de fosforilação podem não ter sido identificadas pelas análises por eletroforese bidimensional. Por exemplo, ERK 1/2 não foi detectada em géis bidimensionais mas foi explorada visto sua participação na resposta de células de mamíferos a adesão a ECM (revisto por Alberts, *et al.*, 2004). De fato, utilizando anticorpos específicos para ERK 1/2 fosforilada, foi observada uma desfosforilação dessa proteína, sugerindo uma provável inibição da mesma. A desfosforilação de ERK 1/2 também foi observada em células do fígado após incubação com laminina (Givant-Horwitz, *et al.*, 2004). Em contrapartida, um aumento na fosforilação (ativação) de ERK 1/2 ocorre em células aderidas a fibronectina via interação com integrinas, induzindo a proliferação ou motilidade de células de mamíferos (Meng *et al.*, 2009). É importante ressaltar que a proteínas TcMAPK2, uma correspondente de ERK 1/2 em *T. cruzi* já foi descrita e se encontra presente em todos os estágios do parasita, embora seja mais fosforilada em tripomastigotas nos quais a localização dessa proteína se dá na região do contorno do flagelo (Bao, *et al.*, 2010).

Os dados obtidos nesse trabalho indicam que a desfosforilação de ERK 1/2 é parte da resposta de tripomastigotas à adesão a fibronectina ou laminina, sugerindo a participação dessa proteína nas cascatas de sinalização ativadas no parasita como resposta à interação com elementos de ECM.

O conhecimento sobre as modificações por fosforilação de proteínas de choque térmico, proteínas do microtúbulo e do *paraflagellar rod* de *T. cruzi*

ocasionadas pela adesão a ECM e a seus elementos está ainda no início. Os resultados obtidos nessa tese são os primeiros passos que contribuirão para o entendimento global do processo de adesão a ECM. De fato, a ativação de fosfatases durante a adesão a fibronectina e laminina, junto à inativação de ERK 1/2 podem formar uma cadeia de eventos que resultem no sucesso da invasão à célula hospedeira. A desfosforilação de proteínas do citoesqueleto, resposta à adesão a fibronectina e laminina, também ocorre em parasitas aderidos a ECM, nos quais também há a fosforilação de proteínas do choque térmico. Dessa maneira, o citoesqueleto e as proteínas HSPs podem ser os principais elementos responsáveis pela preparação do parasita para adesão e invasão à célula hospedeira, mediada pelo contato com ECM.

6. CONCLUSÃO

- A desfosforilação de proteínas é o principal evento relacionada o resposta de *T. cruzi* a adesão a elementos da matriz extracelular (fibronectina e laminina);
- As proteínas do citoesqueleto tubulina e proteínas do *paraflagellar rod* são desfosforiladas durante a adesão;
- A desfosforilação de ERK 1/2 também está envolvida com a resposta a adesão a fibronectina e laminina e quando fosforilada se localiza no flagelo;
- Fosforilação de proteínas do choque térmico e desfosforilação de proteínas do citoesqueleto são os principais componentes da resposta a adesão a ECM;
- Fosforilação/desfosforilação de proteínas do PAR e modificações pós-traducionais de tubulina podem estar envolvida com a estabilidade do flagelo durante a adesão a ECM;
- Modificações de proteínas envolvidas com o flagelo de *T. cruzi* podem ser o principal evento da resposta a adesão a ECM.

