

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

SAMANTHA LUCCIOLA GUEDES PAÇO

**Modificações pós-traducionais durante o processo
de amastigogênese do *Trypanosoma cruzi***

Versão original da Dissertação Defendida

São Paulo

11/09/2019

SAMANTHA LUCCIOLA GUEDES PAÇO

**Modificações pós-traducionais durante o processo
de amastigogênese do *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica)

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Maria Júlia Manso Alves

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P121 Paço, Samantha Lucciola Guedes
m Modificações pós-traducionais durante o processo
de amastigogênese do Trypanosoma cruzi / Samantha
Lucciola Guedes Paço. - São Paulo, 2019.
79 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Alves, Maria Júlia Manso

1. Trypanosoma cruzi. 2. Amastigogênese. 3.
modificações pós-traducionais. I. T. II. Alves, Maria
Júlia Manso, orientador.

**Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Christiane e Jorge, por todo o apoio e
paciência.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Christiane e Jorge e a minha avó Yolanda pelo apoio financeiro e emocional.

Aos meus parentes, em especial, meus primos Jônathas e Jéssica.

Aos meus amigos Adriana Lemos, Larissa Lugão, Julya, Fátima, Luine, Aylana, Jenny, Thierry, Alex, Lary, Maria Fernanda, Giovanna, Cheila e Lialyz.

À Dra. Maria Julia, pela sua orientação e por me ensinar a fazer ciência.

As minhas colegas de laboratório Carol Manchola, Paloma Sousa, Célia Ludio e Izaura pela parceria e pelas recomendações científicas.

Aos colegas com quem dividi o laboratório, Antonio, Giovanni, Ana Zen, Rebeka, Ana Maria, Mayara e Pedro.

Aos demais docentes e pesquisadores do Instituto de Química, em especial Dr. Walter Colli e Dra. Deborah Schechtman, por todas as sugestões e conhecimento transmitido.

A todas as pessoas que me aturaram fora do laboratório ao longo desse período.

À Universidade de São Paulo, com destaque ao Instituto de Química e ao departamento de Bioquímica, pelas condições de trabalho e por possibilitar meu crescimento profissional.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro sem o qual este projeto não poderia ter sido realizado.

RESUMO

PAÇO, S.L.G. Título. 2019. Modificações pós-traducionais durante o processo de amastigogênese do *Trypanosoma cruzi*
Dissertação (Mestrado) –Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* constituindo-se em um problema de saúde pública em vários países da América Latina. No seu complexo ciclo de vida, o protozoário passa por quatro estágios diferentes: tripomastigota metacíclica, amastigota, tripomastigota sanguíneo e epimastigota, que permitem sua sobrevivência nos diferentes ambientes com os quais o parasita entra em contato. A diferenciação dos tripomastigotas de *T. cruzi* em amastigotas (amastigogênese) ocorre com grandes mudanças morfológicas, estruturais e metabólicas no parasita e pode ser reproduzido *in vitro* por exemplo, pela acidificação do meio extracelular. Apesar dos vários trabalhos descritos na literatura, o processo ainda não é totalmente compreendido.

A participação de NO na transdução de sinal durante a amastigogênese, sugerida por dados não publicados de nosso grupo, assim como a via de sinalização dependente de AMPc, foram o foco do presente estudo. A indução da amastigogênese foi obtida por incubação de tripomastigotas em meio de cultura acidificado (pH 6,0) e os parâmetros estudados comparados com parasitas controle (meio de cultura, pH 7,4). Estudamos a variação no perfil de nucleotídeos cíclicos (AMPc, GMPc), de quinases (PKA, MAPK- ERK1/2), de uma fosfatase (PP2A), assim como o perfil de proteínas fosforiladas, S-nitrosiladas e nitradas até 6 h do início da amastigogênese. O processo foi dividido nas etapas: inicial (até 60 minutos) e tardia (em torno de 3-4 h), caracterizados por um aumento de formas amastigotas na etapa tardia.

Houve um aumento de aproximadamente 17 vezes no nível de AMPc nos primeiros 15 minutos da amastigogênese (meio pH 6,0), seguido por aumento discreto no nível de PKA fosforilada, utilizado como indicador de atividade enzimática, este mais evidente na etapa tardia (360 minutos). Quanto à subunidade catalítica fosforilada da MAPK (ativa), há uma aparente diminuição no nível de fosforilação na fase inicial (30 minutos) e aumento na etapa tardia (120 minutos) do processo de amastigogênese. Quanto ao perfil geral de fosforilação de proteínas, há uma diminuição de fosforilação em torno de 30 minutos, seguida de aumento de fosforilação em proteínas de aproximadamente 5 e 100 kDa, mas de maneira geral, não se observaram grandes mudanças nesse perfil com a metodologia utilizada.

Quanto às modificações por NO e seus derivados, foram observadas modificações por S-nitrosilação e nitração das proteínas, além do aumento de GMPc em torno de 60 minutos. Embora essas modificações modulem a atividade biológica de uma grande diversidade de proteínas, seu papel biológico não foi explorado.

Em resumo, nossos resultados apontam para uma variação no perfil de fosforilação, S-nitrosilação e nitração de proteínas, além do aumento de AMPc e GMPc ao longo do processo de amastigogênese *in vitro*, com a via de sinalização dependente de quinases/ fosfatases e de óxido nítrico ocorrendo ao longo do processo de amastigogênese

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Amastigogênese. Modificações pós-traducionais. Fosforilação. Nitração. S-Nitrosilação, NO sintase

ABSTRACT

PAÇO, S.L.G. Thesis-2019. Post-translational modifications during the amastigogenesis of
Trypanosoma cruzi

Master degree– Graduate-Biochemistry department. Chemistry Institute, Universidade de São Paulo,
São Paulo, 2019.

Chagas disease is a neglected disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and is a public health problem in several Latin American countries. In its complex life cycle, the protozoan goes through four different stages: metacyclic trypomastigote, amastigote, blood trypomastigote and epimastigote, which allow its survival in the different environments which the parasite comes into contact. The differentiation of *T. cruzi* trypomastigotes into amastigotes (amastigogenesis) occurs with large morphological, structural and metabolic changes in the parasite and can be reproduced *in vitro* by, for example, acidification of the extracellular medium. Despite the many data described in the literature, the process is not yet fully understood.

The participation of NO in signal transduction during amastigogenesis, suggested by unpublished data from our group, as well as the cAMP-dependent signaling pathway, were the focus of the present study. The induction of amastigogenesis was obtained by incubating trypomastigotes in acidified culture medium (pH 6.0) and the studied parameters compared with control parasites (culture medium, pH 7.4). We studied the variation in the profile of cyclic nucleotides (cAMP, cGMP), kinases (PKA, MAPK-ERK1 / 2), phosphatase (PP2A), as well as the profile of phosphorylated, S-nitrosylated and nitrated proteins up to 6 h. onset of amastigogenesis. The process was divided into early (up to 60 minutes) and late (around 3-4 hours), characterized by an increase in amastigote forms in the late stage.

There was an approximately 17-fold increase in cAMP level in the first 15 minutes of amastigogenesis (pH 6.0 medium), followed by a slight increase in phosphorylated PKA level, most evident in the late stage (360 minutes). As for the phosphorylated catalytic subunit of MAPK (active), there is an apparent decrease in the phosphorylation level in the early phase (30 minutes) and increase in the late stage (120 minutes) of the amastigogenesis process. As for the general protein phosphorylation profile, there is a decrease in phosphorylation around 30 minutes, followed by an increase in phosphorylation of proteins (approximately 5 and 100 kDa), but overall, no major changes were observed in this profile with the methodology used.

As for modifications by NO and its derivatives, modifications were observed by S-nitrosylation and protein nitration, besides the increase of cGMP around 60 minutes. Although these modifications modulate the biological activity of a wide range of proteins, their biological role has not been explored.

In summary, our results point to a variation in phosphorylation, S-nitrosylation and nitration profile of proteins, as well as an increase in cAMP and cGMP along the amastigogenesis process, implicating kinases / phosphatases and nitric oxide dependent signaling pathways in this differentiation.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Amastigogenesis, phosphorylation, nitration, S-nitrosylation, cAMP. cGMP. NO synthase.

Figuras

Figura 1. Transmissão da Doença de Chagas pelo vetor triatomíneo (2014)	18
Figura 2. Representação esquemática dos estágios do <i>T. cruzi</i> .	20
Figura 3. Detalhe da ultraestrutura do flagelo do <i>T. cruzi</i> .	22
Figura 4. Diagrama esquemático da sinalização no AMPc em <i>T. brucei</i> .	26
Figura 5: Visão geral dos mecanismos de sinalização clássica, menos clássica e não clássica induzidos pelo NO.	33
Figura 6: Sinalização por NO de longo e curto alcance.	34
Figura 7. Esquema de denitrosilação de proteínas dependente de glutatona.	36
Figura 8. Esquema de denitrosilação de proteínas dependente do sistema de Tiorredoxina redutase.	36
Figura 9: Princípio do ensaio imunoenzimático	47
Figura 10: Análise morfológica durante a amastigogênese em pH 6.0 (A) e 7.4 (B) pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.	48
Figura 11: Expressão de PAR durante a amastigogênese em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 (A) e 7.4 (B) detectada pela técnica de Imunofluorescência indireta.	49
Figura 12: Relação de Tripomastigotas e Amastigotas durante a amastigogênese de <i>T. cruzi</i> em meio MEM:TAU3AG	50
Figura 13: Expressão de PAR em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	51
Figura 14: Quantificação de AMPc durante o processo de amastigogênese de <i>T. cruzi</i> .	51
Figura 15: Expressão de PKAc total em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	52
Figura 16: Expressão de PKA -P em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	53
Figura 17: Expressão de MAPK (subunidade catalítica) em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	53
Figura 18: Expressão de MAPK-P em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	54
Figura 19: Localização de proteínas fosforiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0, através de imunofluorescência indireta.	55
Figura 20: Localização de proteínas fosforiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 7.4, através de imunofluorescência indireta.	56
Figura 21: Expressão de proteínas fosforiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	57
Figura 22: Modificação por fosforilação da proteína PAR em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese	58
Figura 23: Expressão de PP2A em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese	59

Figura 24: Quantificação de GMPc durante a amastigogênese.	60
Figura 25: Expressão de proteínas S-nitrosiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese	61
Figura 26: Detecção de proteínas S- nitrosiladas pelo Teste de Griess.	62
Figura 27: Localização de proteínas S-nitrosiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0, através de imunofluorescência indireta.	63
Figura 28: Localização de proteínas S-nitrosiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 7.4, através de imunofluorescência indireta	64
Figura 29: Expressão de proteínas nitradas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	65
Figura 30: Modificação por S-nitrosilção e nitração da proteína PAR em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.	66

LISTA DE ABREVIações

BSA Bovine serum albumine (Albumina de soro bovino)	MEM Modified Eagle Medium (Meio Modificado de Eagle)
cAMP Adenosina monofosfato cíclico	MMTS Metanotiosulfonato
CcO Citocromo c oxidase	NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídio
cGMP Guanosina monofosfato cíclico	nNOS Óxido nítrico sintase neuronal
CYP450 Citocromo P450	NO Óxido nítrico
DAPI 4',6'-diamidino-2-fenilindol	NOS Óxido nítrico sintase
DEAE dietilaminoetil	PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida)
EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid	PAR Paraflagelar Rod Protein
EGF Endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelial)	PBS Tampão fosfato-salina
EGTA Ethylene glycol tetraacetic acid	PDE Fosfodiesterase
eNOS Óxido nítrico sintase endotelial	PKA Protein Kinase C (Proteína Quinase A)
FDH Formaldeído desidrogenase	PKG Protein Kinase G (Proteína Quinase G)
GSH Glutationa	PMSF Phenylmethanesulfonylfluoride
GSSH Glutationa oxidada	PP2A Proteína fosfatase 2
HRP Horseradish peroxidase (Peroxidase de raiz-forte)	RNS Espécies reativas de nitrogênio
HSP Heat shock protein (Proteína do shock térmico)	SDS Dodecil sulfato de sódio
IEF Isoelectric focusing (focalização isoelétrica)	SFB Soro fetal bovino
iNOS Óxido nítrico sintase indutível	sGC Guanilato ciclase solúvel
LIT Liver infusion tryptose	Trxn Tioredoxina
L-NAME L-N G-Nitroarginine methyl ester	TrxnR Tioredoxina redutase
MAPK Mitogen Activated Protein Kinases	Ty <i>Trypanosoma cruzi</i> , forma tripomastigota, cepa Y

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	PROTOZOÁRIOS DA ORDEM KINETOPLASTIDA.....	15
1.2	HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS	16
1.3	EPIDEMIOLOGIA	17
1.4	ESTÁGIOS E CICLO DE VIDA DO <i>T. CRUZI</i>	19
1.5	AMASTIGOGÊNESE	21
1.6	FOSFORILAÇÃO NO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	24
1.6.1	PKA de <i>T. cruzi</i>	27
1.6.2	MAPK de <i>T.cruzi</i>	28
1.6.3	Proteína fosfatases de <i>T. cruzi</i>	30
1.7	MODIFICAÇÕES POR ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	31
1.7.1	S-nitrosilação de proteínas.....	34
1.7.2	Nitração de proteínas.....	37
1.7.3	S-nitrosilação e nitração em protozoários.....	38
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	OBJETIVO GERAL.....	41
3	METODOLOGIA.....	42
3.1	MANUTENÇÃO DO <i>T. CRUZI</i>	42
3.2	PURIFICAÇÃO DOS TRIPOMASTIGOTAS:.....	42
3.3	INDUÇÃO DA AMASTIGOGÊNESE:	42
3.4	FRACIONAMENTO DO PARASITA:.....	43
3.5	SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOT</i> :	43
3.6	IMUNOPRECIPITAÇÃO	45
3.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA:	45

3.8	QUANTIFICAÇÃO DE S-NITROSOTIÓIS TOTAIS	46
4	RESULTADOS	48
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE AMASTIGOGÊNESE EXTRACELULAR	48
4.2	FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DURANTE A AMASTIGOGÊNESE EXTRACELULAR	51
4.3	S-NITROSILAÇÃO E NITRAÇÃO DE PROTEÍNAS NA AMASTIGOGÊNESE EXTRACELULAR	60
5	CONCLUSÃO	67
6	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi* e constitui um problema de saúde pública em vários países da América Latina. No seu complexo ciclo de vida, o protozoário passa por dois hospedeiros (mamíferos e insetos) e quatro estágios distintos (tripomastigota metacíclica, amastigota, tripomastigota sanguíneo e epimastigota).

1.1 PROTOZOÁRIOS DA ORDEM KINETOPLASTIDA

Infecções por protozoários são de grande importância na saúde pública pois acarretam em muitas mortes em todo o mundo (Tabela 1).

Tabela 1: Mortes causadas por protozoários no ano de 2017

Doença	Protozoário causador da doença	Mortes no Mundo no ano de 2017 (mil)
Malária	<i>Plasmodium spp.</i>	619,5
Doença de Chagas	<i>Trypanosoma cruzi</i>	7,9
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania donovani</i> <i>Leishmania chagasi</i> <i>Leishmania infantum.</i>	7,5
Doença do sono	<i>Trypanosoma brucei</i>	1,4
Amebíase	<i>Entamoeba histolytica</i>	1,0
	Total de mortes (mil)	637,30

Fonte: Adaptado (Roth *et al.*, 2018) .

Os protozoários são microrganismos originalmente classificados no Reino *Protozoa*, que compreendem um grupo diversificado de eucariotos unicelulares. Embora a maioria deles exista como microrganismos de vida livre em diferentes ambientes aquáticos e úmidos, existem muitas espécies que vivem em associação

com organismos hospedeiros, causando graves doenças (Sibley, 2011; Filardy *et al.*, 2018).

Parasitas pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, estão entre os principais protozoários que afetam a qualidade de vida dos humanos e causam alta mortalidade. Os cinetoplastídeos têm como característica a presença de uma organela denominada cinetoplasto localizada próxima ao corpo basal do flagelo, contendo material genético da alongada mitocôndria (kDNA) presente nesses parasitas, além da presença do flagelo, auxiliando na mobilidade e sensibilidade do meio ambiente.

Os três cinetoplastídeos mais conhecidos por serem agentes causadores de doenças em humanos, são: *Trypanosoma brucei* (tripanossomíase africana ou Doença do sono), *Trypanosoma cruzi* (tripanossomíase americana ou Doença de Chagas) e *Leishmania spp.* (leishmaniose). É importante ressaltar que essas doenças ainda são consideradas doenças tropicais negligenciadas (DTNs) pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Hotez *et al.*, 2016)

Devido ao impacto na saúde pública das doenças citadas acima, estudos sobre esses organismos que visam esclarecer seu complexo ciclo de vida e auxiliar no surgimento de alvos terapêuticos para produção de drogas capazes de erradicarem essas doenças, são importantes.

1.2 HISTÓRICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Em 1908, o bacteriologista Carlos Chagas, durante a campanha em Minas Gerais teve conhecimento de certos insetos hematófagos denominados barbeiros, que foram encontrados nas residências das pessoas e que poderiam abrigar potenciais patógenos, Chagas dissecou esses insetos e encontrou vários tripanosomatídeos no seu sistema digestório, denominando-os de *Schizotrypanum cruzi* (posteriormente classificado como *Trypanosoma cruzi*) em homenagem ao seu mentor Oswaldo Cruz (Chagas, 1909).

Alguns desses insetos infectados foram utilizados para infectar macacos e investigar melhor esse novo organismo descoberto. Foram encontrados tripanosomatídeos no sangue desses animais, o mesmo acontecendo em outros testes com animais de laboratório. Chagas acreditava que era um organismo

patogênico de uma doença infecciosa humana, porém não sabia de que tipo de doença se tratava. Até que ele foi chamado para examinar uma menina de dois anos chamada Berenice que estava febril, e tinha o baço e fígado aumentados e linfonodos inchados. Examinando seu sangue, encontrou tripanosomatídeos com morfologia similar àqueles encontrados nos macacos. Posteriormente Carlos Chagas pode caracterizar uma nova doença tropical, descrevendo: inseto vetor, patógeno, diferentes estágios de desenvolvimento, animais reservatórios, hospedeiros, manifestações clínicas e epidemiologia da doença.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A Doença é endêmica em 21 países da América Latina, estando presente do sul dos Estados Unidos ao Norte da Argentina e do Chile, com alta prevalência Bolívia, Argentina, Equador, El Salvador e Guatemala (Figura 1). Ela ocorre principalmente nas regiões pobres e rurais da América Central e do Sul, onde a transmissão vetorial é a principal rota de contágio. Os residentes de casas infestadas com triatomíneos estão constantemente susceptíveis a picadas de vetores, porém a incidência de infecção é baixa variando de 1%-4% por ano em áreas hiperendêmicas, como a Bolívia (Perez-Molina e Molina, 2018). Nos Estados Unidos, os ciclos silvestres da transmissão do *T. cruzi* são estabelecidos em áreas específicas de alguns estados da região sul, porém pouca infecção oriunda do próprio local foi detectada. A migração intensa possibilitou que a doença se espalhasse para regiões anteriormente não infectadas. Por exemplo, a prevalência da infecção em indivíduos latino americanos vivendo na Europa é de 2 a 4% (Requena-Mendez *et al.*, 2015). O parasita, com alta diversidade genética e fenotípica é classificado em seis unidades de tipagens (DTU-TCI para TCVI). Esta diversidade genética está relacionada à distribuição geográfica, patogênese, características clínicas e resposta a terapia (Zingales, 2018).

O protozoário pode ser transmitido por transmissão vetorial, transfusão de sangue, transplante de órgão, congênita, acidente e oral (Fernandes e Andrews, 2012; Bern, 2015).

Transmissão vetorial: O *T. cruzi* é transmitido em áreas endêmicas por várias espécies de três gêneros de insetos triatomíneos sugadores de sangue, *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*, todos amplamente distribuídos na América Latina, do

México à Argentina e ao Chile, em áreas florestais e secas. As espécies epidemiologicamente ligadas à doença de Chagas humana que se adaptaram ao ambiente doméstico são: *T. infestans*, *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *P. megistus* e *T. brasiliensis* (Perez-Molina e Molina, 2018).



Figura 1. Transmissão da Doença de Chagas pelo vetor triatomíneo (2014)

Fonte: Programa de controle da doença de Chagas da Organização Pan-Americana da Saúde.

Transmissão por transfusão de sangue: Os movimentos migratórios rurais-urbanos que ocorreram na América Latina a partir da década de 1960 possibilitaram que a infecção rural se tornasse urbana, podendo ser transmitida por transfusão de sangue. Nas últimas duas décadas, o número de doadores com sorologia positiva tem sido muito alta nos países endêmicos e a maioria dos países tem sistemas de triagem obrigatórios de doadores em bancos de sangue.

