



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito do PSI na inibição do proteassoma 20S de *Trypanosoma cruzi*

AUTORA: NILZA SATIE HANGAI

ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. RENATA GUERRA DE SÁ

CO-ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. MARIA TEREZINHA BAHIA

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular.

**Ouro Preto - MG,
dezembro de 2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e Laboratório de Doença de Chagas ICEB/NUPEB/UFOP, com apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Dedico esta dissertação à minha avó Tsurukiti (*in memorian*) aos meus pais, Tadashi (*in memorian*) e Hiroko, ao meu marido Ivar e as minhas filhas Sue, Nara e Mie pelo apoio durante todas as dificuldades encontradas e pela compreensão de minhas diversas ausências.

Que Deus nos de a sabedoria para descobrir
o correto, vontade para elegê-lo e a força
para fazer que seja duradouro.

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

A Deus;

Ao meu melhor amigo, Ivar;

Às minhas filhas Sue, Nara e Mie, pelas ausências e negligências;

À minha querida obatian Tsurukiti (*in memorian*) por tudo;

Ao meu querido pai Tadashi (*in memorian*), a quem dedico esta dissertação, a minha mãe Hiroko, irmãos e sobrinhos pelo amor, carinho e por sempre acreditarem na realização desse trabalho;

À Prof.^a Dr.^a Renata Guerra de Sá, pela confiança que depositou em mim, mais do que eu mesma, pelos incentivos, por seu otimismo e pelos ensinamentos valiosos que adquiri em seu convívio;

À Prof.^a Dr.^a Maria Terezinha Bahia, pela gentileza e atenção em todos os momentos em que solicitei seu auxílio;

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Martins Carneiro pelo auxílio nas necropsias, pelas ótimas sugestões e pelo convívio mais que agradável;

Ao Prof. Dr. Elio Hideo Babá, pelos ensinamentos, conselhos e incentivos;

Ao Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista, pela convivência tão agradável e pelo prazer do reencontro após tantos anos;

À Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Pedrosa, minha primeira orientadora;

À Prof.^a Dr.^a Marta de Lana, pela agradável convivência, sugestões e incentivo;

Ao Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis pela amizade;

À Dr. Paulo Pimenta e todo o pessoal do Centro de Pesquisa René Rachou, pelo auxílio durante os experimentos em Belo Horizonte;

Ao meu amigo e colaborador Dr. Paulo Marques da Mata Guedes pelas sugestões e as muitas risadas;

À Vanja, pela sua dedicação, disponibilidade e amizade

À Marcela, pela a amizade, pelas inúmeras conversas e milhares de repique;

À Helen pelas inúmeras sugestões e pela amizade;

Ao Cássio pela grande amizade que surgiu, pelo carinho e apoio durante este caminho;

Ao Matheus, pela amizade, sugestões e apoio durante todo o mestrado;

Ao Roenick, pela amizade, apoio técnico na área da informática e pelas muitas conversas;

Ao Rafael, pela atenção que me dispensou nos experimentos no Centro de Pesquisa René Rachou e pela amizade;

A equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP, Alínia, Cláudia, Daniel, Eneida, Ezequiel, Fabiana, Gustavo, Helaine, Letícia, Leonardo, Leandro 1, Leandro 2, Naiara, Natália, Nayara, Robs, Roberta, Robertinha, Thiago, pelo companheirismo, carinho e vária risadas;

A toda equipe do laboratório de Doença de Chagas;

A toda equipe do laboratório de Imunopatologia;

À Maria Chaves pelo processamento do material histopatológico;

A toda equipe do Biotério Central da UFOP;

Aos colegas do mestrado;

A todos os amigos dos laboratórios do NUPEB;

Às moradores e ex-moradoras da República QC, pela amizade, carinho e boas risadas ao longo desses 25 anos;

A Cida, secretária prestativa e atenciosa, sempre pronta para ajudar;

Às seguintes instituições que colaboraram com recursos financeiros para a realização deste trabalho: CNPq, Capes, FAPEMIG e UFOP.

1. Introdução	1
1.1 A doença de Chagas.....	2
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3 O genoma de <i>T.cruzi</i>	4
1.4 Expressão gênica em <i>T. cruzi</i>	6
1.5 Alterações fenotípicas e/ou populacionais do <i>T. cruzi</i>	7
1.6 Imunopatologia da Doença de Chagas.....	9
1.7 Tratamento da Doença de Chagas	11
1.8 O proteassoma e a ubiquitinação	12
1.9 O proteassoma de parasitos protozoários.....	16
2. Objetivos	19
2.1 Objetivos Gerais	20
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1 Reagentes	22
3.2 Parasitos	22
3.3 Animais	22
3.4-Extração de RNA total e verificação da integridade	22
3.5 Obtenção dos cDNAs.....	23
3.6 Preparação da fração enriquecida de proteassoma	25
3.7 SDS-PAGE e ensaios de Western Blot.....	25
3.8 Dosagem das atividades peptidásicas dos proteassoma.....	26
3.9 Importância do proteassoma na proliferação <i>in vitro</i>	26
3.10 Avaliação Morfológica	27
3.11 O papel do proteassoma do desenvolvimento experimental da D.C.	27
3.12 Taxa de Mortalidade	28
3.13 Avaliação dos processos inflamatórios e tropismo tecidual de camundongos inoculados com tripomastigotas das cepas Y, Be-62 e Be-78, pré-incubadas ou não com PSI	28
3.14 Avaliação da carga parasitária tecidual	29
4 Resultados.....	31
4.1 Análise dos níveis de RNAm das subunidades catalíticas do proteassoma 20S ..	32
4.1.1 Integridade do RNA total de <i>T. cruzi</i>	32
4.1.2 Perfil de expressão das subunidades catalíticas das cepas Y, Be-62 e Be-78	32
4.1.3 Análise densitométrica dos RNAm das subunidades catalíticas do proteassoma 20S	33
4.2 Análise dos níveis protéicos do proteassoma 20S	33
4.3 Atividades enzimáticas do proteassoma 20S	34
4.4 Participação do proteassoma na proliferação <i>in vitro</i> da cepa Y de <i>T. cruzi</i>	35
4.5 Avaliação da importância do proteassoma na proliferação <i>in vitro</i> da cepa Be-62 de <i>T. cruzi</i>	36
4.6 Avaliação da importância do proteassoma na proliferação <i>in vitro</i> da cepa Be-78 de <i>T. cruzi</i>	37
4.7 O efeito do PSI na morfologia das formas epimastigotas das cepas Y, Be-62 e Be- 78 de <i>T. cruzi</i>	38
4.8 Efeito do PSI na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss com a cepa Y de <i>T. cruzi</i>	40

4.9 Efeito do PSI na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss com a cepa Be-62 de <i>T. cruzi</i>	41
4.10 Efeito do PSI na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss com a cepa Be-78 de <i>T. cruzi</i>	42
4.11 Taxa de mortalidade dos camundongos infectados com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> ...	42
4.12 Taxa de mortalidade dos camundongos infectados com a cepa Be-62 <i>T. cruzi</i> .	43
4.13 Avaliação dos processos inflamatórios, tropismo e parasitismo tecidual em camundongos infectados com as cepas Y, Be-62 e Be 78 pré-incubadas ou não com PSI.....	44
5. Discussão.....	53
6. Conclusão.....	68
7. Referências bibliográficas	70

As proteases dos parasitos protozoários têm recebido um foco especial nas últimas décadas como potenciais alvos terapêuticos. Uma delas, o proteassoma 20S, é uma protease compartimentalizada que tem um papel crucial na biologia celular, regulando vários processos, dentre eles, a degradação de proteínas de meia vida curta, a progressão do ciclo celular e a apresentação de antígenos.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o padrão de expressão e a atividade peptidásica desta protease, bem como o impacto da inibição do proteassoma com PSI, um inibidor clássico da atividade quimotripsina, na proliferação *in vitro* e na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss inoculados com as cepas Y, Berenice-62 e Berenice-78 de *Trypanosma cruzi*.

A análise por RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para as subunidades catalíticas do proteassoma 20S (semelhantes à caspase, tripsina e quimotripsina), RNA total das formas epimastigotas obtidas das cepas Y, Be-62 e Be-78, e do gene hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase como normalizador, mostraram níveis equivalentes de mRNA para estas subunidades. Por outro lado, utilizando a técnica de Western blot e anticorpos específicos para as subunidades do tipo alfa (1, 2, 3, 5, 6 e 7), foi evidenciada uma maior abundância de proteassoma 20S na cepa Be-78 quando comparada às cepas Y e Be-62. Estas diferenças nas quantidades absolutas de proteassoma foram confirmadas pela medida das respectivas atividades peptidásicas, utilizando substratos específicos e uma fração enriquecida de proteassoma. Os nossos resultados confirmam a atividade tripsina como a principal em epimastigota de *T. cruzi* e também sugerem que esta protease pode ser regulada por mecanismos pós-transcricionais.

A seguir, para a avaliação do efeito da inibição do proteassoma na replicação das formas epimastigota ao meio LIT contendo 3×10^6 parasitos, foram adicionadas concentrações que variaram entre 0,033 a $50 \mu\text{M}$ de PSI. Foi observada uma redução da proliferação de 90% para as cepas Y e Be-78 quando comparados aos grupos controles. Entretanto, a cepa Be-62 apresentou uma redução da proliferação de 57% na concentração de $0,033 \mu\text{M}$ e de 73% na concentração de $0,083 \mu\text{M}$. Esses resultados sugerem que um proteassoma funcional é essencial para a replicação das formas epimastigotas.

Posteriormente, estes parasitos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. Foi observado o desligamento do corpo celular do parasito do seu flagelo, rugosidade acentuada em suas membranas celulares, bem como deformações na parte anterior do corpo celular, sugerindo que a inibição do proteassoma induz um desequilíbrio no *turnover* das proteínas envolvidas na manutenção do corpo do parasito.

Finalmente foi analisado o efeito da inibição do proteassoma na evolução da infecção experimental da Doença de Chagas. Inicialmente, os tripomastigotas sanguíneos foram incubados com 100 μ M de PSI durante 20 minutos e posteriormente 5x10³ parasitos foram inoculados em camundongos Swiss. Foi observada uma redução do número de parasitos de 68%, 42%, 73% no pico de parasitemia das cepas Y, Be-62 e Be-78, respectivamente. Esses resultados corroboram as diferenças bioquímicas iniciais observadas entre o proteassoma destas cepas.

A análise do parasitismo tecidual e do processo de inflamação no baço, fígado músculo cardíaco e esquelético mostrou que na cepa Y o grau de parasitismo dos camundongos infectados com tripomastigotas pré-incubadas com PSI foi maior quando comparado ao grupo controle, porém, com um processo inflamatório que não acompanhou este quadro. Entretanto, quando foi utilizada a cepa Be-62, foi observado um aumento acentuado do parasitismo no fígado e baço acompanhados por uma exacerbação do processo inflamatório, quando comparado ao grupo controle. Este padrão não foi observado para a cepa Be-78, que apresentou comparada ao grupo controle, uma manutenção do padrão de parasitismo tecidual bem como do processo inflamatório.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o proteassoma é essencial para a manutenção do ciclo biológico do *T. cruzi*, uma vez que a inibição desta protease na fase replicativa (epimastigota), além de bloquear o ciclo celular, induz alterações morfológicas, enquanto que uma inibição na fase infectiva, compromete a progressão da infecção experimental.

In recent decades the proteases of protozoa parasites have emerged as potential therapeutic targets. One of them, the 20S proteasome, is a self-compartmentalizing protease that plays a crucial role in cell biology regulating several cellular processes including proteins degradation, cell-cycle control, and antigens presentation. In this sense, the main objective of this work was to evaluate the pattern of gene expression as well as peptidase activities of this protease and the impact of proteasome inhibition by PSI, a potent and reversible inhibitor of chymotrypsin-like activity on the proliferation *in vitro* and in the development of experimental infection of Swiss mice inoculated with the Y, Berenice-62 e Berenice-78 strains of *Trypanosma cruzi*.

The analysis by RT-PCR, using oligonucleotides specific to the catalytic subunits of proteasome 20S (similar to caspase, trypsin and chymotripinsin), total RNA of the epimastigote forms from the Y, Be-62 and Be-78 strains, and from the gene hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase as a normalizer, showed equivalent levels of mRNA to these subunits. On the other hand, the levels of proteasome analyzed by Western immunoblotting using an antibody to alfa subunit (1, 2, 3, 5, 6 and 7) were higher for strain Be-78 when compared to the strains Y and Be-62. These differences in the proteasome amount in these strains were confirmed for measurement of proteolytic activities associated to these subunits using specific fluorogenic substrates and an enriched fraction of the proteasome obtained from the same strains. Our results showed that the main proteasome activity is trypsin-like activity in epimastigote forms of *T. cruzi*, suggesting that post-transcriptional regulation may modulates the proteolytic activity in *T. cruzi*. For an evaluation of the proteasome inhibition in parasite replication ability we used epimastigote, in the presence of 0033 μ M to 50 μ M of the PSI. It was observed a reduction of the proliferation of 90% for the Y and Be-78 strains when compared to control groups. However, the Be-62 strain presented 57% of proliferation reduction in the concentration of 0,033 μ M and 73% in the concentration of 0,083 μ M. These results suggest that a functional proteasome is essential for the replication of epimastigote forms. Subsequently, these parasites were analyzed by the scanning electron microscopy. We observed that the flagellum was detached from the parasite cell body; roughness appeared on the parasite's cell membranes, besides several others body cell deformations. These results suggest that the proteasome inhibition led to unbalanced of turnover of the proteins involved in the maintenance of the cell. Finally

the effect of proteasome inhibition in the development of experimental infection of Chagas Disease was examined. Initially, young (15/18g), female, outbred Swiss mice were intraperitoneally inoculated with 5×10^3 trypomastigotes of the Y, Be-62 and Be-78 strains in the presence of 100uM of PSI. A reduction of 68, 42 and 73% on the peaks of parasitemia of these strains were corroborating the initial biochemical differences observed between the proteasome of these strains. The analysis of the tissue parasitism inflammation in the spleen, liver, heart and skeletal muscle showed that with Y strain, the level degree of parasitism of mice infected with tripomastigote pre-incubated with PSI,. However, higher tissue parasitism and intense inflammatory processes were observed in all tissue infected with Be-62 strain. This pattern was not observed for Be-78 strain that maintained the same tissue parasitism and inflammatory process when compared to the control group. Taken together, our results suggest that the proteasome is essential for the maintenance of the *T. cruzi* life cycle, since that the protease inhibition during epimastigote division, in addition to cell cycle blocking induces morphological changes, while the inhibition of infective forms leads to changes in the development of the experimental infection.

Lista de abreviaturas

Bis-Acrilamida	N, N' Metileno-Bis-Acrilamida
BCIP	5-bromo-4-cloro-3 indolil-fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Bz	Benzonidazol
Be-62	Berenice-62
Be-78	Berenice-78
CDK	Ciclin-dependent-kinase (Quinase dependente de ciclinas)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Dithithreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico)
LIT	Liver infusion tryptose
MOPS	[Ácido 3-(N-Mofolino)Propanosulfônico]
NBT	Nitrobluetetrazolium
Nf	Nifurtimox
PA	Proteasome ativator
PAP	Peroxidase-anti-peroxidase
PBS	Phosphate buffered saline
PSI	Proteasome Sintetyc Inhibitor
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SFC	SKP1-cullin-F box
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
WHO	World Health Organization

Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. As diferentes formas do *T. cruzi* ao longo de seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Figura adaptada de TDR/Wellcome Trust, 2004.

Figura 2: Estrutura do proteassoma 20S. A figura a esquerda representa o proteassoma 20S, composto por quatro anéis superpostos com sete subunidades alfa distintas compondo os anéis mais externos, e 7 subunidades beta distintas, compondo os anéis internos, sendo que as subunidades β_1 , β_2 e β_5 possuem atividades semelhantes à caspase, tripsina e quimiotripsina respectivamente. A figura a direita mostra um corte transversal em um modelo de preenchimento do proteassoma mostrando em amarelo os sítios catalíticos. Adaptado de *Rechsteiner & Hill, Trends Cell Biol, 15:27–33, 2005.*

Figura 3: Estrutura do complexo 19S e formação do complexo 26S. Em A, encontra-se representado o complexo regulatório 19S formado por 6 subunidades ATPásicas representadas por azul e 11 subunidades não ATPásicas representadas por círculos claros. O conjunto dessas subunidades formam uma base e uma tampa. Em B, encontra-se representado o complexo 26S formado pela união dos complexos 20S e 19S. Figura adaptada de Hicke L. 1999. *Trends Cell Biol. 9: 107-112.*

Figura 4: Gel de RNA total das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. Foi utilizado 5 μ g de RNA total das cepas de *T. cruzi*, obtidos como descrito em Materiais e Métodos.

Figura 5: Padrão de expressão das subunidades catalíticas do proteassoma 20S. Cerca de 10 μ L do produto da PCR das cepas em estudos, obtidos como descritos em Materiais e Métodos foram fracionados em gel de poliacrilamida 10% corado com prata. Como controle foi utilizado o gene HGPRT.

Figura 6: Análise densitométrica relativa às expressões das subunidades catalíticas do proteassoma 20S das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. A figura mostra os níveis relativos de expressão das subunidades catalíticas do proteassoma usando o HGPRT, como gene constitutivo. A análise densitométrica é a média

de três experimentos independentes realizada utilizando-se o programa Quantity One[®] 1-D Analysis Software Versão 4.4.1.

Figura 7: Detecção das subunidades α do proteassoma 20S das cepas Be-62, Be-78 e Y de *T. cruzi*. Cerca de 10 μ g da fração enriquecida de proteassoma das cepas de *T. cruzi* foram fracionadas em gel de poliacrilamida e coradas com Azul de comassie em A. PM - padrão de peso molecular (Invitrogen). Em B, as bandas protéicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a seguir incubada com anticorpos anti-subunidades α de ratos e, posteriormente, revelada como descrito em Materiais e Métodos.

Figura 8: Atividades peptidásicas do proteassoma 20S das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. 10 μ g da fração enriquecida de proteassoma das cepas Y, Be-62 e Be-78 obtidas como descritos em Materiais e Métodos foram utilizados para as medidas das atividades peptidásicas sendo utilizados os substratos Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-metilcumarina, Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina e Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina para a determinação das atividades semelhantes à caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente.

Figura 9: Efeito do PSI na proliferação *in vitro* das formas epimastigotas da cepa Y. Alíquotas de 10 μ L foram retiradas a cada 24 horas e as leituras foram feitas em câmara de Neubauer. As curvas representam as médias dos experimentos feitos em triplicata. O DMSO foi incluído como controle. A análise de variância utilizando o teste de Tukey, mostra um $p < 0,05$ a partir do 5^o dia para as concentrações acima de 1,0 μ M quando comparado aos grupos controle e DMSO.

Figura 10: Efeito do PSI na proliferação *in vitro* das formas epimastigotas da cepa Be-62. Alíquotas de 10 μ L foram retiradas a cada 24 horas e as leituras foram feitas em câmara de Neubauer. As curvas representam as médias dos experimentos feitos em triplicata. O DMSO foi incluído como controle. A análise de variância utilizando o teste de Tukey, mostra um $p < 0,05$ a partir do

5º dia para as concentrações acima de 1,0 µM quando comparado aos grupos controle e DMSO.

Figura 11: Efeito do PSI na proliferação *in vitro* das formas epimastigotas da cepa Be-78. Alíquotas de 10µL foram retiradas a cada 24 horas e as leituras foram feitas em câmara de Neubauer. As curvas representam as médias dos experimentos feitos em triplicata. O DMSO foi incluído como controle. A análise de variância utilizando o teste de Tukey, mostra um $p < 0,05$ a partir do 5º dia para as concentrações acima de 1,0 µM quando comparado aos grupos controle e DMSO.

Figura 12: O efeito do PSI na morfologia das formas epimastigotas, crescidas em meio LIT, das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi* obtidas através de microscopia eletrônica de varredura. As figuras A-F mostram os controles obtidos nos tempos de 24 horas e 72 horas das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*, respectivamente. As figuras L, M, X e Y mostram as culturas incubadas com 1µM de PSI obtidos no tempo de 24 horas da cepa Y de *T. cruzi*. As figuras K, N, W e Z mostram as culturas incubadas com 1µM de PSI obtidos no tempo de 72 horas da cepa Y de *T. cruzi*. As figuras J, O, V e □ mostram as culturas incubadas com 1µM de PSI obtidos no tempo de 24 horas da cepa Be-62 de *T. Cruzi*. As figuras I, P, U e □ mostram as culturas incubadas com 1µM de PSI obtidos no tempo de 72 horas da cepa Be-62 de *T. cruzi*. As figuras H, Q, T e □ mostram as culturas incubadas com 1µM de PSI obtidos nos tempos de 24 horas da cepa Be-78 de *T. Cruzi*. As figuras G, R, S e □ mostram as culturas incubadas com 1µM de PSI obtidos no tempo de 72 horas da cepa Be-78 de *T. cruzi*.

Figura 13: Curva de parasitemia da cepa Y. O controle mostra uma curva de parasitemia típica de uma infecção experimental com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T.cruzi*. No grupo experimental, a curva mostra a

parasitemia quando os tripomastigotas foram pré-incubados com 100µM de PSI. Esse experimento também foi realizado com DMSO. Os dados representam à mediana da parasitemia dos grupos experimentais. A análise não paramétrica foi realizada utilizando o teste de Kruskall-Wallis. Os valores de P para os dias 7, 8 e 9 foram $p < 0,007$, $p < 0,001$ e $p < 0,012$, respectivamente.

Figura 14: Curva de parasitemia da cepa Be-62. O controle mostra uma curva de parasitemia típica de uma infecção experimental com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T.cruzi*. No grupo experimental, a curva mostra a parasitemia quando os tripomastigotas foram pré-incubados com 100µM de PSI. Esse experimento também foi realizado com DMSO. Os dados representam à mediana da parasitemia dos grupos experimentais. A análise não paramétrica foi realizada utilizando o teste de Kruskall-Wallis. Os valores de P para os dias 5, 6 e 7 foram $p < 0,0043$, $p < 0,12$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Figura 15: Curva de parasitemia da cepa Be-78. O controle mostra uma curva de parasitemia típica de uma infecção experimental com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T.cruzi*. No grupo experimental, a curva mostra a parasitemia quando os tripomastigotas foram pré-incubados com 100µM de PSI. Esse experimento também foi realizado com DMSO. Os dados representam à mediana da parasitemia dos grupos experimentais. A análise não paramétrica foi feita utilizando-se o teste de Kruskall-Wallis. Os valores de P a partir do 9º dia para todos os dias foram de $p < 0,05$.

Figura 16: Taxa de mortalidade cumulativa da cepa Y. Camundongos Swiss foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, pré-incubadas ou não com PSI, como descritos em Materiais e Métodos.

Figura 17: Taxa de mortalidade cumulativa da cepa Be-62. Camundongos Swiss foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Be-62 do *T. cruzi*, pré-incubadas ou não com PSI, como descritos em Materiais e Métodos.

Figura 18: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* (A-D) ou infectados pela cepa Y e tratados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*, PAP X 600. Ninhos ou amastigotas isoladas em marrom.

Figura 19: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* (A-D) ou infectados pela cepa Y e tratados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Hematoxilina Eosina, X 300.

Figura 20: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos infectados pela cepa Be-62 do *T. cruzi* (A-D) ou infectados pela cepa Be-62 e tratados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*, PAP, X 600. Ninhos ou amastigotas isoladas em marrom.

Figura 21: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos infectados pela cepa Be-62 do *T. cruzi* (A-D) ou infectados pela cepa Be-62 e tratados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Hematoxilina Eosina, X 300

Figura 22: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* (A-D) ou infectados pela cepa Be-78 e tratados com PSI (F-H)

necropsiados na fase aguda da infecção. Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*, PAP X 600. Ninhos ou amastigotas isoladas em marrom.

Figura 23: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* (A-D) ou infectados pela cepa Be-78 e tratados com PSI (F-H) necropsiados na fase crônica da infecção. Hematoxilina Eosina, X 300.

Figura 24: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* (A-D) ou infectados pela cepa Be-78 e tratados com PSI (F-H) necropsiados na fase crônica da infecção. Hematoxilina Eosina, X 300.

Tabela 1: Número de acesso, seqüência dos iniciadores, tamanho esperado e temperatura de anelamento para os genes β_1 , β_2 e β_5

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas, assim denominada em homenagem ao cientista brasileiro Carlos Chagas, que a descobriu em 1909, é uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano, afetando cerca de 13 milhões de pessoas nas Américas Central e do Sul, onde aproximadamente 50 milhões encontram-se em áreas endêmicas (WHO, 2005). Sabe-se que as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas são determinadas, entre outros fatores, pela grande diversidade das cepas de *T. cruzi*, envolvendo fatores relacionados às suas características genéticas, antigênicas, bioquímicas e de tropismo tecidual e virulência.

A enfermidade inicia-se com uma fase aguda, onde o parasito pode ser encontrado com maior frequência no sangue periférico e nos tecidos, sendo que esta fase, na maioria das vezes, é assintomática ou oligossintomática. As manifestações clínicas da fase aguda começam por volta do sexto dia após a infecção e duram entre um a dois meses (Prata, 2001). Frequentemente, desenvolve-se uma inflamação, no local da infecção, denominada chagoma. O sinal de Romaña, denominação dada à inflamação das pálpebras, resultante da penetração do parasito através da mucosa conjuntival, é outro achado que permite diagnosticar parte das infecções agudas (Romaña, 1935).

A maioria dos indivíduos (70%) acometidos pela doença sobrevive à fase aguda e evoluem para a fase crônica assintomática, denominada forma indeterminada, na qual os parasitos são escassos na corrente sanguínea. Cerca de 30% dos indivíduos evoluem para uma fase crônica sintomática que pode ser cardíaca, digestiva ou mista (WHO, 2002), sendo a miocardite a manifestação mais comum nesta fase com altos índices de mortalidade (Filard & Brener, 1987).

A parasitemia é um importante parâmetro para o estudo da doença de Chagas, pois permite a diferenciação entre as fases aguda e crônica, necessárias para um estabelecimento da correlação anatomopatológica e monitoramento da cura dos pacientes.

1.2 *Trypanosoma cruzi*

As cepas do *T. cruzi* apresentam características genéticas de virulência, tropismo tecidual, antigenicidade, bioquímicas e de resistência a drogas que variam extremamente em relação à distribuição geográfica (Lima *et al.*, 1999). Além disso, diferentes populações podem alterar seu comportamento de acordo com a forma de manutenção (Veloso *et al.*, 2001). Sob condições naturais o ciclo de vida do *T. cruzi* se alterna entre hospedeiros invertebrados, mais de 130 espécies da família Reduviidae, e entre hospedeiros vertebrados, mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens (Lambrecht, 1965; Zeledon & Rabinovich; 1981).

O ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado inicia-se quando este ingere tripomastigotas durante seu repasto sanguíneo. No tubo digestivo do inseto vetor, as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas epimastigotas colonizam o intestino médio e multiplicam-se por divisão binária. A seguir, migram para a parte posterior do tubo digestivo do hospedeiro iniciando os processos de metaciclogênese. De uma forma geral, a metaciclogênese ocorre em resposta a alterações de estímulos ambientais tais como alterações de osmolaridade, pH, temperatura do ambiente intestinal dos triatomíneos e enzimas digestivas resultando em drásticas mudanças na expressão gênica, síntese de proteínas e morfologia do parasito. Fatores como as induzem mudanças morfológicas no *T. cruzi* (González-Perdomo *et al.*, 1988).

Ao realizarem o repasto sanguíneo, os hospedeiros invertebrados ingerem grande quantidade de sangue, seguida por rápida diurese e liberação de grande número de parasitos junto às suas excretas. A contaminação de mamíferos pode ocorrer através da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas depositadas pelo triatomíneo sobre a pele lesada do vertebrado por ação da sua probóscida, ou através da penetração por membranas mucosas. Os tripomastigotas metacíclicos, ao penetrarem no hospedeiro vertebrado, invadem células próximas ao local da infecção sofrendo o primeiro ciclo de multiplicação local seguido pela disseminação em vários tecidos e órgãos do hospedeiro. As formas epimastigotas, apesar de serem também liberadas nas excretas do vetor e penetrarem nas células do hospedeiro vertebrado, são destruídas no interior do vacúolo parasitóforo pela ação de proteínas semelhantes a do complemento (Andrews *et al.*, 1990), sendo apenas as formas tripomastigotas capazes de escapar dos mecanismos de destruição dos fagócitos e da lise mediada pelo complemento. Posteriormente a penetração nas células, as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas amastigotas

no citoplasma destas células. Foi demonstrado recentemente que protozoários, tais como *Toxoplasma gondii* e parasitos protozoários como o *T. cruzi*, acionam a via anti-apoptótica do hospedeiro para se manterem nas células infectadas e se multiplicarem (Nash *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999; Nakagima-Shimada *et al.*, 2000). Após a multiplicação, as amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas que posteriormente são liberados por ruptura celular e alcançam os sistemas circulatórios, sendo potencialmente infectantes para qualquer célula nucleada ou reiniciar o ciclo de infecção, ao serem ingeridas por um novo inseto vetor.