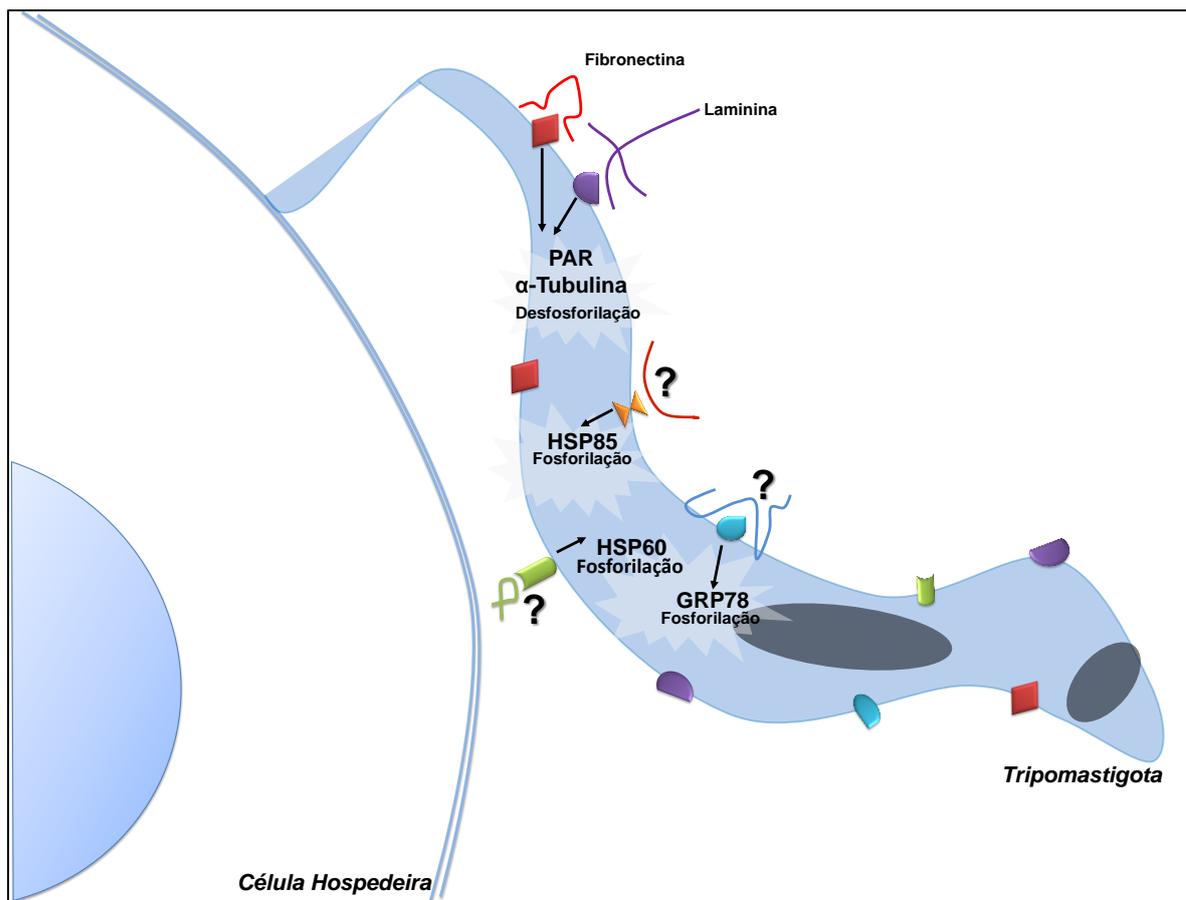


Figura 32. Representação esquemática das principais proteínas identificadas no fosfoproteoma de tripomastigotas de *T. cruzi* aderidos a ECM, fibronectina ou laminina. As diferentes formas vermelhas, roxas, azuis e laranja representam os possíveis receptores para as moléculas de matriz extracelular, localizados na membrana plasmática de tripomastigotas de *T. cruzi*. A adesão de tripomastigotas a elementos da matriz extracelular resulta na fosforilação/desfosforilação das proteínas ilustradas no esquema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeyweera, T.P., Chen, X., Rotenberg, S. (2009). Phosphorylation of α 6-tubulin by protein kinase C α activates motility of human breast cells. *J Biol Chem.* 284: 17648-17656.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. (2004). *Molecular Biology of the cell.* 4th edition. New York: Garland Science.
- Almog, T., Lazar, S., Reiss, N., Etkovitz, N., Eyal, M., Rahamin, N., Dobkin-Bekman, *et al.* (2008) Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality. *J of Biol Chem.* 283 (21): 14479-14489
- Alves, M.J.M. and Mortara, R.A. (2010). A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1: 76-88.
- Alves, M.J.M., Abuin, G., Kuwajima, V.Y., Colli, W. (1986). Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 21: 75-82.
- Andrade, S.G., Rassi, A., Magalhães, J.B., Ferriolli Filho, F., Luquetti, A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with same strains. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 86: 624-626.
- Andrews, N.W. and Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J Protozool* 29: 264–269.
- Araujo-Jorge, T.C., Waghabi, M.C., Soeiro, M.N., Keramidas, M., Bailly, S., Feige, J.J. (2008). Pivotal role for TGF- β in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic cardiomyopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19: 405-413.
- Araya J.E., Orrego P.R., Cordero E.M., Córtez M., Olivares H., Neira I., Saqua H., da Silveria J.F., Yoshida N., González J. (2008). Calcineurin B of the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is involved in cell invasion, *Microbes Infect.* 10(8) 892-900
- Atwood, J.A.I., Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., *et al.* (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309: 473- 4769.
- Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L., Katsanis, N. (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu. Rev.Genomics Hum. Genet.* 7, 125–148.
- Bambino-Medeiros, R., Oliveira, F.O., Calvet, C.M., Vicente, D., Toma, L., Krieger, M.A., Meirelles, M.N.L. and Pereira, M.C.S. (2011). Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. *Parasitology* 138: 593-601.
- Banumathy, G., Singh, V., Pavithra, S.R., Tatu, U. (2003). Heat Shock Protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. *Journal of Biolo Chemistry.* 10.1074/jbc.M211309200.
- Bao, Y., Weiss, L.M., Fen Ma, Y., Kahn, S., Huang, H. (2010). Protein Kinase A catalytic subunit interacts and phosphorylates members of trans-sialidase super-family in *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infections.* 12: 716-726.

- Berbari, N.F., O'Connor, A.K., Haycraft, C.J., Yoder, B. K. (2009). The primary cilium as a complex signaling center. *Curr. Biol.* 19, R526–535
- Boutayeb, A. Developing countries and neglected diseases: challenges and perspectives. *Int J Equity Health.* 26: 6-20
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Brenchley, R., Tariq, H., McElhinney, H., Szoor, B., Huxley-Jones, J., Stevens, R., Matthews, K. R. and Taberner, L. (2007). The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics.* 8: 434.
- Broadhead, R., Dawe, H.R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S.R., *et al.* (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature.* 440: 224-227.
- Bulinski, J.C. (2007) Microtubule modification: acetylation speeds anterograde traffic flow. *Curr Biol.* 17:R18–20.
- Calvet, C.M., Toma, L., De Souza, F.R., Meirelles, M.N. and Pereira, M.C.S. (2003). Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol.* 50: 97-103.
- Calvet, C.M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M.N., Pereira, M.C. (2004). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitol.* 107(1-2):20-30.
- Calvet, C.M., Oliveira, F.O.Jr., Araujo-Jorge, T.C., Pereira, M.C. (2009). Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int J Med Microbiol.* 299: 301-312..
- Caradonna, K.L., Engel, J.C., Jacobi, D., Lee, C.H., Burleigh, B.A. (2012). Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe.* 13(1):108-17.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martínez, E., Valladares, B., Cañavate, C., Requena, J.M., López, M.C., Alvar, J., Moreno, J. (2008). Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 26(15):1902-11.
- Carvalho, C.M.E., Silverio, J.C., Silva, A.A., Pereira, I.R., Coelho, J.M.C., Britto, C.C., Moreira, O.C., Marchevsky, R.S., Xavier, S.S., Gazzinelli, R.T., Almeida, M.G.B., Lannes-Vieira, J. (2012). Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of *Trypanosoma cruzi*-infected Rhesus monkeys association with heart injury. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 6, 5, e1644
- Casas, B., Calabokis, M., Kurz, L., Galán-Caridad, J.M., Bubis, J., *et al.* (2002). *Trypanosoma cruzi*: in vitro phosphorylation of tubulin by a protein kinase CK2-like enzyme. *Exp Parasitol* 101: 129-137.
- Caudron, F., Denarier, E., Thibout-Quintana, J.C., Brocard, J., Andrieux, A., *et al.* (2010). Mutation of Ser172 in yeast β tubulin induces defects in microtubule dynamics and cell division. *Plos One.* 5 (10): e13553.
- Cazzulo, J.J. (2002). Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem* 2: 1261-1271.