Transmissão congênita: A prevalência da infecção pelo *T. cruzi* em mulheres varia amplamente nos diferentes países endêmicos. Casos de doença de Chagas congênita foram relatados na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Guatemala,

Honduras, Paraguai, Uruguai e Venezuela. O risco foi estimado como 1% ou menos no Brasil, a 7% ou mais em algumas regiões da Bolívia, Chile e Paraguai. A transmissão congênita depende diretamente da prevalência da infecção em mulheres férteis, geralmente infectadas por transmissão vetorial. Em áreas endêmicas sujeitas ao controle dos vetores, pode-se esperar uma diminuição progressiva da doença congênita a médio ou longo prazo.

Transmissão por transplante de órgãos: Pacientes que receberam órgãos de doadores com doença de Chagas crônica tiveram episódios agudos da doença e identificação do parasita em seu sangue periférico. Isso ocorre com mais frequência após o transplante renal. Transplantes de coração, medula óssea, pâncreas de doadores infectados com *T. cruzi* são também possíveis causas da transmissão da doença de Chagas, segundo relatos de casos que ocorreram na Argentina, Brasil, Chile e Venezuela.

Transmissão acidental: A transmissão acidental da doença de Chagas tem sido relatada em laboratórios e hospitais de países endêmicos e não endêmicos. Mais de 70 casos bem documentados foram registrados em técnicos, médicos e pesquisadores ao manusearem diferentes tipos de materiais contaminados, tais como dejetos de triatomíneos, culturas de parasitas e sangue infectado.

Transmissão oral: A transmissão oral da doença de Chagas foi documentada no Brasil, na Colômbia e no México, pela ingestão de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou com seus dejetos (Who Expert Committee on the Control of Chagas Disease, 2002). Desde 1990, as medidas mais efetivas para controlar a Doença de Chagas na América Latina, têm sido programas de controle de vetor e compulsório, testes para a doença em bancos de sangue, sendo eficaz na interrupção da transmissão vetorial no Uruguai, desde 1997, Chile desde 1999 e na maior parte do Brasil em 2000. Entretanto essa parasitose continua sendo de grande importância para a saúde pública, tendo sido observado um aumento da transmissão na região Amazônica. Estudos mostram que existem 95% de casos sub diagnosticados (Perez-Molina e Molina, 2018).

1.4 ESTÁGIOS E CICLO DE VIDA DO *T. CRUZI*

Durante seu ciclo biológico, o protozoário apresenta quatro estágios morfológicos distintos: o epimastigota e amastigota, que são as formas que sofrem

replicação; e os tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos, que são as formas infectantes e não replicantes. As diferentes formas podem ser identificadas por características morfológicas, tais como tamanho e forma do parasita, membrana ondulatória e flagelo e a posição relativa do núcleo e do cinetoplasto (Hernández-Osorio *et al.*, 2010) (Figura 2).

As formas epimastigotas, são organismos flagelados que possuem corpos celulares alongados e fusiformes (20-40 μm de comprimento) com um cinetoplasto em forma de bastão localizado anteriormente ao núcleo (Bourguignon *et al.*, 2006).

Os tripomastigotas são a forma infectante do parasita, são mais curtos e mais “delgados” (16-25 μm de comprimento), têm como características um cinetoplasto subterminal mais alongado no lado posterior ao núcleo, possuem membrana ondulante que se estende por todo o comprimento do parasita e um flagelo longo (Hernández-Osorio *et al.*, 2010).

As formas amastigotas possuem uma morfologia esférica com 2 a 4 μm de diâmetro, com flagelo livre muito curto e um cinetoplasto localizado no centro do corpo do parasita próximo ao núcleo (Hernández-Osorio *et al.*, 2010).

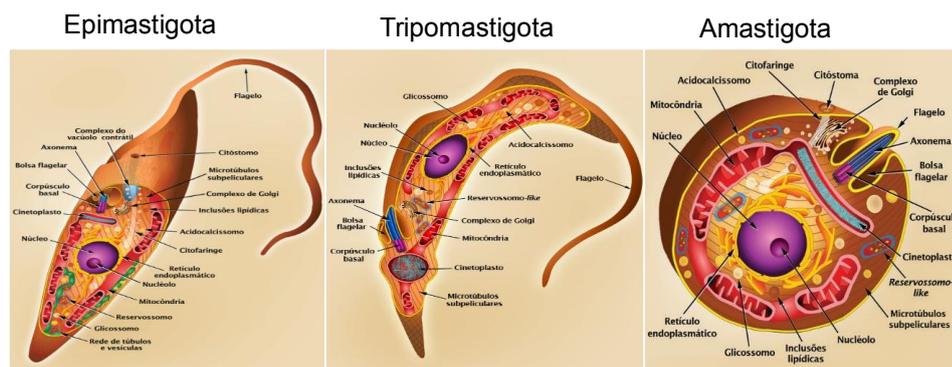


Figura 2. Representação esquemática dos estágios do *T. cruzi*.

Fonte: (Teixeira *et al.*, 2012)

Na natureza, o *T. cruzi* alterna seu ciclo entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. Durante a fase no hospedeiro invertebrado, o parasita, adquirido durante um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, sofre diferentes transformações dentro do tubo digestório do inseto. Após alguns dias, as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas epimastigotas na região anterior do intestino médio (estômago) do inseto, multiplicam-se repetidamente e

diferenciam-se no reto nas formas tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese), sendo eliminadas com as fezes e urina (Alves e Mortara, 2009; Fernandes e Andrews, 2012). Nessa fase de diferenciação, a adesão das formas epimastigotas à cutícula retal é fundamental para que ocorra a metaciclogênese. No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas infectam células adjacentes ao local da picada do inseto, principalmente macrófagos, permanecem no vacúolo parasitóforo por um tempo variável, diferenciam-se em amastigotas, que no citoplasma da célula hospedeira, passam por cerca de 9 ciclos de divisão binária. Sofrem nova diferenciação para tripomastigotas (tripomastigotas sanguíneo), que são liberados no meio por rompimento da célula. Atingindo a circulação, podem infectar novas células do organismo ou serem transmitidas para o inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Além das formas mencionadas, há formas intermediárias como as esferomastigotas (entre epimastigotas e tripomastigotas) no inseto vetor e as formas semelhantes a epimastigotas, (intermediárias entre amastigotas e tripomastigotas) no vertebrado (Almeida-De-Faria *et al.*, 1999).

Em resumo, ao longo de seu ciclo de vida, o *T. cruzi* passa por distintos hospedeiros e entra em contato com diversos ambientes, com a ocorrência de mudanças fisiológicas e morfológicas no parasita. Tanto a metaciclogênese, quanto a amastigogênese e a tripomastigogênese (diferenciação de amastigota para tripomastigota) tem sido alvo de vários estudos, com produção de extensa literatura, que procuram entender o processo de sinalização celular envolvido na diferenciação e invasão celular pelo *T. cruzi* (Hashimoto *et al.*, 2015).

A amastigogênese é o foco do presente estudo.

1.5 AMASTIGOGÊNESE

Amastigogênese é a transformação do tripomastigota em amastigota que, no ciclo do protozoário, se inicia dentro da célula hospedeira no interior do vacúolo parasitóforo e termina no citosol, onde ocorre a replicação desses parasitas (Teixeira *et al.*, 2012). Todavia já se observou a forma amastigota na circulação durante a infecção aguda (Brack, 1968).

O processo de amastigogênese em condições axênicas a partir de tripomastigota foi descrita previamente na literatura (Villalta e Kierszenbaum, 1982;

Andrews *et al.*, 1987; Tomlinson *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 2003; Hernández-Osorio *et al.*, 2010), por microscopia eletrônica de transmissão (MEV), descreveu um padrão complexo de rearranjos morfológicos que envolvem essa diferenciação: há um espessamento da extremidade posterior do parasita, uma internalização gradual do flagelo e um dobramento do tripomastigota em torno de si mesmo de forma helicoidal. Esse padrão de torção é provavelmente influenciado e limitado pelos microtúbulos, que se dispõem em espiral na célula dos cinetoplastídeos. Há, portanto, uma reestruturação celular com gradual e progressiva redução do tamanho e diminuição do flagelo e membrana ondulante até que se alcance a forma arredondada, típica da morfologia do amastigota. O remodelamento do núcleo e o deslocamento do cinetoplasto da região posterior para anterior ao núcleo (Andrews *et al.*, 1987; Navarro *et al.*, 2003) são parte do processo de amastigogênese.

A drástica redução do flagelo é uma das características mais evidentes dessa diferenciação. É importante ressaltar o papel dessa organela multifuncional, que está envolvida em funções vitais, tais como divisão celular, morfogênese, motilidade e evasão do sistema imune. A estrutura central do flagelo dos cinetoplastídeos é envolvida por várias estruturas extra-axonêmicas, como as *proteínas do paraflagellar rod* (PAR), que compõem uma estrutura semelhante a uma rede que se estende ao longo do axonema desde a bolsa flagelar até a ponta flagelar e fornece uma sustentação para o flagelo (Figura 3).

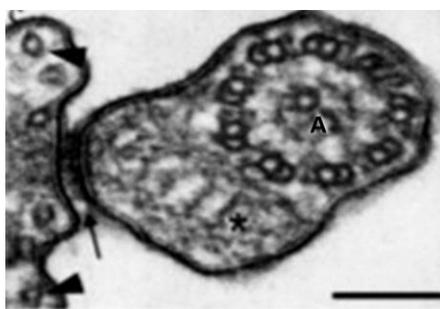


Figura 3. Detalhe da ultraestrutura do flagelo do *T. cruzi*.

Revela a íntima associação do axonema (A) com a estrutura paraflagelar (*). No corte transversal do flagelo podemos observar que o flagelo emerge da bolsa paraflagelar (seta grossa) as regiões de adesão do flagelo-FAZ (setas), e os microtúbulos subpelliculares (cabeça de seta).

Fonte: Adaptado do trabalho de (Rocha *et al.*, 2010).

As sequências codificantes de PAR são altamente conservadas em *Kinetoplastida* e *Euglenida*. A organização de alta ordem e a distribuição evolutiva restrita dos componentes e estrutura do PAR fazem com que ele seja um alvo terapêutico e profilático particularmente valioso.

Parte da função do flagelo está relacionada ao PAR. Está associado ao fornecimento de energia para propulsão em um meio viscoso devido à aparente associação com uma proteína com atividade ATPásica e auxilia na transferência de grupos fosfato para manter o fornecimento de ATP em partes distais do flagelo. O papel do PAR na regulação e no metabolismo para o controle das funções de mobilidade e sensoriais foi apoiado após a descoberta de componentes enzimáticos e componentes controlados por Ca^{2+} interagindo com essa proteína (Maharana *et al.*, 2015), incluindo a descoberta de duas adenilato ciclases associadas a PAR (Maric *et al.*, 2010).

Tanto a amastigogênese, como a metaciclogênese, são associadas ao nível de fosforilação das proteínas, via proteína quinases, dependentes ou não de AMPc e fosfatases (PP). Por exemplo, Caliculina A, inibidor de PP2A e PP1A, induz o arredondamento dos tripomastigotas (Grellier *et al.*, 1999), enquanto que ácido ocadáico, um inibidor de PP2A inibe a amastigogênese (González *et al.*, 2003). Estudos de proteoma e fosfoproteoma mostram que diferentes conjuntos de proteína quinases (por exemplo, subunidade catalítica de PKA, MAPK) ou AMPc-fosfodiesterases são expressas em períodos distintos ao longo da amastigogênese, com a maior variação de fosforilação observada após 2 horas de indução da diferenciação (Queiroz *et al.*, 2014).

Além de moléculas relacionadas acima com a sinalização celular, há mudanças no metabolismo e em antígenos específicos dos estágios de *T. cruzi*. Foi mostrado que durante a amastigogênese, proteínas envolvidas nos processos metabólicos e proteínas anotadas com “atividade catalítica” são as mais abundantes entre as proteínas que tiveram sua expressão alterada ao longo amastigogênese. Isso indica uma reorganização funcional e metabólica pronunciada durante a amastigogênese além do já conhecido rearranjo ultraestrutural, que é uma consequência da indução do pH (Queiroz *et al.*, 2014). Há ainda diminuição de membros das gp85/trans-sialidase e aumento de amastina, marcadores de

tripomastigotas e amastigotas, respectivamente, presentes na superfície dos parasitas (De Pablos e Osuna, 2012).

Além dos aminoácidos e ácidos graxos, que constituem a principal fonte intracelular de carbono e energia para os amastigotas, demonstrou-se que células infectadas por *T. cruzi* apresentam aumento na captação de glicose, sugerindo que esse açúcar ofereceria uma flexibilidade metabólica adicional a esses parasitas intracelulares para aumentar suas chances de sobrevivência em diferentes tecidos do hospedeiro e sob variadas condições ambientais, incluindo aí casos de inibição farmacológica de vias metabólicas específicas (Shah-Simpson *et al.*, 2017).

Em resumo, fatores que representam estresse para o parasita, tais como temperatura, condições nutricionais e principalmente pH, estimulam a amastigogênese (Contreras., 2002; Tomlinson., 1995; Hernández-Osorio, 2010; Navarro, 2003). Essas características morfológicas, capacidade de replicação, a presença de antígenos estágio-específicos, assim como mudanças metabólicas são mantidas no sistema *in vitro* (Li *et al.*, 2016).

A fim de entender os mecanismos que medeiam a diferenciação do *T. cruzi*, é essencial identificar as moléculas responsáveis pelos mecanismos de sinalização intracelular que desencadeiam esse processo em resposta às alterações ambientais. Como de maneira geral a atuação das vias de sinalização celular envolve modificações pós-traducionais (PTM), o presente estudo focou em três dessas modificações: fosforilação, nitrosilação e nitratação.

1.6 FOSFORILAÇÃO NO *TRYPANOSOMA CRUZI*

A fosforilação é uma das modificações mais comuns e regula a maioria dos aspectos da vida celular (Ardito *et al.*, 2017). É uma modificação reversível controlada por proteínas quinases e fosfatases. Em células de mamífero, cerca de um terço das proteínas contém um grupo fosfato covalentemente ligado. Muitas proteínas quinases e fosfatases têm múltiplos substratos *in vivo*, o que possibilita uma diversidade de respostas a estímulos fisiológicos (Hubbard e Cohen, 1993).

Estima-se que 2% do genoma total do *T. cruzi* codifica proteínas quinases. As espécies *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* têm 176, 190 e 199 genes preditos como

codificantes para proteínas quinases, respectivamente. Dessas quinases, 12% são exclusivas de tripanosomatídeos, sugerindo que essas enzimas desempenham um papel regulador importante no parasita (Naula *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005) e representam novos alvos para desenho de drogas anti-parasitárias.

Quanto às proteínas fosfatases, *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* possuem 78, 86 e 88 genes, respectivamente, que codificam essas enzimas. Aproximadamente 40% dos genes codificantes para fosfatases são atípicos, sem nenhum ortólogo claro identificado no genoma de outros eucariotos (Brenchley *et al.*, 2007).

Nos tripanosomatídeos e na maioria das células eucarióticas, o AMPc é sintetizado por adenilato-ciclases e degradado por fosfodiesterases. Em *T. cruzi*, é atribuído um papel do AMPc na metaciclogênese com um aumento observado de cerca de 3-4 vezes (Rangel-Aldao *et al.*, 1988), o mesmo ocorrendo na amastigogênese. No entanto, ainda não é bem conhecido como a síntese de AMPc é estimulada e como controlaria eventos celulares como a diferenciação. Parte da dificuldade reside nas diferenças observadas, tais como a ausência de proteína G nos tripanosomatídios e na presença de isoformas de adenilato ciclase, que tem a possibilidade de interagir com o ambiente e desencadear respostas específicas. Nos tripanosomatídios, as adenilato ciclases são constituídas por um domínio N-terminal extenso e variável, em contato com o ambiente, uma região transmembrânica e um domínio C-terminal citoplasmático, com atividade catalítica. Como hipótese, postulou-se que a atividade de cada isoforma seria controlada pela interação do domínio N-terminal com um ligante específico ou que a resposta seria resultado da perturbação da membrana, por exemplo por um stresse de pH ou outro agente físico ou ainda por estresse metabólico. Em *T. brucei* são estimados cerca de 80 genes que codificam as isoformas de adenilato ciclase (Alexandre *et al.*, 1996), mas em *T. cruzi*, esse número é bem menor, com cerca de 15 genes apenas (Hamedi *et al.*, 2015).

Numerosos processos fisiológicos são regulados pelas proteínas quinases, dependentes de AMPc, que de maneira geral são ativados quando o AMPc se liga à subunidade regulatória da PKA, liberando a subunidade catalítica ativa. No entanto, são pouco caracterizadas as proteínas que respondem a AMPc nos tripanosomatídios. Em *T. brucei* (Figura 4), foram descritas 4 CARPs (cAMP response proteins) (Gould *et al.*, 2013), enquanto que em *T. cruzi*, somente um homólogo de CARP1 (TcCLB.508523.80) que liga AMPc e GMPc foi descrito (Jager

et al., 2014; Tagoe *et al.*, 2015). No *T. cruzi*, a via AMPc- PKA está associada a diferenciação dos parasitas, enquanto que a via de sinalização independente de PKA é pouco explorada.

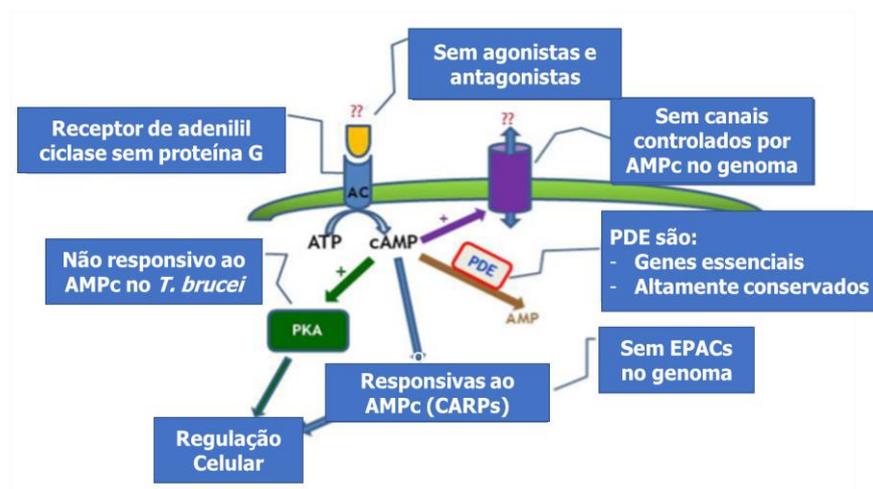


Figura 4. Diagrama esquemático da sinalização no AMPc em *T. brucei*, enfatizando a comparação com o modelo de mamífero. EPAC (exchange protein directly activated by AMPc)

Fonte: Adaptado de (Tagoe *et al.*, 2015).

O envolvimento da via de sinalização de AMPc no processo da amastigogênese foi também sugerido por análise proteômica. Observou-se, no intervalo de duas a nove horas de cultivo de tripomastigostas em meio ácido (pH 5.0), um aumento da expressão de AMPc-fosfodiesterases, proteínas Ser/Thr-quinases, incluindo PKA, enquanto que MAPK, uma outra quinase relevante que interage com PKA, mostrou um perfil oposto. Entretanto ambas, PKA e MAPK, tiveram um aumento de resíduos fosforilados durante a amastigogênese. Foi ainda descrita a regulação negativa de fosfatases, entre elas a subunidade regulatória de fosfatase 2A (PP2A) (Queiroz *et al.*, 2014). No caso específico da PP2A, os dados da literatura são controversos, com a descrição do bloqueio da amastigogênese por ácido ocadáico, um inibidor da enzima (González *et al.*, 2003) e o não envolvimento de PP2A na amastigogênese (Grellier *et al.*, 1999). Os dados controversos têm sido atribuídos a diferenças de cepas, tempo de análise ou pH empregado. De qualquer

forma, os trabalhos enfatizam o envolvimento de fosfatases e quinases em eventos de fosforilação/desfosforilação que coordenam a diferenciação do tripomastigota em amastigota.

Com o atual interesse nas proteínas quinases como alvos moleculares para o tratamento de uma variedade de doenças, diversos outros estudos também analisaram a expressão de proteínas do *T. cruzi* durante a amastigogênese. Observou-se que metade das proteínas em estudo eram reguladas por fosforilação e desfosforilação, entre elas, moléculas proteicas que participam da degradação de proteínas como chaperona ClpB e PA26 (proteína ativadora de proteossomo) (Yao *et al.*, 1999).