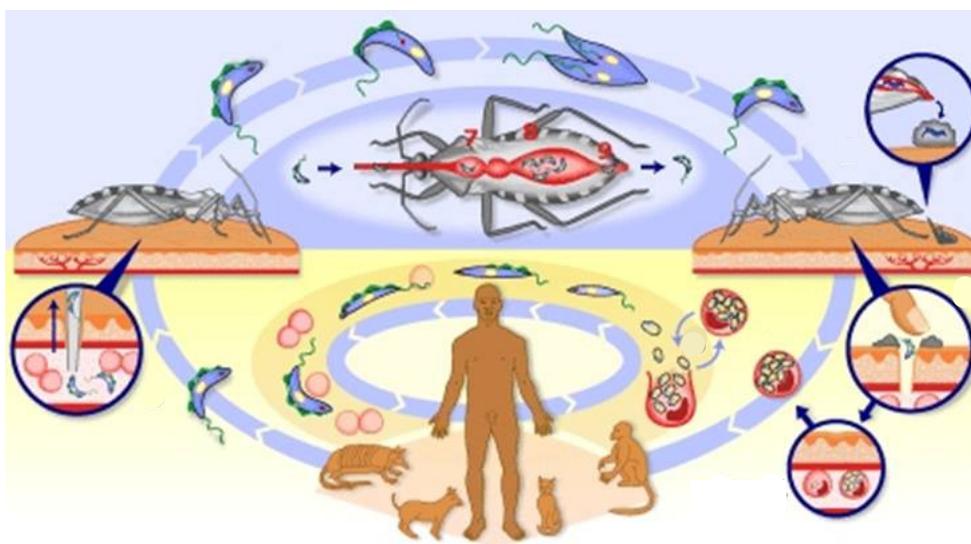


Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. As diferentes formas do *T. cruzi* ao longo de seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Figura adaptada de TDR/Wellcome Trust, 2004.

1.3 O genoma de *T. cruzi*

O genoma total do *T. cruzi* representado pelo clone CL Brener, recentemente publicado, é constituído de aproximadamente de 100 a 200x10⁶ pb dependendo da cepa, sendo que uma das particularidades observadas no genoma do *T. cruzi* é a grande variação no conteúdo de DNA entre diferentes cepas e até mesmo entre clones de uma mesma cepa, uma vez que diferenças de 30-70% no total de DNA foram observadas (Mcdaniel & Dvorak, 1993) e está localizado no núcleo e na mitocôndria.

Seu tamanho é relativamente maior que outros genomas de parasitos, como, por exemplo, *Leishmania* ($45-65 \times 10^6$ pb) e *Trypanosoma brucei* (25×10^6 pb) (El-Sayed *et al.*, 2005). Os genomas nucleares das diferentes cepas desta espécie apresentam número de bandas cromossômicas distintas e diferentes padrões de distribuição. De forma geral o genoma do *T. cruzi*, apresenta em torno de 20 bandas cromossômicas com massa molecular que variam entre 450 Kb a 4 Mb. Cerca de 60% do genoma parece codificar proteínas, sendo preditos 22.570 produtos gênicos dos quais pouco mais da metade, 12.570, representam cópias alélicas (El-Sayed *et al.*, 2005).

A organização dos genes nos tripanossomatídeos difere daquela conhecida em outros eucariotos, embora a composição das seqüências de DNA sejam as mesmas: seqüências codificadoras de proteína, RNAs e seqüências repetitivas. A maioria dos genes codificadores de proteínas está presente em múltiplas cópias na célula, sendo o espaçamento entre eles bem curto (variando de 100 até algumas centenas de pares de base). Genes que codificam tubulinas, calmodulinas, ubiquitinas, antígenos de superfície de membrana e enzimas da via glicolítica existem em arranjos em tandem no genoma (El-Sayed *et al.*, 2005). Essa organização cromossômica em *T. cruzi* é sugerido ser um mecanismo para evitar a perda de genes essenciais à sobrevivência. Genes de cópia única são raros em tripanosomas (El-Sayed *et al.*, 2005).

As análises dos genomas do *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* (Tritryp) evidenciaram diferenças em relação a outros eucariontes no reparo de DNA (estes organismos são capazes de catalisar mais vias de reparo), início da replicação (os tripanossomatídeos possuem somente um gene candidato à somente uma das seis subunidades do complexo de reconhecimento de origem de replicação) e DNA mitocondrial (El-Sayed *et al.* 2005).

A cromatina dos tripanossomatídeos é similar em alguns aspectos quando comparada com cromatinas de eucariotos superiores, sendo que as principais diferenças encontram-se nas histonas, que possuem propriedades bioquímicas diferentes que interferem na sua interação com o DNA. Os cromossomos não se condensam durante a divisão celular, dificultando sua análise pelos métodos convencionais (Belli, 2000).

O DNA nuclear do *T. cruzi* contém cerca de 80 a 200×10^8 pares de bases conforme a cepa e o conteúdo de DNA mitocondrial é de aproximadamente 41,4kb representando cerca de 20 a 25% do conteúdo total do DNA de *T. cruzi*, e se encontram

organizados em minicírculos com aproximadamente 1,4kb e maxicírculos com aproximadamente 40kb (El-Sayed *et al.*, 2005). Os minicírculos codificam pequenos RNAs denominados RNA guias que estão envolvidos no processo de edição de RNAm de enzimas mitocondriais e os maxicírculos codificam proteínas, tais como o citocromo b, a ATPsintase e os rRNA mitocondriais (revisto por Liu *et al.*, 2005).

O polimorfismo cromossômico detectado entre as diferentes cepas de *T. cruzi* é o responsável, em grande parte, pela diversidade nos perfis biológicos e bioquímicos apresentada pelas mesmas (Macedo & Pena, 1998).

1.4 Expressão gênica em *T. cruzi*

Em *T. cruzi* a maioria dos genes é transcrito de forma policistrônica, ou seja, unidades de RNAs policistrônicos, que são unidades transcricionais que contêm várias cópias do mesmo gene ou genes em tandem, com funções relacionadas ou não, processadas através de reações de trans-splicing e poliadenilação para dar origem aos RNAs maduros monocistrônicos. Este tipo de processamento pode explicar a existência de poucos promotores em tripanossomatídeos (Clayton, 2002).

Trans-splicing é um processo em que ocorre a adição de uma seqüência conservada de 39 nucleotídeos denominados de seqüência líder (SL), codificados pelos genes denominados mini-exon, na extremidade 5' que precede a reação de poliadenilação, que consiste, tal qual em eucariotos superiores, na adição de uma cauda composta por 30 resíduos de adenina na extremidade 3'. Estas reações ocorrem através de clivagens em regiões intergênicas, que por sua vez são regiões ricas em pirimidinas e parecem estar envolvidas no processamento correto dos RNAs (Huang & Vander Ploeg, 1991; Nozaki & Cross, 1995).

As RNA polimerases comuns em eucariotos também foram descritas em tripanossomatídeos (Cornelissen *et al.*, 1989; Teixeira, 1998). Foram observadas diferenças mínimas no conteúdo de aminoácidos destas enzimas como, por exemplo, a RNA polimerase II em tripanossomatídeos não apresenta os sete aminoácidos característicos na região C-terminal (Evers *et al.*, 1989). Porém, diferenças em suas atividades foram encontradas. Em tripanossomatídeos, a RNA polimerase I transcreve

os genes ribossomais, a RNA polimerase II, os genes do mini-exon e a RNA polimerase III, o RNA nucleolar e o RNA de transferência (Gillinger & Bellofatto, 2001).

Em tripanossomatídeos, os genes pertencentes à mesma unidade de transcrição policistrônica podem apresentar diferenças em seu nível de expressão (Graham, 1995).

Os promotores em *T. cruzi* parecem ser controlados por fatores que são cepas específicas, pois em experimentos de transfecção, o promotor de uma determinada cepa não mostrou ser funcional em outra cepa (Nunes *et al.*, 1997).

Em *T. cruzi*, as formas replicativas transcrevem mais que as formas infectantes e foi observado que a expressão de alguns genes pode manter-se constante ou aumentar, mesmo ocorrendo a diminuição dos níveis de transcrição (Abuin *et al.*, 1999, Recinos *et al.*, 2001), bem como a expressão transitória de algumas proteínas nas formas em diferenciação (Contreras *et al.*, 1985), sugerindo que nestes organismos a regulação é pós-transcricional e pós-traducional (Teixeira & da Rocha, 2003).

A regulação da expressão gênica em *T. cruzi* parece envolver a estabilidade dos RNAm e a eficiência da tradução, podendo isto estar relacionado com a presença de regiões reguladoras nas seqüências não traduzidas. Dallagiovanna *et al.* (2001) sugere que o acesso dos RNAm para os polissomos pode ser um mecanismo de regulação em tripanossomatídeos. Vincent *et al.* (1981), demonstrou que proteínas regulatórias estágio-específicas podem seqüestrar RNAm, bloqueando seu acesso aos polissomos, e retendo-os no citoplasma como não traduzidas. Recentemente foi sugerida a existência deste mecanismo de regulação em *T. cruzi* (Holetz *et al.*, 2007).

Por fim, mais estudos são necessários para esclarecermos o papel das seqüências de RNAm não traduzidas, dos polissomos e das estruturas semelhantes a P-body, na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos (Holetz *et al.*, 2007).

1.5 Alterações fenotípicas e/ou populacionais do *T. cruzi*

A correlação entre diversidade genética e patogenicidade do *T. cruzi* foi proposta através do modelo Histotrópico-Clonal (Macedo & Pena, 1998). Este modelo baseia-se na hipótese de que a heterogeneidade e multiclonalidade de uma cepa são fatores responsáveis pelos diferentes tropismos teciduais e, conseqüentemente, pelas variações na apresentação clínica da doença. Devido ao tropismo diferencial das várias cepas, os

clones circulantes e disponíveis para o isolamento por hemocultura podem ser diferentes daqueles responsáveis pela lesão tecidual. As técnicas de isolamento e cultivo do parasito podem selecionar subpopulações do parasito, não obtendo isolados representativos da população presente nos tecidos e sangue do hospedeiro vertebrado (Andrade, 1999).

A manutenção de cepas do parasito por vários meses ou anos em cultivo *in vitro*, pode resultar em diminuição da virulência e infectividade destas cepas em animais de laboratório. Essa observação tem sido explicada como resultado da seleção de subpopulações melhores adaptadas ao crescimento *in vitro* do que ao crescimento *in vivo* (Bice & Zeledón, 1970; Chiari *et al.*, 1973; Deane *et al.*, 1984a; Magalhães *et al.*, 1985; Alves *et al.*, 1993). Em hospedeiros vertebrados o sistema imune pode ter um importante papel neste fenômeno (Lana *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 1998). Alterações nas características das cepas originais podem ser observadas em experimentações animais de longa duração. Em relação à virulência dessas cepas, já foi descrito tanto aumento (Carneiro *et al.*, 1991) quanto declínio (Brener *et al.*, 1974). Segundo Basombrio *et al.* (2000), a manutenção de populações do parasito em passagens sanguíneas sucessivas em camundongos seleciona populações com aumentada virulência para invadir as células do hospedeiro vertebrado.

Análises bioquímicas e genômicas do *T. cruzi* estão revelando uma variedade de genes e funções que contribuem, de forma independentemente, para a virulência (Pereyra, 1996; Basombrio *et al.*, 1996). Provavelmente, várias subfunções necessárias para a infectividade podem não ser essenciais para o crescimento *in vitro*. O *T. cruzi* apresenta um genoma plástico capaz de sofrer atenuação temporária reversível (Chiari, 1974; Leguizamón *et al.*, 1993), bem como perda irreversível de virulência em culturas (Figueiredo *et al.*, 1996), possibilidade também suportada por experimentações em animais imunossuprimidos (Basombrio *et al.*, 2000). Lana e Chiari (1986) descreveram resultados similares em camundongos, comparando a cepa Berenice -62 (Be-62) com outro isolado da mesma paciente (Be-78) obtido 16 anos depois. Relatos na mudança do perfil de RFLP do kDNA após inoculação em animais são também comuns, evidenciando o papel seletivo exercido pelos vertebrados (Deane *et al.*, 1984a, b, c; Morel *et al.*, 1986; Carneiro *et al.*, 1990; Alves *et al.*, 1993). Berenice, o primeiro caso humano da doença de Chagas, pode exemplificar o papel seletivo exercido pelo

hospedeiro cronicamente infectado. Duas populações do *T. cruzi* foram isoladas desta paciente aos seus 55 e 71 anos de idade e denominadas Be-62 (Salgado *et al.*, 1962) e Be-78 (Lana & Chiari, 1986), já que os isolamentos foram realizados nos anos de 1962 e 1978 respectivamente. A população Be-78 mostrou-se diferente da população Be-62 em relação à morfologia, parasitemia, tropismo tecidual, patogenicidade, mortalidade em camundongos, crescimento e diferenciação em meio LIT (Lana & Chiari, 1986) e perfis de kDNA e isoenzimas (Lana *et al.*, 1996).

Foram demonstradas, através de análises de microssatélites, diferenças entre as cepas Be-62 e Be-78 do *T. cruzi* (Cruz *et al.*, 2005) e foi sugerido que ambas as populações fossem monoclonais, uma vez que cada cepa e seus respectivos clones apresentaram os mesmos produtos de amplificação. Posteriormente, Veloso *et al.* (2005), demonstraram através de análise dos zimodemas a policlonalidade da cepa Be-78. Alguns trabalhos, utilizando a cepa Y do *T. cruzi* (parcialmente sensível ao Bz) (Filard & Brener, 1987), têm demonstrado a indução de resistência ao Bz *in vivo*, e que a resistência de cepas do *T. cruzi* ao Bz e ao Nf aumenta quando os parasitos são isolados de camundongos previamente tratados com os mesmos fármacos (Marreto & Andrade, 1994; Murta & Romanha, 1998). Os autores sugerem que o tratamento inicial elimina os parasitos sensíveis preservando apenas os resistentes, que multiplicam e dominam a população.

Situação diversa foi observada por Veloso *et al.* (2001), que demonstraram indução natural de resistência ao Bz em duas populações do *T. cruzi* reisoladas de cães previamente infectados com a cepa Be-78 do *T. cruzi*, considerada 100% sensível a este quimioterápico (Toledo *et al.*, 1995). Considerando que as características genéticas das populações do *T. cruzi* podem ser um dos fatores que modulam o processo de susceptibilidade ao Bz, a variação na resistência ao fármaco demonstrada pelos autores citados acima poderia ser reflexo da plasticidade genética observada no *T. cruzi*, fato já demonstrado por diversos autores (Mcdaniel & Dvorak, 1993; Pacheco & Brito, 1999). Durante o processo de adaptação às pressões imunológicas do hospedeiro, o parasito acabaria tornando-se resistente, também, a mecanismos de pressão artificial, como a pressão oferecida pelo Bz, por exemplo.

1.6 Imunopatologia da doença da Chagas.

Muitos estudos têm sido realizados a fim de compreender a relação entre o *T. cruzi* e seus hospedeiros e como esta relação pode direcionar o curso da infecção. A ativação de diferentes células do sistema imune e de moléculas solúveis por elas produzidas desempenham participação direta no controle da carga parasitária durante a fase aguda da infecção (Aliberti *et al.*, 1999). Existem vários fatores que contribuem direta ou indiretamente para lesões produzidas pela infecção por *T. cruzi*. Alguns desses fatores são inerentes ao parasita (interação parasito-hospedeiro, tropismo, virulência, constituição genética e antigênica, número de inóculo do parasita, cepa do parasita, populações mistas, etc.); outros são relacionados ao hospedeiro (constituição genética, sexo, idade, raça, estado nutricional, resposta imune, etc) (Macedo & Pena, 1998).

A resposta imune do hospedeiro apresenta importante papel no controle da infecção pelo *T. cruzi*, pois através de seus mecanismos de ação, o parasito é continuamente combatido, diminuindo sua multiplicação nos tecidos, sendo as células Natural Killer (NK) importantes na limitação do crescimento do parasito e por iniciarem o desenvolvimento da resposta imune adquirida (Scott *et al.*, 1995). Grande parte das manifestações clínicas da DC deve-se a ativação da resposta imune dirigida contra o parasito (Aliberti *et al.*, 1996). A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas por outro lado, contribui para o aparecimento das manifestações clínicas crônicas devido às respostas auto-imunes (Leon & Engman, 2001). No entanto, tanto o parasito quanto a resposta imune podem persistir indefinidamente no hospedeiro e as lesões teciduais resultantes da atividade prolongada de ambos causam alterações morfofuncionais características da doença (Tarleton, 2001).

O *T. cruzi* é capaz de induzir a ativação/produção de proteínas e enzimas efetoras da imunidade inata natural. Porém, a forma tripomastigota consegue resistir ao ataque da via alternativa do complemento, o que permite a instalação da infecção.(Andrews *et al.*, 1990)

O papel dos macrófagos como primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares está bem estabelecido (Taliaferro & Pizzi, 1955; Mackaness, 1969). A capacidade dos macrófagos de participarem da destruição de certos parasitos envolve vários mecanismos complexos que dependem da cepa do parasito (Milder *et*

al., 1977; Alcantara & Brener, 1978), da forma evolutiva (Milder *et al.*, 1977; Nogueira *et al.*, 1980; Kloetzel *et al.*, 1984; Umezawa *et al.*, 1985), além do estado de ativação dos macrófagos (Nogueira *et al.*, 1977).

O mais importante sinal para a ativação dos macrófagos é o IFN- γ , que desempenha papel significativo na destruição do *T. cruzi* (Plata *et al.*, 1984; Murray *et al.*, 1985). Outras citocinas tais como o TNF- α e fatores inespecíficos, como o LPS (lipopolissacarídeo), podem estar envolvidas no processo de ativação dos macrófagos (Alcina & Fresno, 1987). Quando o *T. cruzi* inicia sua interação molecular em macrófagos, a produção de IL-12 é induzida e, além de estimular a proliferação de linfócitos T, acionam as células NK a sintetizarem IFN- γ , cuja função é induzir o recrutamento de macrófagos para a atividade microbicida (Aliberti. *et al.*, 1996). Dessa forma o TNF- α , produzido pelos macrófagos durante a infecção, interage de forma sinérgica tanto com IL-12 como com IFN- γ , ativando os macrófagos a expressarem a enzima óxido-nítrico (NO) sintase induzida e a produzirem NO (Miller *et al.*, 2002).

Foi demonstrado que a maioria das células presentes no infiltrado inflamatório de pacientes com formas cardíacas é célula T CD8⁺, com um número reduzido de células T CD4⁺ (Higushi *et al.*, 1997). Foi observado que os linfócitos T CD8⁺ estavam em contato direto com os miocardiócitos em destruição, sugerindo fortemente uma ação patogênica destas células na miocardite chagásica crônica. Os linfócitos T CD4⁺ específicos podem ter múltiplas funções na resistência ao *T. cruzi* e ainda contribuir como a maior fonte de INF- γ para a ativação de macrófagos. Estes atuariam também na diferenciação e ativação de linfócitos T CD8⁺, sendo importantes componentes na resistência ao parasito (Brener & Gazzinelli, 1997). Por outro lado, o papel das células T CD8⁺ pode estar associado ao fato do *T. cruzi* poder infectar qualquer tipo de célula. As células não-linfóides infectadas expressam apenas moléculas do MHC de classe I, que não são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺, mas poderiam ser identificadas por células T CD8⁺ efectoras (Lenzi *et al.*, 1996). Animais deficientes destas células são ainda mais susceptíveis à infecção (Tarleton *et al.*, 1996).

1.7 Tratamento da doença de Chagas

Várias substâncias têm sido testadas em relação à terapia da . Dentre todas as substâncias testadas, os estudos têm sido concentrados em apenas duas substâncias, o benzonidazol (Rochagan[®], 2-nitroimidazol-[N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamina]), e o nifurtimox (Lampit[®], 5-nitrofurano [3-Metil-4-(5-nitrofurfuridileno-amino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido]), sendo que este último teve sua fabricação descontinuada recentemente. O nifurtimox e o benzonidazol apresentam alta eficácia no tratamento da fase aguda da doença de Chagas, sendo observados índices que variam de 40% a 76% de cura parasitológica (Andrade *et al.*, 1992; Cançado, 1999; Cançado, 2002).

A quimioterapia com benzonidazol também é eficaz no tratamento de crianças, provavelmente na fase crônica recente da doença de Chagas. Sosa-Estani *et al.* (1998) verificaram 62% de cura em triagem clínica para testar a eficácia e tolerância do benzonidazol em crianças na fase indeterminada da infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, em adultos, o tratamento durante a fase crônica tardia da infecção gera um percentual de cura muito baixo (0-20%) (Cançado *et al.*, 1999, Kirchhoff *et al.*, 1999).

A eficácia de ambos também varia de acordo com a área geográfica, provavelmente devido a diferenças genéticas nas cepas encontradas nas diferentes regiões (Filardi & Brener, 1987; Giovanni-de-Simone *et al.*, 1987; Levi *et al.*, 1996; Stoppani, 1999). Isto talvez possa explicar os resultados contraditórios obtidos após o tratamento específico para a doença de Chagas (Andrade *et al.*, 1985; Filardi & Brener, 1987). Os efeitos colaterais produzidos pelo Bz e pelo Nf incluem náuseas, vômitos, perda do apetite e de peso, intoxicações e fenômenos alérgicos que comprometem a manutenção do tratamento. Estes fatos tomados conjuntamente evidenciam a importância da identificação de novos alvos terapêuticos a serem utilizados na quimioterapia da DC (Rassi & Luquetti, 1992; Castro, 1993; Croft, 1999; Engel *et al.*, 1998; Urbina, 1999).

1.8 O proteossoma e a ubiquitinação

Em vista da importância de se obter novos alvos terapêuticos para a doença de Chagas, pesquisas envolvendo proteases do *T. cruzi* têm se revelado de grande valia. Na última década, as proteases dos parasitas receberam considerável atenção da

comunidade científica, o que levou à caracterização de seu papel na interação parasito-hospedeiro. Um parasita bem sucedido deve conseguir penetrar e sobreviver no interior do hospedeiro, assimilando os componentes necessários à sua nutrição e conseguindo escapar da resposta imunológica do mesmo.

O proteassoma 20S é um complexo enzimático com 750kDa, presente tanto no citosol como no núcleo de todas as células de mamíferos (Kania *et al.*, 1996), leveduras (Hill & Wolf, 1992), archaeobactérias como *Thermoplasma acidophilum* e *Rhodococcus* (Seemuller *et al.*, 1995). Recentemente este complexo foi descrito nos seguintes parasitas: *T.cruzi* (Gonzales *et al.*,1996), *T.brucei* (Lomo, *et al.*, 1997), *Entamoeba histolytica* (Scholze *et al.*, 1996), *Leishmania mexicana* (Robertson, 1999), *Schistosoma mansoni* (Guerra-Sá, 2005), *Plasmodium berghei*, (Gantt, et al. 1998) e *Giardia lamblia* (Emmerlich *et al.*; 1999).

Estudos de microscopia eletrônica revelaram que o proteassoma 20S apresenta uma estrutura cilíndrica composta por quatro anéis superpostos com sete subunidades cada um, num arranjo $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$, o que favorece a formação de um poro central por onde passariam as proteínas totalmente desenoveladas e sem ligações dissulfeto, para então serem degradadas. Este complexo apresenta pelo menos três atividades proteolíticas que são semelhantes à ação da tripsina, quimiotripsina e caspase (Tanaka, 1998). A figura 2 representa a estrutura do proteassoma 20S.

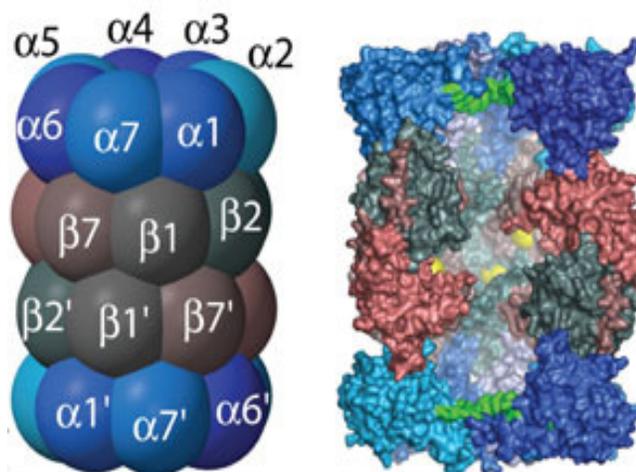


Figura 2: Estrutura do proteassoma 20S. A figura a esquerda representa o proteassoma 20S, composto por quatro anéis superpostos com sete subunidades alfa distintas compondo os anéis mais externos, e 7 subunidades beta distintas, compondo os anéis internos, sendo que as subunidades β_1 , β_2 e β_5 possuem atividades semelhantes à caspase, tripsina e quimiotripsina

respectivamente. A figura a direita mostra um corte transversal em um modelo de preenchimento do proteassoma mostrando em amarelo os sítios catalíticos. Adaptado de *Rechsteiner & Hill, Trends Cell Biol, 15:27–33, 2005*.

A forma predominante de proteassomas encontrado em eucariotos inferiores é o proteassoma 26S, cujo papel principal é a degradação de proteínas tanto de uma maneira dependente como independente de ubiquitina. Atualmente, esta protease vem sendo considerada como a responsável pela remoção tempo-específica de diversas proteínas regulatórias envolvidas em funções celulares diversas e essenciais para a viabilidade celular, como por exemplo: no ciclo celular, no reparo do DNA, no controle da transcrição, na modulação de receptores, em vias de transdução de sinal e na apresentação de antígenos (Glickman & Ciechanover, 2002). A figura 3 ilustra a estrutura do complexo 19S e o proteassoma 26S. O complexo regulatório 19S contém aproximadamente 20 subunidades heterólogas com massa molecular variando de 25 a 110kDa, as quais podem ser classificadas em dois subgrupos: um subgrupo formado por pelo menos 6 ATPases, que são estruturalmente similares e bem conservadas durante a evolução das espécies, e um outro subgrupo, com pelo menos 14 subunidades heterogêneas, não estruturalmente relacionadas à família ATPase de proteínas (DeMartino *et al.*, 1996).

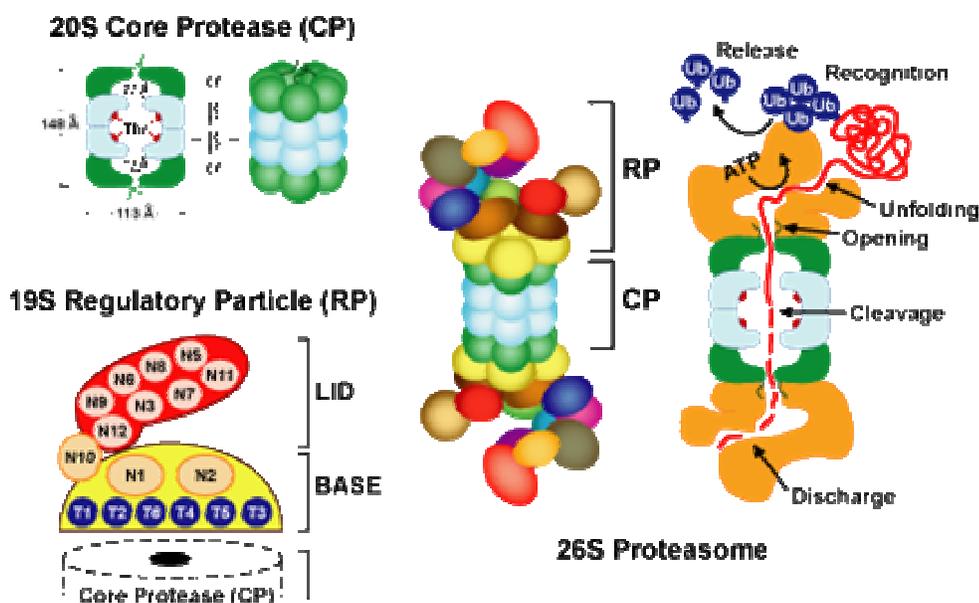


Figura 3: Estrutura do complexo 19S e formação do complexo 26S. Em A, encontra-se representado o complexo regulatório 19S formado por 6 subunidades ATPásicas representadas por azul e 11 subunidades não ATPásicas representadas por círculos claros. O conjunto dessas

subunidades formam uma base e uma tampa. Em B, encontra-se representado o complexo 26S formado pela união dos complexos 20S e 19S. Figura adaptada de Hicke L. 1999. Trends Cell Biol. 9: 107-112.