- Christensen, S.T., Guerra, C.F., Awan, A., Wheatley, D.N., and Satir, P. (2003). Insulin receptor-like proteins in *Tetrahymena thermophila* ciliary membranes. *Curr Biol.* 13, R50–R52.
- Chung, A.A.R, Tonelli, R.R., Castilho, B.A., Schenkman, S. (2013). Eukaryotic initiation factor 5A dephosphorylation is required for translational arrest in stationary phase cells. *Biochem J.* 451, 257–267.
- Claser, C., Curcio, M., de Mello, S. M., Silveira, E. V., Monteiro, H. P. and Rodrigues, M. M. (2008). Silencing cytokeratin 18 gene inhibits intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes. *BMC Cell Biol.* 9: 68.
- Clayton, J. (2010). Chagas disease 101 *Nature.* 465, S4—S5.
- Colli, W. (1993). Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 7: 1257-1264.
- Colognato H. and Yurchenco P.D. (2008). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 218(2):213-34.
- Cortez, C., Yoshida, N., Bahia, D. and Sobreira, T. J. (2012). Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin. *PLoS One* 7: e42153.
- Coura, J.R. and Viñas, P.A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 465: S6-7.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C.V., Fernandes, O., Valente, S.A.S., Miles, M.A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Parasitology.* 18 (4):171-176.
- Cross, G.A.M. and Takle, G.B. (1993). The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 47: 385-411.
- Daily, J.P., Scandfeld, D., Pochet, N., Roch, K.L., Plouffe, D., Kamal, M., Sarr, O., Mboup, S., Ndir, O., Wypij, D., *et al.* (2007). Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature.* 450. 1091–1095.
- Da Silva, R.A., Bartholomeu, D.C., Teixeira, S.M.R. (2006) Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 36, 87-96
- De Lima, A.R., Medina, R., Uzcanga, G.L., Noris Suarez, K., Contreras, V.T., *et al.* (2006). Tight binding between a pool of the heterodimeric α/β tubulin and a protein kinase CK2 in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology.* 132: 511-523.
- De Souza, W., de Carvalho, T., Barrias, E. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *Int J Cell Biol.*
- Dea-Ayuela, M.A., Rama-Iñiguez, S., Bolás-Fernández, F. (2006) Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics.* 6(14):4187-94.
- Delpino, A. and Castelli, M. (2002). The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep.* 22:407–420.
- Detmer, E., Hemphill, A., Mueller, N., Seebeck, T. (1997). The *Trypanosoma brucei* autoantigen I/6 is an internally repetitive cytoskeleton protein. *Eur J Cell Biol.* V72:378-384.

- Dias, F.A., Santos, A.L., Lery, L.M., Alves e Silva, T.L., Oliveira, M.M., Bisch, P.M., Saraiva, E.M., Souto-Adorno, T.C., Lopes, A.H. (2012). Evidence that a laminin-like insect protein mediates early events in the interaction of a phytoparasite with its vector's salivary gland. *PLoS One*. 7: e48170.
- Dobbin, C.A., Smith, N.C., and Johnson, A.M. (2002). Heat Shock Protein 70 Is a Potential Virulence Factor in Murine *Toxoplasma* Infection via immunomodulation of host NF κ -B and Nitric Oxide. *J Immunol*. 169, 958–965.
- Docampo, R. and Moreno, S.N. (1996). The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol Today*. 12: 61-65.
- Drummelsmith, J., Brochu, V., Girard, I., Messier, N., Oullette, M. (2003). Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cellular Proteomics* 2: 146-155.
- Echeverria, P.C., Matrajt, M., Harb, O.S., Zappia, M.P., Costas, M.A., Roos, D.S., Dubremetz, J.F., Angel, S.O. (2005). *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated. *J. Mol. Biol.* 350, 723–734.
- Egui, A, Thomas MC, Morell, M., Marañón, C., Carrilero, B., *et al.* (2012). *Trypanosoma cruzi* paraflagellar rod proteins 2 and 3 contain immunodominant CD8(+) T-cell epitopes that are recognized by cytotoxic T cells from Chagas disease patients. *Mol Immunol*. (3-4):289-98.
- Elam, C.A., Sale, W. S.; Wirschell, M. (2009). The regulation of dynein-driven microtubule sliding in *Chlamydomonas* flagella by axonemal kinases and phosphatases. *Methods Cell Biol*. 92, 133–51.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., *et al.* (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733):409-4.
- Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., *et al.* (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci*. 102:7853–7858.
- Faruki S, Geahlen RL, Asai DJ (2000) Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci*. 113: 2557-2565.
- Favoreto, S., Dorta, M.L.Jr., Yoshida N. (1998). *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Exp Parasitol*. 89: 188-194.
- Fernandes, M.C. and Andrews, N.W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev*. 36(3): 734-47
- Ferrão, P.M., de Oliveira, F.L., Degraeve, W.M., Araujo-Jorge, T.C., Mendonça-Lima, L., Waghbi, M.C.A. (2012). Phosphoproteomic approach towards the understanding of the role of TGF- β in *Trypanosoma cruzi* biology. *PLoS One*. 7(6):e38736.
- Fourest-Lieuvain A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, *et al.* (2006) Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* 17: 1041-1050.
- Fouts DL, Stryker GA, Gorki KS, Miller MJ, Nguyen TV, *et al.* (1998) Evidence for four distinct major protein components in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 273: 21846-21855.