1.6.1 PKA de *T. cruzi*.

Huang e colaboradores, baseados no fato de PKA ser uma molécula muito conservada entre os organismos, clonaram e expressaram as subunidades catalíticas (TcPKAc) e regulatórias (TcPKAr) da PKA de *T. cruzi*. A subunidade catalítica correspondia a 329 aminoácidos, continha todos os motivos de assinatura das subunidades catalíticas conhecidas e também era inibida pelo peptídeo inibidor de quinase (PKI), como a PKA de outros organismos. A TcPKAc correspondia a 503 aminoácidos e também possuía todas as características de PKAr conhecida de outros organismos, incluindo o sítio de autofosforilação e dois domínios de ligação a cAMP. TcPKAr de *T. cruzi* apresenta uma identidade de 72% com *T. brucei* PKAr (Gi10441122) e 63% de identidade com *L. major* PKAr (Gi963391). Com o sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, foram identificadas duas isoformas do TcPKAc (PKA subunidade catalítica isoforma-1 [Tc00.1047053508461.310] e isoforma-2 [Tc00.1047053508461.280]). Tanto a TcPKAc, quanto a TcPKAr, estão localizadas na membrana plasmática e na região flagelar (Huang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2010).

Em *T. brucei* foi detectada uma região homóloga à subunidade regulatória da PKA de eucariotos independente de AMPc, sendo denominada TbRSU. A TbRSU possui dois domínios de interação com nucleotídeos-cíclicos e uma região de regulação inibidora que se liga à subunidade catalítica da proteína. A TbRSU possui a atividade de fosforilação de proteínas e também é inibida pelo peptídeo inibidor de quinase (PKI), mas é estimulada não pelo AMPc e sim pelo GMPc (Shalaby *et al.*, 2001). Devido à semelhança entre as espécies *T. cruzi* e *T. brucei*, foi aventada a

possibilidade de que essa característica também esteja presente em *T. cruzi* (Jackson, 2015). No entanto, a PKA de *T. cruzi* identificada é ativada por AMPc (aproximadamente metade do estímulo máximo na presença de 1nM de AMPc) e não por GMPc.

A relevância da TcPKAc na biologia do *T. cruzi* foi demonstrada pela introdução de um gene que codificava o peptídeo PKI contendo o pseudo substrato de PKA (Arg-Arg-Asn-Ala) em epimastigotas e sua expressão levou à morte do parasita. Resultado semelhante foi obtido com 10 μ M de H89, um inibidor da atividade de PKA, também em epimastigotas (Bao *et al.*, 2008).

Utilizando a técnica de duplo híbrido, Bao e colaboradores (Bao *et al.*, 2008) identificaram 38 candidatos possíveis de interagir com a TcPKAc de *T. cruzi*. Oito deles estavam relacionados com regulação da diferenciação, crescimento e adaptação: PI3K, Vps34 (um tipo de PI3K), DERP (*DNA excision repair protein*), ERK, Hexoquinase, Aquaporina, PDEC2 (AMPc-fosfodiesterase), ATPase, todos fosforilados por PKAc. Também se mostrou que a TcPKAc interage com membros da família da trans-sialidase que permitem a adesão e invasão do parasita nas células hospedeiras, fosforilando a proteína recombinante da trans-sialidase (Bao *et al.*, 2010). A correlação que existe entre o aumento do nível de AMPc, a elevada atividade de PKA e expressão da trans-sialidase em epimastigotas na fase tardia de crescimento, antes de se diferenciarem em tripomastigotas infectantes (metacicloênese) sugere que a atividade de TcPKAc é relevante para a diferenciação e invasão do *T. cruzi*.

Além do AMPc, o GMPc também possui importante função nos processos de sinalização do *T. cruzi* apesar de não ter sido identificada no genoma do parasita uma guanilato ciclase típica. Estudos sugerem semelhanças entre a adenilato-ciclase desses tripanossomatídeos com a guanilato ciclase de mamíferos, o que inclui a organização geral dos domínios das enzimas (Tagoe *et al.*, 2015). Vale notar que foram descritas as fosfodiesterases B e C de *T. cruzi*, que apresentam dupla especificidade para AMPc e GMPc (Laxman e Beavo, 2007).

1.6.2 MAPK de *T.cruzi*

MAPKs são mediadores bem conhecidos de transdução de sinal de eucariotos superiores, que regulam processos importantes como proliferação, diferenciação, resposta ao estresse e apoptose. Exibem um alto grau de

conservação evolutiva e são essenciais para muitas funções celulares em resposta a estímulos extracelulares, incluindo receptores de tirosina quinase, receptores acoplados à proteína G e PKC.

Em células de mamíferos, quatro cascatas de MAPK ativadas por fosforilação são atualmente reconhecidas, incluindo quinase regulada por sinal extracelular (ERK), c-Jun quinase NH₂ terminal / proteína quinase ativada por estresse (JNK / SAPK), p38 e grande proteína ativada por mitógeno-quinase 1 / ERK5 (BMK-1 / ERK5) (Camps *et al.*, 2000; Avruch, 2007; Ramos, 2008).

A importância das MAPKs também foi estabelecida em protozoários patogênicos. Por exemplo, em *T. brucei*, a deleção do homólogo de MAPK, TbMAPK5, resultou em menor parasitemia e diferenciação prematura (Domenicali Pfister *et al.*, 2006), a eliminação de TbMAPK2 também afetou a diferenciação (Müller *et al.*, 2002), enquanto que TbMAPK4 confere resistência ao estresse de temperatura (Guttinger *et al.*, 2007). Em *Leishmania*, foram descritas 15 MAPKs (Wiese, 1998; Wiese *et al.*, 2003; Bengs *et al.*, 2005; Kuhn e Wiese, 2005; Erdmann *et al.*, 2006; Wiese, 2007) e em *T. cruzi*, 6 das 13 MAPKs presentes no genoma possuem a sequência TDY necessária para a dupla fosforilação da MAPK (Bao *et al.*, 2010). No entanto, os ativadores de superfície típicos, tais como receptores de superfície celular, não são conhecidos, sugerindo a existência de mecanismos alternativos para a ativação de MAPKs.

Recentemente, um homólogo da ERK2 em *T. cruzi* (TcMAPK2) foi clonado e caracterizado (Bao *et al.*, 2010). O TcMAPK2 tem alta homologia com ERK2 de eucariotos menos complexos, mas tem diferenças significativas em relação a ERK2 de mamífero. Sua localização subcelular é principalmente citoplasmática em epimastigotas, ao longo do flagelo em tripomastigotas e na membrana plasmática de amastigotas intracelulares. Também a expressão da forma ativa de TcMAPK2 (fosforilada) varia entre os estágios, sendo maior em tripomastigotas e menor em amastigotas. Superexpressão de TcMAPK2 em epimastigotas inibe seu crescimento e desenvolvimento, levando à morte do parasita. O TcMAPK2 interage com TcPKAc e fosfodiesterase específica para AMPc (TcPDEC2), sugerindo a existência em *T. cruzi* de um “crosstalk” entre estas vias de sinalização. O TcMAPK2 recombinante foi capaz de fosforilar o recombinante TcPDEC2, mostrando que o TcMAPK2 pode participar na regulação da homeostase do AMPc no *T. cruzi* e portanto ter papel relevante na regulação da proliferação e diferenciação.

No caso de *Leishmania*, foi descrito que membros da família da MAPKs são importantes no comprimento flagelar, bem como na sobrevivência do parasita no hospedeiro infectado (Bengs *et al.*, 2005; Kuhn e Wiese, 2005; Erdmann *et al.*, 2006; Wiese, 2007).

1.6.3 Proteína fosfatases de *T. cruzi*

Proteínas fosfatases desfosforilam substratos de proteínas quinases, incluindo PKA e MAPKs, sendo portanto, em conjunto com as quinases, responsáveis pelos níveis de fosforilação das proteínas e portanto, envolvidas em distintos eventos celulares. As serina/treonina fosfatases são enzimas multiméricas obrigatórias, estruturadas a partir de um pequeno número de subunidades catalíticas combinadas com muitas centenas de subunidades reguladoras, podendo originar cerca de 400 heterodímeros de PP1 e de 100 de PP2A em eucariotos. Além disso, modificações pós-traducionais, tais como fosforilação e metilação, participam da complexa regulação das proteínas fosfatases permitindo a criação de enzimas específicas que coordenam e controlam eventos bioquímicos.

Em *T. cruzi*, foram descritas 56 fosfatases de serina / treonina, número semelhante a *T. brucei* (54) e *Leishmania* (58) e maior do que em humanos (39) (Brenchley *et al.*, 2007; Szoor *et al.*, 2010). *T. cruzi* tem um grande número de proteínas fosfatases atípicas, representando mais de um terço do total de fosfatases. As proteína fosfatases PP1 e PP2A, são as mais abundantes dentro das fostases de serina/treonina, enquanto que tirosina fosfatases são menos abundantes, refletindo a porcentagem de fosforilação desses resíduos nas proteínas. As duas isoformas PP1, TcPP1a (Tc00.1047053506201.70) e TcPP1b Tc00.1047053507671.39), foram identificadas em *T. cruzi*, e os mRNAs foram detectados em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos (Orr *et al.*, 2000). A TcPP2A foi caracterizada e seu papel na amastigogênese demonstrada (Gonzales-Perdomo *et al.*, 1988; González *et al.*, 2003), assim como expressão diferencial de TcPP2A, uma fosfatase-like e de proteína fosfatase C, uma metalofosfatase ao longo da amastigogênese (Queiroz *et al.*, 2015)

Os inibidores de PP1 e PP2A, ácido ocadáico (AO), tautomicina (TA) e caliculina A (CA), desencadearam a diferenciação de tripomastigotas de *T. cruzi* em amastigotas (Grellier *et al.*, 1999). No caso do tratamento de epimastigotas com Calicuna A, também em baixas concentrações, houve a duplicação flagelar e

divisões nucleares e cinetoplásticas, mas a citocinese não foi completada, com o epimastigota mantendo uma forma arredondada, sugerindo que as fosfatases PP1 e PP2A são importantes para o término da divisão celular em *T.cruzi*. González e colaboradores (2003) por outro lado clonaram e caracterizaram parcialmente a PP2A e demonstraram que a atividade de PP2A é essencial para que a amastigogênese ocorra, com o ácido ocadáico fixando o tripomastigota em um estágio flagelado intermediário. De acordo com os Autores, possíveis diferenças de cepas utilizadas poderiam ser responsáveis pelos resultados distintos encontrados (Grellier et al 1999; González et al, 2003).

Apesar da relevância das proteína fosfatases, estas têm sido menos estudadas em tripanosomatídeos quando comparadas com as proteína quinases.

1.7 MODIFICAÇÕES POR ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Em condições fisiológicas, baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), mantidas pela ação de sistemas antioxidantes endógenos, permitem modificações em resíduos chave de proteínas reguladoras, tais como as de resíduos de cisteína (S-nitrosilação/ S-sulfenilação/ S-glutathionilação, pontes S-S) ou nitração de tirosina e outros resíduos de aminoácidos, como o triptofano. Tanto a nitração, como a S-nitrosilação são dependentes de NO (Martinez-Ruiz *et al.*, 2013), reconhecido como um mediador de várias vias de sinalização. Uma marca registrada desse reconhecimento veio da identificação do NO como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), um fator produzido por células endoteliais, que induziram o relaxamento vascular operando em células musculares lisas (Gryglewski *et al.*, 1986).

NO é produzido na conversão de L-arginina em L-citrulina pelo NO sintase (NOS) na presença de oxigênio. FAD, FMN, heme e tetrahydrobiopterina (BH4) são coenzimas essenciais da reação. Em mamíferos, o estado ativo da proteína NOS é encontrado na forma de homodímeros e as três isoformas da NOS identificadas, codificadas por diferentes genes, têm localização e regulação específicas: nNOS ou tipo I, descrita em tecido neuronal; iNOS ou tipo II, presente em diversas células e tecidos, entretanto ativa somente após indução; e eNOS ou tipo III, descrita em células do tecido endotelial (Stuehr, 1999). As NOS possuem sítio para a ligação de

calmodulina, que opera como um sensor de Ca^{2+} , que leva a mudanças na atividade da enzima. No caso de iNOS, a enzima tem alta afinidade por calmodulina, mesmo em baixas concentrações de Ca^{2+} . De maneira geral, a atividade de NOS é modulada por interações proteína-proteína (HSP90, dinamina, tubulina e outras) ou por modificações pós-traducionais (fosforilação, S-glutationilação) (Moldogazieva *et al.*, 2018).

O NO formado pode reagir com outras espécies reativas de oxigênio, como O_2^- com formação de peroxinitrito (ONOO^-), que pode ser protonado a ácido (ONOOH) na dependência de pH, que por sua vez pode oxidar o grupo tiol de cisteínas, a sulfênico (R-SOH). ONOO^- pode por exemplo reagir com CO_2 , com a produção de $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$. Tanto ONOO^- , como o radical $\cdot\text{NO}_2$ causam a nitração de proteínas. A especificidade da modificação de um determinado aminoácido na proteína é um elemento decisivo na sinalização redox.

Em termos gerais, a ação do NO na célula pode ser organizada em três grupos (Figura 5) (Vanin *et al.*, 2007; Martinez-Ruiz *et al.*, 2011): Via clássica, com ativação da enzima guanilato ciclase, que catalisa a síntese GMPc a partir de GTP, o GMPc participa de diversas cascatas de sinalização; Via “menos clássica”, com a ligação direta do NO ao centro metálico da proteína, como é o caso da inibição da citocromo c oxidase; Via não clássica, que medeia a reação de S-Nitrosilação e Nitração e S-glutationilação, uma modificação pós-traducional em resíduos de cisteína e tirosina, respectivamente; a S-Nitrosilação, por exemplo, atua como uma sinalização para a ativação das cascatas de MAPK, ERK, p38 e JNK (Lander *et al.*, 1996). É importante ressaltar que nem sempre a mudança de atividade observada pode ser associada diretamente à nitrosilação da cisteína ou nitração da tirosina, uma vez que outros aminoácidos estão sendo modificados.

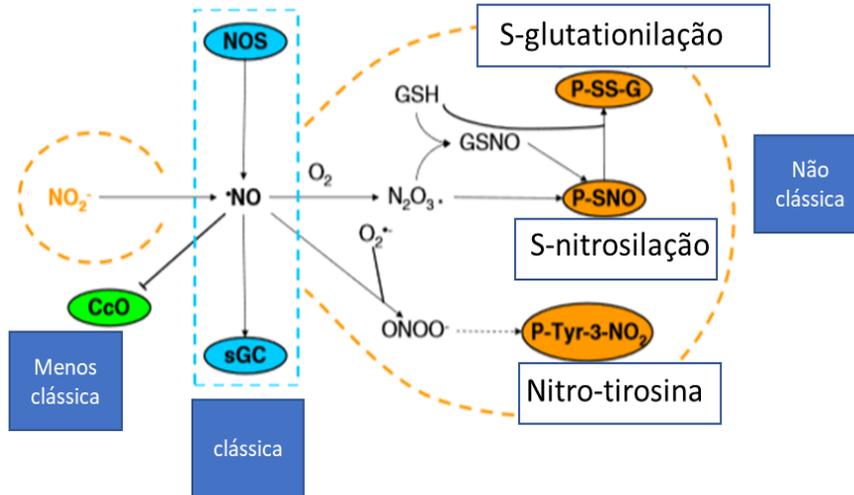


Figura 5: Visão geral dos mecanismos de sinalização clássica, menos clássica e não clássica induzidos pelo NO.

Fonte: Adaptado de (Martinez-Ruiz et al., 2011)

A sinalização de NO pode ser de curto e de longo alcance. A sinalização clássica do NO, como a ativação da sGC, pode ser exercida a uma distância relativamente longa das fontes de NO (enzimas NOS), mesmo que a concentração de NO diminua enquanto os alvos estão mais longe da NOS. Foi sugerido que a S-nitrosilação de proteínas alvo (TP) é essencialmente um mecanismo de curto alcance, limitado para uma pequena esfera em torno do NOS. Entre outros fatores, a formação de RNS requer maior concentração de NO mais fáceis de alcançar no ambiente NOS (isto é mais claro em proteínas que interagem, IP), e as denitrosilases, tais como Trx ou GSNOR com GSH, podem estreitar a gama de ação reduzindo a S-nitrosilação da proteína alvo (Martinez-Ruiz *et al.*, 2013) (Figura 6).

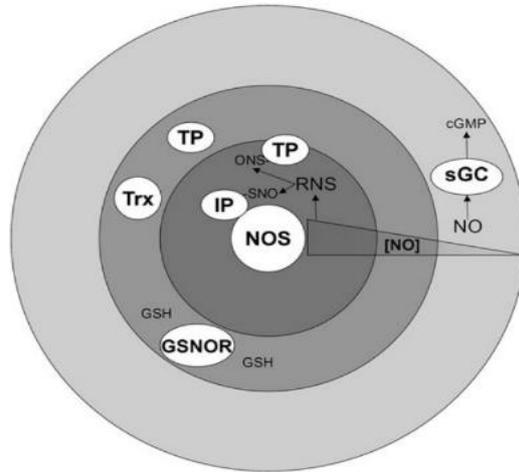


Figura 6: Sinalização por NO de longo e curto alcance.

TP: Proteínas alvo; Trx: Tioredoxina; NOS: NO sintase; IP: ; RNS: espécies reativas de oxigênio; GSNOR: S-nitrosoglutationa redutase ; GSH: *glutationa*; sGC: guanilato ciclase; *GSH*: *glutationa*.

Fonte: Adaptado de (Martinez-Ruiz et al., 2013)

[ja1] Comentário: Adicionar na legenda Nomenclatura da abreviação: TP, TRx, etc

1.7.1 S-nitrosilação (S-nitrosação) de proteínas

A modificação pós-traducional por S-nitrosilação acontece pela adição de espécies derivadas do NO em resíduos de cisteína, podendo alterar diversas atividades biológicas. Estima-se que cerca de 1000 proteínas compõem o chamado nitrosoproteoma de uma célula. Entre os possíveis efeitos da S-nitrosilação está a mudança do estado redox dos grupos –SH, importantes na estabilização da estrutura terciária e função de proteínas envolvidas em resposta ao estresse, balanço redox, citoesqueleto e na regulação do metabolismo (Stamler *et al.*, 1992; Yemets *et al.*, 2011). A S-nitrosilação de proteínas é considerada um dos mecanismos mais frequentes da sinalização não clássica de NO e tem sido considerada tão relevante quanto o de fosforilação de proteínas. No entanto, em muitos casos, a S-nitrosilação é uma etapa intermediária na formação de modificações mais estáveis, como a formação de pontes dissulfeto ou glutationalização (Martinez-Ruiz *et al.*, 2013), o que para alguns autores, correspondem à maioria das mudanças por S-nitrosilação descritas em um nitrosoproteoma.

Diversos mecanismos não enzimáticos têm sido propostos para a formação

de nitrosotióis, como a reação direta de NO com o radical tiil já formado, ou com derivados da reação do NO com O₂, que produzem uma série de óxidos de nitrogênio, com diferentes estados de oxidação para os átomos de N. O N₂O₃ é considerado um dos principais agentes nitrosilantes produzindo nitrito e nitrosotiois (Martinez-Ruiz *et al.*, 2013), o que é principalmente influenciado pela concentração de NO presente, onde proteínas em regiões próximas à enzima NOS estão sujeitas a esse tipo de modificação como citado anteriormente.

Outro mecanismo de S-nitrosilação de proteínas é a transferência do grupo nitroso, um processo conhecido como transnitrosilação, que pode ocorrer entre grupos de baixa massa molecular e proteínas ou entre proteínas. O mecanismo de transnitrosilação entre proteínas explicou a presença de proteínas S-nitrosiladas no núcleo, apesar da baixa concentração de óxido nítrico nesse compartimento. Verificou-se que a proteína GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), citossólica é translocada para o núcleo após ser modificada por S-nitrosilação, sendo capaz de nitrosilar outras proteínas alvo, como fatores de transcrição (Kornberg *et al.*, 2010).

Alguns motivos de consenso foram descritos para S-nitrosilação, incluindo aqueles em que o resíduo de cisteína está adjacente a resíduos básicos, ácidos ou aromáticos na sequência primária ou estrutura terciária da proteína (Ahern *et al.*, 2002; Anand e Stamler, 2012).

A remoção do grupo nitroso é outro aspecto importante na sinalização por S-nitrosilação e é denominado denitrosilação. Esse processo parece ser mediado por fatores enzimáticos e não enzimáticos (Jortzik *et al.*, 2012).

É geralmente aceito que a S-nitrosilação é uma modificação lábil e os níveis de nitrosotiois celulares são baixos, devido a um rápido turnover. A denitrosilação foi primeiramente concebida como um processo espontâneo, e vários mecanismos não enzimáticos de denitrosilação foram descritos que poderiam potencialmente agir *in vivo*. Estes incluem reações mediadas por compostos nucleofílicos, tais como íons de metais de transição, espécies reativas de oxigênio (ROS) e ascorbato (Stamler e Toone, 2002).