O complexo 19S também pode ser dividido em dois complexos menores, a base e a tampa. A base é formada por seis subunidades ATPásicas e duas subunidades não ATPásicas, denominadas de RPN1 (**R**egulatory-**P**article **N**on-ATPase subunit 1) e RPN2, respectivamente, enquanto que o complexo tampa é composto por onze subunidades não-ATPásicas (Glickman & Ciechanover, 2002). Estas seis subunidades ATPásicas distintas pertencem à família AAA de proteínas (ATPase associada com uma variedade de atividades celulares), sendo caracterizada pela presença de um domínio conservado formado por 200 resíduos de aminoácidos contendo a seqüência consenso para a ligação ao ATP. Apesar dos grandes avanços no entendimento do proteassoma, ainda muito pouco é conhecido a respeito da função destas múltiplas ATPases. Uma provável função seria o fornecimento contínuo de energia, necessário para a degradação das proteínas-alvo (Tanaka, 1998b).

O reconhecimento dos substratos poli-ubiquitinados pelo proteassoma 26S é a etapa regulatória desta via de proteólise intracelular. Diversos grupos de pesquisa independentes têm demonstrado que a subunidade RPN10 (originalmente denominada de S5a), constituinte do complexo tampa do 19S é a responsável pelo reconhecimento dos substratos naturais do proteassoma 26S (Tanaka 1998; Glickman & Ciechanover, 2002). Estas análises também sugerem que a subunidade RPN10 foi extremamente conservada durante a evolução das espécies (Kikukawa *et al.*, 2002).

De uma forma resumida, os sinais presentes em uma proteína, que a direcionam para a ubiquitinação podem depender de fosforilação de resíduos específicos na proteína-alvo, ou de sinais "geneticamente programados" para a ubiquitinação. Estes sinais seriam umas seqüências curtas e hidrofóbicas localizadas na região N-terminal, suficientes para direcionar a ubiquitinação. Este sinal é conhecido como regra do N-terminal (Pickart, 1997).

O processo de ubiquitinação se dá através da ligação covalente, via ligações isopeptídicas, que envolve a ativação do C-terminal da ubiquitina pela enzima ubiquitina ativadora (E1), e posterior transferência dos grupos amino de resíduos lisil para o substrato protéico, catalizado pelas enzimas conjugadoras (UBCs ou E2) seguido

da catálise da ligação covalente envolvendo o resíduo de glicina no substrato alvo, mediado pelas enzimas ligases ou E3 (Glickman & Ciechanover, 2002).

Diversos grupos de pesquisa têm demonstrado a ligação de múltiplas moléculas de ubiquitina (usualmente quatro) envolvendo o resíduo de lisina 48 (K48) da ubiquitina, formando uma âncora de ubiquitina (poli-ubiquitinação). A proteína alvo é direcionada para a proteólise mediada pelo proteassoma 26S, enquanto que a poli-ubiquitinação envolvendo o resíduo k63 da ubiquitina está relacionada aos mecanismos de reparo do DNA (Glickman & Ciechanover, 2002).

Além do complexo regulatório 19S, em células de mamíferos e em parasitos protozoários tais como *T. brucei*, têm sido descritas as existências de um outro complexo ativador do proteassoma 20S, denominado de PA28 e o seu correspondente em tripanossomatídeos o PA26 e o PA200. Neste caso, a ligação destes ativadores ao proteassoma ocorre por uma via independente de ATP. Atualmente, a via proteolítica independente é tão importante quanto a dependente de ubiquitina. O PA28 (Hill *et al.*, 2002) existe sob três isoformas: o PA28_α e PA28_β que aparentemente estão envolvidos na resposta imune sendo induzidos por interferon γ . Diversos relatos sugerem que a montagem do proteassoma com os PA28_α e PA28_β são necessários para um processamento eficiente de antígenos, enquanto que o PA28_γ parece estar envolvido na supressão da apoptose. O PA200 encontrado somente no núcleo de mamíferos parece estar envolvido no reparo do DNA (Ustrell *et al.*, 2005).

1.9 O proteassoma de parasitos protozoários

O proteassoma exerce um papel essencial na homeostase celular de várias espécies de parasitos protozoários, tais como *T. brucei* (Hua *et al.*, 1996), *T. cruzi* (González *et al.*, 1996) e *Toxoplasma gondii* (Shaw *et al.*, 2000).

Em *T. cruzi*, foi demonstrado que inibidores específicos do proteassoma, tais como MG132 (N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal) e lactacistina (C₁₅H₂₄N₂O₇S), inibem em 50% a transformação das formas tripomastigota para amastigota quando foi adicionado ao meio de cultivo 1-2 μ M desses inibidores (González *et al.*, 1996).

De Diego *et al.* (2001) demonstrou o envolvimento do proteassoma na transformação estágio-específico de tripomastigota para amastigota. O “turnover” de

proteínas em tripomastigotas é dependente da via proteassoma-ubiquitina, sendo acentuada durante a transformação em amastigotas. Quando a atividade do proteassoma é inibida, profundas mudanças morfológicas ocorrem durante a transformação estágio específico de *T. cruzi*, demonstrando que as proteínas do citoesqueleto associadas ao flagelo são alvos da via dependente de ATP, ubiquitina e proteassoma (González *et al.*, 1996 e de Diego *et al.*, 2001).

Apesar dessas evidências, a caracterização e identificação molecular do proteassoma em parasitos protozoários ainda é um amplo campo a ser elucidado. O uso de inibidores tais como, peptídeos aldeídos MG132 e lactacistina, tem ajudado a definir o papel do proteassoma em vários processos realizados pelos parasitos protozoários. Na *E. invadens*, *E. histolytica* e *L. mexicana*, os inibidores lactacistina e MG132 bloquearam o crescimento do parasito e preveniram a encistação (Makioka *et al.*, 2002; Robertson, 1999); no *P. berghei*, a lactacistina bloqueou a replicação, porém, não impediu a entrada do parasito nas hemácias (Gantt *et al.*, 1998), no *T. brucei*, a lactacistina bloqueou a progressão do ciclo celular das formas procíclicas a uma concentração de 5µM, na fase de transição de G2 para a fase M e nas formas sanguíneas, 1µM de lactacistina bloqueou a proliferação em 30-35% na fase G1 e 55-60% na fase G2 (Mutomba *et al.*, 1997), contudo, não inibiu a diferenciação de formas sanguíneas em formas procíclicas (Nkengu-Njinkeng *et al.*, 2002); finalmente, no *T. cruzi*, o MG132 e a lactacistina inibiram a transformação da forma tripomastigota em amastigota, no entanto, não bloquearam a invasão celular (De Diego *et al.*, 2001).

O proteassoma 26S da forma epimastigota do *T. cruzi* foi identificado como tendo um peso molecular de 1400kDa, apresentando uma atividade semelhante quimotripsina dependente de ATP ao substrato Suc-LLVY-Amc (González *et al.*, 2001).

A principal diferença entre proteassomas dos protozoários parasitos e dos mamíferos está relacionada com a atividade peptidásica. Nos mamíferos, a atividade principal é a atividade semelhante à quimiotripsina enquanto que nos tripanossomatídeos, a atividade principal é a semelhante tripsina (revisado por Paugam *et al.*, 2003).

Essas diferenças reforçam a possibilidade do proteassoma servir como um futuro alvo terapêutico. Entretanto, a limitada informação sobre os mecanismos do

proteassoma de *T. cruzi* e a natureza das diferenças observadas com os proteassomas de mamíferos requer estudos mais aprofundados tanto na parte estrutural quanto funcional para que se torne concreto o uso de drogas específicas que bloqueiem a atividade do proteassoma do *T. cruzi*.

2.1 Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da inibição do proteassoma por um inibidor específico, o PSI (Wilk & Figueiredo-Pereira, 1993), na proliferação *in vitro* e na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss inoculados com as cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi* pré-incubadas ou não com PSI.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar os níveis de RNAm das subunidades β catalíticas do proteassoma 20S das formas epimastigotas das cepas em estudos através de RT-PCR.

2.2.2 Analisar os níveis de expressão do proteassoma 20S, das formas epimastigotas das cepas em estudos através de Western Blot.

2.2.3 Avaliar as atividades peptidásicas semelhantes à caspase, tripsina e quimotripsina do proteassoma 20S, das formas epimastigotas das cepas em estudos.

2.2.4 Avaliar morfológicamente as formas epimastigotas das cepas em estudos, incubadas com PSI, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.2.5 Determinar a intensidade do parasitismo tecidual (coração, baço, fígado, cérebro e músculo esquelético) em camundongos Swiss, submetidos à infecção experimental com formas tripomastigotas sanguíneos previamente incubados ou não com PSI.

2.2.6 Determinar a intensidade das lesões teciduais (coração, baço, fígado, cérebro e músculo esquelético) em camundongos Swiss, submetidos à infecção experimental com formas tripomastigotas sanguíneos previamente incubados ou não com PSI.

2.2.7 Determinar a taxa de mortalidade cumulativa dos camundongos Swiss submetidos à infecção experimental com formas tripomastigotas sanguíneos previamente incubados ou não com PSI.

3.1 Reagentes

Foi utilizado o inibidor de proteassoma PSI (*N*-carbobenzoxy-L-isoleucyl-L- γ -*t*-butyl-L-gultamyl-alanyl-L-leucinal) (SIGMA Chemical Co. - St Louis, MO), dissolvido em DMSO (dimetilsulfoxido) a uma concentração de 10mM e estocado a -20°C.

3.2 Parasitos

As cepas utilizadas neste trabalho são pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* II, devido ser a linhagem que circula com maior frequência no ciclo doméstico da doença de Chagas no Brasil. A cepa Y foi isolada de um caso humano agudo por Freitas *et al.* (1953), sendo estudada e descrita por Silva & Nussenzweig (1953) e as cepas Be-62 e Be-78, isoladas da mesma paciente, através de xenodiagnóstico por Salgado *et al.* (1962) e Lana & Chiari (1986), respectivamente. As formas epimastigotas, utilizadas para os experimentos *in vitro*, foram mantidas em meio LIT (Camargo, 1964), sendo utilizadas na concentração de 3×10^6 parasitos por experimento. Para os experimentos *in vivo* foram utilizadas formas tripomastigotas sanguíneas obtidas de camundongos Swiss mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.3 Animais

Foram utilizados para os experimentos *in vivo* 108 camundongos Swiss fêmeas com 30 dias de idade e peso entre 18 a 20g, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.4-Extração de RNA total e verificação da integridade

Nos experimentos de extração de RNA, a água utilizada foi inicialmente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC-Sigma) na proporção de 1/1000, deixada em repouso por 12 horas e em seguida esterilizada em autoclave, com pressão 1atm e temperatura a 120°C, para tornar-se isenta de RNases. Todos os materiais, tais como, ponteiras, tubos eppendorfs e vidrarias foram lavados com água DEPC e autoclavados por 40 minutos.

Para a extração de RNA total, 2×10^8 formas epimastigotas das cepas em estudo, foram adicionadas a 1mL de Trizol (Gibco-BRL). Em seguida a mistura foi homogeneizada com o auxílio de vortex durante 1 minuto por 3 vezes. Os homogenatos foram incubados por 40 minutos à temperatura ambiente. Após este intervalo foram adicionados 200 μ L de clorofórmio ao homogenato, e agitados vigorosamente por 1 minuto em vortex. A mistura resultante foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 10 minutos a 10.000g. A fase aquosa foi então transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5mL e adicionado 500 μ L de isopropanol (Sigma). A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 30 minutos a -20°C . Após este período os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 10.000g, descartando novamente o sobrenadante. Posteriormente, o RNA total foi mantido por 20 minutos à temperatura ambiente para a evaporação total do etanol. Em seguida, foi ressuspensão em aproximadamente 50 μ L de água DEPC.

Para quantificar o RNA total, 4 μ L dessa solução foram diluídas em 996 μ L de água DEPC. A leitura foi realizada a 260 e 280nm, para estimar o grau de pureza e sua concentração. Segundo Sambrook *et al.* (1989), 1 unidade de absorção em 260nm corresponde à concentração de 40 μ g de RNA/mL.

A integridade da preparação foi verificada em gel de agarose 1,2% em MOPS 1X diluído com água DEPC (MOPS 21g, Acetato de sódio diidratado 3,4g, EDTA tetrassódico 1,9g, água DEPC q.s.p 500mL, em pH 7 e autoclavado). O gel resultante encontra-se representado na figura 4. Antes de aplicar as amostras no gel, 10 μ g de RNA foram adicionados a 15 μ l de tampão da amostra (formamida 187,5 μ L, formaldeído 27,5 μ L, MOPS 10X 37,5 μ L, azul de bromofenol [100mg/mL] 1 μ L, água DEPC 42 μ L e brometo de etídeo 0,5 μ L). Essa mistura foi desnaturada por 15 minutos a 65°C , seguida de banho de gelo por 3 minutos. As amostras foram aplicadas no gel e adotou-se uma voltagem de 45 a 50 volts em tampão de corrida MOPS 1X.

3.5 Obtenção dos cDNAs

Os oligonucleotídeos utilizados para a obtenção dos cDNAs correspondentes aos genes das subunidades β_1 , β_2 e β_5 do proteossoma 20S foram desenhados com base

nas seqüências de nucleotídeos (EST) de *T. cruzi*, depositadas no GeneDB, que apresentaram similaridade significativa (e-Value menor que e^{-150}) com seqüências de *T. brucei*, *Leishmania sp* e *Plasmodium sp*. A Tabela 1 apresenta o número de acesso dos genes, o tamanho dos genes amplificados, o desenho dos iniciadores e a temperatura de anelamento adotada.

Gene	Número de acesso	Seqüência dos iniciadores	Tamanho	TM
β_1	Tc00.1047053507603.40	F5'GGAGCATTGCTTCATGAG3'	798pb	50°C
	Tc00.1047053509429.110	R5'TCGCAGAGCTGCTGAATG3'		
β_2	Tc00.1047053508461.430	F5'TGGTTATTATGGCATGTG3'	809pb	51°C
	Tc00.1047053510287.30			
β_5	Tc00.1047053503891.10087	R5'TGTTTCGGGTACTTACGC3'	805pb	49°C
	Tc00.1047053507639.40	F5'CAACGCTTAGCTCGTATG3'		
HGPRT	Tc00.1047053503781.70	R5'CTACAACACGTAGCGATC3'	411pb	50°C
	Tc00.1047053509693.70	F5'ACCGTAGCCAATCACAAAGGC3'		
	Tc00.1047053506457.30	R5'CTACAAGGGAAAGGGTCTGC3'		

TM = Temperatura de Anelamento.

Tabela 1 - Número de acesso, seqüência dos iniciadores, tamanho esperado e temperatura de anelamento para os genes β_1 , β_2 e β_5 .

A primeira fita do cDNA foi obtida utilizando-se 5 μ g de RNA total e o kit thermoscript RT-PCR (GIBCO-BRL). As condições para esse experimento foram exatamente iguais às fornecidas pelo fabricante.

Para a amplificação do cDNA obtido acima foi utilizado um protocolo de PCR de 20 ciclos, cada um composto pelas seguintes etapas: desnaturaçã, 1 minuto a 95°C, anelamento, 1 minuto em temperatura específica de cada par de iniciador (Tabela 1), extensão, 1 minuto e 30 segundos a 72°C sendo que no final dos 20 ciclos foram necessários mais 6 minutos com a temperatura a 72°C. Em seguida, 10 μ L dessa reação foram analisados em gel de poliacrilamida 10% e posteriormente corados pelo método da prata, conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989).

3.6 Preparação da fração enriquecida de proteassoma

Inicialmente, 4×10^8 formas epimastigotas das cepas do *T. cruzi* em estudo foram homogeneizadas em 1mL de tampão 20S (Tris-HCl 25mM pH=7,5; DTT 1mM, Glicerol 10%, EDTA 1mM, Leupeptina 1mM, NEN 10mM). O homogenato foi transferido para tubo tipo eppendorf e submetido a sonicação por 45 segundos, quatro vezes a 60 watts, com intervalo de 30 segundos em banho de gelo. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000g e o pellet descartado. Posteriormente, o material resultante foi ultracentrifugado por 1 hora a 100.000g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf e centrifugado por 6 horas nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspensionado em 100 μ L do tampão 20S. A determinação da concentração protéica foi realizada segundo o método de Lowry, usando soro albumina bovina para a construção de uma curva padrão.

3.7 SDS-PAGE e ensaios de Western Blot

Cinco μ g da fração enriquecida de proteassoma foram fracionados em gel de SDS-PAGE 10% como descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado como padrão de peso molecular o MultiMark Multi-Colored Standart (Invitrogen). A voltagem adotada foi de 120 Volts. Após a corrida, um dos géis foi corado com comassie blue. O outro gel foi preparado para a transferência de acordo com o método descrito por TOWBIN *et al*, 1979, com modificações no tampão de transferência (Tris-HCl 25mM pH 8,3, glicina 192mM, etanol 18% e SDS 0,02%). A voltagem aplicada no sistema foi de 25 Volts a uma temperatura de 4°C por 16 horas. Após o término da transferência, a membrana foi corada com Ponceau (0,25% em ácido acético 1%) por 5 minutos e descorada com água para visualização das proteínas.

Posteriormente, a membrana foi bloqueada por 16 horas a 4°C com TBS-T (Tris-HCl 50mM pH 8,3, NaCl 150mM, Tween-20 0,05% e leite desnatado em pó 5%) e submetida à *immunoblot*, conforme descrito a seguir. Após o bloqueio, a membrana de PVDF foi lavada 3 vezes em TBS-T e incubada com anticorpo primário (anti-subunidades α para detectar o proteassoma 20S) numa diluição 1:1000 em TBS-T por 3

horas à temperatura ambiente. O anticorpo foi removido e a membrana lavada três vezes rapidamente com TBS-T. Em seguida a membrana foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com fosfatase alcalina) na diluição 1:1000. Após este período, a membrana foi lavada por três vezes durante 5 minutos em tampão de revelação (Tris pH 9, 5, NaCl 5M, MgCl₂ 1M). Finalmente, foram adicionados 5mL de tampão de revelação colorimétrica, 66μL de NBT e 33μL de BCIP agitando-se o conteúdo por 30 minutos.

3.8 Dosagem das atividades peptidásicas dos proteassoma

Nos ensaios da atividade proteolítica exógena, foram utilizados diferentes substratos fluorogênicos como: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-metilcumarina, Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina e Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina para a determinação das atividades semelhantes à caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente, do proteassoma na fração citosólica das formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Utilizamos 5μg da fração enriquecida de proteassoma, obtida como descrito no item 3.6, e 13μM dos substratos fluorogênicos. O tampão utilizado foi Tris HCl 50mM pH 8,0 e MgCl₂ 10mM. O ensaio foi realizado num volume final de 240μL com incubação de 30 minutos a 37°C sendo interrompida pela adição de 2mL de etanol. A seguir a reação foi incubada em gelo por no mínimo 1 hora, sendo posteriormente centrifugada durante 10 minutos a 2500rpm. As leituras fluorimétricas foram realizadas com o auxílio de um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC nos comprimentos de onda 380nm (excitação) e 440nm (emissão), e os resultados expressos em unidades de fluorescência por μg de proteína.

3.9 Importância do proteassoma na proliferação *in vitro*

As formas epimastigotas de *T. cruzi*, das cepas Y, Be-62 e Be-78, foram crescidas em meio de cultura LIT (Camargo, 1964), contendo 20% de soro fetal bovino

em estufa a 28°C. Essas culturas, na concentração de 3×10^6 parasitos, foram diluídas em 3mL de meio LIT e utilizadas na fase log de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada cepa, sendo o inibidor de proteassoma, PSI adicionado às culturas em concentrações crescentes (0,033 μ M, 0,083 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M). Como controle do experimento, um grupo foi crescido na presença de 50 μ M de DMSO. As leituras foram realizadas em câmara de Neubauer por 10 dias para as cepas Y e Be-62 e 12 dias para a cepa Be-78.

3.10 Avaliação Morfológica

Para estudarmos a presença de alterações morfológicas após o acréscimo do PSI, foi utilizado o mesmo processo do item anterior, utilizando-se apenas a concentração de 1 μ M. As amostras das culturas controles e as incubadas com PSI foram coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas, centrifugadas por 20 minutos a 3500g com PBS a 10% por três vezes e ressuspendidas em glutaraldeído a 2,5%. Após 24 horas, foi acrescentado às amostras tampão de cacodilato a 1M por 2 horas. Após esse período, as lâminas foram lavadas 3 vezes com tampão de cacodilato 0,1M. As lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisinas a 1% foram aderidas às lamínulas por 30 min, sendo então lavadas mais uma vez com tampão cacodilato e fixadas com OsO₄, a 1% em tampão cacodilato por 1 hora. Após este período as lâminas foram lavadas três vezes novamente em tampão cacodilato 0,1M, desidratadas em série crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes a 100%), secas no ponto crítico e metalizadas.

3.11 O papel do proteassoma no desenvolvimento experimental da doença de Chagas

Para a avaliação *in vivo* da atividade do inibidor de proteassoma, PSI, no curso da infecção experimental aguda, seis camundongos Swiss foram inoculados com as cepas em estudo e agrupados da seguinte maneira: I - camundongos infectados com formas tripomastigotas do *T. cruzi*; II - camundongos infectados com tripomastigotas previamente incubados com o solvente (DMSO); III - camundongos infectados com

tripomastigotas previamente incubados com 100 μ M do inibidor de proteassoma (PSI). Os experimentos foram realizados em duplicata e a infecção foi feita por via intraperitoneal com 5x10³ tripomastigotas sanguíneos. O inóculo foi pré-incubado com DMSO e PSI por 20 minutos à temperatura ambiente. Antes da inoculação, foi analisada por microscopia óptica a viabilidade dos parasitos. Para a avaliação da parasitemia foram coletados 5 μ L de sangue da veia caudal dos camundongos, sendo os parasitos quantificados segundo o método Brener (1962), a partir do 4º dia após o inóculo até uma semana após a supressão da parasitemia e/ou morte dos animais.

3.12 Taxa de Mortalidade

Para determinar a taxa de mortalidade, os animais foram acompanhados diariamente e a mortalidade registrada foi expressa em porcentagem cumulativa.

3.13 Avaliação dos processos inflamatórios e tropismo tecidual de camundongos inoculados com tripomastigotas das cepas Y, Be-62 e Be-78, pré-incubadas ou não com PSI

Para avaliar o efeito da incubação dos tripomastigotas com PSI sob o tropismo e parasitismo tecidual, necropsiamos camundongos com 11 dias de infecção (fase aguda) para as cepas Y e Be-62, três camundongos infectados com cepa Be-78 necropsiados no 21º dia (fase aguda) e três camundongos infectados com cepa Be-78 necropsiados 180 dias após a infecção (fase crônica).

Fragments do baço, bexiga, ceco, cólon, diafragma, duodeno, encéfalo, esôfago, fígado, glândulas, jejuno, íleo, linfonodo, músculo esquelético, músculo cardíaco, olho, osso, pâncreas, pele, pulmão, tecido adiposo, traquéia, útero e supra renal foram retirados, porém, foram utilizados para este trabalho somente o baço, fígado, músculo cardíaco e esquelético. Posteriormente foram realizados cortes transversais dos órgãos e obtidos fragmentos com aproximadamente 2mm de espessura, fixados em formol tamponado a 10% (pH 7,2) por 24 horas.

Os fragmentos submetidos à fixação química foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois (70%, 80%, 90% e três trocas de álcool absoluto), diafanizados em duas trocas de xilol, embebidos e incluídos em parafina histológica.

Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia e de cada bloco obtiveram-se cortes com espessura de 3µm. Foram confeccionadas duas lâminas, sendo a primeira corada pelo método da Hematoxilina-Eosina para observações rotineiras das alterações histopatológicas e avaliadas ao microscópio óptico (em 100 campos microscópicos, com a objetiva de 40X) e a segunda utilizada na técnica de imunohistoquímica descrita a seguir. Foram realizadas descrições histopatológicas de todos os cortes atentando-se para as alterações degenerativas e inflamatórias e presença de ninhos de amastigotas nos tecidos. Foram avaliadas a presença e intensidade do processo inflamatório.

3.14 Avaliação da carga parasitária tecidual

Os cortes histológicos foram desparafinizados em duas passagens por xilol durante 15 minutos cada, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por três minutos cada. Seguiu-se lavagem em água corrente por 5 minutos e em PBS pH 7,2-7,4.

Posteriormente, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena em banho de PBS/peróxido de hidrogênio durante 30 minutos (240mL de PBS e 10mL de peróxido de hidrogênio a 30%) à temperatura ambiente. Em seguida os cortes histológicos foram submetidos a três banhos consecutivos em PBS por 5 minutos.

Após a secagem das bordas dos cortes com papel absorvente, aplicou-se o soro normal de cabra diluído na proporção 1:40 em PBS, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, com o objetivo de bloquear as reações cruzadas inespecíficas.

Em seguida, secou-se o excesso de soro normal de cabra e as lâminas foram incubadas com anticorpo primário (anti-*T. cruzi* produzido em coelho, diluição 1:1000 em PBS/albumina a 0,1%) em câmara úmida a 37°C, por uma hora. Seguiram-se três banhos de 5 minutos cada em PBS. Seguindo-se a aplicação do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, produzido em cabra), e incubação em câmara úmida por 30 minutos e, posteriormente, 3 banhos de PBS por 5 minutos. Foi aplicado o complexo

peroxidase-anti-peroxidase (PAP diluído 1:250 em PBS/albumina a 0,1%) e as lâminas incubadas por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Seguindo-se novamente três banhos de PBS.

A revelação da reação da peroxidase foi realizada através da incubação em solução de DAB (50mg de diaminobenzidina em 250mL de PBS e 500µl de peróxido de hidrogênio 30%) durante 5 minutos. Para interrupção da revelação os cortes foram mergulhados em PBS por três vezes. Posteriormente foram lavados em água corrente por 5 minutos, contracorados com hematoxilina de Harris por dez segundos, lavados em água corrente por 5 minutos e desidratados em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e montados em Entellan (Merck®).

4.1 Análise dos níveis de RNAm das subunidades catalíticas do proteassoma 20S

4.1.1 Integridade do RNA total de *T. cruzi*

Após a extração do RNA total das culturas, procedeu-se a análise da integridade desta preparação em gel de agarose a 1,2%, como mostrado na figura 4. Para os experimentos de análise da expressão gênica, a concentração RNA foi ajustada para 5µg/µL.

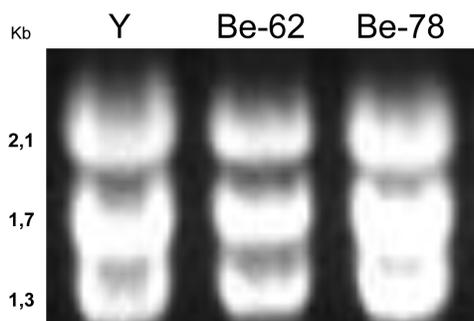


Figura 4: Gel de RNA total das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. Foi utilizado 5µg de RNA total das cepas de *T. cruzi*, obtidos como descrito em Matérias e Métodos.

4.1.2 Perfil de expressão das subunidades catalíticas das cepas Y, Be-62 e Be-78

O perfil da expressão dos genes β_1 , β_2 e β_5 foi analisado em formas epimastigotas crescidas em meio LIT das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. A figura 5 mostra os níveis de expressão das cepas avaliadas de *T. cruzi* juntamente com o gene constitutivo HGPRT que foi utilizado como normalizador.

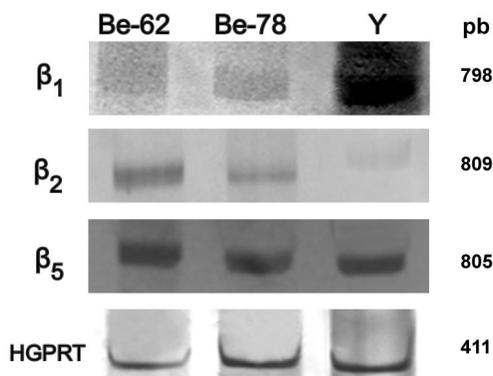


Figura 5: Padrão de expressão das subunidades catalíticas do proteassoma 20S das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. Cerca de 10µL do produto da PCR das cepas em estudos, obtidos

como descritos no ítem Materias e Métodos foram fracionados em gel de poliacrilamida 10% corado com prata. Como controle foi utilizado o gene HGPRT.

4.1.3 Análise densitométrica dos RNAm das subunidades catalíticas do proteassoma 20S

Para quantificar os níveis da expressão relativa das subunidades β_1 , β_2 e β_5 , normalizados com o gene HGPRT, foi utilizado o programa Quantity One[®] 1-D Analysis Software Versão 4.4.1. A figura 9 mostra que os níveis das três subunidades catalíticas do proteassoma são similares em todas as cepas estudadas. Os experimentos foram realizados em duplicata de três extrações de RNA distintas.