- Frasch, A.C.C. (1994). Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology*. 108 Suppl: S37-44.
- Freitas, L. M., dos Santos, S. L., s-Luiz, G. F., Mendes, T. A., Rodrigues, T. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, S. M. R., Fujiwara, R. T. and Bartholomeu, D. C. (2011). Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PLoS One* 6: e25914.
- Galfrè, G. and Milstein C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedure. *Methods Enzymology*. 73 (B): 3-46.
- Gallo, G., Ramos, T.C.P., Tavares, F., Rocha, A.A., Machi, E., *et al.* (2011) Biochemical characterization of a protein tyrosine phosphatase from *Trypanosoma cruzi* involved in metacyclogenesis and cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 408: 427-431.
- Genovesio, A., Giardini, M. A., Kwon, Y. J. (2011). Visual genome-wide RNAi screening to identify human host factors required for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One*. 6(5): e19733
- Giambiagi-deMarval, M., Souto-Padrón, T., Rondinelli, E. (1996). Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 83(3):335-45.
- Ginger, M.L., Collingridge, P.W., Brown, R.W.B., Sproat, R., Shaw, M.K., Gull, K. (2013) Calmodulin is required for paraflagellar rod assembly and flagellum-cell body attachment in trypanosomes. *PLoS One*. 8(12): e81111.
- Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, Alves MJM (1999) Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem*. 274: 3461 – 3468.
- Giordano, R. J., Chamas, R., Veiga, S. S., Colli, W. and Alves, M. J. M. (1994). An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol*. 65: 85-94.
- Givant-Horwitz V, Davdson B, Reich R (2004) Laminin-induced signaling in tumor cells: the role of the Mr 67,000 laminin receptor. *Cancer Res*. 64: 3572-3579.
- González J, Cornejo A, Santos MRM, Cordero SM, Gutiérrez B, *et al.* (2003) A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 374: 647-656.
- Graefe, S.E., Wiesgigl, M., Gaworski, I., Macdonald, A., and Clos, J. (2002). Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryot Cell*. 1: 936–943.
- Graefe, S.E.B., Wiesgigl, M., Gaworski, I., Macdonald, A., Clos, J. (2002). Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces stress response but no stage differentiation. *Euk Cell* 6 (1): 936-943.
- Grellier, P., Vendeville, S., Joyeau, R., Bastos, I. M., Drocbeq, H., Frappier, F., Teixeira, A. R. L., Schrevel, J., Davioud-Charvet, E., Sergheraert, C. and Santana, J. M. (2001). *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J of Biol Chem*. 276: 47078-47086.
- Gull, K. (2003). Host–parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies *Curr Opin Microbiology*. 6:365–370.

- Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. (1999). *Annu Rev Microbiol.* 53:629-55.
- Gupta V. and Bamezai R.N.K. (2010). Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Science.* V19:2031-2044.
- Hammond, J., Cai, D., Verhey, K.J. (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol.* 20(1): 71–76.
- Hanson, P.I. and Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:519–529
- Hem S, Gherardini PF, Osorio y Fortéa J, Hourdel V, Morales MA, *et al.* (2010) Identification of Leishmanias-specific protein phosphorylation by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics* 10(21): 3868-3883.
- Hemphill, A. and Ross, C. A. (1995). Flagellum-mediated adhesion of *Trypanosoma congolense* to bovine aorta endothelial cells. *Parasitol Res.* 81:412-420.
- Hendershot, L., Wei, J., Gaut, J., Melnick, J., Aviel, S., *et al.* (1996) Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc Natl Acad Sci.* 93:5269–5274.
- Henderson, H., Macleod, G., Hrabchak, C., Varmuza, S. (2011) New candidate targets of protein phosphatase-1c, gamma-2 in mouse testis revealed by differential phosphoproteome analysis. *Int J Androl* 34: 339-351.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson, C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W. (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science.* 269: 400-403.
- Hill, KL. (2003) Biology and mechanism of trypanosome cell motility. *Eukaryot Cell* 2:200–208.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., *et al.* (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 417:455–458.
- Hubel, A., Krobitch, S., Horauf, A., and Clos, J. (1997). *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol.* 17, 5987–5995.
- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A.V., *et al.* (2007) Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain. *Science.* 308:1758–1762.
- Jensen, R.E. and Johnson, A.E. (1999). Protein translocation: Is Hsp70 pulling my chain? *Current Biology.* 9:R779–R782
- Johnson, C. A., Kleshchenko, Y. Y., Ikejiani, A. O., Udoko, A. N., Cardenas, T. C., *et al.* (2012). Thrombospondin-1 interacts with *Trypanosoma cruzi* surface calreticulin to enhance cellular infection. *PLoS One* 7: e40614.
- Jones, A., Faldas, A., Foucher, A., Hunt, E., Tait, A., *et al.* (2006) Visualisation and analysis of proteomic data from the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 6: 259-267.
- Kadler, K. (1995). Extracellular matrix 1: Fibril-forming collagens. *Protein Profile* 2: 491-619.
- Kaul, G., Pattan, G., Rafeequi, T. (2011). Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem and Funct.* v29:227-234.

- Kielty, C. M., Sherratt, M. J. and Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. *J Cell Sci.* 115: 2817-2828.
- Kim, S. H., Turnbull, J. and Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209: 139-151.
- King, S.M. (2000); The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta* 1496: 60-75.
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., *et al.* (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 25: 312-318.
- Kleshchenko, Y.Y., Moody, T.N., Furtak, V.A., Ochieng, J., Lima, M.F., Villalta, F. (2004). Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infect. Immun.* 72(11): 6717-21.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Krobitsch, S., and Clos, J. (1999). A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite *Leishmania donovani*. *Cell Stress Chaperones* 4, 191–198.
- Kubo, T., Yagi T., Kamiya R. (2012) Tubulin polyglutamylation regulates flagellar motility by controlling a specific inner-arm dynein that interacts with the dynein regulatory complex. *Cytoskeleton* 69:1059-1068.
- Kubo, T., Yanasisawa, H., Yagi, T., Hirono, M., Kamiya, R. (2010) Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins. *Curr Biol.* 20:441-372.
- Lachance, C., Fortier, M., Himon, V., Sullivan, R., Bailey, J.L., Leclerc, P. (2010) Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. *Intern J of Androl.* 33, 1: 33-34.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lafanechere, L., Courtay-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rudiger, M., Wehland, J., Job, D., Margolis, R.L. (1998) Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J Cell Sci.* 111(Pt 2):171–181.
- Ley, S.C., Verbi, W., Pappin, D.J., Druker, B., Davies, A.A., *et al.* (1994) Tyrosine phosphorylation of α tubulin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24: 99-106.
- Li, H., Song, H., Luo, J., Liang J., Zhao, S., Su, R. (2012). Knockdown of glucose-regulated protein 78 decreases the invasion, metalloproteinase expression. And ECM degradation in hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 31(1): 39.
- Lopes, A.H.C.S., Souto-Padron, T., Dias, F.A. (2010). Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *Open Parasit Journal*, 4, 30-59 s
- MacRae, T.H. (1997) Tubulin post-translation modifications --enzymes and their mechanism of action. *Eur J Biochem* 244(2): 265-278.
- Maeda, F.Y., Cortez, C., Yoshida, N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunol.* 3: 361.