Evidências acumuladas na literatura mostram que várias enzimas podem catalisar a denitrosilação *in vitro* (Hou *et al.*, 1996) e *in vivo* (Liu *et al.*, 2001). Essas enzimas podem contribuir para limitar espacialmente a ação dos eventos de S-nitrosilação, ajudando a manter sua localização subcelular próxima às fontes de NO

e proteger as células da S-nitrosilação "excessiva", como, por exemplo, quando ocorre a indução da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nas células imunes como defesa contra patógenos (Hernansanz-Agustin *et al.*, 2013). Além disso, essas enzimas podem atuar sobre conjuntos definidos de proteínas do substrato, fornecendo outro mecanismo de regulação da sinalização celular. GSNO reductase e o sistema de tioredoxina são os principais mecanismos enzimáticos de denitrosilação descritos (Reiter e Lefkowitz, 2006; Sengupta *et al.*, 2007; Benhar *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011) e estão esquematizados nas Figuras 7 e 8.

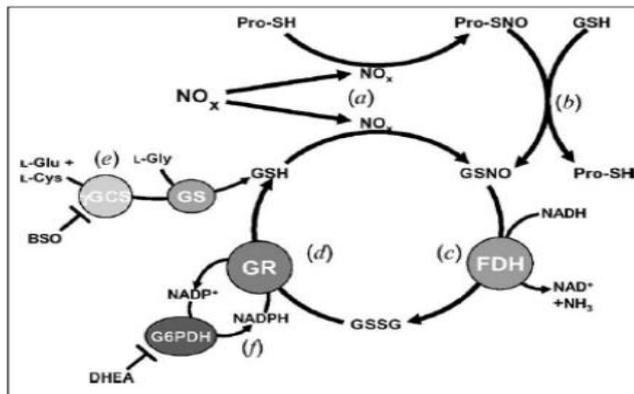


Figura 7. Esquema de denitrosilação de proteínas dependente de glutatona.

GSH: glutatona; GSNO: S-nitrosoglutatona; BSO: Lb-buthionine-(S,R)-sulfoximine; Glicose 6-Fosfato desidrogenase; FDH: Formaldeído Desidrogenase; GR: Glutaciona Redutase; DHEA: dehidroepiandrosterona.

Fonte: (Haqqani *et al.*, 2003).

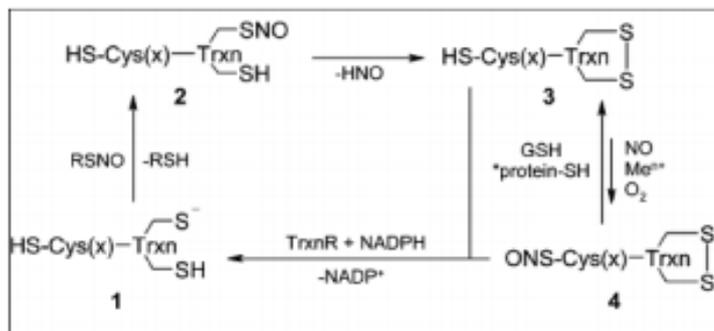


Figura 8. Esquema de denitrosilação de proteínas dependente do sistema de Tioredoxina redutase.

GSH: glutatona; TrxnR: Tioredoxina redutase; Trxn: Tioredoxina; RSNO: proteínas nitrosiladas.

Fonte: (Sengupta *et al.*, 2007).

1.7.2 Nitração de proteínas

A nitração de proteínas ocorre principalmente com a incorporação de um grupo nitro (-NO₂) na posição 3 do grupo fenólico da tirosina, formando 3-nitrotirosina. É uma modificação bastante estável, com meia vida longa *in vitro*, podendo resultar em ganho ou perda de função da proteína. Ocorre através do agente nitrante ONOO⁻, que, como especificado acima, é produzido intracelularmente a partir de NO (Radi, 2004). No entanto, ONOO⁻ não é o único agente de nitração possível, e vários caminhos foram descritos envolvendo diferentes espécies reativas (Hernansanz-Agustin *et al.*, 2013), todos dependentes da presença de RNS e agentes oxidantes (ou NO₂⁻ e oxidantes na presença de peroxidases ou metais). Apesar de ser uma modificação não enzimática, em condições fisiológicas somente poucas tirosinas na proteína são nitradas (frequentemente uma ou duas), assim como poucas proteínas na célula são nitradas (cerca de 110 ou menos), mostrando especificidade nessa oxidação (Batthyány *et al.*, 2017). Também parece haver seletividade na distribuição subcelular de proteínas nitradas, que se encontram enriquecidas na mitocôndria (Wang *et al.*, 2006), o que pode ser explicado pelo aumento da produção de superóxido e a presença de centros metálicos nessa organela que poderiam promover as vias de nitração.

O papel da 3-nitrotirosina em vias de sinalização celular é ainda um tópico que precisa ser melhor estudado, pouco se sabendo sobre sua regulação. A presença de denitrases específicas na célula e seu possível papel precisa ser confirmado (Martinez-Ruiz *et al.*, 2011; Batthyány *et al.*, 2017). Atividade de tirosina-denitrase foi descrita em extratos de baço e pulmão de rato (Kamisaki *et al.*, 1998), além de uma possível atividade de tirosina-denitrase em proteínas específicas, como em Histona H1.2 (Irie *et al.*, 2003).

A nitração de proteínas foi relacionada a diferentes funções, como por exemplo a um sinal para poliubiquitinação e posterior degradação da proteína no proteossoma (Souza *et al.*, 2000), à modulação da atividade de enzimas, por diminuir o pKa da tirosina de 10,1 para 6,8 (pKa muito próximo da histidina, aminoácido importante em catálises ácido-base); ao controle da fosforilação de tirosina pelo aumento de cadeia lateral (Abello *et al.*, 2009); à alteração da imunogenicidade da proteína. Essas alterações são mais evidentes quando

acontecem em um resíduo de tirosina presente no sítio ativo, como é o caso da MnSOD mitocondrial (tirosina 34), uma modificação que foi descrita em vários patologias (Macmillan-Crow e Cruthirds, 2001; Pittman *et al.*, 2002). A MnSOD é uma das enzimas que acelera a decomposição do $\bullet\text{O}_2^-$; uma vez que este reage rapidamente com o NO, produzindo ONOO⁻. Esta reação é relevante não apenas devido às consequências da formação do ONOO⁻, incluindo a nitração de tirosinas, mas também porque pode limitar a biodisponibilidade do NO para a via de sinalização clássica de NO.

A nitração da tirosina não significa necessariamente uma perda de atividade enzimática, fato este que aumenta seu papel potencial como uma PTM fisiológica. Um exemplo disto é a proteína quinase C, isoforma ϵ (PKC ϵ), que após nitração aumenta sua afinidade por RACK2, que ativa a PKC ϵ permitindo a sua translocação para o núcleo e consequente fosforilação de proteínas alvo (Balafanova *et al.*, 2002). Outro exemplo é o ganho de função biologicamente relevante da Glutathione S-transferase 1 microsomal, com aumento de sua atividade de detoxicação após nitração no resíduo da tirosina 92, funcionando como um sensor de dano por NRS (Ji *et al.*, 2006).

Embora na literatura tenham sido descritas modificações no perfil de proteínas nitradas em diversas situações fisiológicas e fisiopatológicas, como na defesa em vegetais como *A. thaliana* (Ceconi *et al.*, 2009) e em diferentes fases do ciclo celular em mamíferos (Jia *et al.*, 2011), não é claro em ambos os casos se a nitração das proteínas participa de algum evento relevante ou se ela é consequência de, por exemplo, uma maior atividade de NOS.

1.7.3 S-nitrosilação (S-nitrosação) e nitração em protozoários.

Além da alteração de proteínas por óxido nítrico com possível papel fisiológico, é importante levar em consideração também o mecanismo de sobrevivência utilizado pelo parasita contra os danos oxidativos causados pela célula hospedeira, como por exemplo durante o *burst* oxidativo de macrófagos durante a infecção. Proteínas como tripanotiona e tripanotiona redutase, tioredoxina e tioredoxina redutase, entre outras, devem atuar contra os danos oxidativos nos tripanosomatídeos. Tripanotiona, sintetizada a partir de espermidina e glutathione, tem papel biológico semelhante à glutathione e pode coordenar em seu átomo de ferro,

dois radicais NO• (Bocedi *et al.*, 2010).

A função de NO na sinalização celular em tripanosomatídios foi pouco explorada. A presença de NOS foi descrita em *Leishmania* (Genestra *et al.*, 2006), *T. cruzi* (Paveto *et al.*, 1995; Goldstein *et al.*, 2000, Pereira *et al.*, 2015) e outros parasitas que infectam humanos, tais como *Toxoplasma gondii* e *Schistosoma mansoni* (Jortzik *et al.*, 2012).

Em *T. cruzi*, a atividade de NOS, passível de ser inibida por L-NG-Nitroarginine methyl ester (L-NAME), um inibidor competitivo da NOS (Paveto *et al.*, 1995) foi determinada em epimastigotas e caracterizada como análoga à isoforma neuronal de mamíferos, com base em dados de microscopia eletrônica de transmissão utilizando anticorpos policlonais anti-nNOS conjugados a ouro coloidal (Goldstein *et al.*, 2000). Não há, no entanto, no genoma de *T. cruzi* uma NOS típica. Também não foi determinada a via de sinalização do NO•intracelular, pois não foi identificada uma guanilato ciclase típica em seu genoma. Supõe-se que esta atividade seja exercida por uma adenilato ciclase, uma vez que esta enzima possui um domínio putativo de guanilil ciclase (Alexandre *et al.*, 1990; Laxman e Beavo, 2007). Nesse contexto, a degradação de mononucleotídeos cíclicos se dá por fosfodiesterases, sendo que em *T. cruzi* quatro famílias desta enzima já foram identificadas, sendo que uma das fosfodiesterases possui atividade dupla, sendo capaz de clivar tanto cAMP quanto cGMP, com Km semelhantes (Kunz *et al.*, 2005).

Tem-se conhecimento de que compostos doadores de óxido nítrico são capazes de nitrosilar proteínas-chave de diversos parasitas, como *T. cruzi* e *P. falciparum*, inibindo-as e tornando os parasitas inviáveis (Jortzik *et al.*, 2012). É o caso da S-nitrosilação de cisteína proteases, como cruzipaina, importantes para esses parasitas (Venturini *et al.*, 2000). É válido notar que a infecção por *T. cruzi* induz a uma maior nitratação em tirosina nas proteínas no hospedeiro, uma provável consequência da maior produção de NO e superóxido, que originam o peroxinitrito, um agente nitrante. Porém, o perfil das proteínas modificadas sugere que as proteínas nitradas auxiliam na sobrevivência do parasita por modularem negativamente as funções destas proteínas da célula hospedeira (Dhiman *et al.*, 2008).

Nosso laboratório mostrou recentemente o papel do óxido nítrico na modificação pós-translacional de proteínas como consequência da adesão de

tripomastigotas à matriz extracelular (ECM) da célula hospedeira: diminuição da atividade de NOS, da concentração de NO e de cGMP, assim como a diminuição dos níveis de nitração e S-nitrosilação de proteínas (Pereira *et al.*, 2015).

Em resumo, as alterações descritas - nitração, S-nitrosilação- ou outras modificações envolvendo resíduos de cisteína- foram muito pouco estudadas em parasitas, incluindo sua presença durante a amastigogênese em *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito do meio externo (pH) na sinalização celular no processo de amastigogênese de *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o perfil de S-nitrosilação e nitração de proteínas ao longo da amastigogênese.
2. Determinar o perfil de fosforilação de proteínas ao longo da amastigogênese
3. Determinar os níveis de nucleotídeos cíclicos e de fosforilação de quinases (PKA, e MAPK) e fosfatase (PP2A) ao longo da amastigogênese.

3 METODOLOGIA

3.1 MANUTENÇÃO DO *T. CRUZI*

Formas tripomastigostas de *T. cruzi*, cepa Y, foram mantidas por infecção de células LLC-MK2 em meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (FBS) . Após cinco dias de infecção, os parasitas liberados para o meio foram coletados, lavados três vezes em PBS, ressuspensos na densidade celular adequada em meio MEM- 2% SFB e utilizados nos respectivos experimentos.

3.2 PURIFICAÇÃO DOS TRIPOMASTIGOTAS:

Os parasitas no estágio de tripomastigota presentes no sobrenadante de cultura foram isolados das formas amastigotas e de restos de células hospedeiras por filtração em coluna contendo a resina DEAE-celulose. Em uma seringa de 20 ml foi adicionada a resina, até um volume de 5-7 ml. A coluna foi equilibrada com 30 ml de tampão PS (tampão fosfato de sódio 5 mM pH 8.0 contendo NaCl 7,3 mM), seguido por 20 ml de tampão PSG (tampão de PS adicionado com Dextrose a 1%). Os parasitas do sobrenadante da cultura foram centrifugados (7000 x g, 12 minutos a 4 °C, numa centrífuga Sorvall), ressuspensos em tampão PSG na concentração de 1×10^9 / ml, e então submetidos à filtração em coluna contendo DEAE-celulose. As formas tripomastigotas coletadas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos e ressuspensas conforme descrito a seguir (Contreras et al., 2002).

3.3 INDUÇÃO DA AMASTIGOGÊNESE:

As formas tripomastigotas purificados na concentração 1×10^8 /ml foram ressuspensas no meio que induz a amastigogênese MEMTAU3AG pH 6.0 ou pH 7,4 (controle), que consiste em 50% de MEM suplementado com 10% de FBS e 50% de TAU3AG (TAU- Urina artificial de triatomíneo- suplementado com 10 mM L-prolina, 50 mM L-glutamato, 2 mM L-aspartato, 10 mM glicose) e pH ajustado com 15 ml de tampão MES 20 mM (N-morfolinoetanossulfônico) (Contreras et al.,2002; Tomlinson et al.,1995). Os parasitas foram incubados em MEMTAU3AG em pH 6.0 ou pH 7.4 a 37 °C e 5% de CO₂, e foram retiradas aliquotas em diferentes tempos no intervalo de

0 a 24 horas, ou como indicado. O tempo zero das figuras corresponde ao zero experimental, que corresponde a 1-3 minutos no meio de diferenciação antes da centrifugação do parasita.

3.4 FRACIONAMENTO DO PARASITA:

O precipitado de parasitas, na concentração 1.10^8 por ponto experimental, foi fracionado utilizando 100ul de tampão de lise (Tris-HCl 500 mM, pH 8, NaCl-150mM e CHAPS 1%) na presença de cocktail de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich) e inibidores de fosfatase (5 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 e 50 μ M β -Glicerofosfato) e acrescido de 1 mM de phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF). Em seguida foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A fração solúvel foi coletada, e à fração insolúvel (precipitado) foram adicionados 100 ul de tampão de lise e o material submetido a sonicação antes do uso.

[ja2] Comentário: Samantha- nao tem inibidor de fosfatase

3.5 SDS-PAGE E WESTERN BLOT:

SDS-PAGE e immunoblotting são rotina no laboratório. Os parasitas foram preparados de acordo com o processo de fracionamento (descrito acima) ou extrato total, dependendo do experimento. O extrato total foi obtido ressuspendendo-se 1.10^8 parasitas em 200ul de tampão de lise (Tris-HCl 500 mM, pH 8, NaCl- 150mM e CHAPS 1%; em caso de condições redutoras, Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris-HCl e, quando em condições redutoras, acrescido de 10% de 2-Mercaptoetanol). A quantidade de proteína foi normalizada pela técnica de Bradford no caso da fração solúvel e no caso do precipitado ou do extrato total do parasita, pela densitometria de bandas do gel corado com Coomassie Coloidal, que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v).

As amostras foram submetidas a SDS-PAGE em 10% de acrilamida, e subsequentemente transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 μ m durante 1 horas a 100 V ou por 15 horas a 15 V. Após a transferência, as membranas foram coradas com ponceau e digitalizadas. Em seguida, as membranas foram lavadas com PBS-Tween (tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 140 mM e Tween

20 a 0,05%) 5 vezes por 5 minutos e bloqueadas com PBS-Tween com 3% de BSA (Soro Bovino) durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose, (*immunoblotting*) foram incubadas com os anticorpos primários de interesse descritos abaixo diluídos em PBS-Tween com 1% de BSA por 15 horas (overnight), Após as lavagens da membrana com PBS contendo 0,05% de Tween 20, ela foi incubada com o anticorpos secundários adequados, anti-IgG conjugados a peroxidase diluídos em PBS-Tween com 1% de BSA por 1 hora à temperatura ambiente e revelados por quimioluminescência (ECL).

Densitometria: Com o auxílio do *software ImageJ* estimou-se a área das bandas correspondentes as proteínas de interesse presentes nas membranas coradas com *Ponceau* (marcador de proteína), e nas membranas após a revelação pela técnica de Western Blotting. Para cada *lane* a expressão da proteína de interesse foi determinada pela razão entre a medida de área das bandas encontradas na técnica de *Western Blot* e a área das bandas encontradas na membrana corada com *Ponceau*.

Anticorpos e diluições utilizados:

Anti-PAR Mab (anticorpo monoclonal produzido em nosso laboratório), obtido em camundongo, específico para proteína *Paraflagelar Rod* presente no flagelo do *T. cruzi* (70 kDa); 1:2000.

Anti-PP2A α (SAB4502298 Sigma-Aldrich): produzido em coelho, policlonal e específico contra a isoforma α da subunidade catalítica da PP2A,(35 kDa); 1:1000.

Anti-MAPK (#4695 Cell Signaling): produzido em coelho, monoclonal e específico contra a subunidade catalítica da p44/42 MAPK (42-44 kDa); 1:1000.

Anti-P-MAPK (#4370 Cell Signaling): produzido em coelho, monoclonal, específico para fosfopeptídeos próximos da região (Thr202/Tyr204) da p44/42 MAPK (42-44 kDa); 1:1000.

Anti-Phospho PAN (# 61-8300 Invitrogen): produzido em coelho, policlonal, específico para peptídeos fosforilados em seus resíduos de treonina, serina e tirosina; 1:1000.

Anti-PKA C- α total (#5842 Cell Signaling): produzido em coelho, monoclonal, específico para PKA C- α total produzido a partir de peptídeo próximo ao resíduo de Ser326 da PKA C- α (42 kDa); 1:1000.

Anti-PKA α /beta/gama fosforilado (ab75991 abcam): produzido em

coelho, monoclonal, reconhece a PKA alpha/beta/gama (subunidade catalítica) fosforilada no resíduo de treonina fosforilado (42 kDa); 1:1000.

Anti-Nitrotirosina (# A-21285 Invitrogen): policlonal produzido em coelho a partir de Hemocianina contendo tirosina nitradas; 1:1000.

Anti-S-Nitrosocisteína (ab94930 abcam): produzido em camundongo, monoclonal, BSA conjugada a uma pequena molécula correspondente a S-nitrosocisteína; 1:1000.

3.6 IMUNOPRECIPITAÇÃO

A imunofluorescência iniciou-se adicionando 50 µl de agarose conjugados a proteína A foram lavados três vezes com PBS (Tampão fosfato-salino) por centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos, seguido de incubação com o anticorpo de interesse (concentração utilizada de acordo com o fabricante) ou com 1 ml de sobrenadante de cultura de hibridoma (anti-PAR), por 2 horas a 25 °C. O extrato protéico de interesse foi adicionado e incubado a 8 °C por 16 horas, seguido de três vezes lavagens com tampão de lise (Tris-HCl 500 mM pH 8, NaCl- 150mM e CHAPS 1%) para a retirada do material que não se ligou à resina. Finalizando a resina foi ressuspendida em tampão de Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris-HCl e, quando em condições redutoras, 10% de 2-Mercaptoetanol) e fervida por 5 minutos a 100 °C. As proteínas foram então separadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidas à técnica de *western blot*. ou coloração por Coomassie Coloidal.

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA:

Amostras de parasitas (5×10^7) foram fixadas em paraformaldeído a 2% por 15 minutos à temperatura ambiente, lavadas por centrifugação (5.000 xg por 5 minutos), ressuspendidas em 500 ml de PBS, adicionados 10 µl da amostra (1×10^6 Ty) nas lâminas de 10 poços apropriadas para imunofluorescência e deixadas a secar por 1 hora na estufa a 27 °C. Em seguida foram adicionados a cada poço 20 µl de PBS-Triton (Tris 20 mM, pH 7.6 contendo NaCl 140 mM e 0,1% de Triton X-100) por 5 minutos. Após tratamento com a solução de bloqueio (20 µl da solução de PBS com BSA a 1%) por meia hora, cada poço foi coberto com 20 µl do anticorpo

primário de interesse diluído em PBS com BSA 1% e incubado durante a noite. Após lavagens exaustivas com PBS, os correspondentes anticorpos secundários foram adicionados, seguido por 45 minutos de incubação a 25 °C. Após lavagens sucessivas em PBS, as lâminas foram coradas com DAPI adicionando 20 ul da solução. Após uma lavagem adicional, foram adicionadas 3 gotas da solução de *fluoroment* finalizando com o selamento da lâmina. As imagens foram feitas em uma câmera ExiBlue™ (Qimaging®) acoplada a um microscópio óptico Nikon Eclipse E 600 e deconvoluídas utilizando o software Huygens Essential (Scientific Volume Imaging).