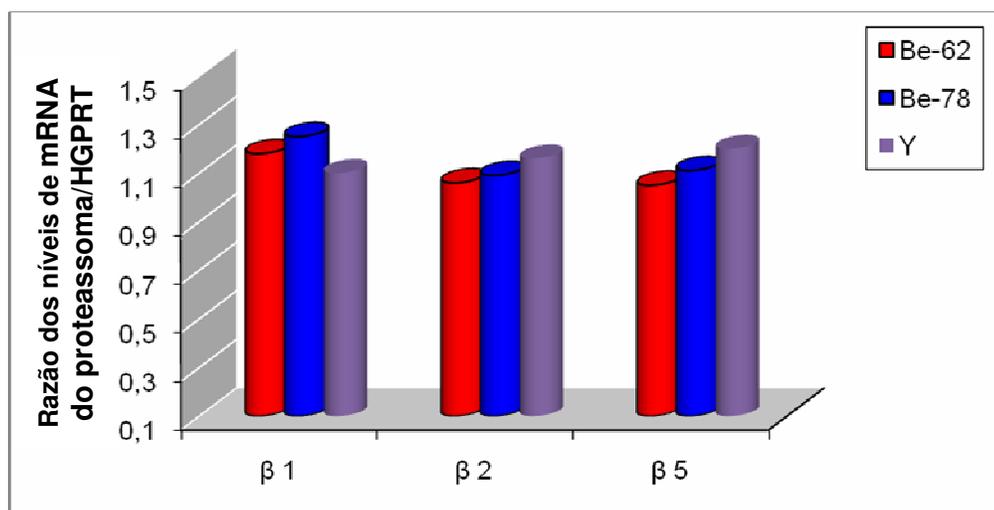


Figura 6: Análise densitométrica relativa às expressões das subunidades catalíticas do proteassoma 20S das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. A figura mostra os níveis relativos de expressão das subunidades catalíticas do proteassoma usando o HGPRT, como gene constitutivo. A análise densitométrica é a média de três experimentos independentes realizada utilizando-se o programa Quantity One[®] 1-D Analysis Software Versão 4.4.1.

4.2 Análise dos níveis protéicos do proteassoma 20S

Para a detecção das subunidades estruturais, foi utilizada a técnica de *Western Blot* da fração enriquecida do proteassoma, extraídas das formas epimastigotas do *T. cruzi* das cepas avaliadas. A figura 10 mostra o padrão de expressão do proteassoma, onde foi observada uma maior reatividade do anticorpo anti-subunidades α para o proteassoma 20S da cepa Be-78, um padrão intermediário para a cepa Y e um padrão de expressão menor para a cepa Be-62.

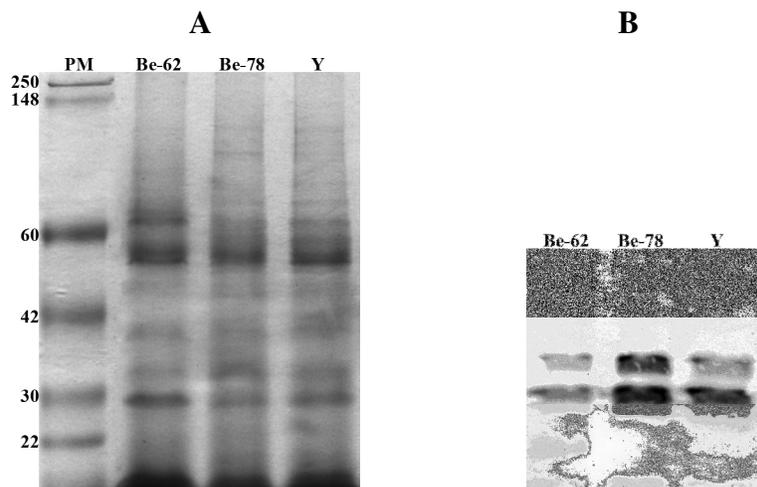


Figura 7: Detecção das subunidades α do proteassoma 20S das cepas Be-62, Be-78 e Y de *T. cruzi*. Cerca de 10 μ g da fração enriquecida de proteassoma das cepas de *T. cruzi* foram fracionadas em gel de poliacrilamida e coradas com Azul de comassie em A. PM - padrão de peso molecular (Invitrogen). Em B, as bandas protéicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a seguir incubadas com anticorpos anti-subunidades α de camundongo e, posteriormente, revelada como descrito no item Materias e Métodos.

4.3 Atividades enzimáticas do proteassoma 20S

Como descrito no ítem Material e Métodos, nestes ensaios foram utilizados 5 μ g de fração enriquecida e substratos fluorogênicos específicos para as atividades semelhantes à caspase, quimotripsina e tripsina do proteassoma 20S. A figura 8 mostra a existência de diferenças entre as atividades do proteassomas entre cepas do *T. cruzi*. A medida das atividades peptidásicas das cepas Y, Be-62 e Be-78, revelaram que em todas as atividades peptidásicas do proteassoma, a cepa Be-78 é a que apresentou os mais elevados níveis. Quando comparada com a Y, cepa de *T. cruzi* utilizada como referência neste trabalho, a cepa Be-78 apresentou atividade semelhante à quimiotripsina 10 vezes maior e em relação à cepa Be-62, 19 vezes maior. Em relação à atividade semelhante à caspase a cepa Be-78 mostrou um aumento de 2 vezes em relação à cepa Y e em relação à cepa Be-62, 6 vezes. A atividade do proteassoma semelhante à tripsina é a que mostrou as diferenças mais significativas, tendo a cepa Be-78 uma atividade 62 vezes maior do que a cepa Y e 70 vezes maior que a cepa Be-62.

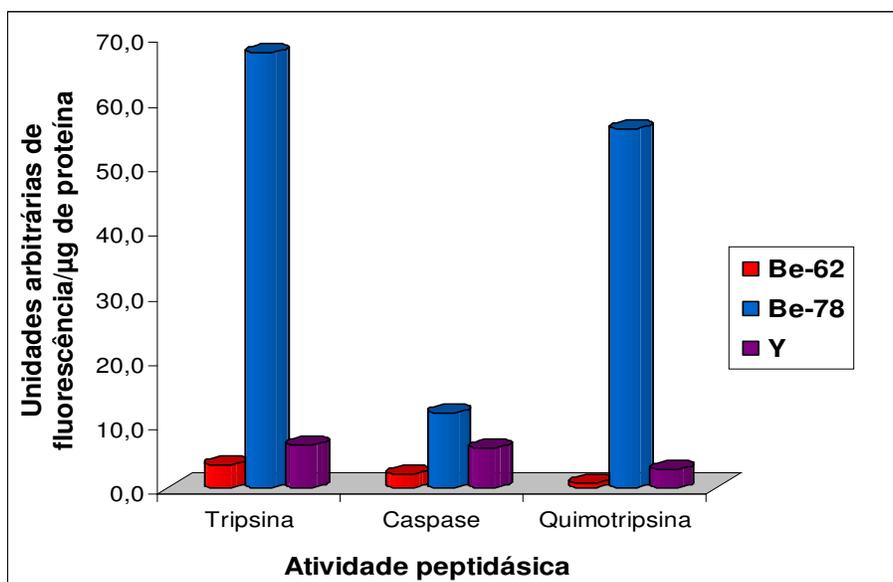


Figura 8: Atividades peptidásicas do proteossoma 20S das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*. 10 μ G da fração enriquecida de proteossoma das cepas Y, Be-62 e Be-78 obtidas como descritos em Materiais e Métodos foram utilizadas para as medidas das atividades peptidásicas sendo utilizados os substratos Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-7-amido-4-metilcumarina, Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina e Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina para a determinação das atividades semelhantes à caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente.

4.4 Participação do proteossoma na proliferação *in vitro* da cepa Y de *T. cruzi*

A curva de proliferação das formas epimastigotas foi realizada utilizando-se uma concentração que variou de 0,033 μ M a 50 μ M de PSI e monitoradas durante 10 dias, como mostra a figura 9. A curva é a média dos experimentos feitos em triplicata. Foi observada uma redução da proliferação de mais de 95% para a cepa Y ao longo do tempo avaliado, sendo mais pronunciada no 8º dia quando comparada ao pico de proliferação do controle. A redução não foi dose-dependente entre as concentrações que variaram entre 1 μ M a 50 μ M. Nas concentrações de 0,033 μ M e 0,083 μ M, a redução, quando comparadas aos grupos controles, foi de 87% e 90% respectivamente, sendo que também foi observado um retardo inicial da proliferação. Não foram observadas diferenças significativas entre o controle e o controle com DMSO.

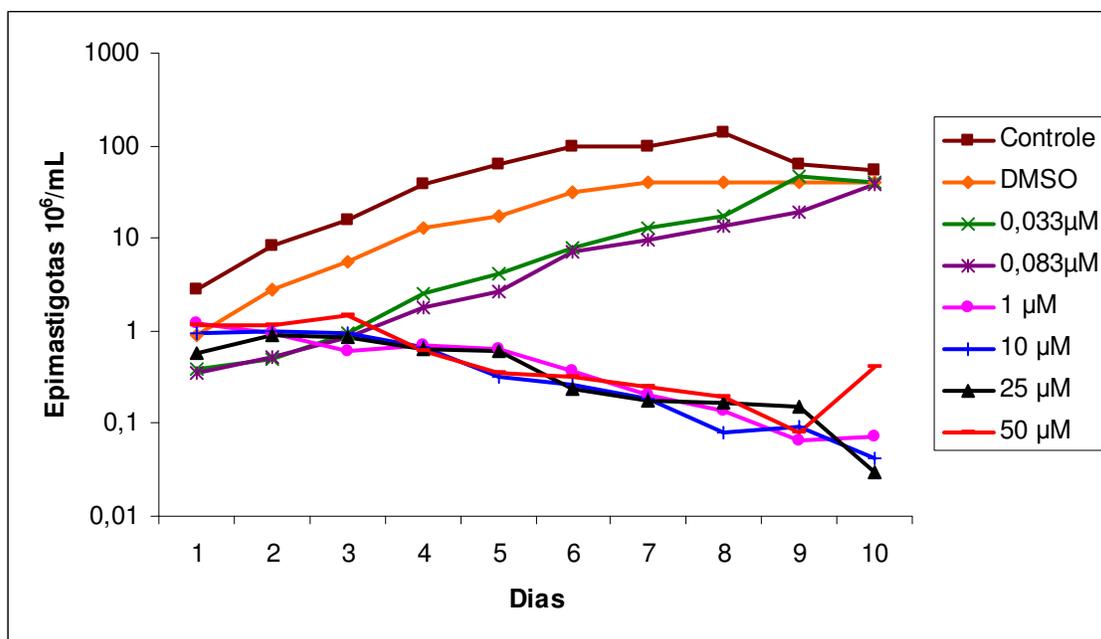


Figura 9: Efeito do PSI na proliferação *in vitro* das formas epimastigotas da cepa Y. Aliquotas de 10µL foram retiradas a cada 24 horas e as leituras foram feitas em câmara de Neubauer. As curvas representam as médias dos experimentos feitos em triplicata. O DMSO foi incluído como controle. A análise de variância utilizando o teste de Tukey, mostra um $p < 0,05$ a partir do 5º dia para as concentrações acima de 1,0 µM quando comparado aos grupos controle e DMSO.

4.5 Avaliação da importância do proteossoma na proliferação *in vitro* da cepa Be-62 de *T. cruzi*

A curva de proliferação das formas epimastigotas, foi realizada utilizando-se uma concentração que variou de 0,033µM a 50µM de PSI e monitoradas durante 10 dias, como mostra a figura 10. A curva é a média dos experimentos feitos em triplicata. Foi observada uma redução da proliferação de mais de 95% para a cepa Be-62 ao longo do tempo avaliado, sendo mais pronunciada no 7º dia quando comparada ao pico de proliferação do controle. A redução não foi dose-dependente entre as concentrações que variaram entre 1µM a 50µM. Nas concentrações de 0,033µM e 0,083 µM observou-se um retardo na inicial da proliferação, porém os níveis de redução foram menores quando comparadas às cepas Y e Be-78 que apresentaram nestas concentrações uma redução de cerca de 90%. A redução da cepa Be-62 observada na concentração de 0,033µM foi de 57% e na concentração de 0,083µM foi de 72%. Não foram observadas diferenças significativas entre o controle e o controle com DMSO.

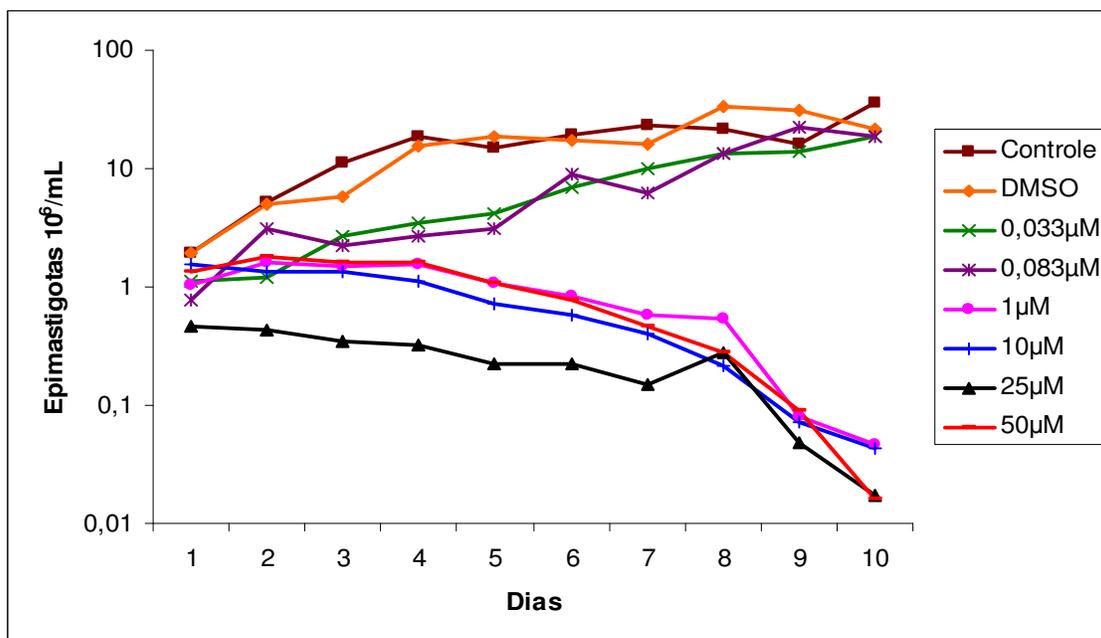


Figura 10: Efeito do PSI na proliferação *in vitro* das formas epimastigotas da cepa Be-62. Aliquotas de 10µL foram retiradas a cada 24 horas e as leituras foram feitas em câmara de Newbauer. As curvas representam as médias dos experimentos feitos em triplicata. O DMSO foi incluído como controle. A análise de variância utilizando o teste de Tukey, mostra um $p < 0,05$ a partir do 5º dia para as concentrações acima de 1,0 µM quando comparado aos grupos controle e DMSO.

4.6 Avaliação da importância do proteossoma na proliferação *in vitro* da cepa Be-78 de *T. cruzi*

A curva de proliferação das formas epimastigotas foi realizada utilizando-se uma concentração que variou de 0,033µM a 50µM de PSI monitoradas durante 13 dias, como mostra a figura 11. A curva é a média dos experimentos feitos em triplicata. Foi observada uma redução da proliferação de mais de 90% para a cepa Be-78 ao longo do tempo avaliado, sendo mais pronunciada no 11º dia quando comparada ao pico de proliferação do grupo controle. A redução não foi dose-dependente entre as concentrações que variaram entre 1µM a 50µM. Nas concentrações de 0,033µM a inibição foi de 93% e na concentração de 0,083µM foi de 97%. Foi observado, como nas demais cepas, um retardo inicial de crescimento. Não foram observadas diferenças significativas entre o controle e o controle com DMSO.

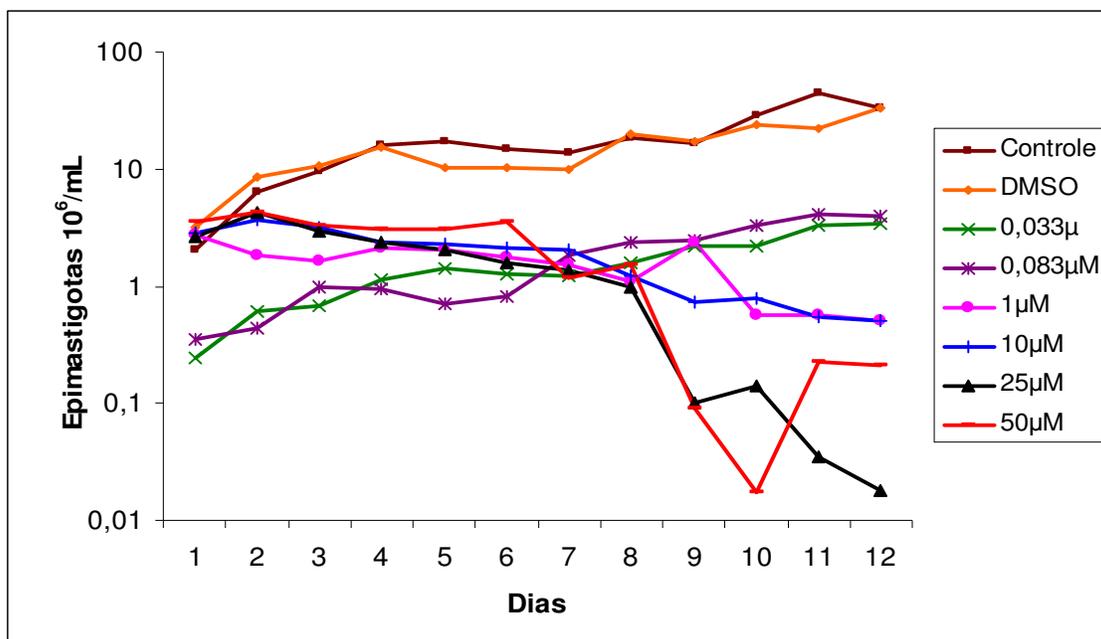


Figura 11: Efeito do PSI na proliferação *in vitro* das formas epimastigotas da cepa Be-78. Alíquotas de 10µL foram retiradas a cada 24 horas e as leituras foram feitas em câmara de Newbauer. As curvas representam as médias dos experimentos feitos em triplicata. O DMSO foi incluído como controle. A análise de variância utilizando o teste de Tukey, mostra um $p < 0,05$ a partir do 5º dia para as concentrações acima de 1,0 µM quando comparado aos grupos controle e DMSO.

4.7 O efeito do PSI na morfologia das formas epimastigotas das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*

Na figura 12 estão apresentadas às mudanças morfológicas das formas epimastigotas crescidas em meio LIT das cepas Y, Be-62 e Be-78 incubadas ou não com 1µM PSI. Em A, B, C, D, E e F são mostradas os controles obtidos nos tempos de 24 horas e 72 horas das cepas Y, Be-62 e Be-78, respectivamente. As figuras L, K, J, I, H e G mostram as formas epimastigotas das cepas Y, Be-62 e Be-78 nos tempos de 24 horas e 72 horas incubadas com 1µM de PSI, onde se destaca o desligamento do corpo celular do parasito do flagelo. As figuras M, N, O, P, Q e R mostram as formas epimastigotas das cepas Y, Be-62 e Be-78 nos tempos de 24 horas e 72 horas incubadas com 1µM de PSI. Nota-se nestas formas que a membrana celular dos parasitos encontra-se com um aspecto rugoso, diferente da membrana celular dos parasitos controles. A mudança morfológica das formas epimastigotas incubadas com 1µM, das cepas Y, Be-62 e Be-78, obtidos nos tempos de 24 horas e 72 horas, se destacam nas figuras X, W, V, U, T e S. Observa-se que a forma da parte anterior do corpo celular do parasito encontra-se mais arredondada ou totalmente deformada sendo observado

também a formação de estruturas semelhantes a pseudópodos em algumas formas. As figuras Y, Z, α , β , γ e δ , mostram um conjunto de mudanças morfológicas variáveis das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi* obtidos nos tempos de 24 horas e 72 horas.

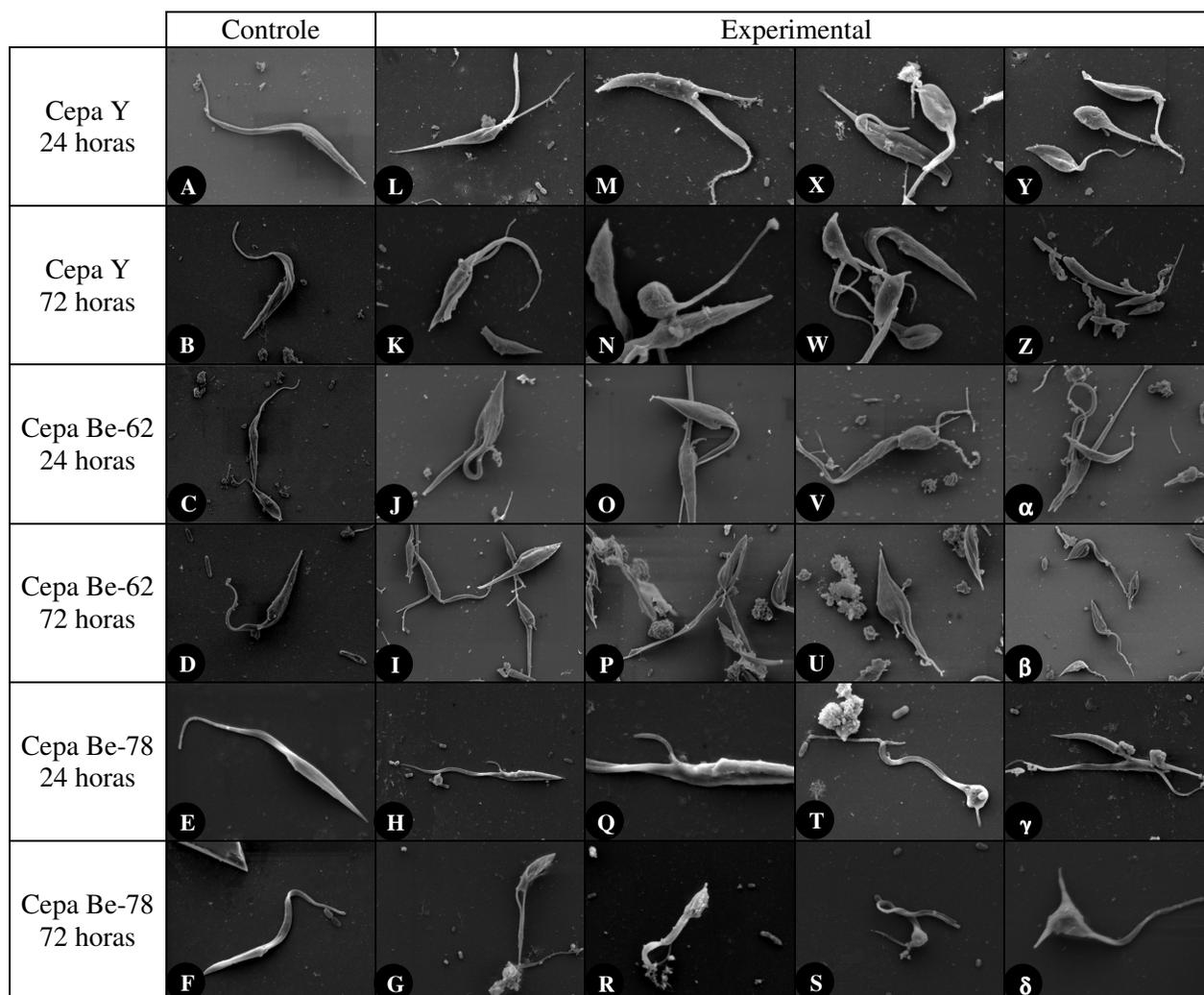


Figura 12: O efeito do PSI na morfologia das formas epimastigotas, crescidas em meio LIT, das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi* obtidas através de microscopia eletrônica de varredura. As figuras A-F mostram os controles obtidos nos tempos de 24 horas e 72 horas das cepas Y, Be-62 e Be-78 de *T. cruzi*, respectivamente. As figuras L, M, X e Y mostram as culturas incubadas com 1 μ M de PSI obtidos no tempo de 24 horas da cepa Y de *T. cruzi*. As figuras K, N, W e Z mostram as culturas incubadas com 1 μ M de PSI obtidos no tempo de 72 horas da cepa Y de *T. cruzi*. As figuras J, O, V e α mostram as culturas incubadas com 1 μ M de PSI obtidos no tempo de 24 horas da cepa Be-62 de *T. cruzi*. As figuras I, P, U e β mostram as culturas incubadas com 1 μ M de PSI obtidos no tempo de 72 horas da cepa Be-62 de *T. cruzi*. As figuras H, Q, T e γ mostram as culturas incubadas com 1 μ M de PSI obtidos nos tempos de 24 horas da cepa Be-78 de *T. cruzi*. As figuras G, R, S e δ mostram as culturas incubadas com 1 μ M de PSI obtidos no tempo de 72 horas da cepa Be-78 de *T. cruzi*.

4.8 Efeito do PSI na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss com a cepa Y de *T. cruzi*

A figura 13 mostra a curva de parasitemia obtida de camundongos Swiss inoculados com tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* pré-incubadas ou não com PSI. Podemos notar que houve 68% de redução no 1º pico de parasitemia, que ocorreu no 8º dia, em relação ao grupo controle e uma redução de 49% em relação ao grupo controle com DMSO. A partir do 14º dia foi observada uma inversão dos perfis das curvas, onde no 2º pico de parasitemia do controle que ocorreu no 18º dia, quando comparadas com a dos pré-incubados com PSI, este apresentou um aumento de 14,0% no crescimento dos parasitos.

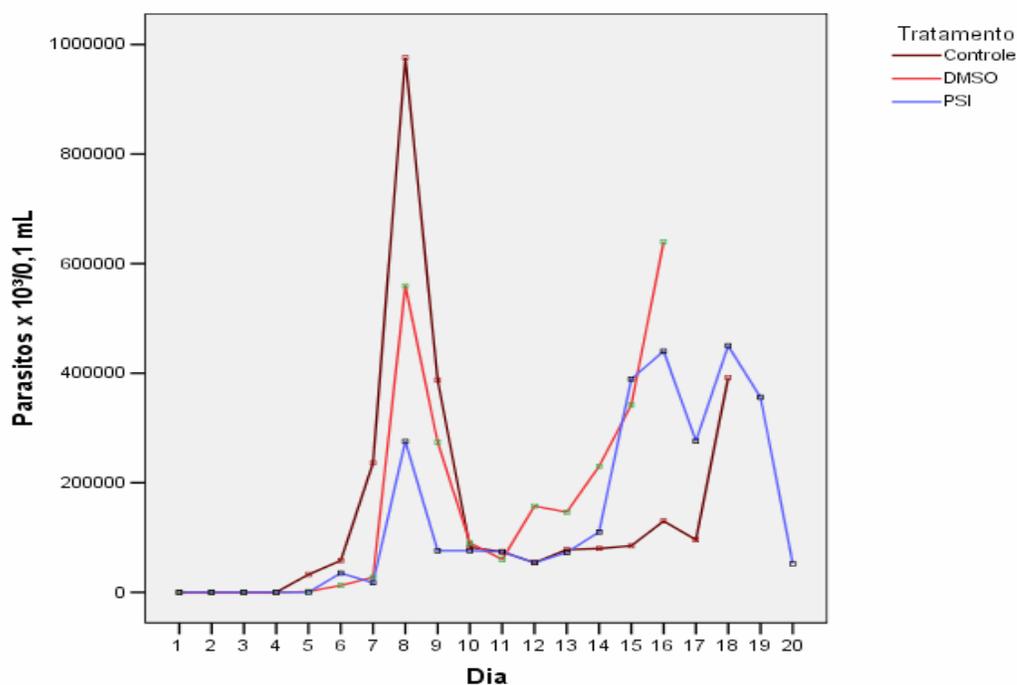


Figura 13: Curva de parasitemia da cepa Y. O controle mostra uma curva de parasitemia típica de uma infecção experimental com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. No grupo experimental, a curva mostra a parasitemia quando os tripomastigotas foram pré-incubados com $100 \mu\text{M}$ de PSI. Esse experimento também foi realizado com DMSO. Os dados representam a mediana da parasitemia dos grupos experimentais. A análise não paramétrica foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de P para os dias 7, 8 e 9 foram $p < 0,007$, $p < 0,001$ e $p < 0,012$, respectivamente.

4.9 Efeito do PSI na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss com a cepa Be-62 de *T. cruzi*

A figura 14 mostra a curva de parasitemia obtida de camundongos Swiss inoculados com tripomastigotas sanguíneos da cepa Be-62 de *T. cruzi* pré-incubados ou não com PSI. Esta mostrou uma redução de 42% no 1º pico de parasitemia, que ocorreu no 8º dia, em relação ao grupo controle, e em relação ao grupo controle com DMSO, ocorreu uma redução de 56%. Nos 13º e 16º dias, as curvas de ambos, controle e os pré-incubados com PSI se igualaram, porém a tendência da redução manteve-se ao longo do período analisado, sendo que no 2º pico de parasitemia, que ocorreu no 18º dia, quando comparada com o grupo controle ocorreu uma redução de 45%.

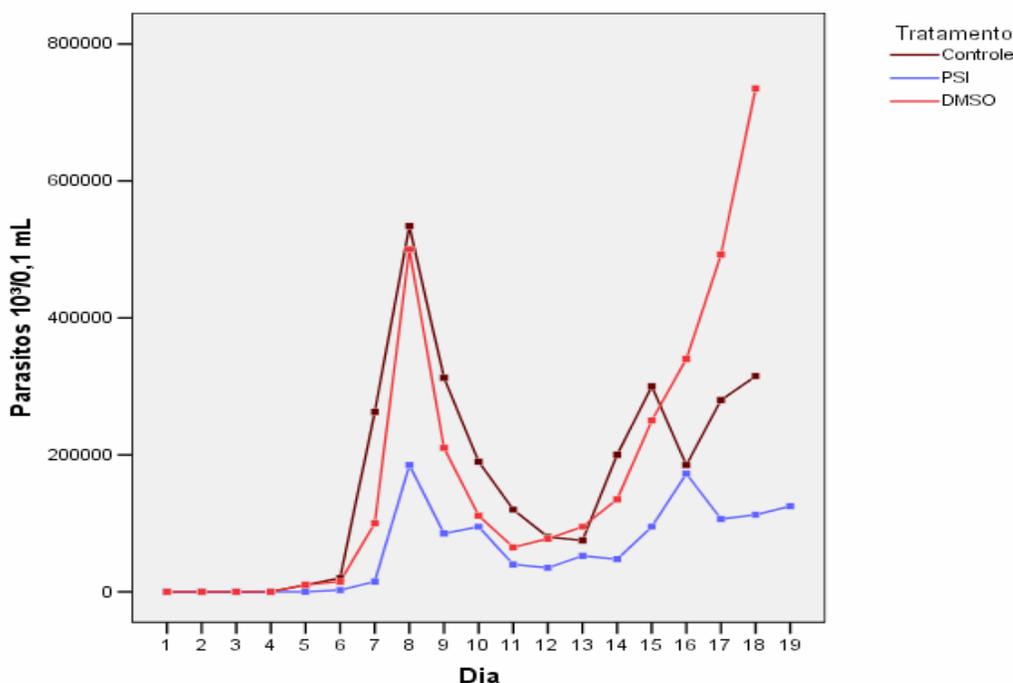


Figura 14: Curva de parasitemia da cepa Be-62. O controle mostra uma curva de parasitemia típica de uma infecção experimental com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. No grupo experimental, a curva mostra a parasitemia quando os tripomastigotas foram pré-incubados com $100 \mu\text{M}$ de PSI. Esse experimento também foi realizado com DMSO. Os dados representam a mediana da parasitemia dos grupos experimentais. A análise não paramétrica foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de P para os dias 5, 6 e 7 foram $p < 0,0043$, $p < 0,12$ e $p < 0,001$, respectivamente.

4.10 Efeito do PSI na evolução da infecção experimental de camundongos Swiss com a cepa Be-78 de *T. cruzi*

A figura 15 mostra a curva de parasitemia obtida de camundongos Swiss inoculados com tripomastigotas sanguíneos da cepa Be-78 de *T. cruzi* pré-incubados ou não com PSI. Foi observada uma redução de 72% no primeiro pico de proliferação, que ocorreu no 11º dia, quando comparada com o grupo controle e teve um aumento de 16% quando comparada com o grupo controle com DMSO. A parasitemia do grupo pré-incubado em momento nenhum ultrapassou a do grupo controle e a tendência de redução manteve-se ao longo de todo o período de avaliação.

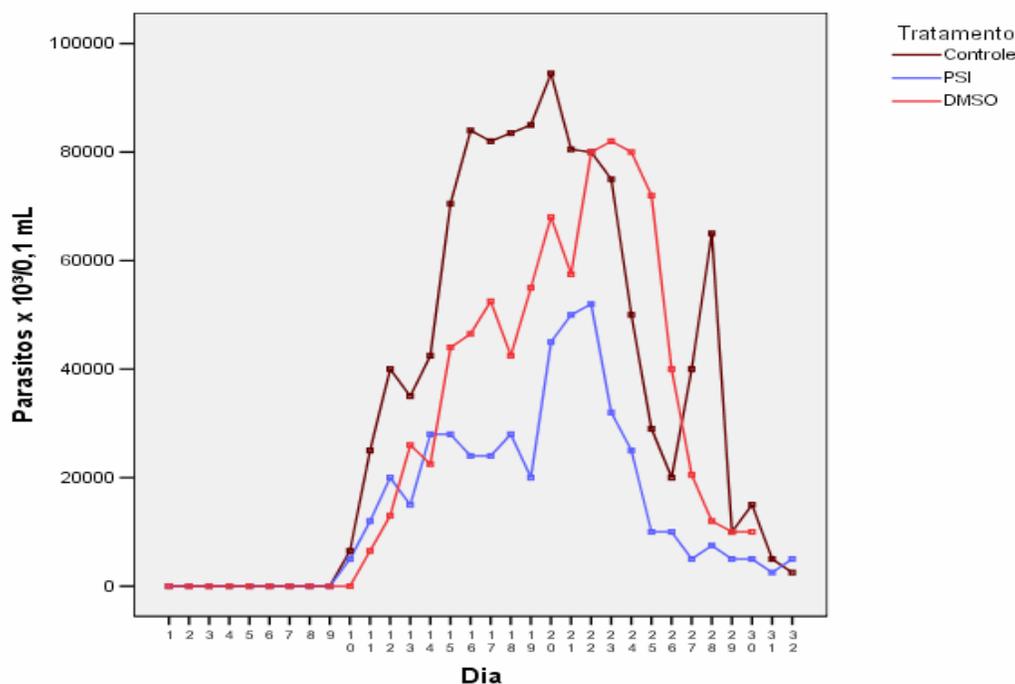


Figura 15: Curva de parasitemia da cepa Be-78. O controle mostra uma curva de parasitemia típica de uma infecção experimental com 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi*. No grupo experimental, a curva mostra a parasitemia quando os tripomastigotas foram pré-incubados com $100 \mu\text{M}$ de PSI. Esse experimento também foi realizado com DMSO. Os dados representam à mediana da parasitemia dos grupos experimentais. A análise não paramétrica foi feita utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Os valores de P a partir do 9º dia para todos os dias foram de $p < 0,05$.

4.11 Taxa de mortalidade dos camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*

Na figura 16 estão representadas as taxas de mortalidade cumulativa dos camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, incubados ou não com PSI. Foi observada uma taxa de mortalidade de 100% para ambos, sendo que no controle o início das mortes deu-se no 10º dia e o término no 19º dia e nos incubados com PSI o controle iniciou-se no 12º alcançando a taxa de 100% no 21º dia.

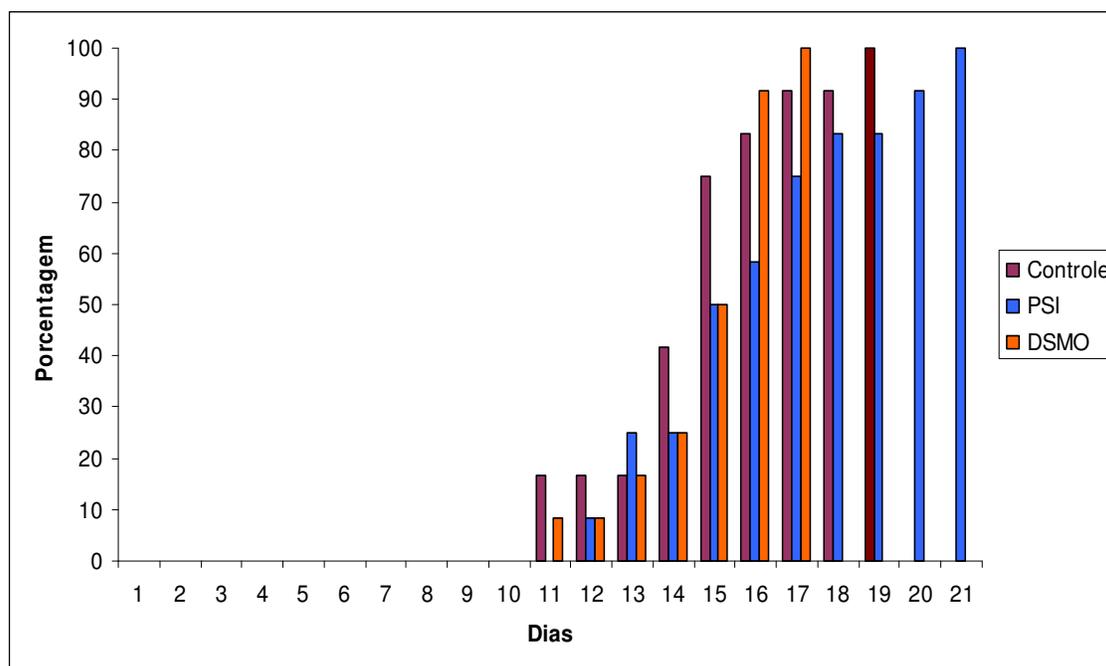


Figura 16: Taxa de mortalidade cumulativa da cepa Y de *T. cruzi*. Camundongos Swiss foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*, pré-incubadas ou não com PSI, como descritos em Materiais e Métodos.

4.12 Taxa de mortalidade dos camundongos infectados com a cepa Be-62 *T. cruzi*

Na figura 17 estão representadas as taxas de mortalidade cumulativa dos camundongos infectados com a cepa Be-62 de *T. cruzi*, incubados ou não com PSI. Foi observada uma taxa de mortalidade de 100% para ambos, sendo que no controle e nos incubados com PSI o início das mortes deu-se no 9º dia e o término no 19º dia para o controle e nos incubados com PSI no 20º dia.

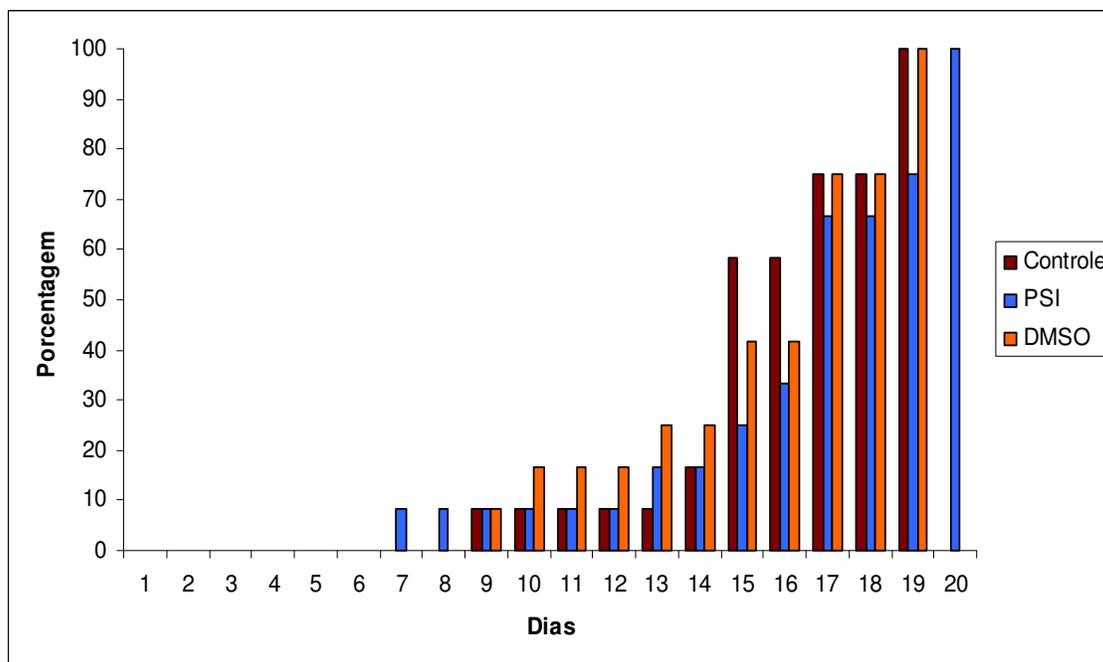


Figura 17: Taxa de mortalidade cumulativa da cepa Be-62 de *T. cruzi*. Camundongos Swiss foram inoculados intraperitonealmente com 5×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Be-62 do *T. cruzi*, pré-incubadas ou não com PSI, como descritos em Materiais e Métodos.

4.13 Avaliação dos processos inflamatórios, tropismo e parasitismo tecidual em camundongos infectados com as cepas Y, Be-62 e Be 78 pré-incubadas ou não com PSI

Nas figuras 18 e 19 estão apresentados cortes histológicos do baço, fígado, músculo cardíaco e esquelético de camundongos inoculados pela cepa Y do *T. cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Y previamente incubada com PSI (E-H) necropsiados no 11º dia de infecção (fase aguda) submetidos a reações imuno-histoquímicas para detecção do parasitismo tecidual (Figura 18) e corados pela Hematoxilina Eosina para avaliação do processo inflamatório (Figura 19). Observa-se um elevado parasitismo hepatoesplênico (Figura 18 A e B) e a presença de raros ninhos de amastigotas, tanto no músculo cardíaco quanto esquelético (Figura 18 C e D). Frente à incubação dos parasitos com PSI ocorreu uma exacerbação do parasitismo nos quatro compartimentos avaliados (Figura 18 E-H). Porém, o processo inflamatório no tecido hepático, cardíaco e músculo esquelético (Figura 19 F-H) não acompanharam esse aumento do parasitismo. Por outro lado, a reatividade esplênica foi maior neste grupo (Figura 19 E).

Nas figuras 20 e 21 estão apresentados cortes histológicos do baço, fígado, músculo cardíaco e esquelético de camundongos inoculados pela cepa Be-62 do *T. cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Be-62 previamente incubados com PSI (E-H)

necropsiados no 11º dia de infecção (fase aguda). Os cortes foram submetidos a reações imuno-histoquímicas para detecção do parasitismo tecidual (Figura 20) e corado pela Hematoxilina Eosina para avaliação do processo inflamatório (Figura 21). Observa-se um padrão de parasitismo semelhante ao observado na infecção pela cepa Y sendo elevado no baço e fígado e raro no músculo cardíaco e esquelético (Figura 20 A-D). Entretanto, frente ao tratamento dos parasitos com PSI, diferente do observado na infecção pela cepa Y, apenas no fígado e coração verificou-se aumento do parasitismo (Figura 20 E-H) sendo este acompanhado por necrose e fenômenos degenerativos intensos no fígado (Figura 21 F). No baço (Figura 21 E) observa-se hipertrofia da polpa vermelha com hipotrofia da polpa branca.

Nas figuras 22 e 23 estão apresentados cortes histológicos do baço, fígado, músculo cardíaco e esquelético de camundongos inoculados pela cepa Be-78 do *T. cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Be-78 previamente tratadas com PSI (E-H) necropsiados no 21º dia de infecção (fase aguda). Quando submetidos a reações imuno-histoquímicas para detecção do parasitismo tecidual (Figura 22) e corado pela Hematoxilina Eosina para avaliação do processo inflamatório (Figura 23). Observa-se um padrão de parasitismo tecidual distinto do observado na infecção pelas cepas Y e Be-62, com presença de parasito em apenas um corte de baço (Figura 22 A), ausência de parasitismo hepático (Figura 22 B) e elevado parasitismo cardíaco e do músculo esquelético (Figura 22 C e D) com presença de processo inflamatório e fenômenos degenerativos intensos no miocárdio e na musculatura esquelética. Surpreendentemente, frente ao tratamento dos parasitos com PSI, ocorreu a manutenção do padrão de parasitismo tecidual (Figura 22 E-H) e de inflamação (Figura 23 F-H). Também no baço verificou-se a manutenção de reatividade nos dois grupos avaliados (Figura 23).

Das três cepas avaliadas na fase aguda, foi estendida a avaliação para a fase crônica da infecção pela cepa Be-78, sob as mesmas condições (Figura 24 A-H). Não foi observado parasitismo tecidual e as alterações inflamatórias e degenerativas foram discretas e semelhantes entre o grupo pré-incubado com PSI ou não.

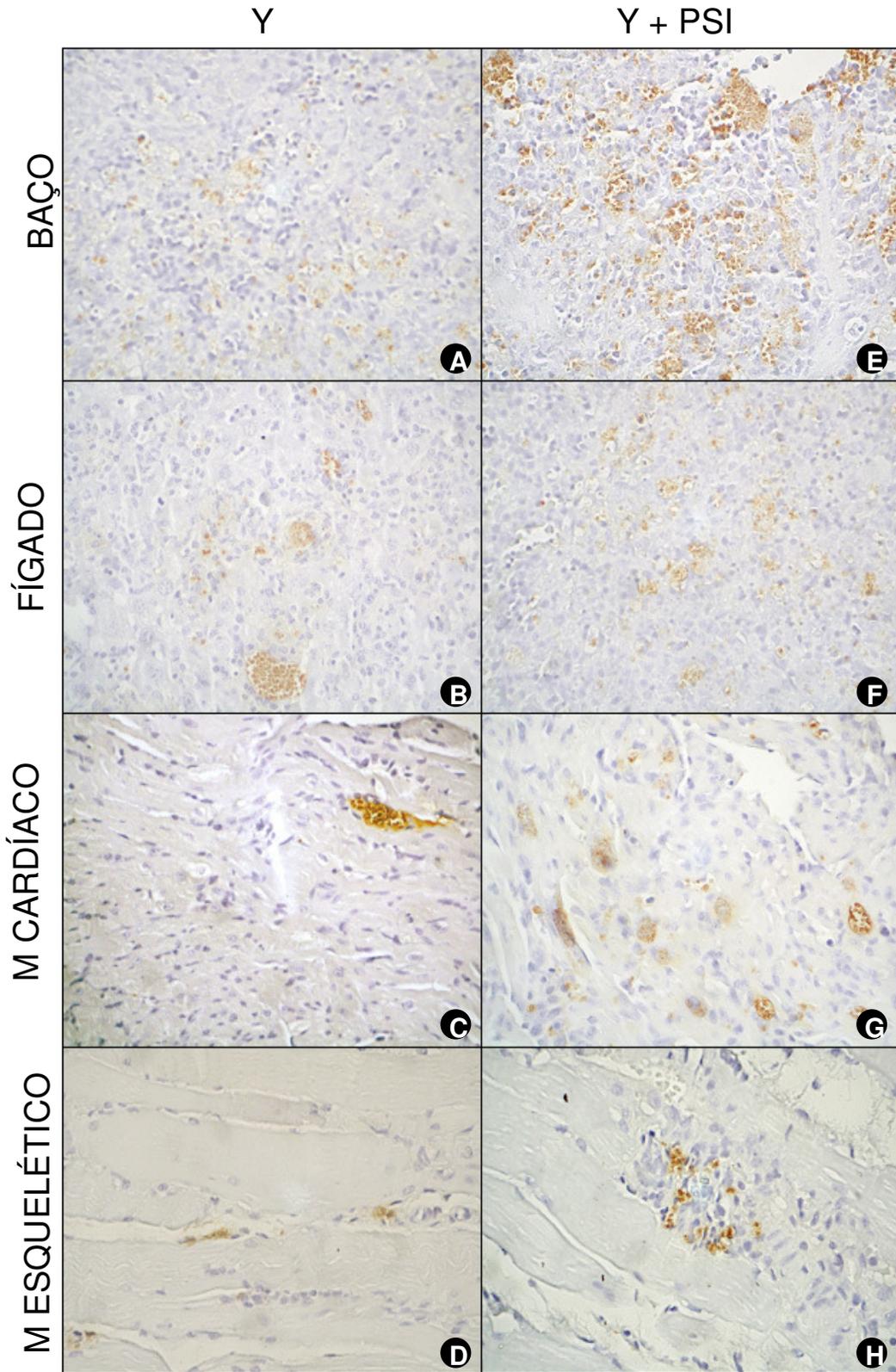


Figura 18: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos inoculados pela cepa Y do *T. cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Y e pré-incubados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*, PAP X 600. Ninhos ou amastigotas isoladas em marrom.

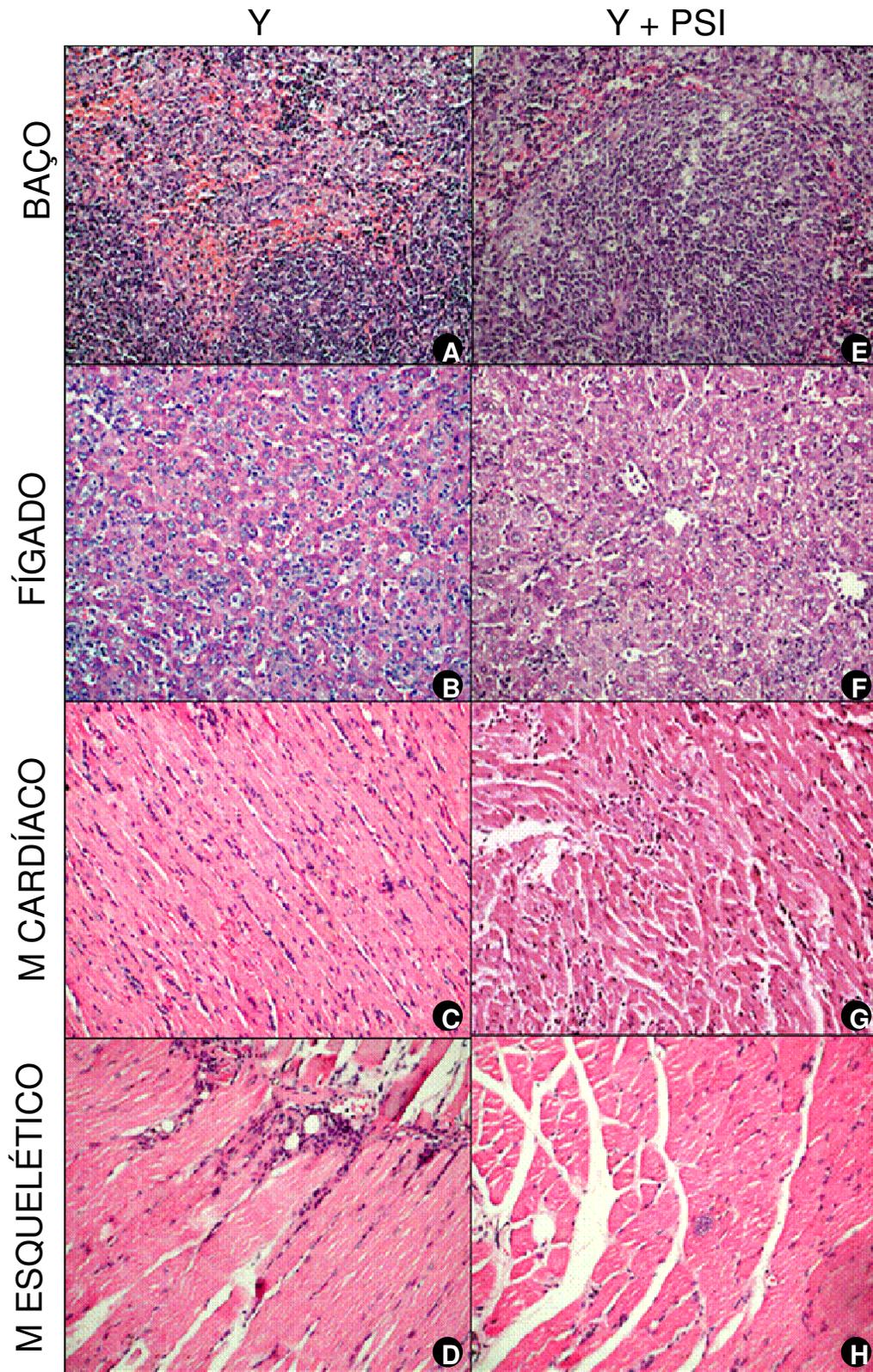


Figura 19: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos inoculados pela cepa Y do *T.cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Y e pré-incubados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Hematoxilina Eosina, X 300.

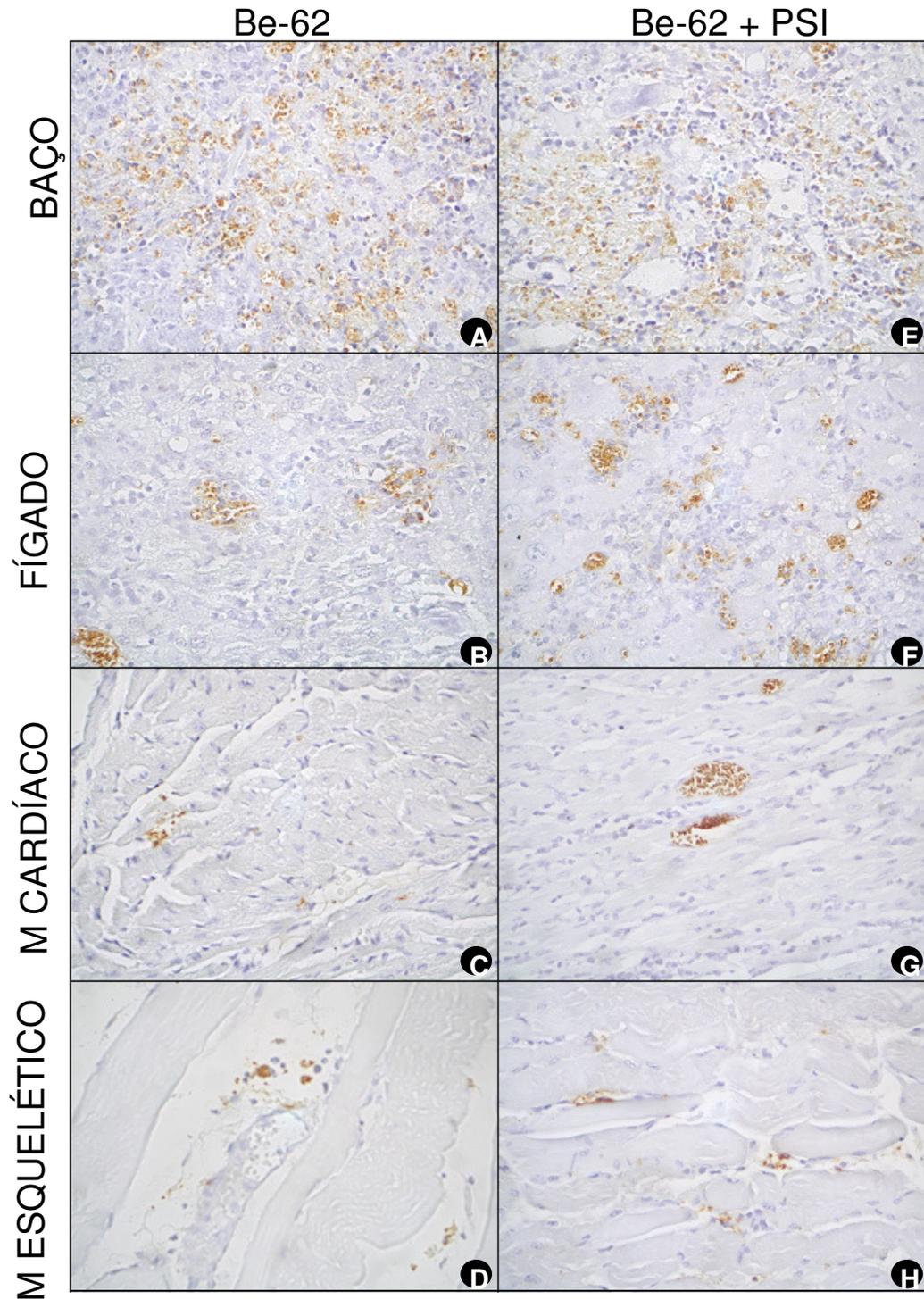


Figura 20: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos inoculados pela cepa Be-62 do *Trypanosoma cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Be-62 e pré-incubados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Imuno-histoquímica anti-*T.cruzi*, PAP, X 600. Ninhos ou amastigotas isoladas em marrom.

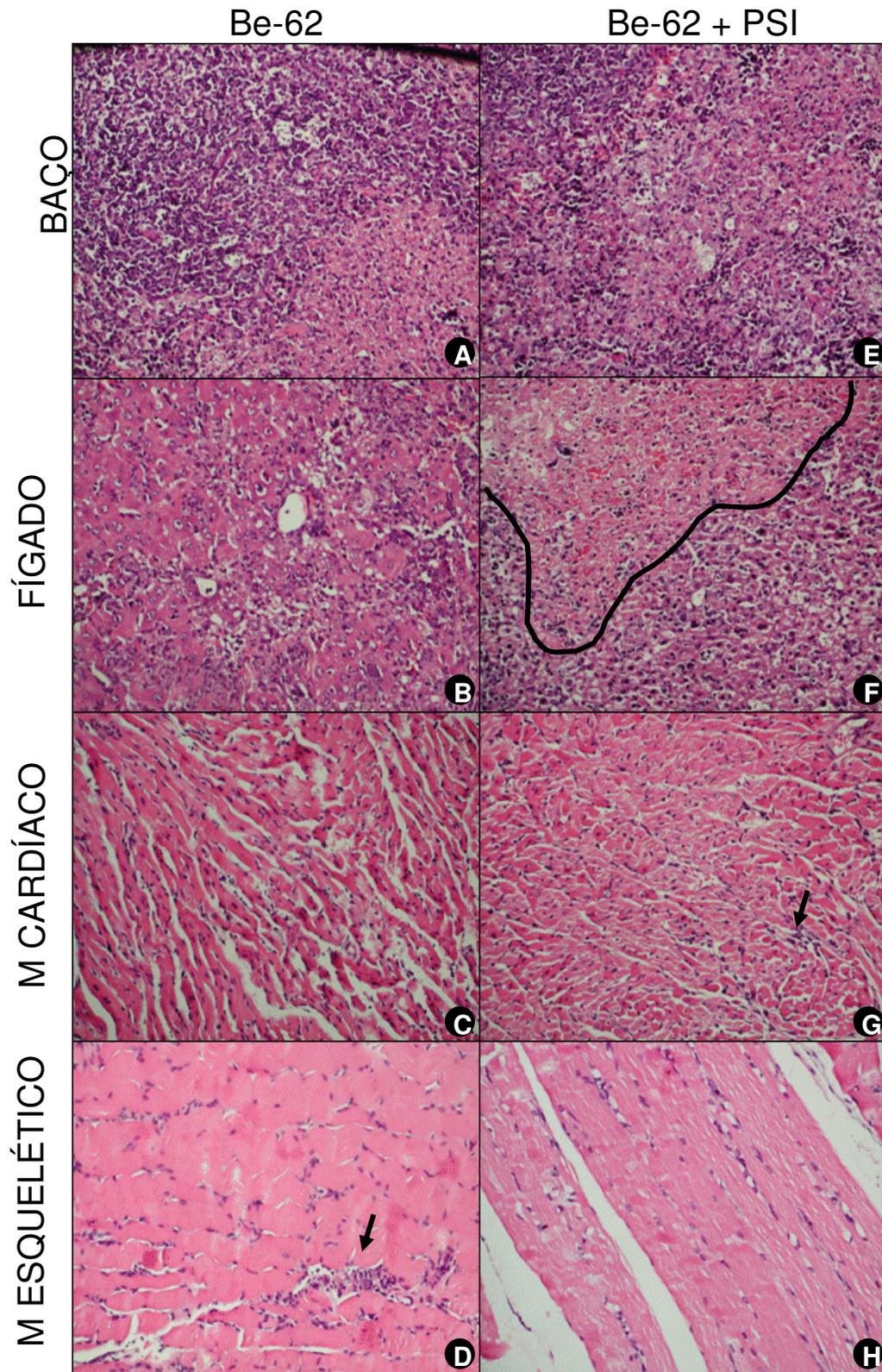


Figura 21: Cortes histológicas de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos inoculados pela cepa Be-62 do *T. cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Be-62 e pré-incubados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Hematoxilina Eosina. X 300.

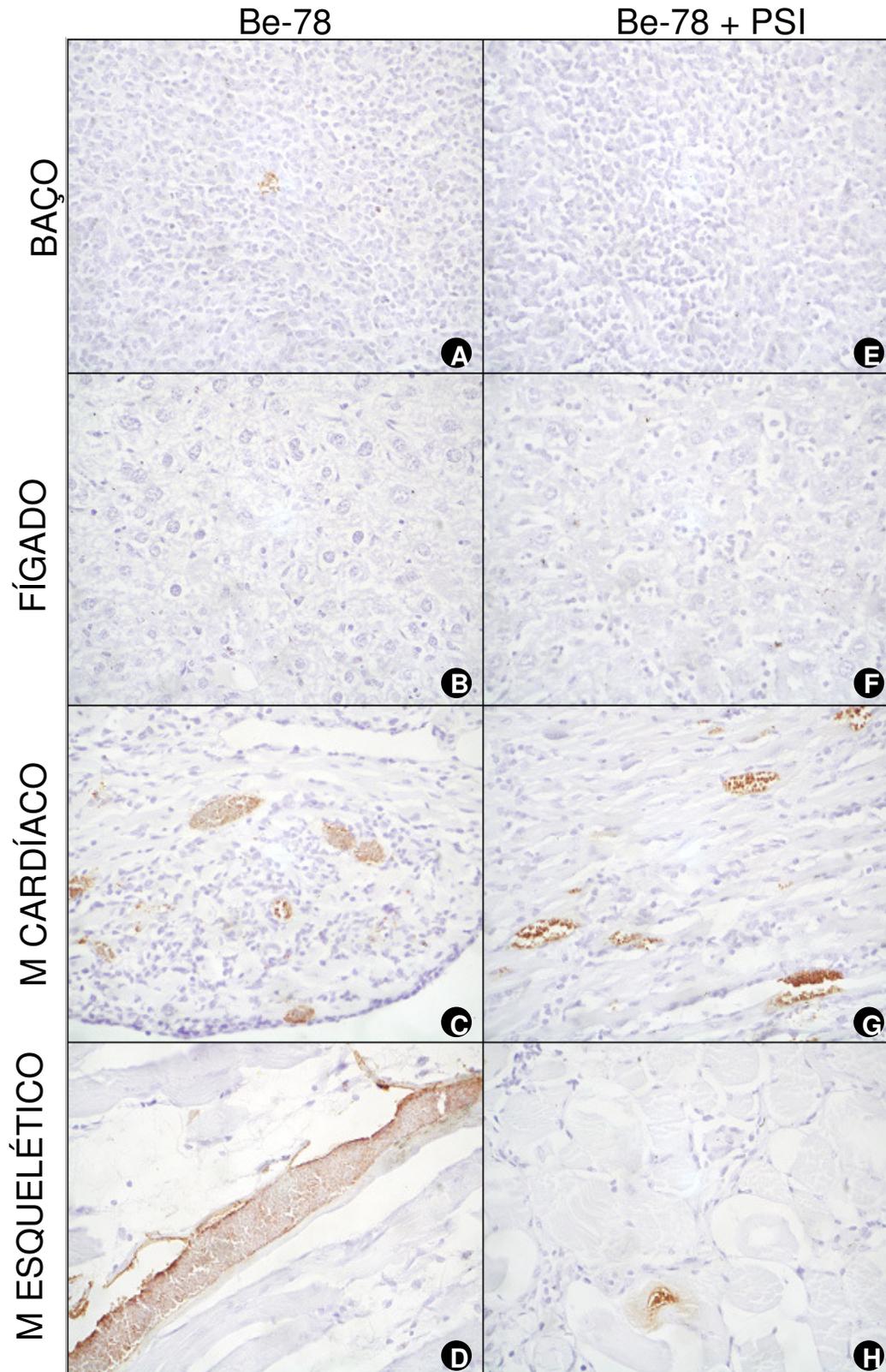


Figura 22: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos inoculados pela cepa Be-78 de *Trypanosoma cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Be-78 e pré-incubados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*, PAP X 600. Ninhos ou amastigotas isoladas em marrom.

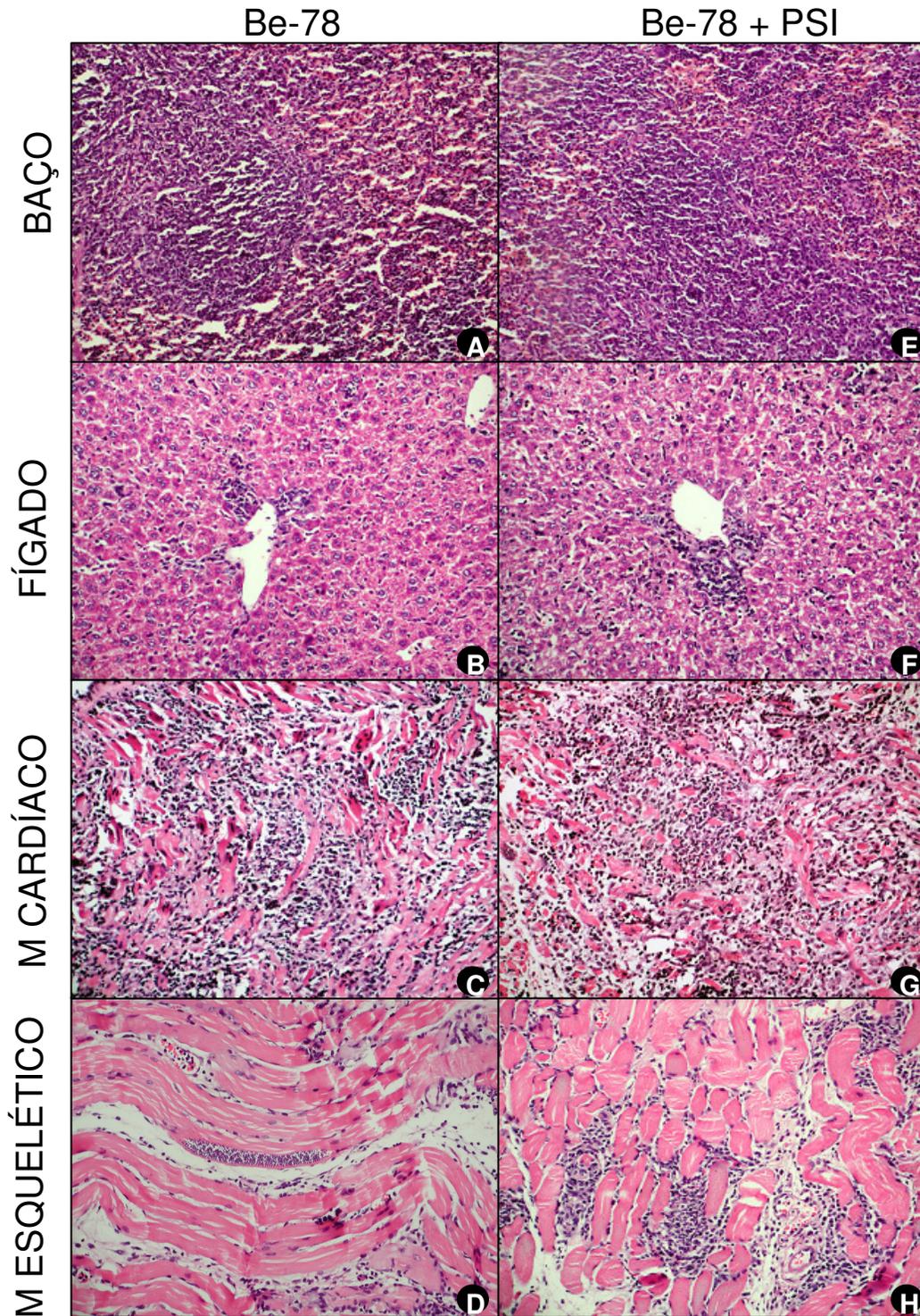


Figura 23: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos inoculados pela cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Be-78 e pré-incubados com PSI (F-H) necropsiados na fase aguda da infecção. Imuno-histoquímica anti-*T. cruzi*, PAP X 600. Ninhos ou amastigotas isoladas em marrom.

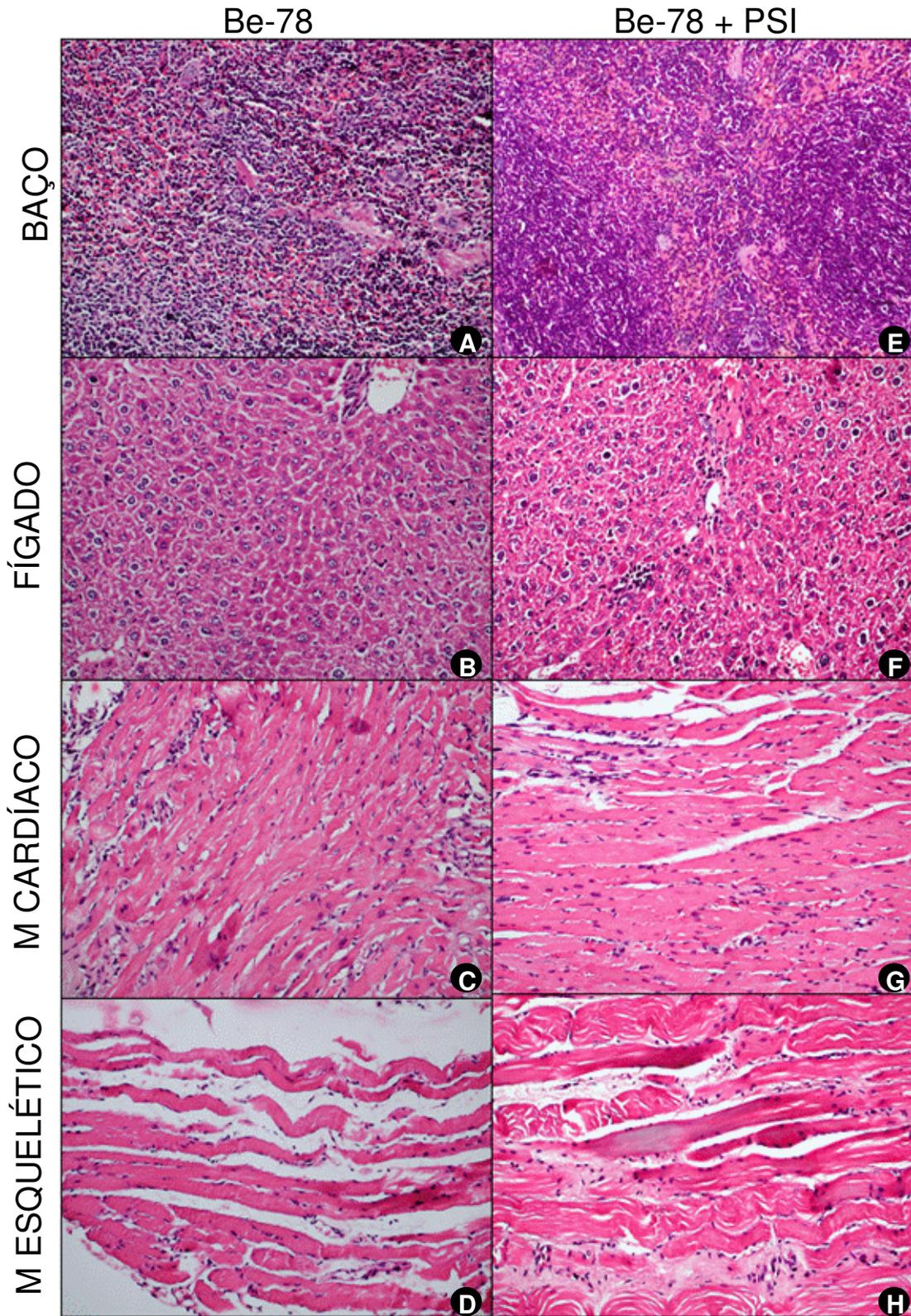


Figura 24: Cortes histológicos de baço (A e E), fígado (B e F), coração (C e G) e músculo esquelético (D e H) de camundongos inoculados pela cepa Be-78 do *T.cruzi* (A-D) ou inoculados pela cepa Be-78 e pré-incubados com PSI (F-H) necropsiados na fase crônica da infecção. Hematoxilina Eosina, X 300.

As proteases de parasitos protozoários têm recebido um foco especial pela comunidade científica, desde a última década, o que levou à caracterização de sua importância na interação parasito-hospedeiro. Um bom exemplo foi a caracterização da toxopaina-1 de *T. gondii*, fundamental para a invasão celular (Que *et al.*, 2002). Em *T. brucei*, a importância das proteases foi ressaltada com a caracterização da TbcAtB, uma cisteína protease, envolvida na degradação de proteínas do hospedeiro necessária para sua sobrevivência (Mackey *et al.*, 2004). Além disso, Kulkani *et al.* (2006) demonstraram que a leishmanolisina, uma metalo-protease, tem um efeito protetor em *Leishmania sp* frente a peptídeos antimicrobianos. Em *T. cruzi*, a cruzipaina é a principal cisteína-protease, presente em todas as formas evolutivas, sendo mais abundante nas formas replicativas. Sua função nas formas epimastigotas parece estar ligada a processos de degradação, com localização endossomal-lisossomal (Murta *et al.*; 1990), entretanto nas formas tripomastigotas foi descrita como tendo um papel na adesão (Souto-Padrón *et al.*; 1990) e invasão celular (Meirelles *et al.*; 1992).

Na última década, diversos grupos independentes têm demonstrado que o proteassoma, por ser uma protease compartimentalizada, ou seja, por possuir pelo menos três atividades peptidásicas na mesma molécula, está envolvido com a principal via de proteólise intracelular não lisossomal, em organismos que vão desde archaeobactérias ao homem, sendo responsável pelo turnover de aproximadamente 80% das proteínas celulares (Adams, 2003). Estima-se que 30% do proteoma celular é composto por proteínas de meia vida curta cuja degradação é mediada pelo proteassoma em menos de 3 horas (Craiu *et al.*, 1997). O uso de inibidores específicos do proteassoma vem mostrando que, além dessas proteínas, a via ubiquitina-proteassoma é responsável pela degradação de proteínas envolvidas em processos celulares distintos como ciclo celular, apresentação de antígenos, modulação de receptor de superfície, proteínas de meia vida longa, podendo então ser considerado como uma molécula integradora de vias metabólicas (Lee & Goldberg, 1993; Hill *et al.*, 2002; Ustrell *et al.*, 2005).

Recentemente, apesar dos grandes progressos no estudo sistemático do genoma do *T. cruzi*, ainda permanecem por serem elucidados os mecanismos moleculares, como por exemplo, a regulação da expressão gênica estágio-específica e quais moléculas regulam as transições epimastigota-tripomastigota-amastigota observadas durante o ciclo evolutivo deste parasito.

Considerando a importância do proteassoma como integrador de vias metabólicas, a hipótese é que esta protease regula vários aspectos da biologia celular do *T. cruzi*.

Neste trabalho foram analisadas cepas com características moleculares e bioquímicas sabidamente distintas tais como a Be-62 e a Be-78, como citado anteriormente e comparadas à cepa Y, a cepa mais descrita na literatura.

Sendo assim o primeiro objetivo deste estudo foi avaliar as expressões relativas das subunidades catalíticas do proteassoma das formas epimastigotas de *T. cruzi*, como mostram as figura 4, 5 e 6. A figura 6 mostra as expressões relativas das subunidades catalíticas do proteassoma normalizadas com o gene HGPRT, que é um gene constitutivo de *T. cruzi*. Podemos observar que a expressão é similar entre as subunidades e entre as cepas estudadas, porém a quantidade de proteassoma 20S analisadas pelo Western Blot (figura 7) mostra que a quantidade de proteassoma na cepa Be-78 é maior que a quantidade de proteassoma da cepa Y que por sua vez é maior que a cepa Be-62. A não correlação apresentada entre esses resultados sugere uma possível modificação pós-transcricional do proteassoma destas cepas.

No genoma do *T. cruzi* muitos genes estão organizados em tandem e contém um único promotor. Genes oriundos da mesma unidade transcricional podem mostrar diferentes padrões de expressão, sugerindo que em *T. cruzi* o controle da expressão gênica ocorre pós-transcionalmente. (Clayton, 2002).

A figura 9 mostra o gráfico representativo das atividades semelhantes à caspase, tripsina e quimiotripsina de uma fração enriquecida do *T. cruzi* no estágio epimastigota. Foi observado que na cepa Be-78 as atividades semelhantes à tripsina, caspase e quimiotripsina, apresentam-se muito maiores em relação às cepas Be-62 e Y. Quando comparada com a cepa Y, a cepa de *T. cruzi*, a cepa Be-78 apresenta atividade semelhante a quimiotripsina 10 vezes maior e em relação à cepa Be-62, 19 vezes maior. Em relação à atividade semelhante à caspase a cepa Be-78 mostrou um aumento de 2 vezes em relação à cepa Y e em relação à cepa Be-62, 6 vezes. A atividade do proteassoma semelhante à tripsina é a que mostrou as diferenças mais significativas, tendo a cepa Be-78 uma atividade 62 vezes maior do que a cepa Y e 70 vezes maior que a cepa Be-62.

O perfil de atividades proteolíticas dos tripanossomatídeos difere do proteassoma 20S de outros eucariotos (Hua S. *et al.*, 1996). É conhecido que a atividade

principal do proteassoma 20S de eucariotas superiores é semelhante à quimotripsina, enquanto que em tripanossomatídeos a atividade semelhante à tripsina é a principal.

Recentemente foi descoberto em nosso laboratório que a atividade principal da forma amastigotas da cepa Y e Be-62 de *T. cruzi* é atividade quimiotripsina (resultados não apresentados), sugerindo que durante um ciclo biológico completo existe uma troca na atividade preferencial do proteassoma. A importância biológica deste dado está sendo estudado no nosso laboratório (Leal, TF. - Regulação pós-traducional do proteassoma de *T. cruzi*: impacto na regulação das atividades peptidásicas - Dissertação de mestrado).

Para confirmar a relevância do proteassoma, na biologia celular do *T. cruzi*, foi avaliado o efeito da inibição *in vitro* desta protease na replicação das formas epimastigotas em meio LIT. Para estes estudos foi utilizado o PSI, um inibidor sintético e específico do proteassoma, pertencente à classe dos inibidores de proteassoma peptídeos aldeídos (Wilk & Figueiredo-Pereira, 1993).

Os estudos das funções do proteassoma têm sido facilitados devido à descoberta de inibidores específicos. Atualmente esses inibidores são divididos em 5 classes: peptídeos aldeídos, peptídeos vinil sulfonas, peptídeos boronatos, peptídeos epoxicetonas e β -lactonas (revisado por Kisselev & Goldeberg, 2001). A lactacistina, (Fenteany *et al.*, 1994) um metabólito do *Streptomyces*, pertencente à classe das β -lactonas, foi o primeiro inibidor específico de proteassoma a ser descoberto. Este inibidor se liga de uma maneira irreversível aos sítios catalíticos das subunidades β do proteassoma e tornou-se uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento dos estudos iniciais sobre a atividade do proteassoma.

As curvas de redução da proliferação *in vitro* das cepas estudadas mostraram um perfil similar de redução entre as cepas, no que diz respeito às formas epimastigotas, quando foram adicionadas às culturas, várias concentrações do inibidor específico do proteassoma (PSI). Utilizando-se concentrações que variaram de 0,033 μ M a 50 μ M, foi observado nas figuras 9, 10 e 11, que as curvas com concentrações acima de 1 μ M não atingiram a fase log de crescimento em todas as cepas, sendo que no pico de proliferação dos controles observa-se, em relação a estas concentrações, uma diminuição da proliferação em mais de 95%. Entretanto, nas concentrações entre 0,033 μ M e 0,083 μ M observou-se um retardo inicial da proliferação, sendo que a partir do 2º dia começou a ocorrer duplicação do número de parasitos por dia de contagem até o final da mesma. Nas cepas Y e Be-78, o perfil de crescimento foi similar (figuras 9 e

11) nestas concentrações (0,033 μ M e 0,083 μ M). Elas apresentaram um crescimento, em relação aos grupos controles, no pico de proliferação, de aproximadamente 90% menos parasitos, em ambas as concentrações. Quanto à cepa Be-62, ela apresentou, no pico de proliferação do grupo controle para a concentração de 0,033 μ M, uma diminuição de 57,4% de parasitos e na concentração de 0,083 μ M uma diminuição de 72,57% (figura 10). Considerando que as cepas Be-62 e Be-78 foram obtidas da mesma paciente em períodos diferentes e que nelas foram constatadas diferenças bioquímicas e biológicas (Lana & Chiari, 1986), e os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que as diferenças nestas cepas possam ser devidas às diferenças das atividades do proteassoma destas cepas. Nossos resultados *in vitro* sugerem também que o proteassoma é necessário para a replicação das formas epimastigotas do *T. cruzi*, pois mesmo se inibindo a atividade quimotripsina, que não é a atividade principal do proteassoma, observou-se uma inibição do crescimento em mais de 95% para todas as cepas estudadas quando foram utilizadas concentrações maiores que 1 μ M.

Mutomba *et al.* (1997) observou, através da análise do conteúdo de DNA, que em *T. brucei*, a lactacistina inibe a proliferação das formas tripomastigotas procíclicas (formas replicativas do inseto vetor) do parasito levando a um acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular e o bloqueio da progressão do ciclo de G2 para a fase M. Resultados semelhantes foram obtidos por Robertson (1999), que ao adicionar MG-132 às culturas de *L. mexicana*, observou um acúmulo de DNA nas formas promastigotas. Esses dados sugerem que a atividade do proteassoma é requerida após a síntese do DNA e antes do término da mitose, pois a proliferação das formas promastigotas de *L. mexicana*, é inibida em um ponto específico do ciclo celular. Esse perfil de inibição pontual sugere uma inativação da destruição de certos reguladores do ciclo celular através da inibição pelo proteassoma.

A importância do proteassoma já foi bem descrita em outros parasitos tais como em *E. invadens*, *E. histolytica*, onde a inibição do proteassoma impediu a sua encistação (Makioka *et al.*, 2000); no *Plasmodium berghei*, a lactacistina bloqueou a replicação, porém, não impediu a entrada do parasito nas hemácias (Gantt *et al.*, 1998).

O papel do proteassoma no ciclo celular já está bem caracterizado. Até o momento são conhecidos varios substratos do proteassoma, como por exemplo, reguladores do ciclo celular (CKIs p21, p27, p57, as ciclinas A, D e E), o fator de transcrição Myc, que aumenta a transcrição de muitos genes, tais como o da ciclina D e de um componente do complexo SFC, entre outros (Revisado por Nakayma *et al.*,

2006). O complexo APC liga-se as ciclinas A, B e securina, entre outras proteínas regulatórias. A degradação desta última proteína leva à liberação da separase, que por sua vez cliva as subunidades do complexo de coesão, culminando na separação das cromátides irmãs (Revisado por Nakayama *et al.*, 2006).

A Mdm2, uma outra ubiquitina ligase, endereça ao proteossoma o p53, um fator de transcrição, que regula a síntese da CKI p21 (Revisado por Nakayama *et al.*, 2006). Quando a degradação destas proteínas é desregulada, ocorre uma aceleração e descontrole da mitose, quadro característico do câncer. Atualmente, já se encontra disponível no mercado o bortezomib, um inibidor específico de proteossoma para o tratamento de diversos tipos de tumor.

Para analisar as mudanças morfológicas observadas em microscópio óptico, quando analisamos o efeito da incubação na proliferação *in vitro* das cepas em estudos, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Foi observado na figura 12 (L, K, J, I, H e G), o desligamento do flagelo do corpo celular do parasito, nas culturas incubadas com 1 μ M PSI das cepas Y, Be-62 e Be-78, nos tempos de 24 horas e 72 horas, respectivamente. O flagelo é uma estrutura especializada envolvida na motilidade celular, bem como em outros processos biológicos do parasito, sendo responsável por estabelecer contato do parasito com as células do hospedeiro. Nos triponossomatídeos, em contraste com outros kinetoplastídeos, é observada uma estrutura definida como zona de conexão do flagelo, que é uma estrutura complexa de filamentos que tem como função conectar o flagelo ao corpo celular do parasito, nas formas epimastigotas e tripomastigotas (Vaughan *et al.*, 2007).

A zona de conexão do flagelo está localizada logo abaixo da membrana do parasito e se liga ao flagelo por conjuntos de microfilamentos. A natureza das proteínas envolvidas nesta região ainda não está bem esclarecida (Rocha *et al.*, 2006). Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura para as três cepas, sugerem que a integridade da zona de conexão do flagelo depende da função normal do proteossoma, e que a inibição do proteossoma levou a um desarranjo estrutural na zona de conexão do flagelo ou nos microfilamentos que conectam esta região ao flagelo, levando ao fenótipo observado.

Em 1993, Cooper *et al.* desenvolveu um mutante das formas epimastigotas de *T. cruzi*, que não expressava uma glicoproteína, a Gp72, uma proteína com 72kDa, encontrada em toda a superfície do corpo celular do parasito, porém mais abundante na zona de conexão do flagelo. Os resultados apresentados nas figuras acima citadas,

mostram o mesmo fenótipo encontrado por Cooper *et al.*, ou seja, desligamento do flagelo do corpo celular e deformações em todo o corpo do parasito sugerindo que esta proteína tem um papel importante nas formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Bissagio *et al.* (2006) utilizando a suramina, um derivado polisulfonado da uréia, que inibe uma variedade de proteínas tais como a proteína quinase C (Mahoney *et al.*, 1990) e DNA polimerase (Voogd *et al.*, 1998), também observaram o mesmo fenótipo induzido pela inibição do proteassoma deste estudo, em formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (95% das formas apresentaram desligamento do flagelo do corpo celular e diferentes graus de deformações em todo o corpo celular).