- Magdesian, M.H., Giordano, R., Ulrich, H., Juliano, M.A., Juliano, L., Schumacher, R.I., Colli, W., Alves, M.J. (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J Biol Chem.* 1;276(22):19382-19389.
- Magdesian, M.H., Tonelli, R.R., Fessel, M.R., Silveira, M.S., Schumacher, R.I., *et al.* (2007). A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Cell Res.* 313: 210-218.
- Maldonado, R.A., Mirzoeva, S., Godsel, L.M., Lukas, T.J., *et al.* Identification of calcium binding sites in the trypanosome flagellar calcium-acyl switch protein. *Mol Biochem Parasitol* 1999;101:61–70.
- Marchini, F.K., de Godoy, L.M.F., Rampazzo, R.C.P., Pavoni, D.P., Probst, C.M., *et al.* (2011). Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *PLoS One* 6: e25381.
- Marroquin-Quelopana, M., Oyama Jr, S., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Juliano, M. A., Juliano, L., Colli, W. and Alves, M. J. M. (2004). Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein and mapping the laminin-binding site. *Biochem Biophys Res Commun.* 325: 612-618.
- Martins, D., Brown-Luwdi, M., Chiquet-Ehrismann, R. (2003). Tenascin-C signaling through induction of 14-3-3 tau. *J. Cell Biol.* v160-n2: 171-175
- Matlack, K.E., Mothes, W., Rapoport, T.A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell.* 92:381-390.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., *et al.* (2002). *In vivo* destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J.* 21:6820–6831.
- Mattos, E.C., Tonelli, R.R., Colli, W., Alves, M.J.M. (2013). The Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma.* Springer, ISBN 978-94-007-7304-2.
- Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W., Holden, D.W. (1997). Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol.* 26(2):399-407.
- Meng, X.N., Jin, Y., Bai, J., Liu, G.Y., Zhu, J., *et al.* (2009) Characterisation of fibronectin-mediated FAK signaling pathway in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 101(2): 327-334.
- Minamino, T., Komuro, I., Kitakaze, M. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 107:1071–1082.
- Ming, M., Ewen, M.E., Pereira, M.E.A. (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. *Cell.* 82, 287-296.
- Mitsopoulos, C., Zihni, C., Garg, R., Ridley, A.J., Morris, J.D. (2003). The prostate-derived sterile 20-like kinase (PSK) regulates microtubule organization and stability. *J Biol Chem* 278: 18085-18091.
- Moody, T.N., Ochieng, J., Villalta, F. (2000). Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Lett.* 470: 305-308.

- Morell, M., Thomas, M.C., Caballero, T., Alonso, C., López, M.C. (2006). The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*.24(49-50):7046-55.
- Moreno, S.N.J., Silva, J., Vercesi, A.E., Docampo, R. (1994) Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* 180: 1535-1540.
- Nagajyothi, F., Machado, F.S., Burleigh, B.A., *et al.* (2012) Mechanism of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol.* 14(5): 634-43.
- Nair, S., Milohanic, E., Berche, P. (2000). ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68,7061–7068.
- Nakayasu, E. S., Gaynor, M. R., Sobreira, T. J., Ross, J. A. and Almeida, I. C. (2009). Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. *Proteomics* 9: 3489-3506.
- Nde, P.N., Simmons, K.J., Kleshchenko, Y.Y., Pratap, S., Lima, M.F. and Villalta, F. (2006). Silencing of the laminin γ -1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 74: 1643-1648.
- Nde, P.N., Lima, M.F., Johnson, C.A., Pratap, S., Villalta, F. (2012) Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. *Front. Immunol.* 3: 337.
- Neckers, L. and Tatu, U. (2008). Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe.* 11, 4(6): 519-27.
- Nett, I.R., Davidson, L., Lamont, D., Ferguson, M.A. (2009). *Trypanosoma brucei*: Identification and specific localization of tyrosine phosphorylated proteins. *Eukaryot Cell.* (a)
- Nett, I.R., Martin, D.M.A., Miranda-Saavedra, D., Lamont, D., Barber, J.D., *et al.* (2009) The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol Cell Proteomics* 8: 1527-1538. (b)
- Neuvald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPase associated with the assembly, operation, and disassembly of protein. *Genome Res* 9:27–43.
- Ni, M., Zhang, Y., Lee, A.S.(2011). Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J.* 434:181–188.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., Verdin, E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. (2003) *Mol Cell.* 11:437–444.
- O'Hagan, R., Piasecki, B.P., Silva, M., Phirke P., Nguyen, K.C.Q., Hall, D.H., Swoboda, P., Barr, M.M. (2011). The tubulin deglutamylase CCP-1 regulates the function and stability of sensory cilia in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2: 1685-1694.
- Oberholzer. M., Bregy, P., Marti, G., *et al.* (2007) Trypanosomes and mammalian sperm: one of a kind? *Trends Parasitol*; 23: 71-7.
- Oberholzer, M., Langousis, G., Nguyen, H.T., Saada E.A., Shimogawa, M.M., Jonsson, Z.O., Nguyen, S.M., Wohlschlegel, J.A., Hill, K.L. (2011). Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Proteomics.* M111.010438-1-14.