Densitometria: A intensidade de fluorescência e o número de células presentes no campo foi mensurada utilizando o *software ImageJ*. Através da razão entre a medida de fluorescência e quantas célula haviam determinou-se a média de intensidade de fluorência por célula em cada campo.

[ja3] Comentário: Colocar a metodologia

Anticorpos e diluições utilizados:

Anti-PAR Mab (anticorpo monoclonal produzido em camundongo em nosso laboratório): específico para proteína *Paraflagelar Rod* presente no flagelo do *T. cruzi*; 70 kDa; 1:700.

Anti-S-Nitrosocisteína (ab94930 abcam): produzido em camundongo, monoclonal, BSA conjugada a uma pequena molécula correspondente a S-nitrosocisteína; 1:100.

Anti-Phospho PAN (# 61-8300 Invitrogen): produzido em coelho, policlonal, específico para fosfopeptídeos fosforilados em seus resíduos de treonina serina e tirosina; 1:100.

Anticorpos secundários: Alexa-fluor 488 anti- IgG de coelho (1: 100); Alexa-fluor 555 anti- IgG de camundongo (1: 500).

DAPI concentrado: Marcador nuclear (de 500ul de 50% de glicerol em água MilliQ, 2 mM de azida de sódio e 10 µg de DAPI-4',6'-diamino-2-fenil-indol) na diluição de 1:1000

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE S-NITROSOTIÓIS TOTAIS

Nitrosotiois totais foram quantificados através do método de Griess após redução de SNO por HgCl₂, como descrito por Cook (COOK et al.,1996). Foram utilizados cerca de 1.10⁹ tripomastigotas de *T. cruzi*, em diferentes tempos de

contato com o meio de diferenciação com seus respectivos pHs. Após lavagens e extração de proteínas como descrito no item 3.4 (utilizando cerca de 200 μL de solução de extração), a fração insolúvel foi removida por centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos., e o sobrenadante coletado. Em seguida, misturou-se o extrato proteico em solução de 57 mM de sulfanilamida e 1,2 mM de *N*-(1-Naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDD) em PBS pH 7,4, na proporção de 1:10. Em seguida, 200 μL desta mistura foram aplicados em uma placa de 96 poços, e a reação foi iniciada pela adição de 2 μL de 10 mM de HgCl_2 (concentração final 100 μM). Para cada grupo, foram feitos controles sem a adição de cloreto de mercúrio, utilizados para se descontar a absorbância causada por NO presente na amostra antes da redução de SNO. A curva padrão de SNO realizada foi feita com concentrações crescentes de nitrosoglutationa adquiridas comercialmente (SIGMA).

3.9 DOSAGEM DE AMPc E GMPc

[ja4] Comentário: Vc nao colocou???

A determinação dos níveis de AMPc e GMPc foi medida em extratos de *T. cruzi* (5×10^8 células em cada poço) de acordo com as instruções dos testes comerciais da EIA Biotrak™ (GE Healthcare), um para o AMPc e outro para GMPc, com esses dois kits realizou-se um sistema de ensaio imunoenzimático competitivo representado no esquema abaixo

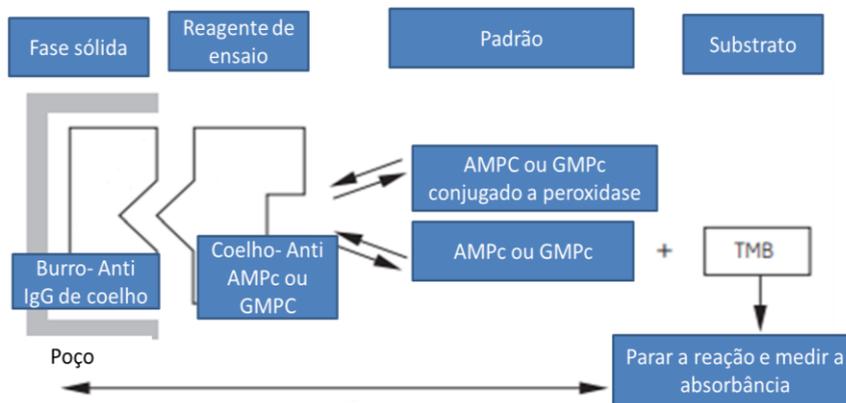


Figura 9: Princípio do ensaio imunoenzimático

Esse kit combina o uso de um conjugado AMPc ou GMPc marcado com peroxidase, um anti-soro que pode ser imobilizado em microplacas pré revestidas, e uma solução de substrato estabilizado.

Fonte: Adaptado do Manual EIA Biotrak™ (GE Healthcare).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE AMASTIGOGÊNESE EXTRACELULAR

O processo de amastigogênese extracelular foi estudado em meio axênico, em diferentes tempos, incubando-se os parasitas em meio de diferenciação MEM:TAU3AG ajustado para pH 6.0 (Contreras et al.,2002 e Tomlinson et al.1995) ou pH 7.4 (controle). As alterações morfológicas de tripomastigotas, como descrito na literatura, são mostrados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 10), nos tempos de 6 e 24 h (dados prévios obtidos por Larissa ABV Fonseca em nosso laboratório). Além de tripomastigotas e amastigotas, também podem ser observadas formas entre os dois estágios e algumas vesículas próximas ao parasita.

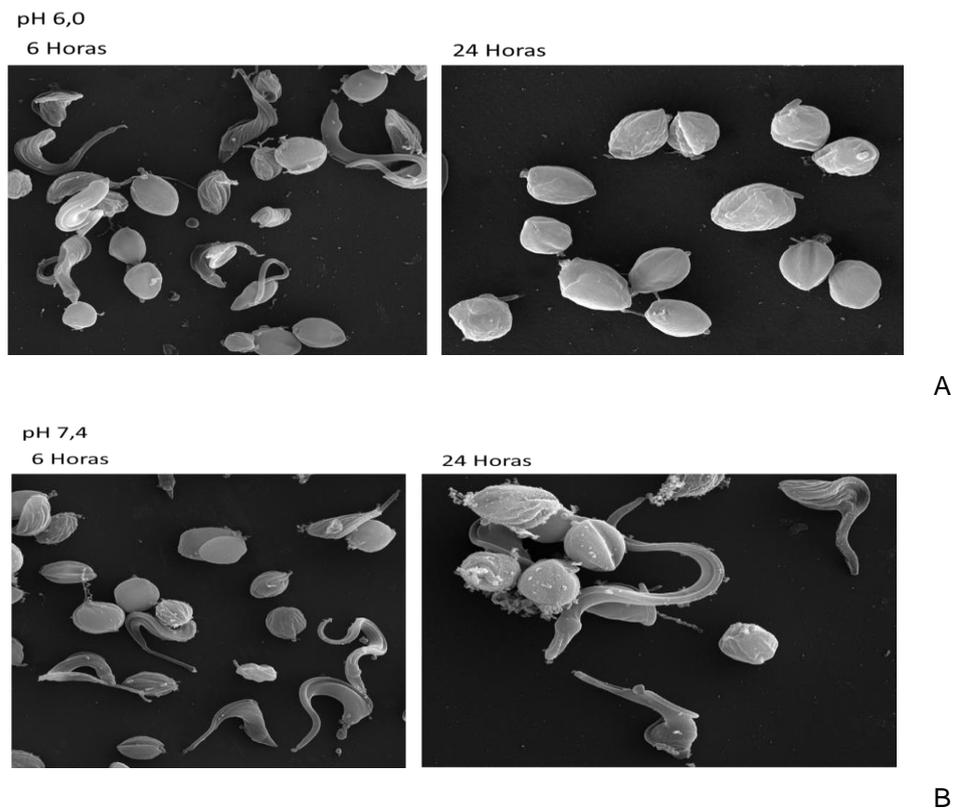
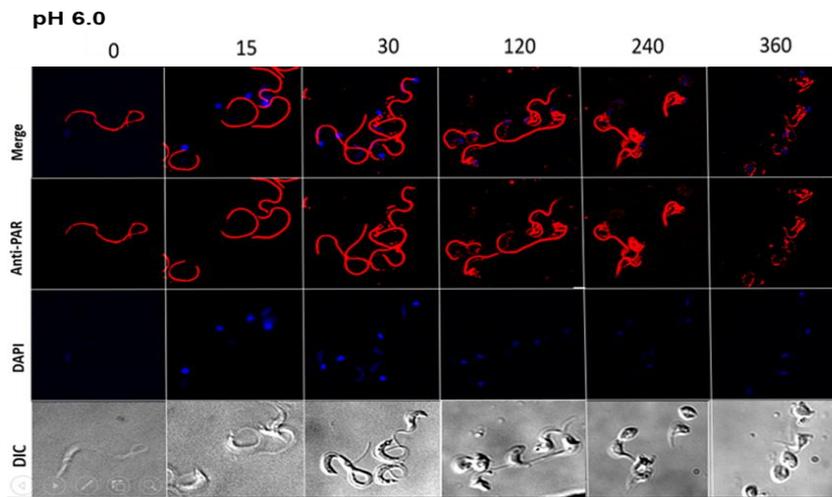


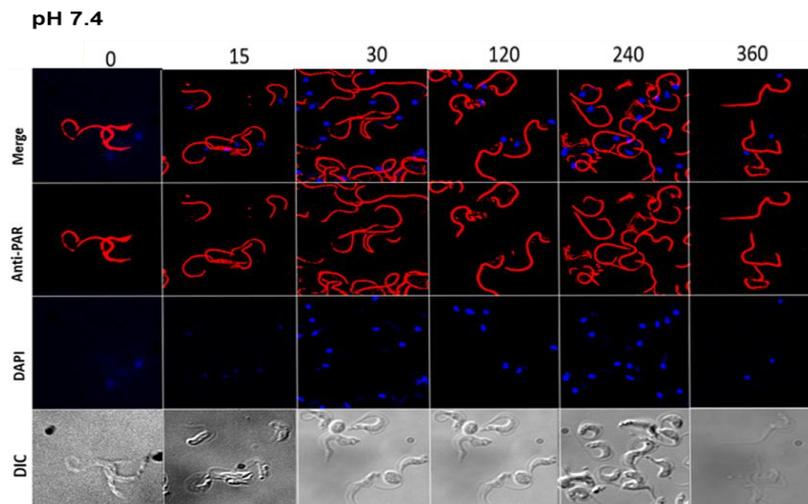
Figura 10: Análise morfológica durante a amastigogênese em pH 6.0 (A) e 7.4 (B) pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.

São mostrados os pontos de 6 e 24 hs de incubação. Fonte: Larissa ABV Fonseca

As mudanças na morfologia celular foram confirmadas por imunofluorescência indireta. Como a alteração de morfologia mais explícita é a perda do flagelo, analisamos ao longo do tempo a expressão da proteína *Paraflagellar Rod* (PAR) presente no flagelo através das técnicas de imunofluorescência (Figura 11) e *Western Blot* (Figura 13).



A



B

Figura 11: Expressão de PAR durante a amastigogênese em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 (A) e 7.4 (B) detectada pela técnica de Imunofluorescência indireta.

Parasitas fixados com 2% de paraformaldeído e incubados com o anticorpo monoclonal anti-PAR (vermelho); núcleo corado com DAPI (1:100). Números no topo da figura correspondem ao tempo (em minutos) ao longo da amastigogênese.

As Figuras 9 e 10 mostram a mudança morfológica dos parasitas em pH 6.0, mais representativa aos 360 minutos, quando comparado ao controle em pH 7.4. O parasita em pH 6.0 adquiriu uma forma arredondada, característica do amastigota, e a proteína do flagelo (PAR) passou a se localizar, pelo menos em parte, no citosol da célula. Os protozoários presentes no meio em pH 7.4, a proteína PAR continua acompanhando o flagelo e a maioria das células é constituída por tripomastigotas.

A quantificação das formas tripomastigotas (morfologia delgada em forma de S ou C) e amastigotas (forma esférica e oval, com flagelo muito curto) identificadas nas imagens em DIC (contraste de interferência diferencial) da Figura 11 é mostrada na Figura 12.

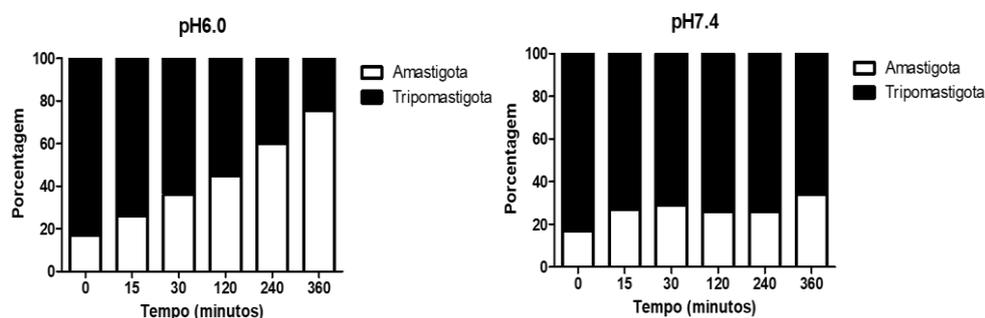


Figura 12: Relação de Tripomastigotas e Amastigotas durante a amastigogênese de *T. cruzi* em meio MEM:TAU3AG

Os dois estágios de *T. cruzi* foram quantificados utilizando imagens de campo claro obtidas no o microscópio óptico Nikon Eclipse E 600 e apresentadas nas Figuras 9 e 10.

A expressão de PAR (Figura 13) mostra a diminuição dessa proteína pela técnica de *western blot* em parasitas mantidos em pH 6.0 em relação ao pH 7.4, confirmando os dados anteriores. As Figuras 9, 10 e 11 confirmaram a degradação/despolimerização do flagelo durante a incubação do parasita com o meio MEM: TAU3AG em pH 6.0, em contraste com o controle em pH 7.4, nos tempos de 240-360 minutos analisados.

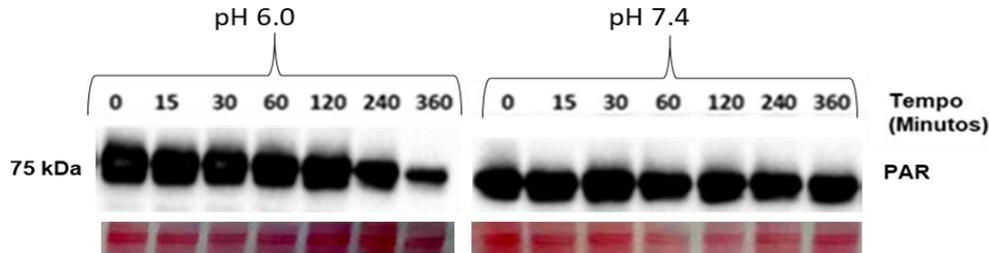


Figura 13: Expressão de PAR em tripomastigotas de *T. cruzi* incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Extrato total correspondendo a 5×10^6 parasitas por canaleta. Anticorpos: anti-PAR-obtido em camundongo (1: 2000); anti-IgG de camundongo (1: 4000). É apresentado um resultado representativo de dois experimentos independentes.

4.2 FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DURANTE A AMASTIGOGÊNESE EXTRACELULAR

Devido à modificação por fosforilação de proteínas em processos de proliferação e diferenciação no *T. cruzi* dependentes de AMPc e PKA descritos na literatura, analisamos o perfil de proteínas fosforiladas, o conteúdo de AMPc, das quinases PKA e MAPK e da fosfatase PP2A), bem caracterizadas em diferentes sistemas e que modulam níveis de fosforilação de proteínas.

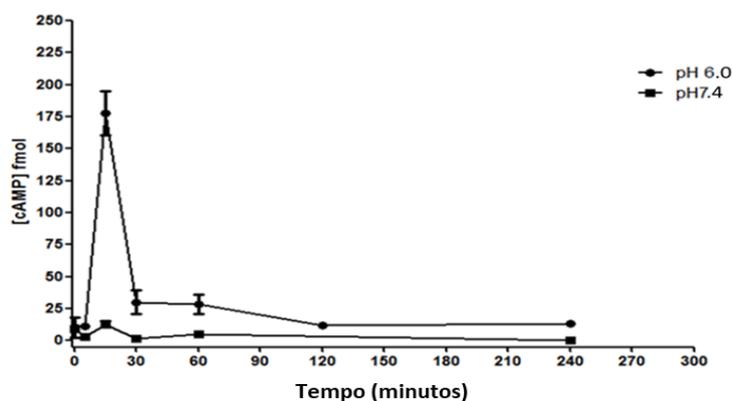


Figura 14: Quantificação de AMPc durante o processo de amastigogênese de *T. cruzi*.

É apresentado um resultado representativo de dois experimentos independentes.

Na Figura 14 observa-se um aumento significativo de AMPc no tempo de 15 minutos de diferenciação em pH 6.0 de aproximadamente 17 vezes, seguido de diminuição, com retorno ao nível inicial em torno de 120 minutos. Já no meio pH 7.4, controle, houve um aumento pouco significativo no tempo de 15 minutos.

Sendo a PKA uma das principais moléculas que respondem ao conteúdo de AMPc em diferentes células, verificamos a expressão da subunidade catalítica, assim como o perfil de fosforilação dessa subunidade durante a amastigogênese através da técnica de *Western Blotting* (Figura 15).

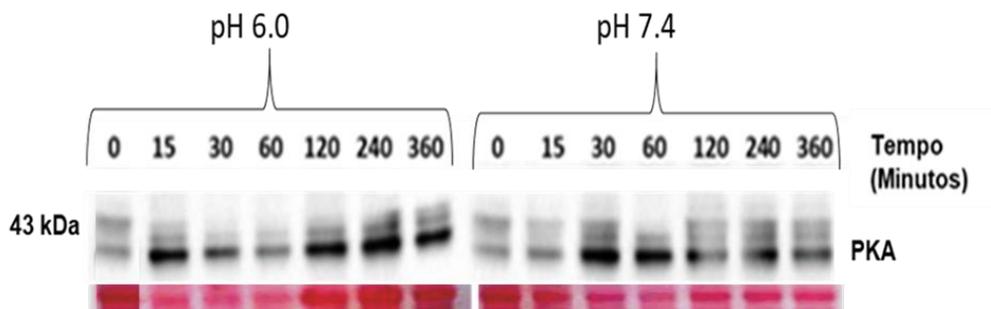


Figura 15: Expressão de PKAc total em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Extrato total correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. *Western blotting*: anticorpos: anti-PKAc obtido em coelho (1: 1000); anti- IgG de coelho (1: 4000). É apresentado um resultado representativo de dois experimentos independentes.

[ja5] Comentário: Colocar fig sem o B

Observa-se em pH 6.0 uma diminuição aparente de PKAc nos tempos de 15, 30 e 60 minutos, e um aumento a partir dos 120- 240 minutos. Já em pH 7.4, a expressão de proteína aumenta no intervalo de 5-30 minutos, mantendo-se, a partir daí, relativamente constante. Os dados sugerem uma variação na expressão de PKAc durante os tempos iniciais/ intermediários da formação dos amastigotas, dado o perfil distinto do controle.

A Figura 16 mostra a expressão da PKA modificada por fosforilação, utilizando um anticorpo específico para avaliar atividade da enzima. Observou-se em pH 6.0 um aumento gradual, discreto, de PKA fosforilada, a partir dos tempos iniciais (15 minutos.) até o tempo de 360 minutos. de diferenciação analisados. Em pH 7.4 há um maior aumento da fosforilação da PKA até 240 minutos, seguido de diminuição em 360 minutos. No entanto a fosforilação de PKA talvez seja um pouco maior nesse período, se levarmos em conta a Figura 14, que mostra uma diminuição

mais acentuada da expressão de PKAc em 15- 30 minutos nos parasitas incubados em pH 6.0.