A figura 12 (M, N, O, P, Q e R) mostra uma exarcebação da rugosidade das membranas celulares dos parasitos incubados com 1 μ M PSI das cepas Y, Be-62 e Be-78, nos tempos de 24 horas e 72 horas, respectivamente. A figura 12 (X, W, V, U, T e S) mostra as deformações ocorridas na parte anterior do corpo dos parasitos incubados com 1 μ M PSI das cepas Y, Be-62 e Be-78, nos tempos de 24 horas e 72 horas, respectivamente. Uma das características nos triponossomatídeos é a presença de uma camada de microtúbulos localizada logo abaixo da membrana plasmática denominada de microtúbulos subpeliculares (revisado por Field & Carrington, 2004). Estas estruturas são conectadas à membrana plasmática por microfilamentos de natureza ainda desconhecidas. Esta associação é provavelmente responsável pela rigidez da célula e por evitar o rompimento da mesma por meios mecânicos.

Além disso, os resultados mostrados nas figuras, também sugerem que a inibição do proteassoma induziu um desarranjo nos microfilamentos ou nos microtúbulos subpeliculares contribuindo para que as formas epimastigotas apresentassem as membranas com aspecto mais rugosos e fragilizados, com posterior desintegração do corpo do parasito, efeito esse que foi mais pronunciado na cepa Y. O alargamento e deformações vistos na parte anterior do corpo do parasito (Figura 12: Y, Z, α , β , γ e δ) provavelmente foi consequência do desarranjo dos microtúbulos.

Sheng *et al.* (2006) observaram que em plantas tratadas com MG-132, ocorria um bloqueio no crescimento do tubo do pólem além de mudanças morfológicas, decorrentes do rompimento do citoesqueleto, porém não detectou actinas ou tubulinas ubiquitinadas e hipotetizou que o proteassoma poderia estar envolvido na turnover das proteínas envolvidas nos mecanismos de organização do citoesqueleto. De fato, estudos anteriores desenvolvidos por Wang *et al.* (2003), demonstraram que RhoA um importante regulador do mecanismo de formação do citoesqueleto é alvo da via

proteassoma- ubiquitina. Em células animais foi descoberto que proteínas associadas aos microtúbulos (David *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005) e o cofator B, que auxilia a formação correta da tubulina (Wang *et al.*, 2005) são degradadas pelo proteassoma. Esses dados tomados conjuntamente reforçam nossa hipótese do proteassoma ser um complexo proteolítico integrador de vias metabólicas, ou seja, sua inibição exerceu um efeito pleiotrópico na biologia celular do parasito.

Uma outra abordagem utilizada neste trabalho para analisar o papel do proteassoma no desenvolvimento da DC experimental foi a utilização de um modelo animal. A DC pode ser avaliada através do acompanhamento de sua evolução em diferentes modelos experimentais como ratos, camundongos, roedores silvestres, cães, coelhos, primatas e cobaias, nos quais é possível reproduzir os distintos aspectos patológicos da doença humana. O modelo murino tem apresentado uma maior preferência por diversos pesquisadores pela facilidade de obtenção, manutenção e pequeno porte. Os camundongos têm também sido utilizados no estudo de diversos parâmetros na relação parasito-hospedeiro, como por exemplo, no comportamento de cepas do *T. cruzi*, na eficácia de várias drogas para a terapia e na resposta imunológica e histopatológica do hospedeiro (Brener *et al.*, 1976; Andrade *et al.*, 1985; Ben Younés-Chennoufi *et al.*, 1988; Rottenberg *et al.*, 1988). O curso da infecção aguda ou crônica pelo *T. cruzi* em camundongos depende do *background* genético do hospedeiro (Pizzi *et al.*, 1949; Trischmann *et al.*, 1978; Corsini *et al.*, 1980; Soares *et al.*, 2001) e do parasito isolado (Brener, 1965; Postan *et al.*, 1983; Soares *et al.*, 2001).

Para este trabalho foram utilizados camundongos Swiss por se tratarem de populações geneticamente heterogêneas, mimetizando assim o que ocorre na natureza. Foi desenvolvido um protocolo que consiste na incubação prévia de 5×10^3 tripomastigotas sanguíneos com $100 \mu\text{M}$ de PSI por 20 minutos. Após este período, foram inoculados, intraperitonealmente, estes tripomastigotas tratados com PSI em camundongos Swiss e como controle, utilizamos 5×10^3 tripomastigotas não incubados com PSI. Anteriormente ao inóculo (5 minutos), foi feita a mesma observação para analisar se o PSI teria uma atividade tripanomicida. Foi observado que o PSI não afeta a viabilidade dos parasitos, pois os mesmos se mostraram com uma densidade próxima à contagem no tempo zero e com o mesmo perfil de motilidade. Infelizmente, a documentação da viabilidade dos parasitos ficará como perspectiva futura, pois no momento não havia métodos a nós disponíveis para esse fim.

Foi realizado o mesmo teste com o TLCK (L-1-Chloro-3-[4-tosylamido]-7-amino-2-heptanone-HCL), um inibidor de cisteíno proteases, pois havia a intenção de utilizá-lo para experimentação de inibição de parasitemia por inibição do ciclo celular, assim como no PSI. Foi observado que o TLCK tem atividade tripanomicida, ou seja, afetou a viabilidade dos parasitos, pois nas mesmas condições em que o teste foi realizado para o PSI, foi observado, momento antes do inóculo propriamente dito, uma densidade de aproximadamente 80% a menos de parasitos, quando comparado ao momento zero da incubação com TLCK e uma motilidade muito baixa. Sendo assim, o TLCK, teve uma ação tripanomicida, não sendo útil como parâmetro de redução da replicação (resultados não apresentados).

Atualmente, as drogas utilizadas no tratamento são tripanomicidas, dentre elas, o benzonidazol é o mais utilizado. O mecanismo pelo qual o benzonidazol tem atividade anti-*T. cruzi* parece envolver modificações covalentes em macromoléculas por nitrorredução (Docampo, 1990).

Outros fármacos, tais como os inibidores de biossíntese de ergosterol, inibidores de cruzipaina, inibidores do metabolismo do pirofosfato e da biossíntese de novo de purinas, estão ainda em fase de estudos (Urbina, 2003).

A análise das curvas de parasitemia dos grupos controle mostrou-se consistente com trabalhos anteriores, que evidenciaram diferenças nos perfis biológicos (Lana & Chiari, 1986) e bioquímicos (Lana *et al.*, 1996) de diferentes cepas de *T. cruzi*. Quanto à análise das curvas de parasitemia dos tripomastigotas previamente incubados com PSI, monitorada durante 21 dias (ou até a morte dos animais) a cepa Y (Figura 13) obteve uma porcentagem de inibição de 68% no 1º pico de parasitemia, que ocorreu no 8º dia, em relação ao grupo controle. A partir do 14º dia, foi observada uma inversão dos perfis das curvas, onde no 2º pico de parasitemia do controle, que ocorreu no 18º dia, quando comparadas com a dos pré-incubados com PSI, houve um aumento de aproximadamente 14% no crescimento. A cepa Be-62 (Figura 14) apresentou uma inibição de 42% no 1º pico de parasitemia, que ocorreu no 8º dia, em relação ao grupo controle. Nos 13º e 16º dias, as curvas de ambos, controle e os pré-incubados com PSI, se igualaram, porém a tendência da inibição manteve-se ao longo do período analisado, sendo que no 2º pico de parasitemia, que ocorreu no 18º dia, quando comparada com o grupo controle, ocorreu uma inibição de 45,0%. A cepa Be-78 (figura 15) obteve uma inibição de 73% no primeiro pico de proliferação, que ocorreu no 11º dia quando comparada com o grupo controle. A curva do grupo pré-incubado em momento nenhum

ultrapassou a do grupo controle e a tendência de inibição manteve-se ao longo de todo o período de análise.

A inibição das formas tripomastigotas, de *T. cruzi* corroboram com os experimentos de Mutomba *et al.* (1997), os quais demonstraram que quando as formas sanguíneas de *T. brucei* eram incubadas com 1 μ M de lactacistina, ocorria um bloqueio de 30-35% da população celular na fase G1 e 55-60% na fase G2.

Para testar esta hipótese em *T. cruzi*, foram analisados o tropismo e a densidade do tropismo nos camundongos infectados experimentalmente, incubados ou não com PSI. Foram retirados o baço, bexiga, ceco, cólon, diafragma, duodeno, encéfalo, esôfago, fígado, glândulas, jejuno, íleo, linfonodo, músculo esquelético, músculo cardíaco, olho, osso, pâncreas, pele, pulmão, tecido adiposo, traquéia, útero e supra renal, nas fases aguda (Y, Be-62 e Be-78) e crônica (Be-78) da infecção, sendo que para este trabalho, foram analisados o baço, fígado, músculo cardíaco e músculo esquelético, ficando para análise posterior os demais órgãos.

Os processos patológicos na fase aguda da infecção no camundongo são complexos e neles estão envolvidos o parasito, sua multiplicação, morte intracelular e os mecanismos imunológicos como respostas humorais e celulares, que levam às lesões características dessa fase.

No curso destes processos, o surgimento de alterações nos órgãos e tecidos está relacionado também ao tropismo da cepa e, conseqüentemente, ao maior parasitismo dos diferentes setores do organismo (Andrade *et al.*, 1970; Andrade, 1974; Lana & Chiari, 1986).

A forma aguda da doença representa uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, pois suas formas amastigotas podem ser encontradas nas secções histológicas de quase todos os órgãos e no interior de vários tipos celulares, usualmente com a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, congestão aguda e edema. A inflamação é o processo patológico básico nos tecidos afetados, com a presença de células inflamatórias, que incluem macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células T (Villalta & Kierszenbaum, 1983; 1984).

Apesar dos mecanismos envolvidos na patogênese de órgãos alvos do *T. cruzi* não serem elucidados completamente, a persistência do parasito e os eventos auto-imunes têm sido apontados como fundamentais na formação das lesões teciduais (Tarleton, 1999).

Neste trabalho, os órgãos analisados são importantes para o entendimento das lesões provocadas pelo *T. cruzi* e dos processos decorrentes dos tratamentos empregados na experimentação. A inflamação do miocárdio é de extrema importância em todo o processo patológico da doença, devido à maneira como as reações ao parasito se desenvolvem neste órgão. O fígado é o principal órgão metabólico do corpo e os hepatócitos têm a função de desintoxicação e de metabolização de muitas substâncias exógenas. O baço é um dos órgãos mais importantes na resposta imune e remoção do *T. cruzi*, sendo ao mesmo tempo alvo e componente ativo de resistência à infecção pelo *T. cruzi* (Olivieri *et al.*, 2002). Cortes do músculo esquelético foram analisados devido ao conhecido tropismo da cepa Be-78 para este tecido, bem como para o músculo cardíaco.

O acometimento cardíaco é a principal causa de morbidade e mortalidade na DC, com diferentes níveis de danos ao sistema de condução e com a ocorrência de falha cardíaca em muitos casos graves (Prata, 2001). Diversos estudos confirmaram que, durante o curso da infecção cardíaca, ocorrem alterações microvasculares induzidas pelo parasito, que podem conduzir a degeneração miocárdica e inflamação crônica (Factor *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1990; Petkova *et al.*, 2001).

Os camundongos sobreviventes a um longo período de infecção pelo *T. cruzi* podem desenvolver miocardite intensa e lesões na inervação autonômica do coração (Tafari, 1970; Machado *et al.*, 1975), na microcirculação (Factor *et al.*, 1985) e mudanças eletrocardiográficas, parecidas com aquelas encontradas na miocardite chagásica humana (Laguens *et al.*, 1981). A inflamação do miocárdio é de extrema importância em todo o processo patológico da doença de Chagas, devido à maneira como as reações ao *T. cruzi* se desenvolvem no coração. O acometimento do miocárdio em camundongos cronicamente infectados parece ser consequência do parasitismo e da inflamação durante os primeiros estágios da doença (Schlemper *et al.*, 1983).

Estudos histológicos do coração de indivíduos que vieram a óbito em decorrência da doença mostraram fibrose intersticial difusa, infiltração linfocítica e miocitólise, mesmo na ausência de parasitos (Engman & Leon, 2002). Em 1999, Zhang e Tarleton demonstraram que o DNA do parasito e suas proteínas podem estar presentes no foco inflamatório, mesmo na ausência de formas amastigotas intactas. Estes dados foram confirmados pelo encontro de grande porcentagem destas formas em biópsias cardíacas de indivíduos cronicamente infectados (Anez *et al.*, 1999).

Lima *et al.* (2001) demonstraram que camundongos infectados com uma cepa macrofagotrófica do *T. cruzi* (cepa Peruviana), desenvolveram esplenomeglia devido à

hiperplasia reativa com quantidades aumentadas de linfócitos e macrófagos, culminando em desintegração do parasito e necrose de células parasitadas. A necrose vem sendo atribuída à liberação de citocinas tóxicas, incluindo TNF- α , de macrófagos parasitados. As lesões necróticas apresentaram-se mais intensas em camundongos susceptíveis (C3H e Swiss) do que em camundongos resistentes (DBA).

Neste trabalho, a análise dos cortes histológicos do baço, fígado, músculo cardíaco e esquelético, dos grupos infectados e não incubados com PSI das cepas Y (Figuras 18 e 19), Be-62 (Figuras 20 e 21), notadamente macrofagotrópicas e Be-78, miotrópicas (Figuras 22, 23 e 24) estão de acordo com trabalhos anteriores de outros autores (Silva & Nussenzweig, 1953; Lana & Chiari, 1986).

Melo & Brener (1978) demonstraram que no baço de camundongos albinos inoculados com formas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* ocorria um elevado parasitismo e uma intensidade um pouco menos elevada de parasitismo para os camundongos inoculados com a cepa Be-62. Eles demonstraram, também, que o fígado dos animais inoculados com estas mesmas cepas apresentou um parasitismo muito intenso. Em contrapartida, no mesmo período, raros parasitos foram encontrados nos músculos cardíaco e esquelético desses mesmos animais.

Os achados histológicos da cepa Be-78 não incubados com PSI deste trabalho estão de acordo com os encontrados por Lana & Chiari (1986). Eles demonstraram que esta cepa tem um tropismo preferencial para as células do músculo cardíaco e esquelético, quando esta cepa foi inoculada em camundongos albinos e C3H isogênicos.

Nos grupos inoculados e pré-incubados com PSI, foi observado que na cepa Y, houve um aumento do parasitismo em todos os órgãos estudados, porém com um processo inflamatório que não acompanhou esse aumento de parasitismo. Uma hipótese que poderia explicar este fenômeno relaciona-se ao fato do proteossoma estar envolvido na transformação do tripomastigota para amastigota e posteriormente de amastigota para triplo. Como mostra a figura 18, a quantidade de amastigota detectada sugere que a incubação dos tripomastigotas com PSI não compromete a infecção, não altera o tropismo tecidual, entretanto, houve um retardo na transição amastigota-tripomastigota. A permanência nas formas amastigotas implica na não lise da célula, pois isto só ocorre para a liberação das formas tripomastigotas para o meio extracelular. Em consequência deste fato, o conteúdo intracelular não é liberado, sugerindo que a baixa intensidade do processo inflamatório nesses animais, no momento das necropsias, foi ocasionada por este fenômeno.

O que poderia corroborar com esta hipótese é a curva de parasitemia destes animais. Quando comparados com a curva do grupo controle, o grupo pré-incubado com PSI obteve uma inibição de 68% no 1º pico, porém, a curva de parasitemia desta cepa, mostrou um aumento de tripomastigotas sanguíneas no final do tempo de leitura, quando comparados ao grupo controle, mostrando que provalvente houve um bloqueio temporário na diferenciação entre as formas evolutivas de amastigota para tripomastigotas sanguíneos.

No grupo de animais infectados com a cepa Be-62, previamente incubados com PSI, foi observado um perfil diferente, quando comparado ao grupo de animais da cepa Y previamente incubados com PSI. Apesar da queda de 42% na parasitemia, não detectamos diferenças significativas entre o grupo controle e o experimental. Esses resultados levantam duas questões. A primeira, que o PSI não teve a mesma eficiência de inibição do proteossoma quanto na cepa Y e a segunda, que a diferenciação amastigota-tripomastigota sanguíneo nesta cepa envolve mecanismos independentes de proteossoma. A primeira questão nós descartamos, uma vez que os nossos resultados de proteólise utilizando tripomastigotas de cultura e substratos específico para a atividade quimotripsina, mostrou 95% de inibição com PSI (dados não mostrados), reforçando a segunda questão.

A hipótese de que a regulação da diferenciação de amastigota para tripomastigota sanguíneo na cepa Be-62 envolva vários mecanismos diferentes de proteossoma é corroborado uma vez que o aumento do parasitismo, observado somente no fígado e coração destes animais, bem como a intensa necrose e os fenômenos degenerativos no fígado, quando comparado ao grupo controle, sugere que uma parcela dos parasitos conseguiu passar da forma amastigota para a forma tripomastigota, rompendo a célula, causando os fenômenos acima citados na cepa Be-62 e mantendo a redução até o fim da leitura, onde no 2º pico de parasitemia ocorreu uma redução de 45%.

Como mostra nas figuras 22 e 23, a cepa Be-78 apresentou um perfil distinto frente à incubação com o PSI com cepas Y e Be-62. Foi observado na cepa Be-78, a manutenção do padrão de parasitismo tecidual, quando comparado com o grupo de animais infectados e não incubados com o PSI. Interessantemente a curva de parasitemia desta cepa, mostrou uma inibição, de 73% no grupo infectado e incubado com PSI.

Apesar de não haver consenso na literatura sobre a natureza clonal da cepa Be-78, a redução da parasitemia encontrada sugere que a inibição do proteassoma induziu a ativação da via apoptótica no parasito, tendo como consequência uma queda expressiva dos parasitos viáveis. Vários grupos independentes vêm mostrando nos últimos anos a relação direta de inibição do proteassoma e ativação da apoptose.

Estudos recentes demonstraram a existência da via apoptótica ou morte celular programada (PCD) em organismos unicelulares, sugerindo que esta via tem um papel funcional importante em *T. cruzi* (Ameisen *et al.*, 1996), *Leishmania* (Lee *et al.*, 2002), *Plasmodium* (Al-Olayan *et al.*, 2002) dentre outros, contudo, não esta bem claro por quais mecanismos a PCD é viabilizada nestes organismos.

Além disso, Clark & Kuhn (1999) investigaram se a infecção de fibroblastos com *T. cruzi* poderia causar PCD. Analisando as células infectadas por cinco dias, eles não conseguiram detectar nenhum sinal de apoptose, embora os tripomastigotas fossem produzidos e liberados na corrente sanguínea. Outros trabalhos demonstraram que em células HeLa infectadas com *T. cruzi*, os parasitos inibiram a apoptose (Nakajima-Shimada *et al.*, 2000)

Embora a infecção por *T. cruzi* pareça inibir a apoptose em células infectadas, foi claramente demonstrado que na infecção experimental em ratos, ocorreu uma perda massiva de células T CD4+ não infectadas, sugerindo que o *T. cruzi* beneficia-se destes eventos. (Lopes *et al.*, 1995, Lopes & Dos Reis, 1995). Estes dados, tomados conjuntamente com os resultados obtidos com a cepa Be-78, sugerem que nesta cepa, a inibição do proteassoma possa ter subvertido a maquinaria da PCD do parasito desfavorecendo a sobrevivência dos mesmos nas células por eles infectadas. Desta forma, os nossos resultados apontam para a necessidade de investigar a comunicação entre o proteassoma e a PCD neste parasito.

Em relação à taxa de mortalidade dos camundongos infectados com as cepas Y e Be-62, incubados ou não com PSI, foi calculada a porcentagem dos animais que morreram espontaneamente ao longo do curso da infecção experimental diariamente. Foi observada na cepa Y (Figura 16) uma taxa de 100% de mortalidade para ambos e uma taxa de sobrevivência que não ultrapassou os 10%, ou seja, os camundongos infectados com tripomastigotas previamente incubados com PSI morreram dois dias após os controles. O início das mortes no grupo controle deu-se no 10º dia e o término no 19º dia e nos incubados com PSI iniciou-se no 12º, alcançando a taxa de 100% no 21º dia. Na cepa Be-62 (figura 17) o controle e nos incubados com PSI o início das mortes deu-se

no 9º dia e o término no 19º dia para o controle e nos incubados com PSI no 20º dia. A taxa de sobrevivência da cepa Be-62 foi de 5%, ou seja, os camundongos infectados com tripomastigotas previamente tratados com PSI sobreviveram apenas um dia a mais.

As diferenças de inibição em relação às formas epimastigotas e tripomastigotas provavelmente são derivadas do fato de que a forma tripomastigota é a forma infectiva e a forma epimastigota é uma das formas replicativas do *T. cruzi*, ou seja, esta forma tem um ciclo celular ativo e várias funções necessárias para o crescimento *in vitro*, talvez não sejam necessárias para a infecção. O *T. cruzi* apresenta um genoma plástico capaz de sofrer mudanças temporárias reversíveis (Chiari, 1974; Leguizamón *et al.*, 1993).

Esses dados sugerem que fatores relacionados às características intrínsecas do parasito e do hospedeiro, provavelmente contribuem para o aparecimento das diversas manifestações clínicas da doença de Chagas. Algumas evidências têm demonstrado também que o *T. cruzi* possui grande capacidade de adaptação às modificações do meio ambiente (Pacheco & Brito, 1999) podendo as cepas serem compostas de populações geneticamente heterogêneas (Lambrecht, 1965; Tibayrenc & Ayala, 1988). Neste caso, esta heterogeneidade pode ser um dos fatores que modula a doença.

Os principais resultados obtidos neste trabalho foram:

- A expressão das subunidades β_1 , β_2 e β_5 , é similar entre as subunidades e entre as cepas Y, Be-62 e Be-78;
- Os níveis de proteassoma das formas epimastigota são maiores na cepa Be-78 quando comparado a Y e Be-62, sugerindo a presença de mecanismos de regulação pós-transcricional;
- Houve uma relação direta entre níveis de proteassoma e atividade peptidásica do proteassoma nas cepas em estudo
- O proteassoma é necessário para a replicação das formas epimastigotas das cepas Y, Be-62 e Be-78.
- O proteassoma é necessário para a manutenção da integridade morfológica das formas epimastigotas das cepas Y, Be-62 e Be-78.
- Os resultados da infecção experimental da Doença de Chagas, quando tomados conjuntamente, mostram que o proteassoma é regulado de forma diferenciada entre as cepas Y, Be-62 e Be-78.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o proteassoma é essencial para a manutenção do ciclo biológico do *T. cruzi*, uma vez que a inibição desta protease na fase replicativa (epimastigota) além de bloquear o ciclo celular induz alterações morfológicas, enquanto que uma inibição na fase infectiva, compromete a progressão da infecção experimental.

- ABUIN G., FREITAS-JUNIOR L.H., COLLI W., ALVES M.J. & SCHENKMAN S. (1999) Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. *J.Biol.Chem.* **274**, 13041-13047.
- ADAMS J. (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat.Rev.* **29 Suppl 1**, 3-9.
- ADAMS J., BEHNKE M., CHEN S., CRUICKSHANK A.A., DICK L.R., GRENIER L., KLUNDER J.M., MA Y.T., PLAMONDON L. & STEIN R.L. (1998) Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **8**, 333-338.
- ADAMS J., PALOMBELLA V.J., SAUSVILLE E.A., JOHNSON J., DESTREE A., LAZARUS D.D., MAAS J., PIEN C.S., PRAKASH S. & ELLIOTT P.J. (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* **59**, 2615-2622.
- AL-OLAYAN E.M., WILLIAMS G.T. & HURD H. (2002) Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *Int.J.Parasitol.* **32**, 1133-1143.
- ALCANTARA A. & BRENER Z. (1978) The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop.* **35**, 209-219.
- ALCINA A. & FRESNO M. (1987) Activation by synergism between endotoxin and lymphokines of the mouse macrophage cell line J774 against infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **9**, 175-186.
- ALIBERTI J.C., CARDOSO M.A., MARTINS G.A., GAZZINELLI R.T., VIEIRA L.Q. & SILVA J.S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect.Immun.* **64**, 1961-1967.
- ALIBERTI J.C., MACHADO F.S., SOUTO J.T., CAMPANELLI A.P., TEIXEIRA M.M., GAZZINELLI R.T. & SILVA J.S. (1999) beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect.Immun.* **67**, 4819-4826.
- ALLEN E., DING J., WANG W., PRAMANIK S., CHOU J., YAU V. & YANG Y. (2005) Gigaxonin-controlled degradation of MAP1B light chain is critical to neuronal survival. *Nature* **438**, 224-228.
- ALVES A.M., TANURI A., DE ALMEIDA D.F. & VON KRUGER W.M. (1993) Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp.Parasitol.* **77**, 246-253.
- AMEISEN J.C. (1996) The origin of programmed cell death. *Science* **272**, 1278-1279.

- ANDRADE L.O., MACHADO C.R., CHIARI E., PENA S.D. & MACEDO A.M. (1999) Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol.Biochem.Parasitol.* **100**, 163-172.
- ANDRADE, S.G. (1974) Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* **3**, 65-121.
- ANDRADE S.G. (1999) *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 185-187.
- ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L. & FIGUEIRA, R.M. (1970) Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Med.Bahia* **70**, 32-42.
- ANDRADE S.G. & MAGALHAES J.B. (1996) Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **30**, 27-35.
- ANDRADE S.G., MAGALHAES J.B. & PONTES A.L. (1985) Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull.World Health Organ* **63**, 721-726.
- ANDREWS N.W., ABRAMS C.K., SLATIN S.L. & GRIFFITHS G. (1990) A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* **61**, 1277-1287.
- ANEZ N., CARRASCO H., PARADA H., CRISANTE G., ROJAS A., FUENMAYOR C., GONZALEZ N., PERCOCO G., BORGES R., GUEVARA P. & RAMIREZ J.L. (1999) Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **60**, 726-732.
- BAINES A. & GULL K. (2007) WCB is a C2 Domain Protein Defining the Plasma Membrane - Sub-Pellicular Microtubule Corset of Kinetoplastid Parasites. *Protist.* (in press).
- BASOMBRÍO, M.A.; NOZAKI, T.; GÓMEZ, L.; RAMOS, F.; CROSS, G. (1996) GP72 gene deletion increases culture induced virulence attenuation in *Trypanosoma cruzi*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **91 Suppl**, p. 303.
- BASOMBRIO M.A., SEGURA M.A., GOMEZ L. & PADILLA M. (2000) Studies on the virulence and attenuation of *Trypanosoma cruzi* using immunodeficient animals. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **95 Suppl 1**, 175-178.
- BELLI S.I. (2000) Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int.J.Parasitol.* **30**, 679-687.
- BEN YOUNES-CHENNOUFI A., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M., TRICOTTET V., EISEN H., REYNES M. & SAID G. (1988) Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **82**, 77-83.

- BICE D.E. & ZELEDON R. (1970) Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J.Parasitol.* **56**, 663-670.
- BISAGGIO D.F., CAMPANATI L., PINTO R.C. & SOUTO-PADRON T. (2006) Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta Trop.* **98**, 162-175.
- BRENER Z. (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **4**, 389-396.
- BRENER Z. (1965) Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann.Trop.Parasitol.* **59**, 19-26.
- BRENER Z. (1969) The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* **63**, 215-220.
- BRENER Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu.Rev.Microbiol.* **27**, 347-382.
- BRENER Z. (1986) Why vaccines do not work in Chagas disease. *Parasitol.Today* **2**, 196-197.
- BRENER Z. & CHIARI E. (1963) Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **19**, 220-224.
- BRENER Z. & CHIARI E. (1967) Susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to various chemotherapeutic agents. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **9**, 197-207.
- BRENER Z., CHIARI E. & ALVARENGA N.J. (1974) Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-year period in experimentally inoculated mice. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **16**, 39-46.
- BRENER, Z.; COSTA, C.A.G.; CHIARI, C. (1976) Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev.Inst.Med.Trop.* **18**, 450-455.
- BRENER Z. & GAZZINELLI R.T. (1997) Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **114**, 103-110.
- CAMARGO E.P. (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev.Inst.Med.Trop.* **12**, 93-100.
- CANCADO J.R. (1999) Criteria of Chagas disease cure. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 331-335.
- CARNEIRO M., CHIARI E., GONCALVES A.M., DA SILVA PEREIRA A.A., MOREL C.M. & ROMANHA A.J. (1990) Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Acta Trop.* **47**, 35-45.

- CARNEIRO M., ROMANHA A.J. & CHIARI E. (1991) Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **86**, 387-393.
- CASTRO A.M., LUQUETTI A.O., RASSI A., RASSI G.G., CHIARI E. & GALVAO L.M. (2002) Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.Res.* **88**, 894-900.
- CHIARI E. (1974) Infectivity of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes from cultures kept in laboratory for different periods of time. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **16**, 61-67.
- CHIARI E., TAFURI W.L., ALVARENGA N.J. & SOARES S.J. (1973) Findings on the behavior, in vertebrate and invertebrate hosts, of different cultures of *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **15**, 255-260.
- CLARK R.K. & KUHN R.E. (1999) *Trypanosoma cruzi* does not induce apoptosis in murine fibroblasts. *Parasitology* **118** (Pt 2), 167-175.
- CLAYTON C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* **21**, 1881-1888.
- CONTRERAS V.T., SALLES J.M., THOMAS N., MOREL C.M. & GOLDENBERG S. (1985) In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol.Biochem.Parasitol.* **16**, 315-327.
- COOPER R., DE JESUS A.R. & CROSS G.A. (1993) Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J.Cell Biol.* **122**, 149-156.
- CORNELISSEN A.W., EVERS R., GRONDAL E.J., HAMMER A., JESS W. & KOCK J. (1989) Transcription and RNA polymerases in *Trypanosoma brucei*. *Acta Leiden* **58**, 75-96.
- CORSINI A.C., COSTA M.G., OLIVEIRA O.L., CAMARGO I.J. & STELINI A., Jr. (1980) Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **22**, 192-196.
- CRAIU A., GACZYNSKA M., AKOPIAN T., GRAMM C.F., FENTEANY G., GOLDBERG A.L. & ROCK K.L. (1997) Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J.Biol.Chem.* **272**, 13437-13445.
- CROFT S.L. (1999) Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94**, 215-220.
- CRUZ R.E., MACEDO A.M., BARNABE C., FREITAS J.M., CHIARI E., VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., BAHIA M.T., TAFURI W.L. & LANA M. (2006) Further genetic characterization of the two *Trypanosoma cruzi* Berenice strains

- (Be-62 and Be-78) isolated from the first human case of Chagas disease (Chagas, 1909). *Acta Trop.* **97**, 239-246.
- CUTCHEN-MALONEY S.L., MATSUDA K., SHIMBARA N., BINNS D.D., TANAKA K., SLAUGHTER C.A. & DEMARTINO G.N. (2000) cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. *J.Biol.Chem.* **275**, 18557-18565.
- DALLAGIOVANNA B., PLAZANET-MENUT C., OGATTA S.F., AVILA A.R., KRIEGER M.A., GOLDENBERG S. (2001) *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp Parasitol.* **99(1)**, 7-16.
- DAVID D.C., LAYFIELD R., SERPELL L., NARAIN Y., GOEDERT M. & SPILLANTINI M.G. (2002) Proteasomal degradation of tau protein. *J.Neurochem.* **83**, 176-185.
- DE CASTRO S.L. (1993) The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **53**, 83-98.
- DE DIEGO J.L., KATZ J.M., MARSHALL P., GUTIERREZ B., MANNING J.E., NUSSENZWEIG V. & GONZALEZ J. (2001) The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* **40**, 1053-1062.
- DEANE M.P.; JANSEN A.M.; MANGAIA R.H.R.; GONÇALVES A.M. & MOREL C.M. (1984a) Are our laboratory "strain" representative sample of *Trypanosoma cruzi* population that circulate in nature?. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, **79 Suppl**, p.19-24.
- DEANE M.P., MANGIA R.H., PEREIRA N.M., MOMEN H., GONCALVES A.M. & MOREL C.M. (1984b) *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **79**, 495-497.
- DEANE M.P.; SOUZA M.A.; PEREIRA N.M.; GONÇALVES A.M.; MOMEN H. & DOCAMPO R. (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem.Biol.Interact.* **73**, 1-27.
- DEANE M.P., SOUSA M.A., PEREIRA N.M., GONCALVES A.M., MOMEN H. & MOREL C.M. (1984c) *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *J.Protozool.* **31**, 276-280.
- DEMARTINO G.N. & SLAUGHTER C.A. (1999a) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J.Biol.Chem.* **274**, 22123-22126.
- DEMARTINO G.N. & SLAUGHTER C.A. (1999b) The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J.Biol.Chem.* **274**, 22123-22126.

- DOCAMPO R. (1990) Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem.Biol.Interact.* **73**, 1-27.
- DUTRA W.O., COLLEY D.G., PINTO-DIAS J.C., GAZZINELLI G., BRENER Z., PEREIRA M.E., COFFMAN R.L., CORREA-OLIVEIRA R. & CARVALHO-PARRA J.F. (2000) Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand.J.Immunol.* **51**, 91-97.
- EMMERLICH V., SANTARIUS U., BAKKER-GRUNWALD T. & SCHOLZE H. (1999) Isolation and subunit composition of the 20S proteasome of *Giardia lamblia*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **100**, 131-134.
- ENGEL J.C., DOYLE P.S., HSIEH I. & MCKERROW J.H. (1998) Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J.Exp.Med.* **188**, 725-734.
- ENGMAN D.M. & LEON J.S. (2002) Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop.* **81**, 123-132.
- EVERS R., HAMMER A., KOCK J., JESS W., BORST P., MEMET S. & CORNELISSEN A.W. (1989) *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. *Cell* **56**, 585-597.
- FACTOR S.M., CHO S., WITTNER M. & TANOWITZ H. (1985) Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **34**, 246-253.
- FIELD M.C. & CARRINGTON M. (2004) Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. *Traffic.* **5**, 905-913.
- FIGUEIREDO I.F.; LIMA M.T.; GATASS C.R. & SOUTO PADRON T. (1996) Trypomastigotes of clone C14 of *Trypanosoma cruzi* are rapidly destroyed by macrophages *in vivo*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, **91**, p. 56-61.
- FILARDI L.S. & BRENER Z. (1987a) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **81**, 755-759.
- FILARDI L.S. & BRENER Z. (1987b) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **81**, 755-759.
- GANTT S.M., MYUNG J.M., BRIONES M.R., LI W.D., COREY E.J., OMURA S., NUSSENZWEIG V. & SINNIS P. (1998) Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**, 2731-2738.
- GARCIA E.S. & AZAMBUJA P. (1991) Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol.Today* **7**, 240-244.

- GILINGER G. & BELLOFATTO V. (2001) Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1556-1564.
- GIOVANNI-DE-SIMONE S., PONTES DE CARVALHO L.C., OLIVA O.F., ANDRADE S.G. & GALVAO-CASTRO B. (1987) Trypanosoma cruzi strain-specific monoclonal antibodies: identification of Colombian strain flagellates in the insect vector. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **81**, 750-754.
- GLICKMAN M.H. & CIECHANOVER A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428.
- GONZALES-PERDOMO M., ROMERO P. & GOLDENBERG S. (1988) Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate Trypanosoma cruzi differentiation. *Exp.Parasitol.* **66**, 205-212.
- GONZALEZ J., BAI G., FREVERT U., COREY E.J. & EICHINGER D. (1999) Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in Entamoeba invadens. *Eur.J.Biochem.* **264**, 897-904.
- GONZALEZ J., FREVERT U., COREY E.J., NUSSENZWEIG V. & EICHINGER D. (1997) Proteasome function is required for encystation of Entamoeba invadens. *Arch.Med.Res.* **28 Spec No**, 139-140.
- GONZALEZ J., RAMALHO-PINTO F.J., FREVERT U., GHISO J., TOMLINSON S., SCHARFSTEIN J., COREY E.J. & NUSSENZWEIG V. (1996) Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J.Exp.Med.* **184**, 1909-1918.
- GRAHAM S.V. (1995) Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol.Today* **11**, 217-223.
- GUERRA-SA R., CASTRO-BORGES W., EVANGELISTA E.A., KETTELHUT I.C. & RODRIGUES V. (2005) Schistosoma mansoni: functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. *Exp.Parasitol.* **109**, 228-236.
- HIGUCHI M.D., RIES M.M., AIELLO V.D., BENVENUTI L.A., GUTIERREZ P.S., BELLOTTI G. & PILEGGI F. (1997) Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **56**, 485-489.
- HILL C.P., MASTERS E.I. & WHITBY F.G. (2002) The 11S regulators of 20S proteasome activity. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **268**, 73-89.
- HILT W. & WOLF D.H. (1995) Proteasomes of the yeast S. cerevisiae: genes, structure and functions. *Mol.Biol.Rep.* **21**, 3-10.
- HOLETZ F.B., CORREA A., AVILA A.R., NAKAMURA C.V., KRIEGER M.A. & GOLDENBERG S. (2007) Evidence of P-body-like structures in Trypanosoma cruzi. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **356**, 1062-1067.

- HUA S.B., TO W.Y., NGUYEN T.T., WONG M.L. & WANG C.C. (1996) Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **78**, 33-46.
- HUANG J. & VAN DER PLOEG L.H. (1991) Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.* **10**, 3877-3885.
- KANIA M.A., DEMARTINO G.N., BAUMEISTER W. & GOLDBERG A.L. (1996) The proteasome subunit, C2, contains an important site for binding of the PA28 (11S) activator. *Eur.J.Biochem.* **236**, 510-516.
- KIRCHHOFF L.V. (1993) Chagas disease. American trypanosomiasis. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **7**, 487-502.
- KIRCHHOFF L.V. (1999) Chagas disease. American Trypanosomiasis: a tropical disease now emerging in the United States. *Emerging Infections* **3**, 111-134.
- KISSELEV A.F., CALLARD A. & GOLDBERG A.L. (2006) Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J.Biol.Chem.* **281**, 8582-8590.
- KLOETZEL J.K., MILDER R.V. & UMEZAWA E.S. (1984) *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **26**, 179-185.
- KULKARNI M.M., MCMASTER W.R., KAMYSZ E., KAMYSZ W., ENGMAN D.M. & MCGWIRE B.S. (2006a) The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol.Microbiol.* **62**, 1484-1497.
- KULKARNI M.M., MCMASTER W.R., KAMYSZ E., KAMYSZ W., ENGMAN D.M. & MCGWIRE B.S. (2006b) The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol.Microbiol.* **62**, 1484-1497.
- LAGUENS R.P., MECKERT P.C. & GELPI R.J. (1981) Chronic Chagas disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina (B Aires)* **41**, 35-39.
- LAMBRECHT F.L. (1965) Biological variations in trypanosomes and their relation to the epidemiology of Chagas' disease. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **7**, 346-352.
- LANA M., CHIARI C.A., CHIARI E., MOREL C.M., GONCALVES A.M. & ROMANHA A.J. (1996) Characterization of two isolates of *Trypanosoma cruzi* obtained from the patient Berenice, the first human case of Chagas' disease described by Carlos Chagas in 1909. *Parasitol.Res.* **82**, 257-260.
- LANA M., CHIARI E. & TAFURI W.L. (1992) Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **87**, 59-71.

- LANA M. & CHIARI C.A. (1986) Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **81**, 247-253.
- LEE D.H. & GOLDBERG A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* **8**, 397-403.
- LEE N., BERTHOLET S., DEBRABANT A., MULLER J., DUNCAN R. & NAKHASI H.L. (2002) Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death.Differ.* **9**, 53-64.
- LEGUIZAMON M.S., CAMPETELLA O.E., ORN A. & CAPPA S.M. (1993) Reversion of culture-induced virulence-attenuation in *Trypanosoma cruzi*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **88**, 161-162.
- LENZI H.L., OLIVEIRA D.N., LIMA M.T. & GATTASS C.R. (1996) *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp.Parasitol.* **84**, 16-27.
- LEON J.S. & ENGMAN D.M. (2001) Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int.J.Parasitol.* **31**, 555-561.
- LEVI G.C.; LOBO I.M.F.; KALLÁS E.G.; AMATO NETO V. (1996) Etiological drug treatment of human infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop.* **38** (1), 35-8.
- LI B. & DOU Q.P. (2000) Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 3850-3855.
- LI Z., ZOU C.B., YAO Y., HOYT M.A., MCDONOUGH S., MACKEY Z.B., COFFINO P. & WANG C.C. (2002) An easily dissociated 26 S proteasome catalyzes an essential ubiquitin-mediated protein degradation pathway in *Trypanosoma brucei*. *J.Biol.Chem.* **277**, 15486-15498.
- LIMA A.P., DOS REIS F.C., SERVEAU C., LALMANACH G., JULIANO L., MENARD R., VERNET T., THOMAS D.Y., STORER A.C. & SCHARFSTEIN J. (2001) Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol.Biochem.Parasitol.* **114**, 41-52.
- LIMA V.S., MANGIA R.H., CARREIRA J.C., MARCHEWSKI R.S. & JANSEN A.M. (1999) *Trypanosoma cruzi*: correlations of biological aspects of the life cycle in mice and triatomines. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94**, 397-402.
- LIU B., LIU Y., MOTYKA S.A., AGBO E.E. & ENGLUND P.T. (2005) Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol.* **21**, 363-369.
- LOMO P.O., COETZER T.H. & LONSDALE-ECCLES J.D. (1997) Characterization of a multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) from *Trypanosoma brucei*. *Immunopharmacology* **36**, 285-293.

- LOPES M.F., DA V., V, SANTOS A.R., FONSECA M.E. & DOSREIS G.A. (1995) Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J.Immunol.* **154**, 744-752.
- LOPES M.F. & DOSREIS G.A. (1995) Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **28**, 913-918.
- LUQUETTI A.O. (1997) Etiological treatment for Chagas disease. *Parasitol.today.* **13**,127-128.
- MACEDO A.M. & PENA S.D. (1998) Genetic Variability of Trypanosoma cruzi:Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol.Today* **14**, 119-124.
- MACHADO A.B., MACHADO C.R. & GOMES C.B. (1975) Depletion of heart norepinephrine in experimental acute myocarditis caused by Trypanosoma cruzi. *Experientia* **31**, 1202-1203.
- MACKANESS G.B. (1969) The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J.Exp.Med.* **129**, 973-992.
- MACKEY Z.B., O'BRIEN T.C., GREENBAUM D.C., BLANK R.B. & MCKERROW J.H. (2004) A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in Trypanosoma brucei. *J.Biol.Chem.* **279**, 48426-48433.
- MAGALHAES J.B., PONTES A.L. & ANDRADE S.G. (1985) Behavior of the Y and Peruvian strains of Trypanosoma cruzi in mice, after passage through various media. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **80**, 41-50.
- MAHONEY C.W., AZZI A. & HUANG K.P. (1990) Effects of suramin, an anti-human immunodeficiency virus reverse transcriptase agent, on protein kinase C. Differential activation and inhibition of protein kinase C isozymes. *J.Biol.Chem.* **265**, 5424-5428.
- MAKIOKA A., KUMAGAI M., OHTOMO H., KOBAYASHI S. & TAKEUCHI T. (2002) Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens. *Parasitol.Res.* **88**, 454-459.
- MARRETTO J.P. & ANDRADE S.G. (1994) Biochemical behavior of Trypanosoma cruzi strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* **27**, 209-215.
- MCDANIEL J.P. & DVORAK J.A. (1993b) Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring Trypanosoma cruzi variants. *Mol.Biochem.Parasitol.* **57**, 213-222.
- MCDANIEL J.P. & DVORAK J.A. (1993a) Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring Trypanosoma cruzi variants. *Mol.Biochem.Parasitol.* **57**, 213-222.

- MEIRELLES M.N., JULIANO L., CARMONA E., SILVA S.G., COSTA E.M., MURTA A.C. & SCHARFSTEIN J. (1992) Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol.Biochem.Parasitol.* **52**, 175-184.
- MELO R.C. & BRENER Z. (1978) Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J.Parasitol.* **64**, 475-482.
- MENG L., MOHAN R., KWOK B.H., ELOFSSON M., SIN N. & CREWS C.M. (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 10403-10408.
- MILDER R., KLOETZEL J. & DEANE M.P. (1977) Observation on the interaction of peritoneal macrophages with *Trypanosoma cruzi*. II. Intracellular fate of bloodstream forms. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **19**, 313-322.
- MILES M.A., FELICIANGELI M.D. & DE ARIAS A.R. (2003) American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* **326**, 1444-1448.
- MILLER G.E., COHEN S. & RITCHEY A.K. (2002) Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol.* **21**, 531-541.
- MOREL C.M., DEANE M.P. & GONCALVES A.M. (1986) The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol.Today* **2**, 97-101.
- MORRIS S.A., TANOWITZ H.B., WITTNER M. & BILEZIKIAN J.P. (1990) Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation* **82**, 1900-1909.
- MURRAY H.W., SPITALNY G.L. & NATHAN C.F. (1985) Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J.Immunol.* **134**, 1619-1622.
- MURTA A.C., PERSECHINI P.M., PADRON T.S., DE S.W., GUIMARAES J.A. & SCHARFSTEIN J. (1990) Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol.Biochem.Parasitol.* **43**, 27-38.
- MURTA S.M., GAZZINELLI R.T., BRENER Z. & ROMANHA A.J. (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol.Biochem.Parasitol.* **93**, 203-214.
- MUTOMBA M.C., TO W.Y., HYUN W.C. & WANG C.C. (1997) Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in African trypanosomes. *Mol.Biochem.Parasitol.* **90**, 491-504.

- MUTOMBA M.C. & WANG C.C. (1998) The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. *Mol.Biochem.Parasitol.* **93**, 11-22.
- NAKAJIMA-SHIMADA J., ZOU C., TAKAGI M., UMEDA M., NARA T. & AOKI T. (2000) Inhibition of Fas-mediated apoptosis by *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochim.Biophys.Acta* **1475**, 175-183.
- NASH P.B., PURNER M.B., LEON R.P., CLARKE P., DUKE R.C. & CUIRIEL T.J. (1998) *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J.Immunol.* **160**, 1824-1830.
- NKENGU-NJINKENG, J. (2002) Antitrypanosomal activities of proteasome inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **46**, 2038-2040.
- NOGUEIRA N., CHAPLAN S. & COHN Z. (1980) *Trypanosoma cruzi*. Factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. *J.Exp.Med.* **152**, 447-451.
- NOGUEIRA N., GORDON S. & COHN Z. (1977) *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *J.Exp.Med.* **146**, 157-171.
- NOZAKI T. & CROSS G.A. (1995) Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **75**, 55-67.
- NUNES L.R., CARVALHO M.R., SHAKARIAN A.M. & BUCK G.A. (1997) The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. *Gene* **188**, 157-168.
- OLIVEIRA R.P., BROUDE N.E., MACEDO A.M., CANTOR C.R., SMITH C.L. & PENA S.D. (1998) Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 3776-3780.
- OLIVIERI B.P., COTTA-DE-ALMEIDA V. & RAUJO-JORGE T. (2002) Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob.Agents Chemother.* **46**, 3790-3796.
- PACHECO R.S. & BRITO C.M. (1999) Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **94 Suppl 1**, 199-201.
- PAUGAM A., BULTEAU A.L., DUPOUY-CAMET J., CREUZET C. & FRIGUET B. (2003) Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends Parasitol.* **19**, 55-59.
- PEREYRA, M. (1996) Generation of an invasive phenotype in *Trypanosoma cruzi* by an endogenous, cytokine like molecule. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, **91 Suppl**, p. 14.

- PETKOVA S.B., HUANG H., FACTOR S.M., PESTELL R.G., BOUZAHZAH B., JELICKS L.A., WEISS L.M., DOUGLAS S.A., WITTNER M. & TANOWITZ H.B. (2001) The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int.J.Parasitol.* **31**, 499-511.
- PICKART C.M. (1997) Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J.* **11**, 1055-1066.
- PIZZI T.; AGOSIN M.; CHRISTEN R.; HOECKER G. & NEGhme, A. (1949) Influencia de la constitución genética en la resistencia de la laucha a la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biológica* **8**, 43-53.
- PLATA F., WIETZERBIN J., PONS F.G., FALCOFF E. & EISEN H. (1984) Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Eur.J.Immunol.* **14**, 930-935.
- POSTAN M., DVORAK J.A. & MCDANIEL J.P. (1983) Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN-mice with two clones isolated from a common source. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **32**, 497-506.
- PRATA A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect.Dis.* **1**, 92-100.
- QUE X., ENGEL J.C., FERGUSON D., WUNDERLICH A., TOMAVO S. & REED S.L. (2007) Cathepsin Cs are key for the intracellular survival of the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *J.Biol.Chem.* **282**, 4994-5003.
- RASSI A (1979) Clínica: Fase aguda. In *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds Z.Brener & Andrade Z. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 249-264.
- RECINOS R.F., KIRCHHOFF L.V. & DONELSON J.E. (2001) Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **113**, 215-222.
- ROBERTSON C.D. (1999) The *Leishmania mexicana* proteasome. *Mol.Biochem.Parasitol.* **103**, 49-60.
- ROCHA G.M., BRANDAO B.A., MORTARA R.A., ATTIAS M., DE S.W. & CARVALHO T.M. (2006) The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *J.Struct.Biol.* **154**, 89-99.
- ROMAÑA C. (1935) Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *MEPRA* **22**, 16-28.
- ROTTENBERG M.E., BAKHIET M., OLSSON T., KRISTENSSON K., MAK T., WIGZELL H. & ORN A. (1993) Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect.Immun.* **61**, 5129-5133.

- ROTTENBERG M.E., CARDONI R.L., DETITTO E.H., MORENO M. & SEGURA E.L. (1988) Trypanosoma cruzi: immune response in mice immunized with parasite antigens. *Exp.Parasitol.* **65**, 101-108.
- RUIZ R.C., FAVORETO S JR, DORTA M.L., OSHIRO M.E., FERREIRA A.T., MANQUE P.M. & YOSHIDA N. (1998) Infectivity of Trypanosoma cruzi strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem.J.* **330** (Pt 1), 505-511.
- SALGADO J.A., GARCEZ P.N., DE O.C. & GALIZZI J. (1962) Current clinical review of the 1st described human case of Chagas' disease. *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo* **4**, 330-337.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2.ed. New York. *Cold Spring Harbor Lab.* **18**, 88.
- SCHENNA M.; SHALON D.; DAVIS R.W. & BROWN P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- SCHLEMPER JR B.R.; AVILA, C.M.; COURA J.R. & BRENER, Z. (1983) Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. *Rev.Soc.Br.Med.Trop.* **16**, 23-30.
- SCHOLZE H., FREY S., CEJKA Z. & BAKKER-GRUNWALD T. (1996) Evidence for the existence of both proteasomes and a novel high molecular weight peptidase in Entamoeba histolytica. *J.Biol.Chem.* **271**, 6212-6216.
- SCOTT P. & TRINCHIERI G. (1995) The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr.Opin.Immunol.* **7**, 34-40.
- SEEMULLER E., LUPAS A., STOCK D., LOWE J., HUBER R. & BAUMEISTER W. (1995) Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease. *Science* **268**, 579-582.
- SHAW M.K., HE C.Y., ROOS D.S. & TILNEY L.G. (2000) Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of Toxoplasma gondii. *Parasitology* **121** (Pt 1), 35-47.
- SHENG X., HU Z., LU H., WANG X., BALUSKA F., SAMAJ J. & LIN J. (2006) Roles of the ubiquitin/proteasome pathway in pollen tube growth with emphasis on MG132-induced alterations in ultrastructure, cytoskeleton, and cell wall components. *Plant Physiol* **141**, 1578-1590.
- SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V. (1953) Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para camundongo branco. *Folia clin.biol.* **20**, 191-207.
- SOARES M.B., PONTES-DE-CARVALHO L. & RIBEIRO-DOS-SANTOS R. (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An.Acad.Bras.Cienc.* **73**, 547-559.

- SOSA-ESTANI S., SEGURA E.L., RUIZ A.M., VELAZQUEZ E., PORCEL B.M., YAMPOTIS C. (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* **59(4)**, 526-9.
- SOUTO-PADRON T., CAMPETELLA O.E., CAZZULO J.J. & DE S.W. (1990) Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J.Cell Sci.* **96 (Pt 3)**, 485-490.
- STOPPANI A.O. (1999) [The chemotherapy of Chagas disease]. *Medicina (B Aires)* **59 Suppl 2**, 147-165.
- TAFURI W.L. (1970) Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* **19**, 405-417.
- TALIAFERRO W.H. & PIZZI T. (1955) Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J.Infect.Dis.* **96**, 199-226.
- TANAKA K. (1998) Proteasomes: structure and biology. *J.Biochem.(Tokyo)* **123**, 195-204.
- TARLETON R.L. (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int.J.Parasitol.* **31**, 550-554.
- TARLETON R.L. (2003) Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol.* **19**, 447-451.
- TARLETON R.L., GRUSBY M.J., POSTAN M. & GLIMCHER L.H. (1996) *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int.Immunol.* **8**, 13-22.
- TARLETON R.L. & ZHANG L. (1999) Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol.Today* **15**, 94-99.
- TEIXEIRA S.M. (1998) Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **31**, 1503-1516.
- TEIXEIRA S.M. & DAROCHA W.D. (2003) Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet.Mol.Res.* **2**, 148-158.
- TIBAYRENC M. & AYALA F. J. (1988) Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, **42**, 277-292.
- TOLEDO M.J.O.; GASPERI M.V.; MARQUES DE ARAÚJO S. & LANA M. (1995) Berenice 62 and Berenice 78 strains of *Trypanosoma cruzi*: comparison of their susceptibility to benznidazole. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **90**, 201.

- TRISCHMANN T., TANOWITZ H., WITTNER M. & BLOOM B. (1978b) Trypanosoma cruzi: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp.Parasitol.* **45**, 160-168.
- TRISCHMANN T., TANOWITZ H., WITTNER M. & BLOOM B. (1978a) Trypanosoma cruzi: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp.Parasitol.* **45**, 160-168.
- UMEZAWA E.S., BASTOS S.F., COURA J.R., LEVIN M.J., GONZALEZ A., RANGEL-ALDAO R., ZINGALES B., LUQUETTI A.O. & DA SILVEIRA J.F. (2003) An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of Trypanosoma cruzi recombinant antigens. *Transfusion* **43**, 91-97.
- URBINA J.A. (2003) New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Expert Opin.Ther.Pat.* **13**, 661-669.
- USTRELL V., HOFFMAN L., PRATT G. & RECHSTEINER M. (2002) PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.* **21**, 3516-3525.
- USTRELL V., PRATT G., GORBEA C. & RECHSTEINER M. (2005) Purification and assay of proteasome activator PA200. *Methods Enzymol.* **398**, 321-329.
- VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; D' AVILA ReIS, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTE, S Jr.; MOREIRA, M.C.; FILHO, G.B.; PENA, S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverge organs. *Am J Pathol* 156: 1805-1809.
- VAUGHAN S., KOHL L., NGAI I., WHEELER R.J. & GULL K. (2007) A Repetitive Protein Essential for the Flagellum Attachment Zone Filament Structure and Function in Trypanosoma brucei. *Protist.*
- VELOSO V.M., CARNEIRO C.M., TOLEDO M.J., LANA M., CHIARI E., TAFURI W.L. & BAHIA M.T. (2001) Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from Trypanosoma cruzi parental strains. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **96**, 1005-1011.
- VELOSO V.M., ROMANHA A.J., LANA M., MURTA S.M., CARNEIRO C.M., ALVES C.F., BORGES E.C., TAFURI W.L., HADO-COELHO G.L., CHIARI E. & BAHIA M.T. (2005) Influence of the long-term Trypanosoma cruzi infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol.Res.* **96**, 382-389.
- VILLALTA F. & KIERSZENBAUM F. (1983) Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigote) forms of Trypanosoma cruzi by human neutrophils. *J.Immunol.* **131**, 1504-1510.
- VILLALTA F. & KIERSZENBAUM F. (1985) The effect of swainsonine on the association of Trypanosoma cruzi with host cells. *Mol.Biochem.Parasitol.* **16**, 1-10.

- VOOGD T.E., VANSTERKENBURG E.L., WILTING J. & JANSSEN L.H. (1993) Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol.Rev.* **45**, 177-203.
- WANG H.R., ZHANG Y., OZDAMAR B., OGUNJIMI A.A., ALEXANDROVA E., THOMSEN G.H. & WRANA J.L. (2003) Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**, 1775-1779.
- WILK S. & FIGUEIREDO-PEREIRA M.E. (1993) Synthetic inhibitors of the multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein* **47**, 306–313.
- WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Control of Chagas disease. WHO technical report series 905. 2000. Geneva, WHO. (GENERIC)
Ref Type: Report
- WU J. (2002) On the role of proteasomes in cell biology and proteasome inhibition as a novel frontier in the development of immunosuppressants. *Am J Transplant.* **2(10)**, 904-12.
- YAO Y., HUANG L., KRUTCHINSKY A., WONG M.L., STANDING K.G., BURLINGAME A.L. & WANG C.C. (1999) Structural and functional characterizations of the proteasome-activating protein PA26 from *Trypanosoma brucei*. *J.Biol.Chem.* **274**, 33921-33930.
- ZELEDON R. & RABINOVICH J.E. (1981) Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu.Rev.Entomol.* **26**, 101-133.
- ZHANG J.Y., LIU S.J., LI H.L. & WANG J.Z. (2005) Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system. *J.Neural Transm.* **112**, 547-555
- ZHANG L. & TARLETON R.L. (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J.Infect.Dis.* **180**, 480-486.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)