- Oberholzer, M., Marti, G., Baresic, M., Kunz, S., Hemphill, A., Seebeck, T. (2007). The *Trypanosoma brucei* cAMP phosphodiesterases TbrPDEB1 and TbrPDEB2: flagellar enzymes that are essential for parasite virulence. *FASEB J.* 21: 720-31.
- Ogura, A., and Takahashi, K. (1976) Artificial deciliation causes loss of calcium-dependent responses in *Paramecium*. *Nature* 264, 170–172
- Oliveira, F.O., Alves, C.R., Calvet, C.M., Toma, L., Boucas, R.I., *et al.* (2008). *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *Microb. Pathog.* 44: 329-338.
- Oliveira-Jr, F., Alves, C., Silva, F., Cortes, L., Toma, L., Boucas, R., Aguilar, T., Nader, H. and Pereira, M. (2012). *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins present a flagellar membrane localization and serine proteinase activity. *Parasitology*: 1-10.
- Olson, C. L., Nadeau, K. C, Sullivan, M. A., Winkquist, A.G., Donelson, J.E., *et al.* (1994). Molecular and biochemical comparison of the 70 kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 269:3868-3874.
- Ouaissi, M.A., Afchain, D., Capron, A., Grimaud, J.A. (1984) Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 308 (5957): 380-382.
- Ouaissi, M.A., Cornett, J., Capron, A., (1986). Identification of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol Biochem Parasitology*. (b)
- Ouaissi, A., Cornett, J., Afchain, D., Capron, A., Gras-Masse, H. and Tartar, A. (1986). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from fibronectin cell attachment domain. *Science* 234: 603-607. (a)
- Paba, J., Ricart, C.A.O., Fontes, W., Santana, J.M., Teixeira, A.R.L., *et al.* (2004) Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity Tag reagents. *J Proteomic Res* 3: 517-524.
- Paindavoine, P., Rolin, S., Van Assel, S., *et al.* (1992). A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* 12: 1218-25.
- Pan, J., and Snell, W.J. (2000). Signal transduction during fertilization in the unicellular green alga, *Chlamydomonas*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 596–602
- Pan, J., Wang, Q., and Snell, W. J. (2005) Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Lab. Invest.* 85, 452–463
- Park, M.H., Nishimura C., Zanelli, C.F. (2010). Functional significance of eIF5A and hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids.* V38:491-500.
- Parodi-Talice, A., Monteiro-Goes, V., Arrambide, N., Avila, A.R., Duran, R., *et al.* (2007) Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom* 42: 1422-1432.
- Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N. and Mottram, J. C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6: 127.

- Pathak, N., Obara, T., Mangos, S., Liu, Y., Drummond I.A. (2007) The zebrafish fleer gene encodes an essential regulator of cilia tubulin polyglutamylation. *Mol Biol Cell*. 18(11):4353-4364.
- Pazour, G.J., Agrin, N., Leszyk, J., Witman, G.B. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol*. 2005, 170, 103–13.
- Pearl, L.H. and Prodromou, C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75: 271–294.
- Pereira, M.E., Mejia, J.S., Ortega-Barria, E., Matzilevich, D., Prioli, R.P. (1991). The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. *J Exp Med*. 174: 179-191.
- Petherick, A. (2010). Country by country. *Nature*. 465:S10-S11.
- Piperno, G., Huang, B., Ramanis, Z., Luck, D.J.L. (1981). Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: Polypeptide composition and phosphorylation of stalk components. *J. Cell Biol*. v88:73-79.
- Porter, M. E. and Sale, W. S. (2000). The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J. Cell Biol*. 151, F37–42
- Portman, N. and Gull, K. (2010). The paraflagellar rod of kinetoplastid Parasites: from structure to components and function. *Int J Parasitol* 40: 135-148.
- Portman, N., Lacomble, S., Thomas, B., McKean, P.G., Gull, K. (2008). Combining RNA interference mutants and comparative proteomics to identify protein components and dependencies in a eukaryotic flagellum. *J Biol Chem* 284: 5610-9.
- Radwanska, M., Magez S., Dumont, N., Pays, A., Nolan, D., Pays, E. (2000). Antibodies raised against the flagellar pocket fraction of *Trypanosoma brucei* preferentially recognize HSP60 in cDNA expression library. *Paras Immunol*. 22: 639-650.
- Ralston, K.S., Kabututu, Z.P., Melehani, J.H., Oberholzer, M., Hill, K.L. (2009). The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annu Rev Microbiol*. 63: 335-62.
- Ramírez, G., Valck, C., Aguilar, L., Kemmerling, U., López-Muñoz, R., Cabrera, G., Morello, A., Ferreira, J., Maya, J.D., Galanti, N., Ferreira, A. (2012). Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. *Mol Immunol*. 52(3-4):133-40.
- Rassi, A.; Rassi Jr., A.; & Rassi, G.G. (2000). Fase Aguda. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Ed. Brener, Z., Andrade, Z.A.; Barral-Neto; Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.
- Reddy, M., Gill, S.S., Kalkar, S.R., Wu, W., Anderson, P.J., Rochon, P.A. (2007). Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases. *J of Amer Med Association*. 298 (16): 1911-1924.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., Verhey, K.J. (2006) Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol*. 16:2166–2172.

- Reiling, L., Jacobs, T., Kroemer, M., Gaworski, I., Graefe, S., and Clos, J. (2006). Spontaneous recovery of pathogenicity by *Leishmania major* hsp100^{-/-} alters the immune response in mice. *Infect. Immun.* 74, 6027–6036.
- Requena, J.M., Soto, M., Guzman, F., Maekelt, A., Noya, O., Patarroyo, M.E., Alonso, C. (1993). Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Mol Immunol.* 30(12):1115-21.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571–573.
- Robinson, DR and Gull K. (1991) Basal body movement as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Letters to Nature.* 352: 731-733.
- Rocha, G.M., Teixeira, D.E., Miranda, K., Weissmuller, G., Bisch, P.M., *et al.* (2010) Structural changes of the paraflagellar rod during flagellar beating in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 5: e11407.
- Rodriguez, A., Martinez, I., Chung, A., Berlot, C.H., Andrews, N.W. (1999). cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem.* 274: 16754-16759.
- Rotureau, B., Morales, M.A., Bastin, P., Späth, G. (2009). The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signaling and development? *Cell Microb.* 11(5):710-718.
- Rouquette, C., Chastellier, C., Nair, S., and Berche, P. (1998). The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol. Microbiol.* 27, 1235–1245.
- Rubin, S.S. and Schenkman, S. (2012). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. *Cell. Microbiol.* 14: 1522-1530.
- Ruoslahti, E. (1988). Fibronectin and its receptors. *Annual Review of Biochemistry* 57 375–413.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 697-715.
- Ryhänen, T., Viiri, J., Hyttinen, J.M.T., Uusitalo, H., Salminen, A., Kaarniranta, K. (2011). Influence of Hsp90 and HDAC inhibition and tubulin acetylation on perinuclear protein aggregation in human retinal pigment epithelial cells. (2011). *J of Biomedicine and Biotechnology.* ID 798052, 8 pages
- Saborio, J.L., Hernandez, M.M., Narayanswami, S., Wrightsman, R., Palmer, E., *et al.* (1989) Isolation and characterization of paraflagellar proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 264: 4071-4075.
- Schenkman, S. and Eichinger, D. (1994). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitology Today* 9: 218-221.
- Scholey, J.M. (2003) Intraflagellar transport. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:423–443.
- Schwede, A., Kramer, S. and Carrington, M. (2012). How do trypanosomes change gene expression in response to the environment? *Protoclasma* 249: 223-238.