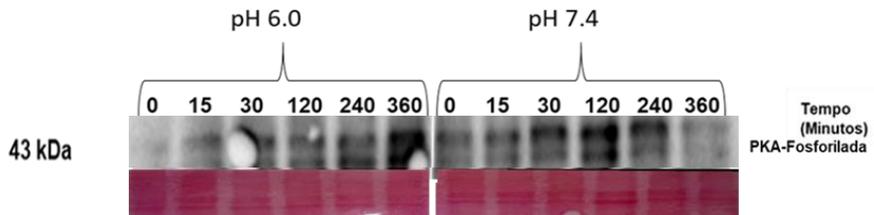


Figura 16: Expressão de PKA -P em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Extrato total correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. *Western blotting*: anticorpos: anti-PKA-P obtido em coelho (1: 1000); anti- IgG de coelho (1: 4000). É apresentado um resultado representativo de dois experimentos independentes.

Outra proteína quinase presente no *T.cruzi*, homóloga a Erk1/2 em mamíferos, pertence ao grupo de quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que autofosforilam seus resíduos duplos de serina e treonina ou os encontrados em seus substratos.

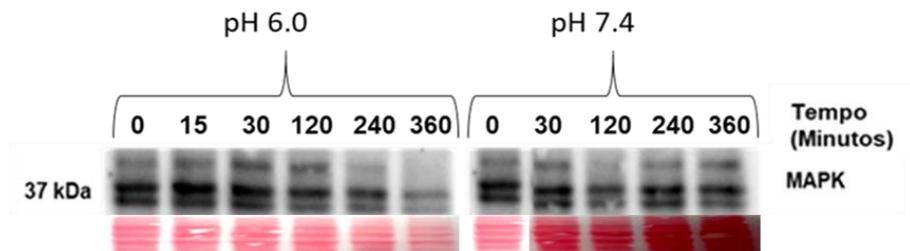


Figura 17: Expressão de MAPK (subunidade catalítica) em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Extrato total correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. *Western blotting*: anticorpos: anti-MAPKc- obtido em coelho (1: 1000); anti- IgG de coelho (1: 4000).

A expressão da subunidade catalítica da MAPK (Figura 17) diminui após 30 minutos em parasitas incubados em pH 6.0, em comparação com observado em pH 7.4, que se mantém mais constante.

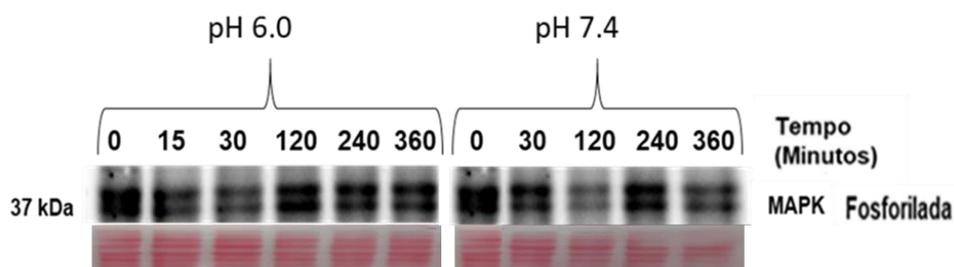


Figura 18: Expressão de MAPK-P em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Extrato total correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. *Western blotting*: anticorpos: anti-MAPK-P obtido em coelho (1: 1000); anti-IgG de coelho (1: 4000).

Já analisando a MAPK fosforilada (Figura 18) pode-se perceber uma diminuição de fosforilação em pH 6.0 nos tempos entre 15 e 30 minutos, seguido de um aumento nos tempos posteriores, mantendo-se praticamente constante até 360 minutos, apesar da diminuição detectada (Figura 17). Em pH 7.4, o perfil assemelha-se ao do pH 6.0, mas com diminuição da fosforilação aos 120 minutos.

A fosforilação total de proteínas durante a amastigogênese foi verificada por imunofluorescência indireta utilizando anticorpos anti-fosfo Pan (anti-fosfo serina, treonina e tirosina) (Figuras 19 e 20). Observa-se uma mudança do perfil de distribuição da fluorescência nos parasitas incubados em pH 6.0, quando comparados ao controle (pH 7.4), nos tempos de 120- 240 minutos ou em 360 minutos, quando um maior número de formas arredondadas, características dos amastigotas estão presentes. Também puderam ser observadas diferenças na localização da fluorescência no corpo e no flagelo do parasita ao longo da amastigogênese.

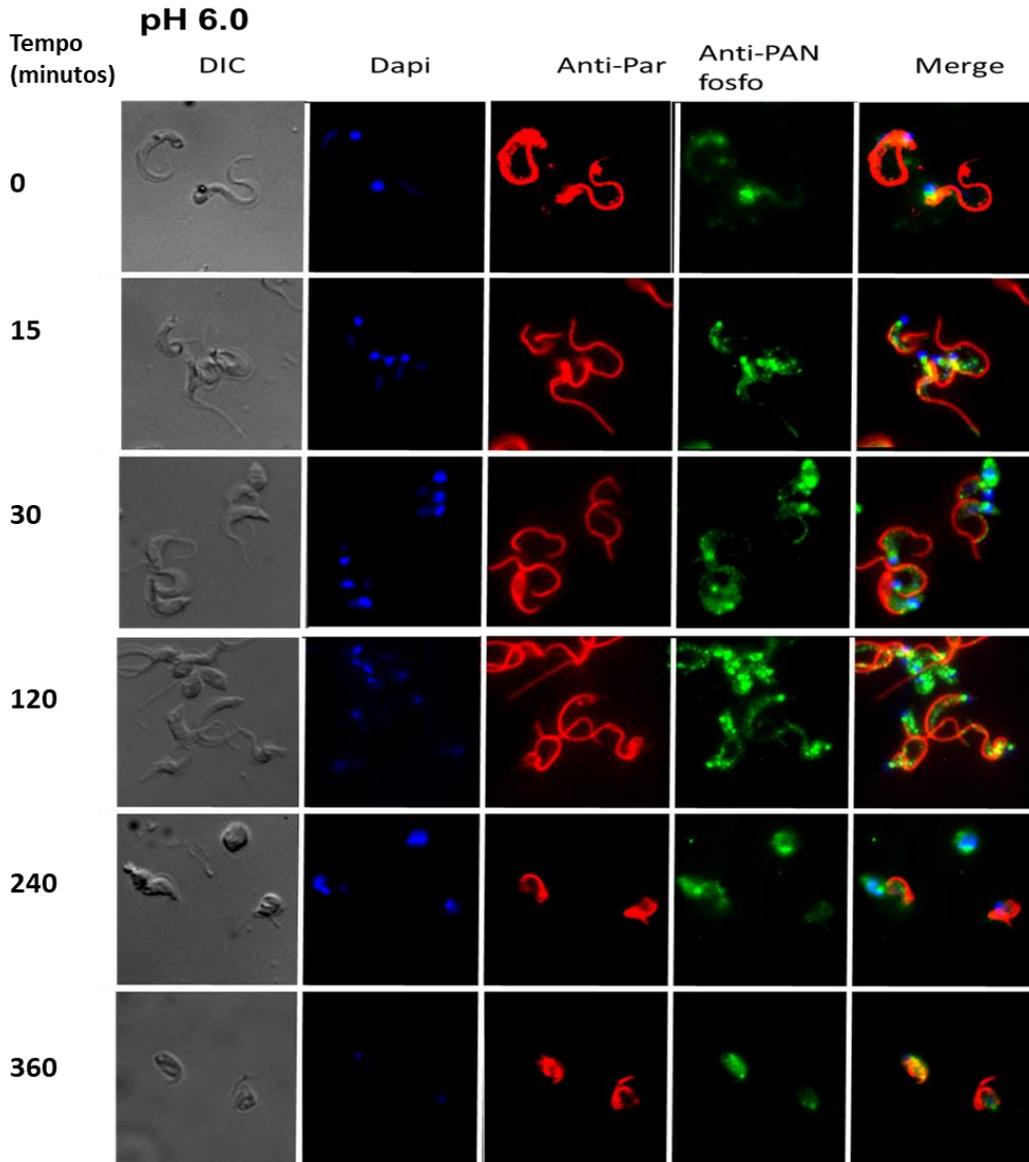


Figura 19: Localização de proteínas fosforiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0, através de imunofluorescência indireta.

Os tripomastigotas foram incubados em MEM:TAU3AG, pH 6.0, fixados com 2% de paraformaldeído (1×10^6) e incubados com anti-fosfo Pan (verde), anti-PAR (vermelho) e DAPI (azul). Imunofluorescência: Anti-PAR, obtido em camundongo, (1: 700); Anti- fosfo PAN, obtido em coelho (1:100); anticorpos secundários: Alexa-fluor 488 anti- IgG de coelho (1: 500); Alexa-fluor 555 anti-IgG de camundongo (1: 100), DAPI: (1:100).

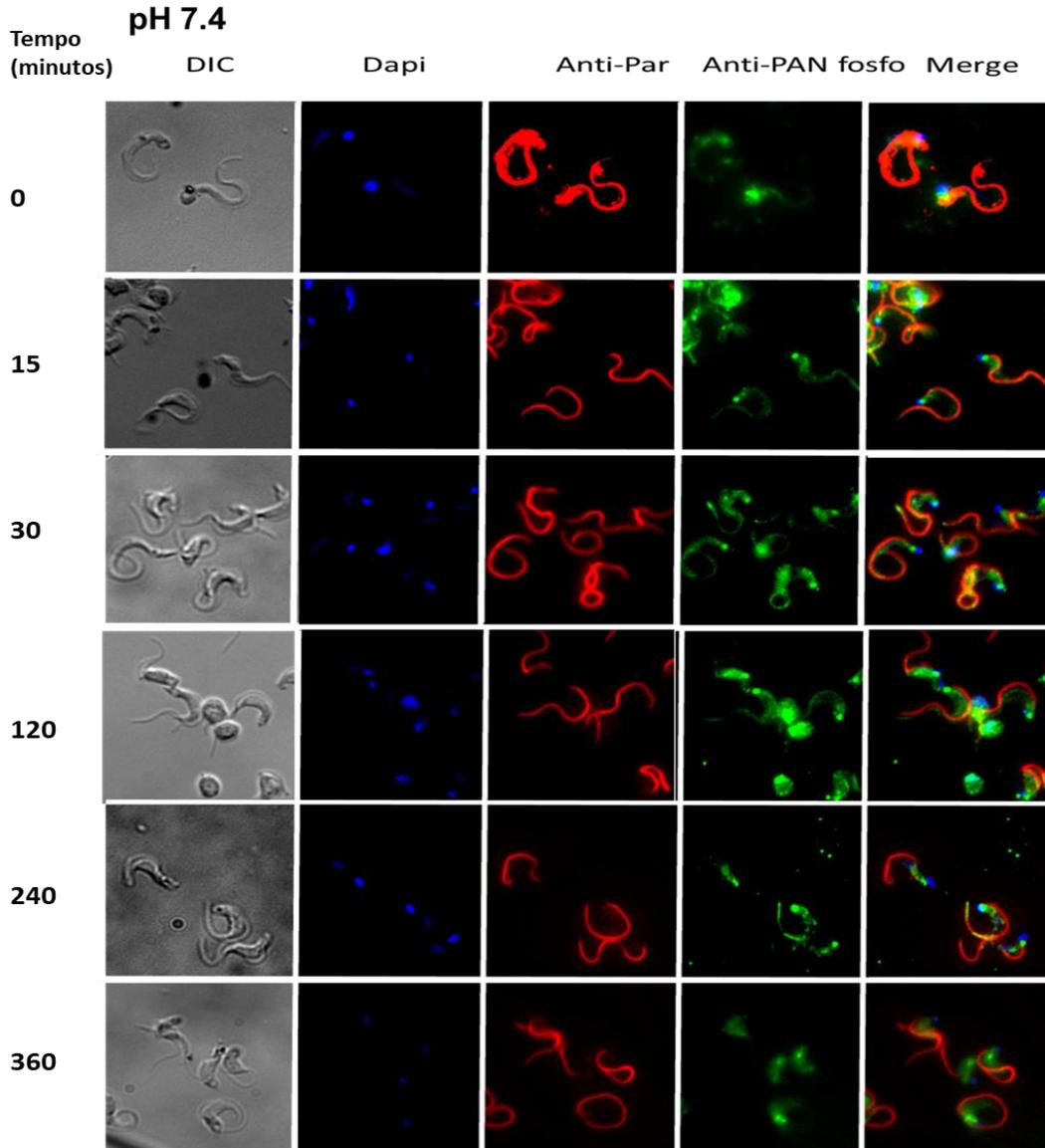


Figura 20: Localização de proteínas fosforiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 7.4, através de imunofluorescência indireta.

Os tripomastigotas foram incubados em MEM:TAU3AG, pH 7.4, fixados com 2% de paraformaldeído (1×10^6) e incubados com anti-fosfo Pan (verde), anti-PAR (vermelho) e DAPI (azul). Imunofluorescência: Anti-PAR, obtido em camundongo, (1: 700); Anti- fosfo PAN, obtido em coelho (1:100); anticorpos secundários: Alexa-fluor 488 anti- IgG de coelho (1:500); Alexa-fluor 555 anti-IgG de camundongo (1: 100), DAPI: 1:100.

O perfil de fosforilação das proteínas do extrato total de tripomastigotas (Figura 21), mostra que a maioria dos eventos regulados por fosforilação apresentam alteração no tempo de 30 minutos em parasitas incubados em meio de pH 6.0. Nesse caso há uma diminuição, seguida de um aumento de fosforilação, que se mantém relativamente constante nos demais tempos. Já em pH 7.4, houve uma menor variação no perfil de fosforilação no decorrer da amastigogênese. Em ambos os casos, a fosforilação mais intensa está concentrada em proteínas em torno de 60-70 kDa. Embora essas proteínas não tenham sido identificadas, vale ressaltar que PAR (69 kDa), HSP70 (71 kDa), HSP60 (59,6 kDa), MAPK2 (51 kDa) podem fazer parte desse grupo fosforilado. Em dados não mostrados foi visto o perfil de fosforilação das proteínas na fração solúvel em tampão de lise (Tris-HCl 500 mM pH 8, NaCl- 150mM e CHAPS 1%, acrescido de inibidores de proteases e fosfatases), observando um perfil semelhante entre a fração solúvel e o extrato total, com diminuição de fosforilação em 30 minutos em pH 6.0. Não se observaram mudanças significativas na fração insolúvel em parasitas incubados nos dois pHs.

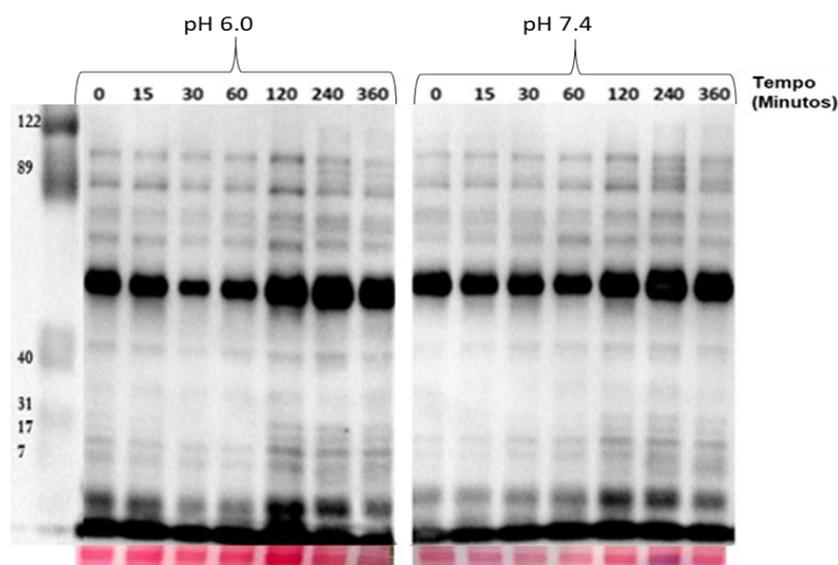


Figura 21: Expressão de proteínas fosforiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Extrato total correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. Anticorpos: Anti-fosfotirosina, Anti-fosfotreonina e Anti-fosfoserina obtidos em camundongo (1:1000); anti- IgG de camundongo (1:4000). É apresentado um resultado representativo de dois experimentos independentes.

Uma vez que a proteína PAR é um indicador do processo da diferenciação do tripomastigota em amastigota, está dentro da faixa de massa molecular que mostrou mudanças no nível de fosforilação e a estabilidade do citoesqueleto foi associado com a PP2A (González et al 2003), foi analisada a possível modificação de PAR por fosforilação. Para tanto, a fração solúvel foi imunoprecipitada com o anticorpo anti-PAR e o *western blot* correspondente revelado com o anticorpo anti-fosfo-Pan (Figura 23). Pode-se observar um ligeiro aumento na fosforilação de PAR na fração solúvel de parasitas incubados por 240 minutos em pH 6.0, quando comparado com o controle em pH 7.4. Não se observam mudanças significativas nas frações insolúveis.

Fosforilação

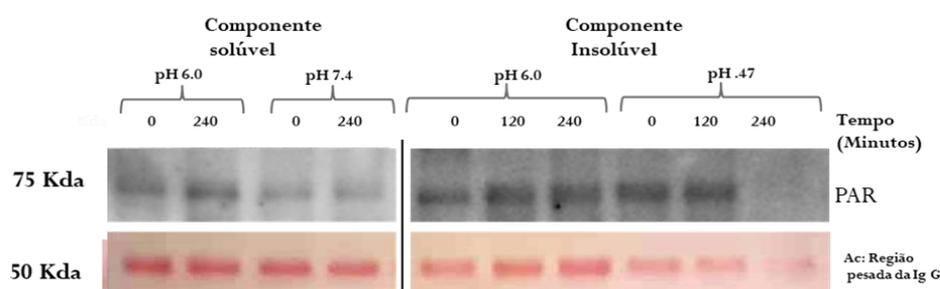


Figura 22: Modificação por fosforilação da proteína PAR em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese

Frações solúvel e insolúvel em tampão de lise imunoprecipitados com anti-PAR. Foram utilizados no SDS-PAGE, 5×10^8 parasitas por canaleta. *Western Blot*: anticorpos: Anti-fosfotirosina, Anti-fosfotreonina e Anti-fosfoserina, obtidos em camundongo (1:1000); anti- IgG de camundongo (1:4000). Utilizado como normalizador, a cadeia pesada pesada da IgG (anti-PAR).

Como pelos resultados descritos acima, a diminuição de proteínas fosforiladas logo no início da amastigogênese parece ser um fenômeno relevante, verificamos a expressão de PP2A durante o processo. Há um aumento significativo da expressão da subunidade catalítica da PP2A (PP2Ac) a partir dos primeiros 15 minutos, que continua praticamente constante até o final da indução da amastigogênese em pH 6.0, o que não é observado em pH 7.4 (Figura 23). Esse nível praticamente constante da expressão de PP2Ac ao longo de todo o processo não tem relação aparente com o nível total de proteínas fosforiladas observado em tempos mais tardios da amastigogênese (Figura 21). No entanto, embora a subunidade catalítica da PP2A seja constante ao longo do processo, a expressão

diferencial de modificações pós-traducionais ou de proteínas reguladoras, ambas controladoras da atividade da fosfatase, não foram analisadas. Embora essa expressão constante de PP2Ac ao longo da amastigogênese observada esteja em desacordo com a variação da PP2Ac descrita na literatura (Queiroz *et al.*, 2014), condições experimentais distintas (pH 5.0 x pH 6.0; ausência x presença de soro fetal bovino) podem ser responsáveis por essas diferenças.

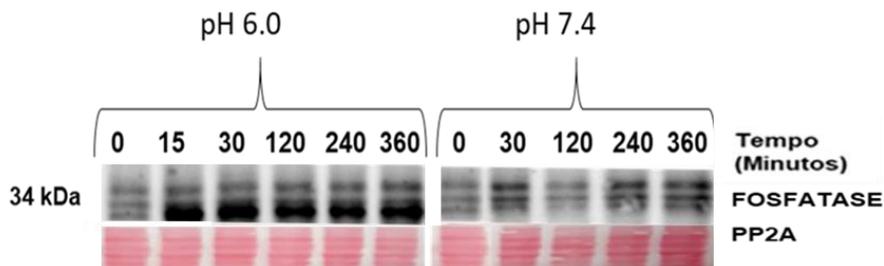


Figura 23: Expressão de PP2A em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese

Extrato total correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. *Western blotting*: anticorpos: anti-PP2A-obtido em coelho (1: 1000); anti-IgG de coelho (1: 4000). É apresentado um resultado representativo de dois experimentos independentes.