- Shen, S., Wang, J., Liang, J., He, D. (2013). Comparative proteomics study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World J of Urology*. 10.1007/s00345-013-1023-5.
- Sims, J.D., McCready, J., Jay, D.G. (2011). Extracellular Heat Shock Protein (Hsp)70 and Hsp90a Assist in Matrix Metalloproteinase-2 Activation and Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *PLoS One*. 6. 4. e18848
- Smejkal, R.M., Wolff, R., and Olenick, J.G. (1988). *Leishmania braziliensis panamensis*: increased infectivity resulting from heat shock. *Exp. Parasitol*. 65, 1–9.
- Sontag E, Nunbhakdi-craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, *et al.* (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, Tau, and microtubules. *J Biol Chem* 274: 25490-25498.
- Souto-Padron, T., Cunha-e-Silva, N.L., de Souza, W. (1993). Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88(4): 517-528.
- Sun, F.C., Wei, S., Li, C.W., Chang, Y.S., Chao, C.C., *et al.* (2006). Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J*. 396:31–39.
- Suryavanshi, S., Eddé, B., Fox, L.A., Guerrero S., Hard R., *et al.* (2010) Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. *Curr Biol*. 20: 435-440.
- Sydor, J.R., Normant, E., Pien, C.S., Porter, J.R., Ge, J., *et al.* (2006) Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI- 504), an anti-cancer agent directed against Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17408–17413
- Szoor, B., Wilson, J., McElhinney, H., Taberner, L., Matthews, K.R. (2006). Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes. *J Cell Biol*. 175(2):293-303.
- Takashi, S., Yoshinobu, F., Eri, O., Asami, O., Yoriko, A. (2005). .The decrease of the cytoskeleton tubulin follows the decrease of the associating molecular chaperone α B-crystallin in unloaded soleus muscle atrophy without stretch. *FASEB Journal*. 10.1096/fj.04-3060fje.
- Takaya, A., Tomoyasu, T., Matsui, H., and Yamamoto, T. (2004). The DnaK/ DnaJ chaperone machinery of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium is essential for invasion of epithelial cells and survival within macrophages, leading to systemic infection. *Infect. Immun*. 72, 1364–1373.
- Tibbetts, R.S., Kim IY, Olson CL, Barthel LM, Sullivan MA, Winkquist AG, Miller SD, Engman, DM. (1994). Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 62(6):2499-507.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*. 85, 389–398.
- Todeschini, A. R., Dias, W. B., Girard, M. F., *et al.* (2004). *J Biol Chem*. 279(7): 5323-8.
- Tonelli, R.R., Augusto, L.S., Castilho, B.A., Schenkman, S. (2011). Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2 α is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS One* 6: 27904.

- Tonelli, R. R., Giordano, R. J., Barbu, E. M., Torrecilhas, A. C., Kobayashi, G. S., *et al.* (2010). Role of the gp85/trans-sialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature *in vivo*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4: e864.
- Tonelli, R.R., Silber, A.M., Almeida-de-Faria, M., Hirata, I.Y., Colli, W., Alves, M.J. (2004). L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* 6: 733-741.
- Torrecilhas, A.C.T., Schumacher, R.I., Alves, M.J.M., Colli, W. (2012). Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes Infect* 14: 1465-1474.
- Urbaniak, M.D., Mathieson, T., Bantscheff, M., Eberhard, D., Grimaldi, R. *et al.* Chemical proteomic analysis reveals the drugability of the kinome of *Trypanosoma brucei* (2012). *ACS Chem. Biol.* 7(11): 1858-65.
- Urbaniak, M.D., Martin, D.M.A., Ferguson, M.A.J. (2013) Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of *Trypanosoma brucei*. *J. Proteome Res.* 12, 2233–2244.
- Velge, P., Ouaiissi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A. (1988) Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology.* 97(Pt2): 255-268.
- Verhey, K.J. and Gaertig, J. (2007). The Tubulin Code. *Cell Cycle.* 6:2152–2160.
- Villalta, F., Scharfstein, J., Ashton, A.W., Tyler, K.M., Guan, F., *et al.* (2009). Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol. Res.* 104: 1251-1260.
- Villalta, F., Zhang, Y., Bibb, E.K., Burns, J.M.Jr., Lima, M.F. (1998). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 247–252.
- Villalta, F., Zhang, Y., Bibb, K.E., Pratap, S., Burns, J.M.Jr., Lima, M.F. (1999). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2, 64–70.
- Weeks, B.S., diSalvo, J., Kleinman, H.K. (1990). Laminin-mediated process formation in neuronal cells involves protein dephosphorylation. *J Neurosci Res* 27: 418-426.
- Weinkauf, C., Salvador, R., Pereira Perrin, M. (2011). Neurotrophin receptor TrkC is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* in neural glial and epithelial cells. *Infect. Immun.* 79: 4081-4087.
- Weis, F., Moullintraffort, L., Heichette, C., Chretien, D., Garnier, C. (2010). The 90-kDa Heat Shock Protein Hsp90 protects tubulin against thermal denaturation. *J Biol Chem.* DOI 10.1074/jbc.M109.096586
- Westermann, S. and Weber, K. (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:938–947.
- Wiesgigl, M., and Clos, J. (2001) Heat Shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol. Biol. Cell.* 12:3307-3316