Em resumo, nossos resultados mostram que os parâmetros analisados dentro do período da amastigogênese estudado variam ao longo do tempo e são mais evidentes quando são comparadas as etapas: inicial (até cerca de 30-60 minutos) e tardia (em torno de 3-4 h). No início da amastigogênese, a presença de uma via de sinalização dependente de AMPc é relevante, como sugerido na literatura, dado o aumento significativo de AMPc observado nos primeiros 15 minutos do processo da amastigogênese e aumento da atividade de PKA (PKA-P), ainda que relativamente modesta. A presença de uma via independente de PKA não pode ser evidentemente afastada. PKA e MAPK, encontram-se mais ou menos fosforiladas dependendo do intervalo analisado, mas ambas foram detetadas nas etapas inicial e tardia, embora com maior atividade aparente na fase tardia. Embora não esperado, dada a complexidade da regulação das fosfatases e salvo um erro experimental, observou-se um aumento da expressão da subunidade catalítica de PP2A logo no início do processo de amastigogênese que precisaria ser melhor explorado no futuro.

A variação dos parâmetros estudados ao longo do tempo está relacionada com diferentes etapas do processo de amastigogênese, que inclui também uma mudança de localização de proteínas fosforiladas no corpo e flagelo do parasita, como mostrado nos experimentos de fluorescência indireta.

4.3 S-NITROSILAÇÃO E NITRAÇÃO DE PROTEÍNAS NA AMASTIGOGÊNESE EXTRACELULAR

Além das mudanças por fosforilação descritas acima, fomos verificar se a resposta à mudança de pH envolvia a produção de NO e a via clássica de sinalização, com aumento na produção de GMPc e modificações pós traducionais em proteínas, como S-nitrosilação e Nitração no processo da amastigogênese.

Inicialmente foi analisada no nosso laboratório a concentração de GMPc (Figura 24).

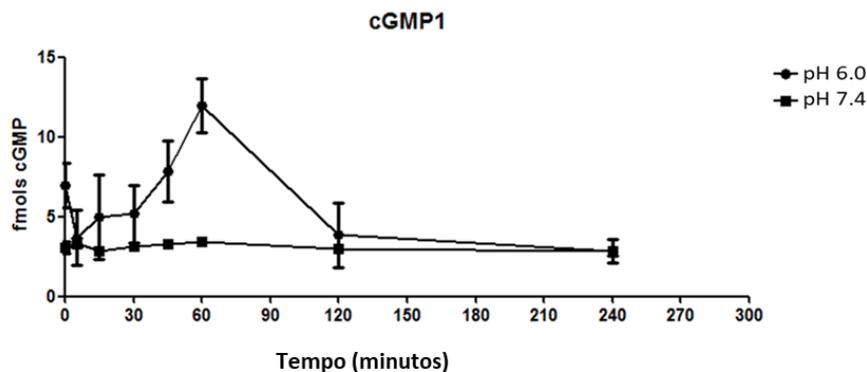


Figura 24: Quantificação de GMPc durante a amastigogênese.

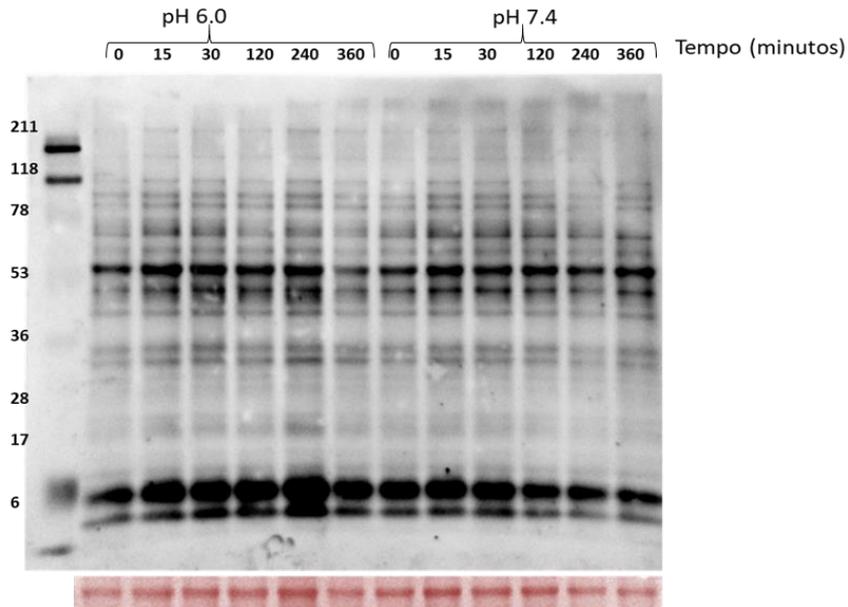
A concentração de GMPc em pH 6.0, atingiu um pico máximo em torno de 60 minutos, em contraste com o controle (pH 7.4), que praticamente se manteve constante nesse período. A quantidade máxima de GMPc é cerca de 10 vezes menor do que detectada no AMPc nos tripomastigotas incubados com o meio pH 6.0 (aproximadamente 12 fmol x 180 fmoles para GMPc e AMPc, respectivamente) e atingida em tempos distintos da amastigogênese (60 e 15 minutos para GMPc e AMPc, respectivamente) (Figuras 24 e 14), Os resultados obtidos da concentração de AMPc e GMPc ao longo da amastigogênese sugerem a presença de diferentes enzimas (ou isoformas) ou a regulação por ligantes específicos da atividade da

[ja6] Comentário: Verificar os números no experimento original - ponto médio da variação)

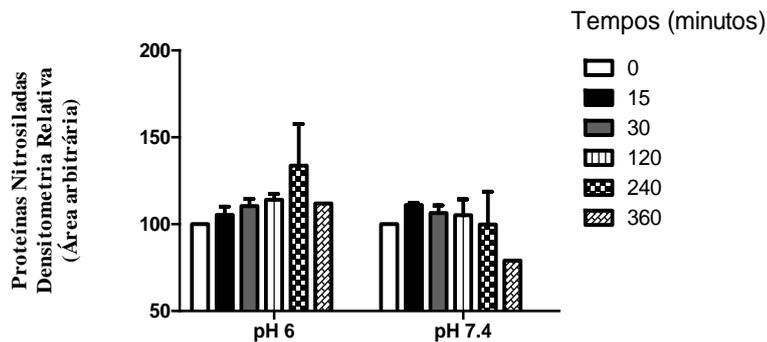
adenilato ciclase de dupla especificidade sugerida na literatura (Alexandre *et al.*, 1990; Laxman e Beavo, 2007; Tagoe *et al.*, 2015).

[ja7] Comentário: Ver

A análise de proteínas S-nitrosiladas nesse período da amastigogênese é mostrada na Figura 25.



A



B

Figura 25: Expressão de proteínas S-nitrosiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese

Extrato total correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. *Western Blot* anticorpos: Anti-NOCys obtido em coelho (1:1000); anti- IgG de coelho (1: 4000). É apresentado um resultado representativo de três experimentos independentes.

B) Estimativa da expressão de proteínas totais S-nitrosiladas por densitometria das bandas utilizando o ponceau como normalizador da quantidade de proteína

Houve um ligeiro aumento de proteínas nitrosiladas em pH 6.0 ao longo do tempo, em comparação com o controle, em componentes em torno de 50-55 kDa e principalmente em torno de 10 kDa, com diminuição de S-nitrosilação em torno de 4 h de incubação. Esse aumento nos tempos iniciais (zero e 2 hs) em pH 6.0 foi observado previamente no laboratório pela quantificação de proteínas S-nitrosiladas pelo método de Saville-Griess Figura 26 (Dra. Chrislaine Soares, dados não publicados).

[ja8] Comentário: marcador de massa molecular na figura 27

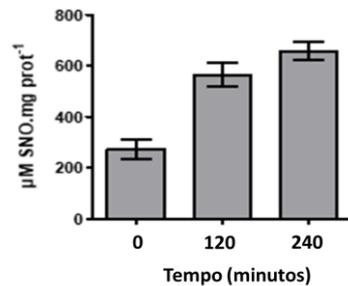


Figura 26: Detecção de proteínas S- nitrosiladas pelo Teste de Griess.

Dados obtidos por Dra. Chrislaine Soares

Os resultados da imunofluorescência indireta com anticorpos anti-NOCys (Figuras 27,28) durante a amastigogênese são mostrados nas Figuras 27 e 28. Os dados sugerem uma variação na localização da marcação ao longo do tempo entre o corpo e o flagelo do parasita, mas que de maneira geral são semelhantes quando se comparam os pH 6.0 e 7.4

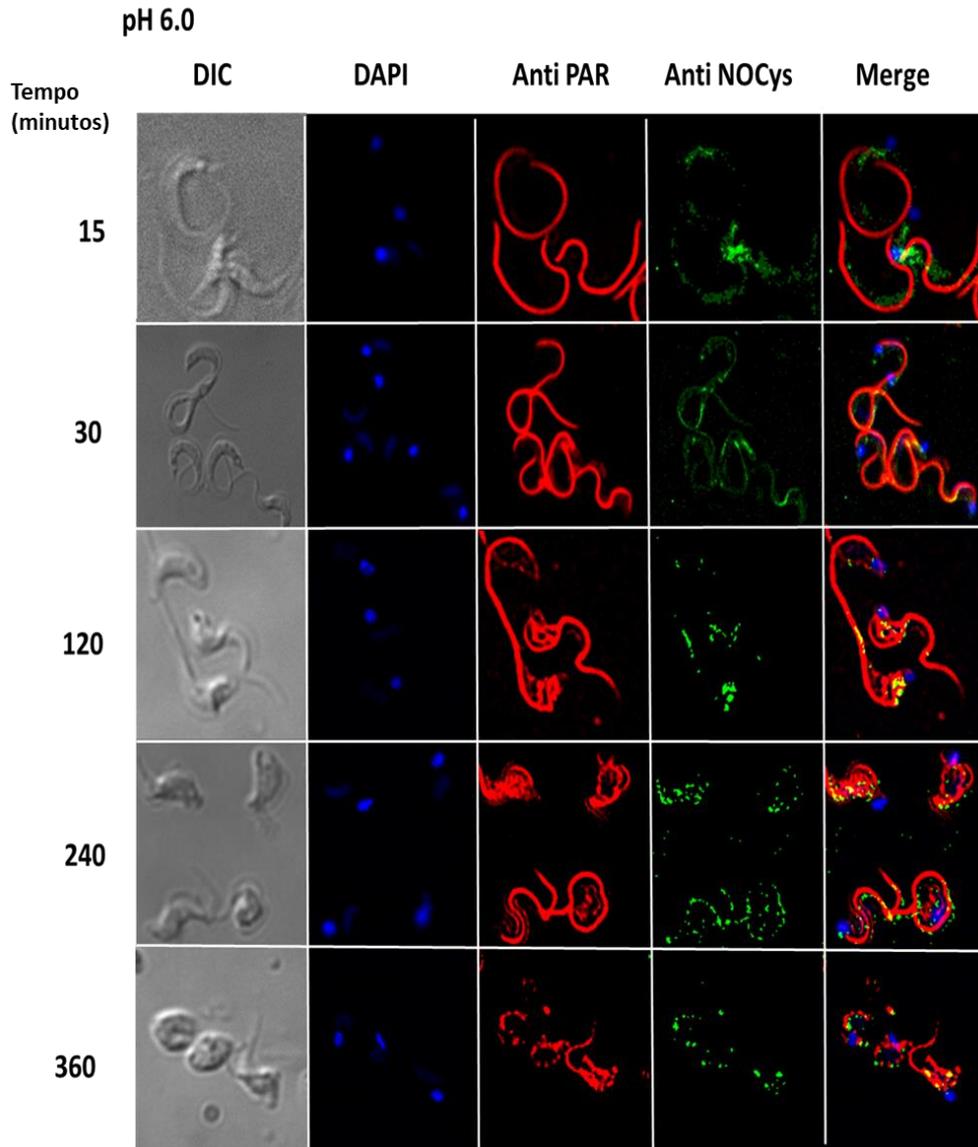


Figura 27: Localização de proteínas S-nitrosiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0, através de imunofluorescência indireta.

Os tripomastigotas foram incubados em MEM:TAU3AG, pH 6.0 fixados com 2% de paraformaldeído (1×10^6) e incubados com anti-S-nitrosilação (verde), anti-PAR (vermelho) e DAPI (azul).
 Imunofluorescência: Anti-paraflagelar obtido em camundongo (1:700); Anti-S-nitrosilação, obtido em coelho (1:100); e os secundários Alexa-fluor 488-anti-IgG de coelho (1:500); Alexa-fluor 555 anti-IgG de camundongo (1:100), 10ul de DAPI: (1:100)

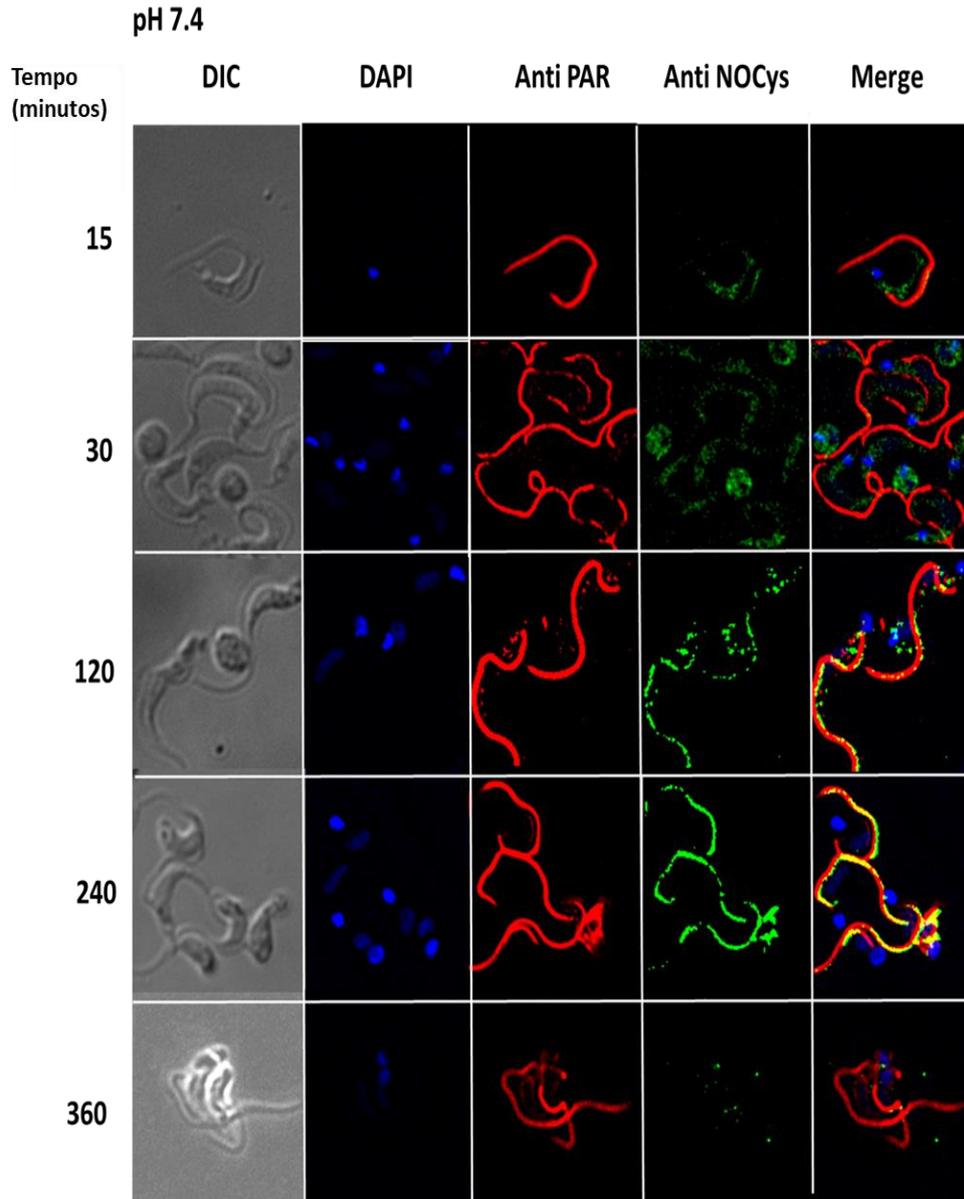


Figura 28: Localização de proteínas S-nitrosiladas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 7.4, através de imunofluorescência indireta

Os tripomastigotas foram incubados em MEM:TAU3AG, pH 7.4, fixados com 2% de paraformaldeído (1×10^6) e incubados com anti-S-nitrosilação (verde), anti-PAR (vermelho) e DAPI (azul).
 Imunofluorescência: Anti-parafagelar obtido em camundongo (1:700); Anti-S-nitrosilação, obtido em coelho (1:100); e os secundários Alexa-fluor 488-anti-IgG de coelho (1:500); Alexa-fluor 555 anti-IgG de camundongo (1:100), 10ul de DAPI: (1:100)

O perfil de proteínas nitradas é mostrado na Figura 29.

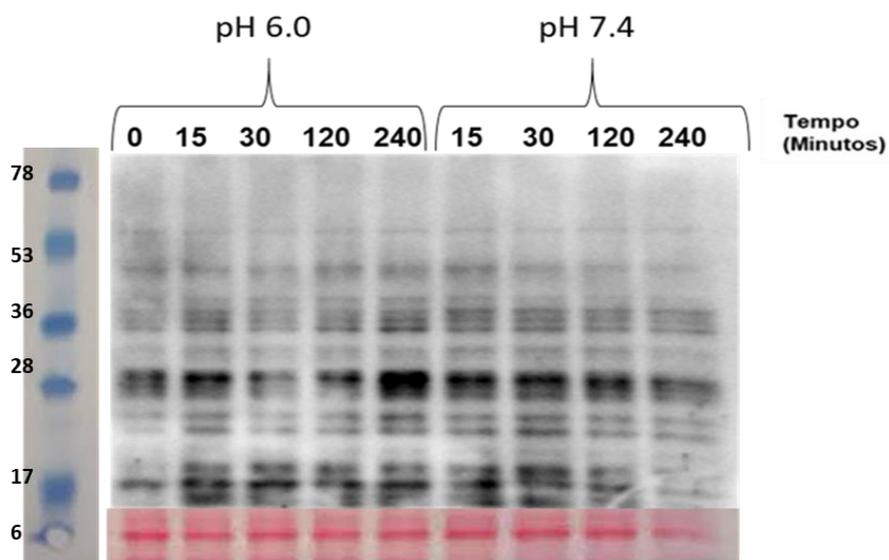


Figura 29: Expressão de proteínas nitradas em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Western Blot: anticorpos: anti- nitro tirosina obtido em coelho (1:1000); anti IgG de coelho (1:4000).

Foi observada na Figura 29 uma diminuição do perfil de proteínas nitradas no extrato de tripomastigotas na etapa inicial da amastigogênese (até 30 minutos) e um aumento na etapa tardia (240 minutos) incubados em meio pH 6.0 em relação ao pH 7.4, mais acentuado em proteínas em torno de 28 kDa.

Embora as proteínas modificadas por NO não tenham sido identificadas, possíveis mudanças por nitração ou S-nitrosilação foram analisadas na proteína de PAR. Percebe-se que a PAR é nitrada em tripomastigotas, com aparente aumento de nitração na fração insolúvel e diminuição na fração solúvel em 120-240 minutos de incubação dos parasitas em meio pH 6.0 quando comparado com o controle. Não se observaram mudanças por S-nitrosilação de PAR em tripomastigotas (Figura 30).

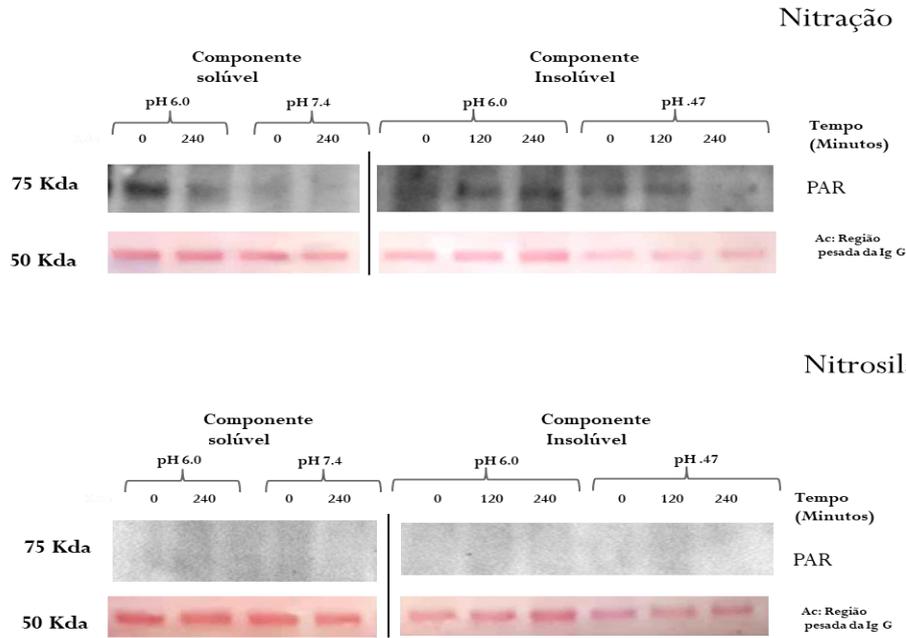


Figura 30: Modificação por S-nitrosilação e nitração da proteína PAR em parasitas incubados em meio MEM:TAU3AG, pH 6.0 ou 7.4 ao longo da amastigogênese.

Componente solúvel e insolúvel em tampão de lise (Tris-HCl 500 mM, pH 8, NaCl- 150mM e CHAPS 1%) correspondente a 5×10^6 parasitas por canaleta. Frações imunoprecipitadas com anti-PAR e submetidas ao *Western Blot*. Anticorpos: anti-S-CysNO obtido em coelho (1:1000); anti-nitrotirosina obtido em coelho (1:1000); anti- IgG de coelho (1: 4000). Utilizado como normalizador da cadeia pesada da IgG. (Abello *et al.*, 2009).

5 CONCLUSÃO

A diferenciação de tripomastigotas em amastigotas de *T. cruzi*, no processo conhecido como amastigogênese, ocorre com uma série de modificações que permitem a sobrevivência desse parasita no interior da célula hospedeira, tais como: mudanças de proteínas de superfície, de citoesqueleto ou de metabolismo. É consenso na literatura de que a permanência das formas tripomastigotas no interior do vacúolo parasitóforo, um ambiente mais ácido, é responsável por desencadear o processo.

Nosso estudo teve como principal objetivo analisar o perfil de três modificações pós-traducionais: fosforilação, S-nitrosilação e nitração, em resposta de tripomastigotas de *T. cruzi* ao pH ácido. Foi analisado o processo de amastigogênese *in vitro* em pH 6.0 e pH 7.4 (controle) até um período máximo de 6 horas de diferenciação. Foi possível verificar no processo de amastigogênese em pH 6.0 que:

-Há variações no perfil de fosforilação, de S-nitrosilação e nitração de proteínas que podem ser agrupadas em etapa inicial (até 1 h do início) e tardia (entre 3-6 hs);

-Há um aumento significativo de AMPc e GMPc nos primeiros 15 e 60 minutos, respectivamente da etapa inicial da amastigogênese. Sugerindo então que sejam respostas independentes dentro do processo;

-PKA ativa, embora presente durante todo o processo, é mais abundante na etapa tardia (6 hs); há um decréscimo na expressão da PKA na fase inicial, principalmente entre 30- 60 minutos da amastigogênese;

-MAPK ativa, embora presente durante todo o processo, apresenta uma diminuição entre 15- 30 minutos; há um novo decréscimo na expressão da MAPK na etapa tardia, principalmente em torno de 360 minutos da amastigogênese;

-Há uma diminuição na fosforilação total das proteínas entre 30- 60 minutos da amastigogênese. Pelo menos parte do processo é dependente de AMPc;

-A subunidade catalítica da PP2A, aumenta significativamente no tempo de 15 minutos de diferenciação, e permanece com alta expressão praticamente durante todo o processo em pH 6.0, enquanto no controle não ocorre esse aumento. O papel de PP2A na amastigogênese deve ser mais explorado;

-O perfil qualitativo de modificações por S-nitrosilação não apresenta grandes variações considerando a metodologia empregada, embora se observe um ligeiro aumento de S-nitrosilação até 240 minutos, confirmado pela dosagem de proteínas nitrosiladas pelo método de Saville-Griess.

-O perfil qualitativo de modificações por nitração não apresenta grandes variações considerando a metodologia empregada, mas se observa uma diminuição de proteínas nitradas em torno de 30- 120 minutos do processo.

-Nitração e nitrosilação de proteínas são associadas com os níveis de NO produzidos pelo organismo; a atividade de NO sintase não varia de forma significativa nos períodos analisados (dados obtidos previamente). Os níveis de GMPc ou de NO sintase não parecem diretamente associados à nitração e S-nitrosilação descritos.

Em resumo, nesse trabalho são mostradas modificações moduladas durante o processo de transformação de tripomastigota em amastigota do *Trypanosoma cruzi*, revelando a importância de se estudá-las e aprofundar o estudo dos mecanismos de regulação nesse protozoário.

6 REFERÊNCIAS

ABELLO, N. et al. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. **J Proteome Res**, v. 8, n. 7, p. 3222-38, Jul 2009. ISSN 1535-3893 (Print) 1535-3893.

AHERN, G. P.; KLYACHKO, V. A.; JACKSON, M. B. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 510-7, Oct 2002. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236.

ALEXANDRE, S. et al. Families of adenylate cyclase genes in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 77, n. 2, p. 173-82, May 1996. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851.

_____. Differential expression of a family of putative adenylate/guanylate cyclase genes in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 43, n. 2, p. 279-88, Dec 1990. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851.

ALMEIDA-DE-FARIA, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Exp Parasitol**, v. 92, n. 4, p. 263-74, Aug 1999. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894.

ALVES, M. J. M.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 76-88, 2009. ISSN 0074-0276.

ANAND, P.; STAMLER, J. S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 90, n. 3, p. 233-44, Mar 2012. ISSN 0946-2716.

ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 64, n. 3, p. 474-84, Dec 1987. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894.

ARDITO, F. et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 40, n. 2, p. 271-280, 2017. ISSN 1791-244X 1107-3756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656226> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5500920/> >.

AVRUCH, J. MAP kinase pathways: the first twenty years. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1150-60, Aug 2007. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

BALAFANOVA, Z. et al. Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon-RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 15021-7, Apr 26 2002. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

BAO, Y. et al. Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 76, n. 10, p. 4757-63, Oct 2008. ISSN 0019-9567.

_____. Protein kinase A catalytic subunit interacts and phosphorylates members of transsialidase super-family in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect**, v. 12, n. 10, p. 716-26, Sep 2010. ISSN 1286-4579.

BATTHYÁNY, C. et al. Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects. **Antioxidants & redox signaling**, v. 26, n. 7, p. 313-328, 2017. ISSN 1557-7716 1523-0864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27324931> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5326983/> >.

BENGS, F. et al. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. **Mol Microbiol**, v. 55, n. 5, p. 1606-15, Mar 2005. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382x.

BENHAR, M. et al. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. **Science**, v. 320, n. 5879, p. 1050-4, May 23 2008. ISSN 0036-8075.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015/07/30 2015. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150> >. Acesso em: 2019/05/17.

BOCEDI, A. et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **Faseb j**, v. 24, n. 4, p. 1035-42, Apr 2010. ISSN 0892-6638.

BOURGUIGNON, S. C. et al. Biological aspects of the *Trypanosoma cruzi* (Dm28c clone) intermediate form, between epimastigote and trypomastigote, obtained in modified liver infusion tryptose (LIT) medium. **Acta Trop**, v. 98, n. 1, p. 103-9, Apr 2006. ISSN 0001-706X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574051> >.

BRACK, C. [Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *rhodnius prolixus*]. **Acta Trop**, v. 25, n. 4, p. 289-356, 1968. ISSN 0001-706X (Print) 0001-706x.

BRENCHLEY, R. et al. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. **BMC genomics**, v. 8, p. 434-434, 2007. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039372> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2175518/> >.

CAMPS, M.; NICHOLS, A.; ARKINSTALL, S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. **Faseb j**, v. 14, n. 1, p. 6-16, Jan 2000. ISSN 0892-6638 (Print) 0892-6638.

CECCONI, D. et al. Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. **Electrophoresis**, v. 30, n. 14, p. 2460-8, Jul 2009. ISSN 0173-0835.

CHAGAS, Carlos. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 1909, vol.1, n.2 [cited 2019-09-10], pp.159-218. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.

CONTRERAS, Víctor T et al. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 2002, vol.97, n.8 [cited 2019-09-10], pp.1213-1220. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000800025&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000800025>

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Conserved regions as markers of different patterns of expression and distribution of the mucin-associated surface proteins of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 80, n. 1, p. 169-174, 2012. ISSN 1098-5522 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025509> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255683/> >.

DHIMAN, M. et al. Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins: implications in Chagas' disease. **Am J Pathol**, v. 173, n. 3, p. 728-40, Sep 2008. ISSN 0002-9440.

DOMENICALI PFISTER, D. et al. A Mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 7, p. 1126-35, Jul 2006. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786.

ERDMANN, M. et al. Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 4, p. 2035-45, Apr 2006. ISSN 1059-1524 (Print) 1059-1524.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 734-47, May 2012. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339763> >.

FILARDY, A. A. et al. Human Kinetoplastid Protozoan Infections: Where Are We Going Next? **Front Immunol**, v. 9, p. 1493, 2018. ISSN 1664-3224 (Print) 1664-3224.

GENESTRA, M. et al. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. **Arch Med Res**, v. 37, n. 3, p. 328-33, Apr 2006. ISSN 0188-4409 (Print) 0188-4409.

GOLDSTEIN, J. et al. Immuno and cytochemical localization of *Trypanosoma cruzi* nitric oxide synthase. **Biocell**, v. 24, n. 3, p. 217-22, Dec 2000. ISSN 0327-9545 (Print) 0327-9545.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Exp Parasitol**, v. 66, n. 2, p. 205-12, Aug 1988. ISSN 0014-4894 (Print) 0014-4894.

GONZÁLEZ, J. et al. A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical journal**, v. 374, n. Pt 3, p. 647-656, 2003. ISSN 1470-8728 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12737627> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1223626/> >.

GOULD, M. K. et al. Cyclic AMP effectors in African trypanosomes revealed by genome-scale RNA interference library screening for resistance to the phosphodiesterase inhibitor CpdA. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 10, p. 4882-93, Oct 2013. ISSN 0066-4804.

GRELLIER, P. et al. Involvement of calyculin A-sensitive phosphatase(s) in the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 239-252, 1999/01/25/ 1999. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685198001728> >.

GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v. 320, n. 6061, p. 454-6, Apr 3-9 1986. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

GUTTINGER, A. et al. A mitogen-activated protein kinase of *Trypanosoma brucei* confers resistance to temperature stress. **Mol Biochem Parasitol**, v. 153, n. 2, p. 203-6, Jun 2007. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851.

HAMEDI, A. et al. In vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. **Mol Biochem Parasitol**, v. 200, n. 1-2, p. 9-18, Mar-Apr 2015. ISSN 0166-6851.

HAQQANI, A. S.; DO, S. K.; BIRNBOIM, H. C. The role of a formaldehyde dehydrogenase-glutathione pathway in protein S-nitrosation in mammalian cells. **Nitric Oxide**, v. 9, n. 3, p. 172-81, Nov 2003. ISSN 1089-8603 (Print) 1089-8603.

HASHIMOTO, M. et al. A Novel Method for Inducing Amastigote-To-Trypomastigote Transformation In Vitro in *Trypanosoma cruzi* Reveals the Importance of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135726, 2015. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135726> >.

HERNANSANZ-AGUSTIN, P. et al. Nitrosothiols in the immune system: signaling and protection. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 3, p. 288-308, Jan 20 2013. ISSN 1523-0864.

HERNÁNDEZ-OSORIO, L. A. et al. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 283842, 2010. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037731> >.

HOTEZ, P. J. et al. Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0003895, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003895> >.

HOU, Y. et al. Seleno compounds and glutathione peroxidase catalyzed decomposition of S-nitrosothiols. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 228, n. 1, p. 88-93, Nov 1 1996. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

HUANG, H. et al. Molecular cloning and characterization of the protein kinase A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 149, n. 2, p. 242-5, Oct 2006. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851.

_____. Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 1107-1115, 2002/08/01/ 2002. ISSN 0020-7519. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751902000851> >.

HUBBARD, M. J.; COHEN, P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. **Trends Biochem Sci**, v. 18, n. 5, p. 172-7, May 1993. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004.

IRIE, Y. et al. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5634-9, May 13 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

JACKSON, A. P. Genome evolution in trypanosomatid parasites. **Parasitology**, v. 142 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S40-S56, 2015. ISSN 1469-8161 0031-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25068268> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413820/> >.

JAGER, A. V. et al. Identification of novel cyclic nucleotide binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 198, n. 2, p. 104-12, Dec 2014. ISSN 0166-6851.

Jl, Y. et al. Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione s-transferase by peroxynitrite. **J Biol Chem**, v. 281, n. 4, p. 1986-91, Jan 27 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

JIA, M.; MATEOIU, C.; SOUCHELNYTSKYI, S. Protein tyrosine nitration in the cell cycle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 413, n. 2, p. 270-6, Sep 23 2011. ISSN 0006-291x.

JORTZIK, E.; WANG, L.; BECKER, K. Thiol-based posttranslational modifications in parasites. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, n. 4, p. 657-73, Aug 15 2012. ISSN 1523-0864.

KAMISAKI, Y. et al. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 20, p. 11584-9, Sep 29 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

KORNBERG, M. D. et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 1094-100, Nov 2010. ISSN 1465-7392.

KUHN, D.; WIESE, M. LmxPK4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. **Mol Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 1169-82, Jun 2005. ISSN 0950-382X (Print) 0950-382x.

KUNZ, S.; OBERHOLZER, M.; SEEBECK, T. A FYVE-containing unusual cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. **The FEBS Journal**, v. 272, n. 24, p. 6412-6422, 2005/12/01 2005. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05039.x> >. Acesso em: 2019/06/24.

LANDER, H. M. et al. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. **J Biol Chem**, v. 271, n. 33, p. 19705-9, Aug 16 1996. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

LAXMAN, S.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. **Mol Interv**, v. 7, n. 4, p. 203-15, Aug 2007. ISSN 1534-0384 (Print) 1534-0384.

LI, Y. et al. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 4, p. e1005511, Apr 2016. ISSN 1553-7366.

LIU, L. et al. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 490-4, Mar 22 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

MACMILLAN-CROW, L. A.; CRUTHIRDS, D. L. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. **Free Radic Res**, v. 34, n. 4, p. 325-36, Apr 2001. ISSN 1071-5762 (Print) 1029-2470.

MAHARANA, B. R.; TEWARI, A. K.; SINGH, V. An overview on kinetoplastid paraflagellar rod. **Journal of parasitic diseases : official organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 39, n. 4, p. 589-595, 2015. ISSN 0971-7196 0975-0703. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26688619> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4675581/> >.

MARIC, D.; EPTING, C. L.; ENGMAN, D. M. Composition and sensory function of the trypanosome flagellar membrane. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 4, p. 466-472, 2010. ISSN 1879-0364 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580599> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2920355/> >.

MARTINEZ-RUIZ, A. et al. Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 11, p. 1220-35, Oct 10 2013. ISSN 1523-0864.

MARTINEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 1, p. 17-29, Jul 1 2011. ISSN 0891-5849.

MOLDOGAZIEVA, N. T. et al. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. **Free Radic Res**, v. 52, n. 5, p. 507-543, May 2018. ISSN 1029-2470.

MÜLLER, I. et al. **Stage-specific Requirement of a Mitogen-activated Protein Kinase by *Trypanosoma brucei***. 2002. 3787-99.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. **Biochim Biophys Acta**, v. 1754, n. 1-2, p. 151-9, Dec 30 2005. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

NAVARRO, M. C. et al. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 83-91, 2003. ISSN 0074-0276.

ORR, G. A. et al. Identification of novel serine/threonine protein phosphatases in *Trypanosoma cruzi*: a potential role in control of cytokinesis and morphology. **Infection and immunity**, v. 68, n. 3, p. 1350-1358, 2000. ISSN 0019-9567 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678947> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97288/> >.

PARSONS, M. et al. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 6, p. 127, Sep 15 2005. ISSN 1471-2164.

PAVETO, C. et al. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**, v. 270, n. 28, p. 16576-9, Jul 14 1995. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

PEREIRA, M. et al. Down regulation of NO signaling in *Trypanosoma cruzi* upon parasite-extracellular matrix interaction: changes in protein modification by nitrosylation and nitration. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 4, p. e0003683, Apr 2015. ISSN 1935-2727.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, Jan 6 2018. ISSN 0140-6736.

PITTMAN, K. M. et al. Nitration of manganese superoxide dismutase during ocular inflammation. **Exp Eye Res**, v. 74, n. 4, p. 463-71, Apr 2002. ISSN 0014-4835 (Print) 0014-4835.

QUEIROZ, R. M. et al. Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* amastigogenesis. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 12, p. 3457-72, Dec 2014. ISSN 1535-9476.

QUEIROZ, R. M. L. et al. Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Amastigogenesis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 12, p. 3457, 2014. Disponível em: < <http://www.mcponline.org/content/13/12/3457.abstract> >.

RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 12, p. 4003-8, Mar 23 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

RAMOS, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40, n. 12, p. 2707-19, 2008. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725.

RANGEL-ALDAO, R. et al. Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Int**, v. 17, n. 2, p. 337-44, Aug 1988. ISSN 0158-5231 (Print) 0158-5231.

REITER, E.; LEFKOWITZ, R. J. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. **Trends Endocrinol Metab**, v. 17, n. 4, p. 159-65, May-Jun 2006. ISSN 1043-2760 (Print) 1043-2760.

REQUENA-MENDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 2, p. e0003540, Feb 2015. ISSN 1935-2727.

ROCHA, G. M. et al. Structural changes of the paraflagellar rod during flagellar beating in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS one**, v. 5, n. 6, p. e11407-e11407, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20613980> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894934/> >.

ROTH, G. et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, p. 1736-1788, 11/10 2018.

SENGUPTA, R. et al. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. **Biochemistry**, v. 46, n. 28, p. 8472-83, Jul 17 2007. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960.

SHAH-SIMPSON, S. et al. Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 11, p. e1006747, Nov 2017. ISSN 1553-7366.

SHALABY, T.; LINIGER, M.; SEEBECK, T. The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 23, p. 6197-206, Dec 2001. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 72-91, Mar 2011. ISSN 0105-2896.

SOUZA, J. M. et al. Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. **Arch Biochem Biophys**, v. 380, n. 2, p. 360-6, Aug 15 2000. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1898-902, Dec 18 1992. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

STAMLER, J. S.; TOONE, E. J. The decomposition of thionitrites. **Curr Opin Chem Biol**, v. 6, n. 6, p. 779-85, Dec 2002. ISSN 1367-5931 (Print) 1367-5931.

Stuehr, Mammalian nitric oxide synthases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1411, Issues 2–3, 1999, Pages 217-230, ISSN 0005-2728, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00016-X) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527289900016X>)

SZOR, B. et al. A novel phosphatase cascade regulates differentiation in *Trypanosoma brucei* via a glycosomal signaling pathway. **Genes Dev**, v. 24, n. 12, p. 1306-16, Jun 15 2010. ISSN 0890-9369.

TAGOE, D. N.; KALEJAIYE, T. D.; DE KONING, H. P. The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference! **Front Pharmacol**, v. 6, p. 185, 2015. ISSN 1663-9812 (Print) 1663-9812.

TEIXEIRA, D. E. et al. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, p. e1749-e1749, 2012. ISSN 1935-2735 1935-2727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970330> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3429381/> >.

TOMLINSON, S. et al. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, v. 110 (Pt 5), p. 547-54, Jun 1995. ISSN 0031-1820 (Print) 0031-1820.

VANIN, A. F. et al. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 1, p. 96-103, Jan 2007. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682x.

VENTURINI, G. et al. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 270, n. 2, p. 437-41, Apr 13 2000. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Growth of Isolated Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in Cell-Free Medium1. **The Journal of Protozoology**, v. 29, n. 4, p. 570-576, 1982/11/01 1982. ISSN 0022-3921. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1982.tb01338.x> >. Acesso em: 2019/06/14.

WANG, G. et al. Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1295-300, Jan 31 2006. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF CHAGAS DISEASE (2000 : BRASILIA, B. W. H. O. **Control of Chagas disease : second report of the WHO expert committee.** 2002.

WIESE, M. A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. **The EMBO journal**, v. 17, n. 9, p. 2619-2628, 1998. ISSN 0261-4189
1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9564044> >. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1170603/> >.

_____. *Leishmania* MAP kinases--familiar proteins in an unusual context. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1053-62, Aug 2007. ISSN 0020-7519 (Print)
0020-7519.

WIESE, M.; KUHN, D.; GRUNFELDER, C. G. Protein kinase involved in flagellar-length control. **Eukaryot Cell**, v. 2, n. 4, p. 769-77, Aug 2003. ISSN 1535-9778 (Print)
1535-9786.

WU, C. et al. Thioredoxin 1-mediated post-translational modifications: reduction, transnitrosylation, denitrosylation, and related proteomics methodologies. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 9, p. 2565-604, Nov 1 2011. ISSN 1523-0864.

YAO, Y. et al. Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 33921-30, Nov 26 1999. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258.

YEMETS, A. I. et al. Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants. **Plant Sci**, v. 181, n. 5, p. 545-54, Nov 2011. ISSN 0168-9452.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38-52, 2018/08/01/ 2018. ISSN 0001-706X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17304266> >.