- Williams, N.E. and Nelsen, E.M. (1997). HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of Tetrahymena. *J Cell Sci* 110:1665-1672
- Wloga, D. and Gaertig, J. (2010). Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci* 123: 3447-3455.
- Wolf, M. and Sahyoun, N. (1986). Protein kinase C and phosphatidylserine bind to Mr 110,000/115,000 polypeptides enriched in cytoskeletal and postsynaptic density preparations. *J Biol Chem* 261(28): 13327-13332.
- Woolsey, A.M., Sunwoo, L., Petersen, C.A., Brachmann, S.M., Cantley, L.C., Burleigh, B.A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci.* 116: 3611-3622. 2003
- World Health Organization (WHO). Chagas Disease (2013) Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> .
- Yang, P., Diener, D.R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G.J., *et al.* (2006) Radial spoke proteins of Chlamydomonas flagella. *J Cell Science* 119: 1165-1174.
- Yoshida, N.; Favoreto Jr.S.; Ferreira, A.T. & Manque, P.M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz. J. Med. Biol. Research.* 33:269-78. 2000
- Zhang, L., Pelech, S.L., Mayrand, D., Grenier, D., Heinom, J., and Uitto, V.J. (2001). Bacterial heat shock protein-60 increases epithelial cell proliferation through the ERK1/2 MAP kinases. *Exp. Cell Res.* 266, 11–20
- Zhong, L., Hong-Gang L, Moreno SNJ, Docampo R (1998) Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. *FEMS Microbiol Letters* 161: 15-20.
- Zolkiewski, M., Zhang, T., Nagy, M. (2012). Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones. *Arch Biochem Biophys.* 520(1):1-6.

8. ANEXO

ANEXO I – SÚMULA CURRICULAR

Nome: Eliciane Cevolani Mattos

e-mail: eliciane@usp.br

1. Formação:

- 1.1. Graduação em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG (ano de início: 2004; conclusão: 2008);
- 1.2. Doutorado direto em Ciências Biológicas (Bioquímica) no Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP) – SP (ano de início: 2008; previsão de conclusão: 2013).

2. Histórico Profissional:

1. Bolsista de Doutorado Direto do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Projeto de pesquisa título: Interação Parasita-Célula hospedeira: Moléculas do *Trypanosoma cruzi* envolvidas na resposta a interação com elementos da matriz extracelular e do citoesqueleto. Orientador: Maria Júlia Manso Alves. Vigência: 08/2008-07/2013;
2. Bolsista PAE – Monitoria – Instituto de Química – USP, 2009;
3. Bolsista monitora em Laboratório de Bioquímica, UFV, 2006;
4. Bolsista monitora em Bioquímica Fundamental, UFV, 2006;
5. Bolsista de Iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, UFV. Título do projeto: Mecanismos moleculares associados a estresses bióticos e abióticos: vias de sinalização conectadas ao retículo citoplasmático e interação geminivirus: hospedeiro. Vigência: 2006-2008.

3. Resultados mais relevantes:

3.1. Artigos completos publicados em periódicos:

- 1- Gadelha, F.R., Gonçalves, C.C., **Mattos, E.C.**, Alves, M.J.M., Piñeyro, M.D., Robello, C., Peloso, E.F. Release of the cytosolic tryparedoxin peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes. *Experimental Parasitology*. v.133, p.287 - 293, 2013. Citações: 0.
- 2- **Mattos, E.C.**, Schumacher R.I., Colli W., Alves, M.J.M. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Fibronectin or Laminin Modifies

Tubulin and Paraflagellar Rod Protein Phosphorylation. Plos One. v.7, p.e46767, 2012. Citações: 1.

- 3- Carvalho, C.M., Santos, A.A., Pires, S.R., Rocha, C.S., Saraiva, D.I., Machado, J.P.B., **Mattos, E.C.**, Fietto, L.G., Fontes, E.P.B. Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. PLoS Pathogens. v.4, p.e1000247, 2008. Citações: 27.
- 4- Almeida, H. O., **Mattos, E.C.**, Barbosa, M.O., Teixeira, F.R., Magalhães, R.D.M., Romeiro, R.S., Fontes, E.P.B., Baracat-Pereira, M.C. Peptide Fraction Inhibiting Plant Pathogen Growth Predominated in Cell Wall Extracts from Young Plants or in Soluble Cell Fraction from Expanded leaves from Eggplants. Journal of Phytopathology. v.155, p.735 - 737, 2007. Citações: 4.

3.2. Capítulo de livro aceito para publicação:

- 1- Mattos, E.C., Tonelli, R.R., Colli, W., Alves, M.J.M. The Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma. Springer, ISBN 978-94-007-7304-2.

3.3. Resumos publicados em anais de eventos (5 de 11):

1. **Mattos, E.C.**, Schumacher, R.I., Colli, W., Alves, M.J.M. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin and laminin leads predominantly to dephosphorylation of tubulin and paraflagellar rod proteins. Gordon Research Conferences - Host-parasite interaction, Biology of, 2012, Newport – RI. USA.
2. **Mattos, E.C.**, Picioni, H. B., Colli, W., Alves, M.J.M. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* to the host cell leads to the phosphorylation of parasite proteins. XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2011, Foz do Iguaçu. Brasil.
3. Peloso, E.F., Gonçalves, C.C., **Mattos, E. C.**, Alves, M.J.M., Colli, W., Piñeyro, M.D., Robello, C., Gadelha, F.R. Evaluation of parasite mobility and morphology and expression of antioxidant enzymes in H₂O₂ - treated *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. VII Meeting of the SFRBM South American Group Free Radicals, 2011, Aguas de São Pedro. Brasil.
4. **Mattos, E.C.**, Colli, W., Alves, M.J.M. Identification of proteins modified by phosphorylation in *Trypanosoma cruzi* during the invasion of host cells. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia. XXXVII Reunião Anual sobre Pesquisa básica em Doença de Chagas, Foz do Iguaçu. Brasil.
5. Khusal, K.G., **Mattos, E.C.**, Tonelli, R., Colli, W., Alves, M.J.M. Invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi*: A new putative receptor. XVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia. XXXVII Reunião Anual sobre Pesquisa básica em Doença de Chagas, 2010, Foz do Iguaçu. Brasil.

1. Indicadores quantitativos:

| | Quantidades totais |
|--|---------------------------|
| Artigos publicados em periódicos | 4 |
| Capítulo de livro aceito para publicação | 1 |
| Resumos em congressos | 11 |
| Quantidade de citações (Google Scholar) | 32 |

2. Link para o Google Scholar (My Citation):

<http://scholar.google.com.br/citations?user=efoRxiAAAAAJ&hl=en>

ANEXO II – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO