



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

**Identificação, classificação e anotação de enzimas
desubiquitinadoras e ubiquitina-símile em
*Trypanosoma cruzi***

AUTOR: ROENICK PROVETI OLMO

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

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, maio de 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

O512i Olmo, Roenick Proveti.

Identificação, classificação e anotação de enzimas desubiquitinadoras e ubiquitina-símile em *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] /
Roenick Proveti Olmo. - 2009.
xxiv, 121f.: il., color; graf.; tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Renata Guerra de Sá.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia molecular.

1. *Tripanossoma cruzi* - Teses. 2. Enzimas - Teses. 3. Ubiquitina - Teses.
I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular ICEB/NUPEB/UFOP, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico esta dissertação aos meus pais Edison e Edna, aos meus irmãos Patrick e Zarick, aos meus familiares, e aos meus amigos. Dedico também a todos do meu laboratório pelo apoio e carinho que tiveram comigo tanto nos momentos de alegria quanto nos momentos difíceis. Tenho a certeza que não só tive uma boa formação, como também conquistei uma nova família.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas sim na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Pessoa

Agradecimentos

A Deus;

Aos meus queridos pais pelo amor, carinho, compreensão, e por sempre acreditarem na realização desse trabalho;

Aos meus irmãos Patrick e Zarick, por sempre estarem presentes das formas mais inusitadas possíveis;

À Prof.^a Dr.^a Renata Guerra de Sá, pela confiança que depositou em mim, mais do que eu mesmo, pelos incentivos, por seu otimismo e pelos ensinamentos valiosos tanto na parte profissional quanto pessoal que adquiri em seu convívio; Seu exemplo de profissionalismo e persistência sempre será lembrado;

Ao Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista, pela convivência tão agradável e por todos os ensinamentos que sempre me foram passados com tanta dedicação;

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

À Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Pedrosa, sempre carismática e alegre;

Ao Prof. Dr. William de Castro Borges pelo auxílio na padronização do fracionamento subcelular de proteínas;

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

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Martins Carneiro pelo auxílio na utilização do microscópio de fluorescência, e pelas ótimas sugestões;

Ao Prof. Alexandre Barbosa Reis, sempre prestativo e sempre incentivando;

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

Ao meu amigo Dr. Paulo Marques da Mata Guedes pelos ensinamentos e muitas risadas;

Ao Prof. Vanderlei Rodrigues, por gentilmente ter cedido seu laboratório na FMRP-USP para parte da padronização do RT-qPCR;

À Camila, Enyara, Luciana, Silvia, Cláudia, Lizandra, Erika, Elenice e Mara por terem me recebido tão atenciosamente na FMRP-USP;

À Helen, Cristiane e Larissa pela amizade feita durante o curso;

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

À Nilza Satie Hangai, uma verdadeira mãe;

A equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFOP, Cláudia, Daniel, Eneida, Ezequiel, Fabiana, Gustavo, Helaine, Letícia, Leonardo, Leandro “Nerso”, Leandro “Bartira”, Naiara, Natália, Nayara, Robs, Roberta, Robertinha, e Thiago, pelo companheirismo, carinho e várias risadas;

Aos moradores e ex-alunos da República Katapulta, pela amizade, companheirismo e boas risadas ao longo desses 5 anos;

Aos colegas do mestrado;

A todos os amigos dos laboratórios do NUPEB;

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

E por todos aqueles que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Resumo	X
Abstract	XI
Lista de abreviaturas	XII
Lista de figuras e tabelas.....	XIII
1. Introdução	25
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	26
1.2. O genoma do <i>T. cruzi</i>	28
1.3 Transcrição e controle da expressão gênica em tripanossomatídeos	30
1.4. Modificação pós-traducional dependente de proteínas	32
1.5 A ubiquitinação é um processo reversível	35
2. Objetivos	40
3. Material e métodos	42
3.1. Análises utilizando ferramentas de bioinformática.....	41
3.1.1. Obtenção das sequências	43
3.1.2. Análise das sequências	43
3.1.3. Caracterização das sequências.....	43
3.1.4. Análises filogenéticas.....	44
3.2. Validação experimental das análises <i>in silico</i>	45
3.2.1. Obtenção das formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>	45
3.2.2. Extração de DNA genômico.....	45
3.2.3. Extração do RNA total em formas epimastigotas de cepas do <i>T. cruzi</i>	46
3.2.4. Obtenção da primeira fita	48
3.2.5. Idealização dos <i>primers</i>	48
3.2.6. Amplificação utilizando PCR convencional	49
3.2.7. Purificação do produto de PCR.....	50
3.2.8. Preparo de células competentes.....	50
3.2.9. Clonagem e obtenção do DNA plasmidial	51
3.2.10. Sequenciamento e análise das sequências	52
3.2.11. Padronização da técnica de RT-qPCR.....	52
3.2.12. Obtenção do extrato protéico bruto e fração nuclear de formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	54
3.2.13. Gel SDS-PAGE e <i>western blot</i>	55
3.2.14. Atividade desubiquitinadora total	56
4. Resultados	57

4.1. Parte I - Análises <i>in silico</i>	59
4.1.1. Repertório das enzimas desubiquitinadoras e desubiquitinadoras-símile em <i>T. cruzi</i>	60
4.1.2. Subfamília USP em <i>T. cruzi</i>	64
4.1.3. Subfamília UCH em <i>T. cruzi</i>	70
4.1.4. Subfamília JAMM em <i>T. cruzi</i>	71
4.1.5. Subfamília otubaína em <i>T. cruzi</i>	71
4.1.6. Subfamília sentrina em <i>T. cruzi</i>	73
4.1.7. Subfamília autofagina em <i>T. cruzi</i>	73
4.1.8. Subfamília PPPDE em <i>T. cruzi</i>	74
4.1.9. Subfamília WLM em <i>T. cruzi</i>	76
4.1.10. DUBs e DUBs-símile no TriTryp	77
4.1.11. Subfamília USP de proteínas no TriTryp	82
4.1.12. Membros das subfamílias UCH/JAMM/OTU no TriTryp	83
4.1.13. DUBs-símile específicas para NEDD8/Smt3 no TriTryp	85
4.1.14. DUBs-símile específicas para Atg8 e/ou Atg12 no TriTryp	85
4.1.15. Subfamília PPPDE no TriTryp	89
4.1.18. Proteases com domínio WLM no TriTryp	90
4.2. Parte II – Validação experimental	91
4.2.1. Determinação do perfil de expressão dos genes	92
4.2.2. Conjugados ubiquitinados e sumorilados	93
4.2.3. Determinação da atividade desubiquitinadora total	94
5. Discussão	95
6. Conclusões	105
7. Perspectivas futuras	107
8. Referências bibliográficas	109
9. Anexos	119

O sequenciamento do genoma de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* mostrou que cada genoma contém entre 8300-1200 genes que codificam proteínas, dos quais aproximadamente 6500 são comuns entre estas espécies. Neste estudo nós focamos a busca nos bancos de dados de tripanossomatídeos por proteínas envolvidas com o metabolismo de ubiquitina. Existem basicamente nove subfamílias distintas de enzimas envolvidas com esta via, denominadas DUBs: ubiquitina C-terminal hidrolases (UCHs), proteases específicas ao processamento de ubiquitina (USPs), proteases relacionadas à doença de Machado-Joseph (MJDs), proteases de tumor ovariano, também chamadas otubaínas (OTUs), proteases com motivo JAMM, sentrinas, autofaginas, peptidases semelhantes à papaína de vírus de RNA de fita dupla e eucariotas (PPPDEs), e metaloproteases Wss1p-símile (WLMs). Neste trabalho nós utilizamos ferramentas de bioinformática para identificar esse repertório de enzimas nos bancos de dados públicos de genomas das espécies *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Nossa pesquisa *in silico* obteve 163 possíveis entradas que codificam para DUBs nestas espécies quando comparadas por BLASTx à proteínas ortólogas conhecidas no GenBank. Destas, 84 pertenciam à subfamília USP, 10 à JAMM, 10 à UCH, 15 à OTU, 5 à sentrina, 24 à PPPDE, 10 à autofagina, 5 à WLM, e não foram encontradas sequências correspondentes à MJD. No genoma do *T. cruzi* foi também observado a presença de genes duplicados, onde 63 entradas puderam ser resumidas, com no mínimo 95% de similaridade, à 34 entradas. No entanto, em cada genoma de *Leishmania* estudado foram encontrados em média 32 entradas para DUBs, e sua maioria possuindo ortólogos no mesmo gênero. Análises comparativas dos genes responsáveis pela remoção de ubiquitina mostraram diferenças significativas nos tamanhos das suas sequências de nucleotídeos bem como em suas composições de aminoácidos, especialmente nas regiões não cobertas por domínios conservados, sugerindo que há manutenção da função, mas diferente especificidade aos substratos. Além disso, a expressão relativa dos genes *TcUSP7*, *-10*, *-14*, *-15* e *TcUCH-L3* determinadas por RT-qPCR mostraram perfis similares de expressão em formas epimastigotas das cepas Berenice-62, Berenice-78, Colombiana e Y do *T. cruzi*. No entanto, os níveis de *TcUSP15* foram menores quando comparados às outras cepas analisadas neste estudo, enquanto os níveis de *TcUCH-L3* foram os maiores. Finalmente, nós determinamos a atividade DUB utilizando o substrato CBZ-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina em extratos nucleares e citosólicos e a conjugação de proteínas com ubiquitina e SUMO nos mesmos extratos utilizando western blot e anticorpos específicos para ubiquitina e SUMO. Nossos resultados mostraram que a atividade é predominantemente citosólica. A técnica de western blotting mostrou que os conjugados ubiquitinados são preferencialmente encontrados no citoplasma e os sumorilados no núcleo. Esses resultados evidenciam a complexidade e diversidade das DUBs em tripanossomatídeos e abre a possibilidade de explorar a relevância das interações na regulação das vias mediadas por ubiquitina nesses parasitos.

The genome sequences of *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi* revealed that each genome contains 8300-12000 protein-coding genes, of which approximately 6500 are common to their genomes. In this study we focused the mining the trypanosomatid databases looking for proteins involved in ubiquitin metabolism. There are basically nine distinct subfamilies of enzymes involved in this pathway, denominated DUBs: ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs), ubiquitin-specific processing proteases (USPs), Machado-Joseph disease proteases (MJDs), ovarian tumour proteases (OTUs), JAMM motif proteases, sentrins, autophagins, Permuted Papain fold Peptidases of DsRNA viruses and Eukaryotes (PPPDEs), and Wss1p-like metalloproteases (WLMs). In this work we used bioinformatic approaches to identify these set of enzymes in *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*, *T. brucei* and *T. cruzi* public genome databases. Our *in silico* search retrieved 163 putative entries coding to DUBs in these species among databases when compared to known GenBank ortholog proteins through BLASTx. Of these, 84 belong to USP subfamily, 23 to JAMM, 10 to UCH, 15 to OTU, 5 to sentrin, 24 to PPPDE, 10 to autophagin, 5 to WLM, and where not found entries to MJD. In *T. cruzi* genome was also observed the presence of duplicated genes, where the 63 entries might be resumed, with at least 95% of similarity, in 34 sequences. However, in each *Leishmania* genome studied were found on average 32 entries for DUBs, and most of them have its orthologues into the same genus. Comparative analysis of genes responsible for ubiquitin removal showed significant difference in their respective nucleotide sequence lengths as well as amino acid composition, especially with regards to regions outer conserved domains, suggesting maintaining of function, but different substrate specificity. In addition, the relative gene expression of *TcUSP7*, *-10*, *-14*, *-15* and *TcUCH-L3* determined by RT-qPCR showed similar profile in epimastigotes forms between Berenice-62, Berenice-78, Colombian and Y strains of *T. cruzi*. However, the levels of *TcUSP15* were lowest when compared to strains analyzed in this study, while the levels of *TcUCH-L3* where highest. Finally, we determinate the DUB activity using the substrate CBZ-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-methylcoumarin in nuclear and cytosolic extracts and the ubiquitin and SUMO protein conjugation in the same extracts using western blot and specific antibody to ubiquitin and SUMO. Our results showed that the activity were predominantly cytosolic. The western blotting showed that preferentially conjugate ubiquitin was found in the cytoplasm and sumoylation in the nucleus. These results evidence the complexity and diversity of DUBs in tripanosomatids and open the possibility to explore the relevance of their interactions in regulation of ubiquitin-mediated pathways in these parasites.

AMC	Amido-metil-cumarina
Bis-Acrilamida	N, N' Metileno-Bis-Acrilamida
BCA	Ácido bicinchoninico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3 indolil-fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Bz	Benzonidazol
CDK	Ciclin-dependent-kinase (Quinase dependente de ciclinas)
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato (N= A, C, G ou T)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidade Óptica
DTT	Dithithreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico)
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanosulfônico
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LIT	Liver infusion tryptose
MOPS	[Ácido 3-(N-Mofolino)Propanosulfônico]
mRNA	RNA mensageiro
NBT	Nitrobluetetrazolium
NEM	N-etil maleimida
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NP-40	Nonidet P-40 (octyl phenoxy polyethoxy ethanol)
PBS	Phosphate buffered saline
PMSF	phenylmethanesulphonyl fluoride
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N',-Tetrametil Etilenodiamina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
TLCK	N- α -Tosyl-L-Lysinyl-Chloromethylketone
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalaninyl-Chloromethylketone
TriTryp	<i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania major</i>
WHO	World Health Organization
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside

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: Alinhamento das seqüências primárias codificadoras para a molécula de ubiquitina em diversos eucariotos. O alinhamento ressalta a grande identidade entre as seqüências obtidas nos bancos (70 resíduos idênticos e 6 similares). São indicados pelas setas os resíduos de lisina (K) responsáveis pela ligação entre moléculas de ubiquitina que formam diversos tipos de cadeias de poliubiquitina em suas respectivas posições nas seqüências primárias. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam posições em que todas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 3: Representação esquemática da via de ubiquitinação envolvendo as enzimas E1-ativadora, E2-conjugadora e E3-ligase de ubiquitina. A ubiquitina é ativada pela E1 (1), por uma ligação ATP dependente, sendo em seguida transferida ao grupo tio-éster de uma E2 conjugadora (2). Essas E2 transferem a ubiquitina a uma enzima ligase (E3) que se liga a E2 e ao substrato (3). Este processo é repetido diversas vezes (4) para formar a cadeia de poliubiquitina (5). Um processo bem conhecido é a degradação de proteínas pelo proteassoma 28S (6). Adaptado de <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2004/public.html> (acessado em 01/03/2009).

Tabela 1: Moléculas de ubiquitina-símile e sua ocorrência. Adaptado de Ponder e Bogyo, 2007.

Figura 4: Maturação, conjugação e desconjugação de ubiquitina (Ub) e ubiquitinas-símile (Ubls). Antes da conjugação da Ub e Ubls, as mesmas são processadas de um precursor para exposição de sua porção C-terminal. Substratos modificados são então sujeitos ou estimulam uma variedade de processos biológicos, dependendo do tipo de modificação. Eventualmente o modificador é

removido e reciclado por proteases específicas que clivam as ligações isopeptídicas geradas durante o processo de conjugação. Revisado por Ponder e Bogyo, 2007.

Figura 5: Gel de agarose (0,6%) em TBE, corado com brometo de etídeo, mostrando extrações de DNA genômico de formas epimastigota de *T. cruzi*.

Cerca de 5µg de DNAg de cada cepa foram utilizados na corrida eletroforética, e para visualização o gel foi corado com brometo de etídeo. A extração do DNAg e a montagem do gel foram realizadas segundo o método descrito anteriormente. – cepa Be-62; – cepa Be-78; Col – cepa Colombiana; Y – cepa Y; CN – controle negativo.

Figura 6: Análise da integridade do RNA total obtido a partir de formas epimastigotas de cepas do *T. cruzi*.

Aproximadamente 10µg de RNA total, obtidos como descrito acima, foram analisados em gel de agarose/formaldeído e corados com brometo de etídeo. Em 1 – cepa Be-62; 2 – cepa Be-78; 3 – cepa Colombiana e 4 – cepa Y. Os RNAs ribossomais estão indicados por setas e apresentam seus respectivos pesos moleculares.

Tabela 2: Entradas correspondentes aos *primers* utilizados na reação de RT-qPCR em cepas de *T. cruzi*.

São apresentadas as respectivas entradas do banco de dados GeneDB, os oligonucleotídeos e o respectivo tamanho do produto gênico esperado. bp – pares de base; F – fita direta; R – fita reversa.

Tabela 3: Eficiência dos *primers* utilizados na técnica de RT-qPCR.

Tabela 4: Entradas de prováveis enzimas desubiquitinadoras em *T. cruzi*.

As sequências foram recuperadas do banco de dados geneDB (<http://www.genedb.org>). Os e-Values foram obtidos através da ferramenta BLASTp sob o modelo HMM no banco de dados PFAM v23.0.

Figura 7: Representação esquemática dos domínios conservados em ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras de *T. cruzi*.

As sequências foram recuperadas do banco de dados GeneDB. As linhas horizontais representam a estrutura primária da ORF predita. Domínios conservados das subfamílias UCH (PF00443), zf-UBP (PF02148), Peptidase_C12 (PF01088), Mov34 (PF01398),

OTU (PF02338), Peptidase_C48 (PF02902), DUF862 (PF05903), Peptidase_C54 (PF03416) e WLM (PF08325).

Figura 8: Árvore filogenética consenso baseada nas seqüências de aminoácidos que contém o domínio UCH (PF00443). A construção da árvore e a análise do “bootstrap” foram realizadas nos programas ClustalX 2.0 e MEGA 4.1 respectivamente. Para árvore consenso e confiabilidade dos ramos formados foi utilizado o teste de filogenia *bootstrap*, utilizando 2000 réplicas para cada seqüência, como descrito em material e métodos. A barra representa o número de aminoácidos que foram substituídos de uma seqüência para outra. Os códigos de acesso referentes às sequencias foram obtidos no banco de dados GeneDB.

Figura 9: Alinhamento da região compreendendo os resíduos catalíticos de domínios UCH (PF00443) em ORFs preditas de *T. cruzi*. O alinhamento mostra a região dos resíduos catalíticos cisteína/histidina/histidina (C/H/H – realçados com um quadrado) característicos desse domínio. Os pontilhados localizados na porção N e C-terminal representam a porção extra-domínio da proteína. Os pontilhados dentro da seqüência divergem em tamanho de acordo com a entrada, sendo o menor correspondente à seqüência Tc00.1047053507053.100 (~280 aa) e o maior à Tc00.1047053509073.30 (~600 aa) – dados não mostrados. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB e os domínios conservados foram localizados utilizando a ferramenta BLASTp sob o modelo HMM do banco PFAM v23.0. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam posições em que todas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 10: Alinhamento das ORFs preditas de USP7-símile em eucariotos. A caixa azul mostra a região compreendida pelo domínio UCH (PF00443). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053510761.70; Tb - *T. brucei*, Tb09.211.4910; Li - *L. infantum*,

LinJ35_V3.1730; Lm - *L. major*, LmjF35.1740; Lb - *L. braziliensis*, LbrM34_V2.1640) e NCBI (At - *Arabidopsis thaliana*, AAG42754.1; Hs - *Homo sapiens*, N Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.P_003461.2).

Figura 11: Alinhamento das ORFs preditas de USP10-símile em eucariotos. A caixa azul mostra a região compreendida pelo domínio UCH (PF00443). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053507507.40; Tb - *T. brucei*, Tb11.01.6080; Li - *L. infantum*, LinJ32_V3.1310; Lm - *L. major*, LmjF32.1250; Lb - *L. braziliensis*, LbrM32_V2.1400) e NCBI (Dr - *Danio rerio*, XP_685621.3; Hs - *Homo sapiens*, NP_005144.2). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 12: Alinhamento das ORFs preditas de USP14-símile em eucariotos. A caixa azul mostra a região compreendida pelo domínio UCH (PF00443). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053506569.10; Tb - *T. brucei*, Tb927.4.3790; Li - *L. infantum*, LinJ31_V3.0150; Lm - *L. major*, LmjF31.0140; Lb - *L. braziliensis*, LbrM31_V2.0140) e NCBI (Dm - *Drosophila melanogaster*, NP_609377.1; Hs - *Homo sapiens*, NP_001032411.1). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas

sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 13: Alinhamento das ORFs preditas de USP15-símile em eucariotos. A caixa azul mostra a região compreendida pelo domínio UCH (PF00443). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053508707.180; Tb - *T. brucei*, Tb11.01.7760; Li - *L. infantum*, LinJ32_V3.3060; Lm - *L. major*, LmjF32.2910; Lb - *L. braziliensis*, LbrM32_V2.3160) e NCBI (Dr - *Danio rerio*, XP_686236.3; Hs - *Homo sapiens*, NP_004642.2). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 14: Alinhamento ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio Peptidase_C12 (PF01088) de *T. cruzi*. O alinhamento ressalta a grande similaridade entre as sequências. Estão marcados com um quadrado os resíduos catalíticos cisteína, histidina e ácido aspártico (C/H/D), característicos deste domínio. Observa-se que a entrada Tc00.1047053510945.10 apresenta um braço em sua porção C-terminal com aproximadamente 80 resíduos de aminoácidos, a qual não apresenta cobertura com sua paróloga. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 15: Alinhamento das ORFs preditas de UCH-L3-símile em eucariotos. A caixa verde mostra a região compreendida pelo domínio Peptidase_C12 (PF01088). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos, indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de

dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053504109.90; Tb - *T. brucei*, Tb11.03.0890; Li - *L. infantum*, LinJ25_V3.0190; Lm - *L. major*, LmjF25.0190; Lb - *L. braziliensis*, LbrM25_V2.0190) e NCBI (Xl - *Xenopus laevis*, NP_001088200.1; Hs - *Homo sapiens*, NP_005993.1). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 16: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio Mov34 (PF01398) de *T. cruzi*. O alinhamento ressalta a baixa similaridade entre as sequências. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 17: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio OTU (PF02338) de *T. cruzi*. O alinhamento ressalta a baixa cobertura entre as sequências. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 18: Alinhamento da região do domínio Peptidase_C48 (PF02902) da entrada Tc00.1047053505193.40 de *T. cruzi* com seu correspondente HMM. Os domínios catalíticos estão realçados por quadrados nas posições H588/D605/C680 (considerando a posição na ORF completa). Os *matches* quando

+ representam a conservação da função do resíduo de aminoácido quando comparado a sequência (#SEQ) ao domínio conservado (#HMM) depositado no banco; quando há a repetição do aminoácido significa identidade entre os resíduos representados. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (#SEQ) e PFAM (#HMM), e o alinhamento foi obtido com o auxílio do software PFAM.

Figura 19: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio Peptidase_C54 (PF03416) de *T. cruzi*.

O alinhamento ressalta a alta similaridade entre as sequências obtidas no banco, bem como a presença de regiões onde não há cobertura entre as parálogas. Estão marcados com um quadrado os resíduos catalíticos cisteína e histidina (C/H), característicos deste domínio. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 20: Árvore filogenética consenso baseada nas sequências de aminoácidos que apresentam o domínio DUF862 (PF05903).

A construção da árvore e a análise do “bootstrap” foram realizadas nos programas ClustalX 2.0 e MEGA 4.1. Para árvore consenso e confiabilidade dos ramos formados foi utilizado o teste de filogenia bootstrap, utilizando 2000 réplicas para cada sequência. A barra representa o número de aminoácidos que foram substituídos de uma sequência para outra. Os códigos de acesso referentes às sequências foram obtidos no banco de dados GeneDB.

Figura 21: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio DUF862 (PF05903) de *T. cruzi*.

O alinhamento ressalta a diversidade entre as possíveis enzimas desubiquitinadoras-símiles sequências obtidas no banco GeneDB. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições

em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 22: Alinhamento da região dos domínios WLM (PF08325) da entrada Tc00.1047053507509.60 de *T. cruzi* com seu correspondente HMM. Os *matches* quando + representam a conservação da função do resíduo de aminoácido comparando a sequência (#SEQ) ao domínio conservado (#HMM) depositado no banco; a repetição do aminoácido significa identidade entre as posições. **A** – primeiro domínio, apresentado pela sequência, com 169 aminoácidos, iniciando na posição 12 e terminando na posição 180 em relação à ORF completa; **B** – segundo domínio, apresentado pela sequência possuindo 177 aa, com início na posição 272 e término na posição 448 em relação à ORF completa. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (#SEQ) e PFAM (#HMM), e o alinhamento foi obtido com o auxílio do software PFAM.

Tabela 5: Número de contigs que possivelmente codificam para enzimas desubiquitinadoras e desubiquitinadoras-símile em diversos tripanosomatídeos. As sequências foram recuperadas do banco de dados geneDB.

Tabela 6: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *L. braziliensis*.

Tabela 7: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *L. infantum*.

Tabela 8: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *L. major*.

Tabela 9: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *T. brucei*.

Figura 23: Dendograma dos membros da subfamília USP de proteínas em tripanossomatídeos. A construção foi realizada com o auxílio dos *softwares* ClustalX 2.0 e MEGA 4.1 respectivamente. Para isso, foram utilizados os domínios conservados UCH (PF00443) presentes nas ORFs preditas previamente identificadas, como descrito na seção material e métodos. Pode-se observar que a sequência Tc00.1047053507053.100 não apresenta ortólogo em *T. brucei*. Os códigos de acesso referentes às sequências foram obtidos no banco de dados GeneDB.

Figura 24: Percentual de identidade entre membros das subfamílias UCH, JAMM e OTU. A identidade foi determinada utilizando o *software* ClustalW, como descrito em material e métodos. Em A- membros da subfamília UCH que apresentam o domínio Peptidase_C12 (PF01088); B- membros da subfamília JAMM que apresentam o domínio Mov34 (PF01398); e C- membros da subfamília Otubaína que apresentam o domínio OTU (PF02338). Os números de entrada foram obtidos do banco de dados GeneDB.

Figura 25: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras da subfamília sentrina/Smt3. O alinhamento ressalta a alta cobertura em determinadas regiões das sequências obtidas nos bancos, bem como a presença de regiões onde quase não há cobertura entre as ortólogas. As entradas para as sequências de ULP1-símile são: *H. sapiens* - NP_001070671.1; *Canis familiaris* - XP_545077.2; *Mus musculus* - NP_001003971.1; *Rattus norvegicus* - NP_001099358.1; *Gallus gallus* - XP_001232523.1; *Xenopus laevis* - NP_001082507.1; *Caenorhabditis elegans* - NP_498095.3; *Trypanosoma cruzi* - Tc00.1047053505193.40; *Trypanosoma brucei* - Tb09.160.0970; *Leishmania braziliensis* - LbrM26_V2.1990; *Leishmania infantum* - LinJ26_V3.2070; *Leishmania major* - LmjF26.2070. As entradas para as sequências de ULP2-símile são: *Drosophila simulans* - XP_002077300.1; *Drosophila melanogaster* - NP_572827.1; *Aedes aegypti* - XP_001653149.1; *Danio rerio* - CAM56615.1; *Homo sapiens* - NP_055369.1; *Canis familiaris* - XP_534823.2; *Mus musculus* - NP_659100.1; *Rattus norvegicus* - XP_217046.4; *Bos taurus*- NP_001095358.1. Já as entradas para as sequências caracterizadas como SENP8-símile são: *Drosophila pseudoobscura* - XP_001360346.2; *Drosophila melanogaster* - NP_610763.1; *Aedes aegypti* - XP_001650938.1; *Apis mellifera* - XP_001122332.1; *Gallus gallus* - XP_413710.1; *Bos taurus* - XP_001250987.1; *Canis familiaris* - XP_544756.1; *Homo sapiens* - NP_660205.2; *Mus musculus* - NP_082114.1; *Rattus norvegicus* - NP_001012355.1.

Figura 26: Alinhamento das ORFs preditas de enzimas ULP-símile em eucariotos. O alinhamento ressalta a presença de regiões onde não há cobertura entre as ortólogas. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (*T. cruzi* -

Tc00.1047053505193.40; *T. brucei* - Tb09.160.0970; *L. infantum* - LinJ26_V3.2070; *L. major* - LmjF26.2070; *L. braziliensis* - LbrM26_V2.1990) e NCBI (*G. gallus* - XP_422676.2; *C. elegans* - NP_498095.3; *T. gondii* - EEB03638.1; *P. falciparum* - PFL1635w e *S. cerevisiae* - NP_015305.1). As cores indicam similaridade (cinza claro) e identidade (cinza escuro) entre os aminoácidos das seqüências analisadas. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 27: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras da subfamília autofagina. O alinhamento ressalta a alta cobertura em determinadas regiões das sequências obtidas nos bancos, bem como a presença de regiões onde quase não há cobertura entre as ortólogas. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (*T. cruzi* - Tc00.1047053507509.60; *T. brucei* - Tb11.01.6130; *L. infantum* - LinJ32_V3.1370; *L. major* - LmjF32.1310; *L. braziliensis* - LbrM32_V2.1470) e NCBI (*O. sativa* - NP_001057027.1; *S. cerevisiae* - YHR134W; *P. falciparum* - PF10_0092). As cores indicam similaridade (cinza claro) e identidade (cinza escuro) entre os aminoácidos das seqüências analisadas. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Figura 28: Árvore filogenética consenso baseada nas seqüências de aminoácidos que apresentam o domínio DUF862 (PF05903) em 5 diferentes tripanosomatídeos. A construção da árvore e a análise do “bootstrap” foram realizadas nos programas ClustalX 2.0 e MEGA 4.1. Para árvore consenso e confiabilidade dos ramos formados foi utilizado o teste de filogenia bootstrap,

utilizando 2000 réplicas para cada sequência. As sequências iniciadas pelas siglas Lbr, Lin, Lmj, Tc e Tb correspondem respectivamente às espécies *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei*. Os códigos de acesso referentes às sequências foram obtidos no banco de dados GeneDB.

Figura 29: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras da subfamília WLM. O alinhamento ressalta a alta cobertura em determinadas regiões das sequências obtidas nos bancos, bem como a presença de regiões onde quase não há cobertura entre as ortólogas. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (*T. cruzi* - Tc00.1047053507509.60; *T. brucei* - Tb11.01.6130; *L. infantum* - LinJ32_V3.1370; *L. major* - LmjF32.1310; *L. braziliensis* - LbrM32_V2.1470) e NCBI (*O. sativa* - NP_001057027.1; *S. cerevisiae* - YHR134W; *P. falciparum* - PF10_0092). As cores indicam similaridade (cinza claro) e identidade (cinza escuro) entre os aminoácidos das sequências analisadas.

Figura 30: Níveis de expressão relativo de genes em formas epimastigotas de cepas do *T. cruzi*. São avaliadas as expressões relativas dos genes *TcUSP7*, *TcUSP10*, *TcUSP14*, *TcUSP15* e *TcUCH-L3*. Para o cálculo dos níveis relativos de expressão foi utilizado o método do $2^{-\Delta Ct}$, tendo como normalizador o gene HGPRT. Be-62 – Cepa Berenice-62; Be-78 – Cepa Berenice-78; Col – Cepa Colombiana; Y – Cepa Y.

Figura 31: Detecção de conjugados protéicos modificados com ubiquitina e SUMO. Em A, as bandas protéicas (30 μ g de proteínas) após eletroforese em gel de acrilamida a 10% foram coradas com azul de Coomassie. Em B e C, as bandas protéicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a seguir incubadas com anticorpos anti-ubiquitina humana e anti-SUMO1 de cabra, respectivamente, e posteriormente revelados como descrito em material e métodos. PM- padrão de peso molecular.

Figura 32: Atividade desubiquitinadora em frações citosólicas e nucleares em formas epimastigota de cepas do *T. cruzi*. 20 μ g do extrato bruto obtido como descrito em material e métodos foram utilizados em cada experimento. Como

substrato foi utilizado o peptídeo (Cbz- Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina). Estes valores são resultados de no mínimo três experimentos independentes para cada situação apresentada.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

O *T. cruzi* foi descoberto em 1907 por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, em triatomíneos alojados nas paredes de casas de pau a pique, em Lassance (Minas Gerais, Brasil). Carlos Chagas verificou a patogenicidade deste novo parasito em animais de laboratório e sua presença em animais domésticos. Carlos Chagas em abril de 1909 descobriu o parasito no sangue de um ser humano, durante a fase aguda da doença, em uma menina de 3 anos chamada Berenice, cujo nome batizou a primeira cepa do parasito.

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, tem ampla distribuição nas Américas do Sul e Central, estando concentrada principalmente no hemisfério sul. É considerada endêmica em 21 países, com 16 a 18 milhões de pessoas infectadas por esta doença e 100 milhões sob risco de infecção, sendo que, das pessoas portadoras, 50.000 morrem a cada ano (WHO, 2006).

No homem, além do contágio através de excretas dos triatomíneos infectados, a transmissão do parasito pode ocorrer através de transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos, transmissão congênita (Brener e Gazzinelli, 1997) e, mais raramente por alimentos contaminados com tripomastigotas do *T. cruzi* e acidentes de laboratório (Lambrecht, 1965; Prata, 2001).

O *T. cruzi*, agente etiológico da doença chagas, é um protozoário flagelado digenético, pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastidae. Os membros dessa ordem se caracterizam pela presença de uma organela denominada cinetoplasto, que contém a mitocôndria do parasito.

O *T. cruzi* apresenta um ciclo biológico que tem, basicamente, três formas diferentes, definidas com base na forma geral da célula e na posição do núcleo com relação ao cinetoplasto. O ciclo no hospedeiro invertebrado inicia-se quando este ingere tripomastigotas sanguíneos durante seu repasto sanguíneo. No tubo digestivo do inseto vetor, estas formas 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 (González-Perdomo, 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, sendo apenas as formas tripomastigotas capazes de escapar dos mecanismos de destruição dos fagócitos e da lise mediada pelo complemento (Andrews, 1990)

Posteriormente a penetração nas células, as formas tripomastigotas diferenciam-se em formas amastigotas no citoplasma destas células. Após a multiplicação, as amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas que posteriormente são liberados por ruptura celular e alcançam os sistemas circulatórios, podendo infectar qualquer célula nucleada ou reiniciar o ciclo de infecção, ao serem ingeridas por um novo inseto vetor.

Diversos grupos independentes demonstraram 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 (Lima e cols, 1999; Macedo e Pena, 1998).

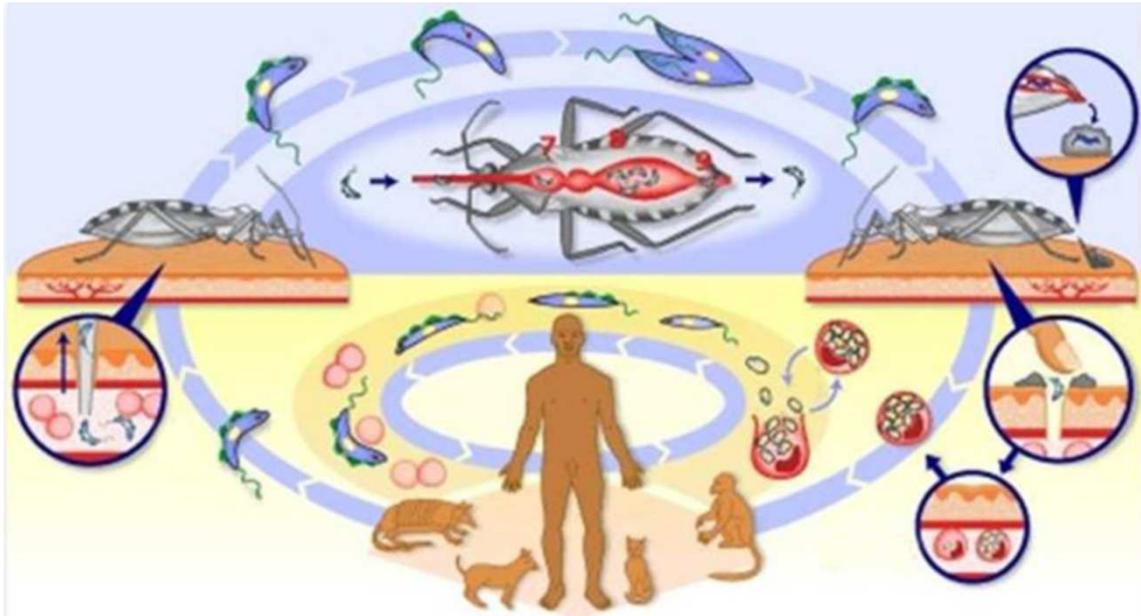


Figura 1: Ciclo de vida do *T. cruzi*. As diferentes formas do *T. cruzi* ao longo de seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Figura adaptada de TDR/Wellcome Trust, 2004.

1.2. O genoma do *T. cruzi*

A organização dos genes em tripanossomas e outros parasitos da ordem Kinetoplastidae lembram o operon das bactérias, (Vanhamme e Pays, 1995; Teixeira, 1998; Clayton, 2002). Os genes que codificam proteínas são destituídos de *introns* estando geralmente reunidos em agrupamentos densos em *tandem* e suas sequências são separadas por regiões intergênicas. Muitos genes estão presentes em duas ou mais cópias no genoma, que podem ser encontradas dispersas ou agrupadas. Como exemplos, temos os genes que codificam proteínas de choque térmico, histonas, cisteína-proteínases, ubiquitina, tubulinas, calmodulinas, amastinas, proteínas P β ribossomais, proteínas ligantes de cálcio, antígenos de superfície, entre outros. Igualmente organizados estão os genes para moléculas de RNA ribossomal e do mini-exon (Hernandez, 1990; Sogin, 1986). A existência de genes multicópias nesses microrganismos poderia ser explicada como um mecanismo para evitar a perda de genes essenciais durante os vários ciclos celulares, permitindo assim a perpetuação da espécie. Outra hipótese estaria relacionada à manutenção dos níveis de produtos específicos na

célula, como acontece com genes que codificam proteínas estruturais abundantes, por exemplo, histonas e tubulinas (Swindle e Tait, 1996).

Genes de cópia única ocorrem em frequência relativamente pequena nos tripanossomatídeos, tais como os que codificam para DNA topoisomerase II (Fragoso e Goldenberg, 1992), TcPGP2 (Dallagiovanna, 2001) e fosfatidil-inositol-fosfolipase C (Nozaki, 1995).

O genoma do *T. cruzi* está situado em dois compartimentos bem definidos: núcleo e mitocôndria. Nos tripanossomatídeos em geral, a mitocôndria apresenta características peculiares. Alberga uma complexa rede de moléculas circulares de DNA, localizada em uma região especializada, denominada cinetoplasto. Cada rede contém minicírculos de cerca de 1.4Kb e maxicírculos de cerca de 30Kb (Shapiro e Englund, 1995; Morris, 2001).

Os maxicírculos assemelham-se em função ao DNA mitocondrial encontrado em outros organismos, ou seja, codificam para RNA ribossomal e um pequeno número de proteínas que estão envolvidas principalmente no metabolismo energético da mitocôndria (revisito por Shapiro e Englund, 1995).

Alguns RNAs transcritos pelos genes contidos nos maxicírculos sofrem uma modificação pós-transcricional que é denominada edição do RNA. Este processo consiste na inserção e retirada de resíduos de uridina para a formação de uma fase aberta de leitura funcional. A especificidade do processo de edição é controlada por pequenas sequências de RNA (RNAs guias) transcritas a partir dos minicírculos (Moffet, 1997; Sloof e Benne, 1997).

O genoma nuclear do *T. cruzi* consiste, em média, de 43 a 50Mb de DNA distribuídos entre 30 a 40 bandas cromossômicas que apresentam tamanhos de 0,45 a 4,0Mb (Johnston, 1999), detectado através de técnicas de eletroforese de campo pulsado (Schwartz e Cantor, 1984; Carle, 1986). O polimorfismo cromossômico detectado entre as diferentes cepas pode ser o responsável pelas variações do conteúdo de DNA (Engman, 1987).

Foi observada variação entre os cromossomos homólogos (Henriksson, 1995) e a diferença de intensidade da fluorescência emitida pelas bandas cromossômicas após coloração com brometo de etídio sugere co-migração de dois ou mais cromossomos (Cano, 1995). Apesar da plasticidade do genoma entre 8 cepas do *T. cruzi*, nenhuma

modificação foi observada durante a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (Aymerich e Goldeneberg, 1989).

O sequenciamento do genoma do *T. cruzi* mostrou que a cepa CL Brener apresenta um genoma diplóide com 22.570 proteínas preditas. Dos genes que codificam essas proteínas 12.570 representam pares de alelos. Seu genoma ($60\text{-}200 \times 10^6 \text{pb}$) possui um tamanho relativamente maior que o tamanho dos genomas de outros parasitos, como, por exemplo, *Leishmania* sp ($\sim 33 \times 10^6 \text{pb}$) e *Trypanosoma brucei* ($26 \times 10^6 \text{pb}$), porém a complexidade do genoma do *T. cruzi* é significativamente inferior à do genoma humano, cujo tamanho é da ordem de $3000 \times 10^6 \text{pb}$ (El-Sayed e cols, 2005). Mais de 50% do genoma consiste de sequências repetitivas tais como retrotransposons e genes para grandes famílias de moléculas de superfície, como: trans-sialidases, mucinas, gp63s e uma grande família (contendo pelo menos 1300 cópias) de genes de mucinas-associadas a proteínas de superfícies. (El-Sayed e cols, 2005).

1.3 Transcrição e controle da expressão gênica em tripanossomatídeos

Devido à organização em *tandem* dos genes do *T. cruzi*, os transcritos são normalmente formados por longas unidades policistrônicas. Esta organização particular explica porque apenas poucos promotores têm sido encontrados. Genes originados da mesma unidade transcricional podem mostrar grandes diferenças no padrão de expressão. Isso leva à conclusão que, em tripanossomatídeos, grande parte do controle da expressão gênica ocorre após a transcrição (Clayton, 2002).

As unidades de RNA policistrônicas são processadas através de reações de trans-splicing e poliadenilação para dar origem aos RNAs mensageiros maduros monocistrônicos. O trans-splicing é uma reação de processamento de RNA na qual sequências de duas moléculas separadas são associadas para formar um mRNA maduro. Nos tripanossomatídeos, uma sequência, spliced-leader (SL) ou mini-exon, presente na extremidade 5' de um pequeno RNA não poliadenilado (SL-RNA), é adicionada ao transcrito primário em um sítio de clivagem caracterizado pelo dinucleotídeo AG e um resíduo de adenosina (Davis, 1996).

As reações de trans-splicing e poliadenilação ocorrem através de clivagens dentro das regiões intergênicas. Até o momento não há evidências para uma sequência

sinal consenso conhecida para a poliadenilação (Vanhamme e Pays, 1995) e a reação parece ocorrer em uma região a montante situada a uma distância conservada do sítio de corte e adição do mini-exon (Lebowitz, 1993; Schurch, 1994). As regiões intergênicas apresentam motivos ricos em pirimidinas que são cruciais para o processamento correto do mRNA (Huang e Vander Ploeg, 1991; Vassella, 1994; Nozaki e Cross, 1995).

As três polimerases clássicas de eucariotos já foram identificadas em tripanossomatídeos (revisto por Vanhamme e Pays, 1995; Lee e Van der Ploeg, 1997). Em eucariotos geralmente os genes que codificam proteínas possuem sua transcrição dirigida por promotores que são reconhecidos por RNA polimerase do tipo II, que são sensíveis à droga α -amanitina.

Em eucariotos superiores, a regulação da expressão gênica, na maioria das vezes, é atribuída ao controle do início da transcrição pela RNA polimerase II. Em tripanossomatídeos nenhum promotor característico para essa enzima foi observado, com exceção para os genes do mini-exon onde algumas evidências sugerem que a transcrição dos genes de *Leishmania* sp. que codificam a sequência líder é mediada por RNA pol II, enquanto outros snRNA são transcritos por RNA polimerase III (Saito, 1994; Gilinger e Bellofatto, 2001; Matkin, 2001).

Promotores para polimerase I foram identificados em *T. brucei* em genes que codificam glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) nas formas sanguíneas e procíclicas (Clayton, 1990; Rudenko, 1990; Zomerdijk, 1990; Pays, 1990).

Em tripanossomatídeos, de modo geral, a polimerase I transcreve os genes ribossomais e a polimerase III, moléculas de RNA nucleolar e de transferência. A polimerase II transcreve os genes do mini-exon. Muitas evidências mostram que os principais mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorrem após o início da transcrição (Gillinger e Bellofatto, 2001).

Estudos relacionados com a estabilidade de certos mRNAs propõem possíveis mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Esta estabilidade diferencial, de acordo com a forma evolutiva do parasito pode estar em parte associada à presença de sequências reguladoras nas regiões não traduzidas. Estudos em *T. cruzi* demonstraram que a meia-vida do mRNA do gene amastina é sete vezes maior em amastigotas do que em epimatigotas (Teixeira, 1998). Este efeito é provavelmente

mediado por fatores que se ligam na região 3' UTR e estabilizam o RNA em amastigotas (Coughlin, 2000).

Também foi demonstrado que, em *T. cruzi*, moléculas de RNA mensageiro, podem ser mantidas estáveis e não associadas aos polissomas, no citoplasma. (Goldenberg, 1985). Existem evidências que o controle da mobilização polissomal é um importante mecanismo na regulação pós-transcricional. (Ávila, 2001; Dallagiovanna, 2001; Fragoso, 2003). Este mecanismo provavelmente está também associado a sequências nas UTRs o que leva à tradução diferencial dos RNAs. Em *L. major* o gene da amastina tem a expressão regulada por um elemento em sua 3' UTR que modula a associação do transcrito deste gene para polissomos aumentando sua tradução (Boucher, 2002). Outras evidências sobre um possível controle traducional também foram demonstradas em tripanossomatídeos. Em algumas proteínas expressas por *T. cruzi*, tais como a cruzipaina (Tomás e Kelly, 1996), e topoisomerase II (Fragoso, 1998), foram observadas que, apesar de níveis similares de mRNA estarem presentes em todas as formas evolutivas do parasito, os níveis de proteínas eram maiores nas formas epimastigotas em relação às outras formas.

1.4. Modificação pós-traducional dependente de proteínas

Muitos processos biológicos são controlados pelas modificações pós-traducionais dependentes de proteínas. Até o momento, o sistema melhor entendido é o dependente de ubiquitina. Este sistema está envolvido na regulação de vários processos celulares, dentre eles: proteólise intracelular, controle do ciclo celular, desenvolvimento embrionário, resposta a estresse, reparo do DNA, resposta imune, transdução de sinal, biogênese de organelas, regulação transcricional, endocitose e endereçamento de proteínas (Quesada, 2004).

A ubiquitina é uma proteína de 76 resíduos de aminoácidos, presente no citosol, núcleo e em diversos compartimentos da célula, sendo bastante conservada entre os organismos eucariotos (Schwartz, 2003), como demonstrado na figura 2.

O processo de ubiquitinação de proteínas é catalizado por três enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e enzima ligase (E3), como ilustrado pela figura 3. A ubiquitina é ativada pela E1, por uma ligação ATP

dependente, formando um intermediário tio-éster, sendo em seguida transferida ao grupo tio-éster de uma E2 conjugadora. Essas E2 transferem a ubiquitina a uma enzima ligase (E3) que se liga a E2 e ao substrato (Pickart, 2001).

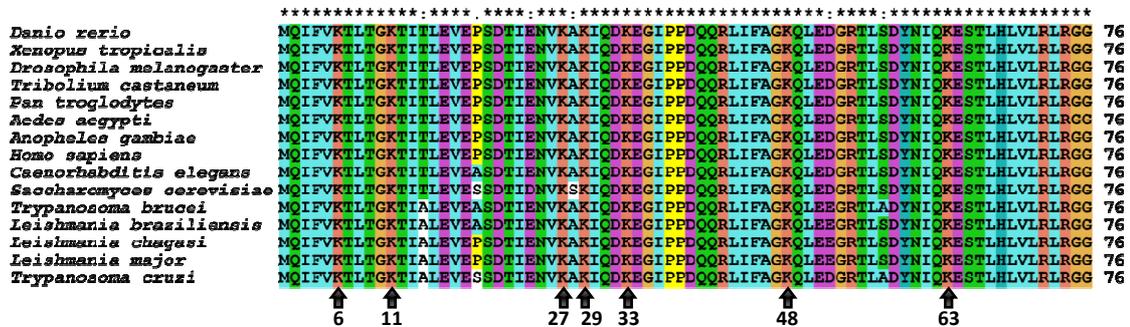


Figura 2: Alinhamento das seqüências primárias codificadoras para a molécula de ubiquitina em diversos eucariotos. O alinhamento ressalta a grande identidade entre as seqüências obtidas nos bancos (70 resíduos idênticos e 6 similares). São indicados pelas setas os resíduos de lisina (K) responsáveis pela ligação entre moléculas de ubiquitina que formam diversos tipos de cadeias de poliubiquitina em suas respectivas posições nas seqüências primárias. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam posições em que todas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

Um substrato alvo pode ser modificado pela adição de uma, duas ou mais ubiquitinas. Substratos com quatro ou mais moléculas de ubiquitina ligados no resíduo de lisina 29 ou lisina 48 são direcionados para a proteólise dependente do proteassoma 26S – figura 3. A mono e poliubiquitinação no resíduo de lisina 63 está envolvida no processo de degradação lisossomal, endocitose, reparo de DNA, ativação de quinases e herança mitocondrial (Kim, 2003).

A ubiquitina é conjugada covalentemente a proteína alvo através de uma ligação isopeptídica entre o resíduo de glicina (Gly 76) da ubiquitina, localizado na região C-terminal e o resíduo de lisina (Lys) do grupo amino da proteína a ser ubiquitinada (Kim, 2003). Os sinais para a ubiquitinação nas proteínas alvo podem ser geneticamente programados, regra do N-terminal, onde as proteínas têm seqüências de aminoácidos na região N-terminal necessárias para direcionar a sua ubiquitinação. Uma outra forma de sinalização ocorre por meio da fosforilação regulando a ubiquitinação das proteínas alvo (Wilkinson, 2000).

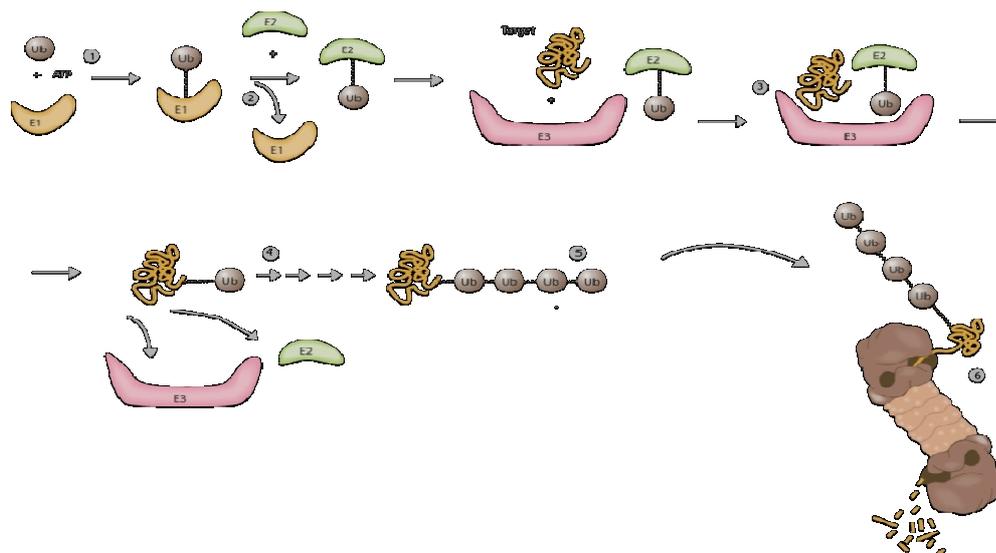


Figura 3: Representação esquemática da via de ubiquitinação envolvendo as enzimas E1-ativadora, E2-conjugadora e E3-ligase de ubiquitina. A ubiquitina é ativada pela E1 (1), por uma ligação ATP dependente, sendo em seguida transferida ao grupo tio-éster de uma E2 conjugadora (2). Essas E2 transferem a ubiquitina a uma enzima ligase (E3) que se liga a E2 e ao substrato (3). Este processo é repetido diversas vezes (4) para formar a cadeia de poliubiquitina (5). Um processo bem conhecido é a degradação de proteínas pelo proteossoma 28S (6). Adaptado de <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2004/public.html> (acessado em 01/03/2009).

Além da ubiquitina, até o momento são conhecidos 8 proteínas similares à ubiquitina (Ub-símile), conforme descrito pela tabela 1. Estas proteínas utilizam uma maquinaria similar à já descrita para conjugação, dependendo também de enzimas E1, E2 e E3-símiles (Ponder e Bogyo, 2007).

Tabela 1: Moléculas de ubiquitina-símile e sua ocorrência. Adaptado de Ponder e Bogyo, 2007.

Ubiquitina-símile	Função conhecida	Homólogos preditos	Ubiquitina-símile caracterizada
<i>Ubiquitina</i>	Degradação de proteína, internalização, regulação de histonas	<i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Entamoeba</i> , <i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidium</i> e <i>Theileria</i> spp.	<i>Plasmodium</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Entamoeba</i> e <i>Giardia</i> spp.
<i>NEDD8</i>	Conjugação de ubiquitina	<i>Plasmodium</i> spp.	Nenhum
<i>ISG15</i>	Resposta a interferon	Nenhum	Nenhum
<i>SUMO</i>	Regulação transcricional, localização protéica	<i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Entamoeba</i> , <i>Cryptosporidium</i> e <i>Theileria</i> spp.	Nenhum
<i>FAT10</i>	Degradação ub-indepedente	Nenhum	Nenhum
<i>Hub1</i>	Pré-mRNA <i>splicing</i>	<i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Entamoeba</i> , <i>Cryptosporidium</i> e <i>Theileria</i> spp.	Nenhum
<i>Urm1</i>	Resposta à inanição	<i>Plasmodium</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Entamoeba</i> , <i>Cryptosporidium</i> e <i>Theileria</i> spp.	Nenhum
<i>Atg8</i>	Autofagia	<i>Plasmodium</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma</i> e <i>Theileria</i> spp.	<i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i> spp.
<i>Atg12</i>	Autofagia	Nenhum	Nenhum

1.5 A ubiquitinação é um processo reversível

A modificação de proteínas dependente de ubiquitina e ubiquitinas-símile é um processo reversível, sendo as enzimas desubiquitinadoras responsáveis pela remoção de ubiquitina dos conjugados ubiquitinados, em um mecanismo denominado desubiquitinação. Assim como fosforilar e defosforilar, a ubiquitinação e a desubiquitinação são de extrema importância na regulação das vias dependentes de ubiquitina, que está relacionada a numerosos processos celulares (Tanaka, 1999).

No princípio da década de oitenta foi caracterizada a primeira atividade desubiquitinadora, quando pôde ser verificado que a enzima denominada isopeptidase era capaz de clivar as ligações isopeptídicas de ubiquitina de histona H2A (Matsui, 1982). Desde então um vasto número de enzimas desubiquitinadoras e desubiquitinadoras-símile vêm sendo identificadas, porém muito pouco é conhecido sobre o mecanismo de ação destas enzimas.

As enzimas desubiquitinadoras (DUBs) também estão envolvidas no processamento de ubiquitina, reconhecendo a ligação peptídica entre os resíduos de glicina e metionina da cadeia de poliubiquitina. A molécula de ubiquitina é codificada como um transcrito policistrônico (poliubiquitina) ou em fusão com subunidades ribossomais L40 e S27a. Estes mRNAs são traduzidos e processados gerando a ubiquitina livre (Hershko e Ciechanover, 1998).

As DUBs regulam de forma negativa a degradação de proteínas poliubiquitinadas, evitando a proteólise via proteassoma ou vacuolar, aumentando assim a meia-vida destas proteínas. Elas são responsáveis também pela retirada das cadeias de ubiquitina ancoradas ao proteassoma 26S, que podem competir com substratos ubiquitinados pelos sítios de ligação à ubiquitina, além de estarem envolvidas na remoção de ubiquitina de proteínas que regulam o ciclo celular durante a mitose. Estas e outras funções são listadas na figura 4 (Kim, 2003; Amerik e Hoshstrasser, 2004).

As DUBs e DUBs-símile são organizadas em subfamílias distintas: UCH (*ubiquitin C-terminal hydrolase*), USP (*ubiquitin-specific protease*), OTU (*Ovarian Tumour*), MJD (*Machado-Joseph disease protease*), metaloproteases JAMM (JAB1/MPN/Mov34, metaloenzima), Sentrininas, Autofaginas, PPPDE (*Permuted Papain*

fold Peptidases of DsRNA viruses and Eukaryotes) e WLM (*Wss1p-like metalloproteases*) (Nijman, 2005).

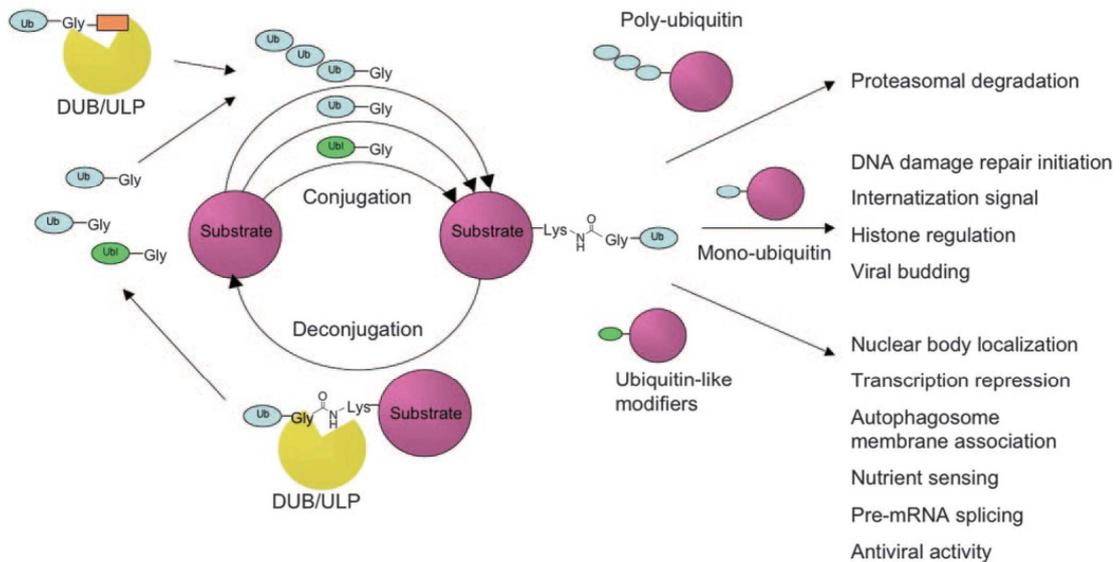


Figura 4: Maturação, conjugação e desconjugação de ubiquitina (Ub) e ubiquitinas-símile (Ubls). Antes da conjugação da Ub e Ubls, as mesmas são processadas de um precursor para exposição de sua porção C-terminal. Substratos modificados são então sujeitos ou estimulam uma variedade de processos biológicos, dependendo do tipo de modificação. Eventualmente o modificador é removido e reciclado por proteases específicas que clivam as ligações isopeptídicas geradas durante o processo de conjugação. Revisado por Ponder e Bogoy, 2007.

As USPs, também denominadas proteases processadoras de ubiquitina (UBP), apresentam tamanhos variados e grande complexidade estrutural. Cerca de 90 proteases constituem este grupo em *Homo sapiens*, sendo proteínas de alto peso molecular, 50-300 kDa, que contém várias regiões conservadas em suas sequências de aminoácidos, incluindo aquelas em torno dos resíduos Cys, His e Asp que formam a tríade catalítica (Wing e cols, 2003; Hu e cols, 2002).

As USPs exibem extensões N-terminal e C-terminal que parecem ter importante papel na determinação da localização celular e na especificidade/reconhecimento dessas enzimas pelo substrato. Estas proteases atuam em múltiplos níveis na via da ubiquitina, sendo responsáveis pela geração de ubiquitina livre através da hidrólise das cadeias não ancoradas de poliubiquitina e de proteínas precursoras de ubiquitina. As UBPs também estão correlacionadas com a estabilidade de fatores transcripcionais entre outras funções (Kim, 2003; Quesada, 2004).

Um segundo grupo de cisteíno-proteases, as UCHs, é composto de proteínas relativamente pequenas, entre 20 a 30 kDa, com algumas exceções. Estas têm um domínio catalítico de aproximadamente 230 aminoácidos, que é estruturalmente caracterizado pela presença de uma tríade catalítica apresentando os resíduos conservados Cys, His e Asp (Kim, 2003).

Alguns estudos sugerem um papel para as UCHs em processos específicos regulados por ubiquitina. Mutações em UCH-L1 (UCH expressa especificamente em neurônios), foram descritas em dois irmãos com doença de Parkinson (PD). UCH-L1 mutada tem sua atividade DUB reduzida e um polimorfismo neste gene tem sido relacionado à redução no risco desta doença. Nem todos os estudos têm encontrado uma relação estrita entre a atividade UCH-L1 e PD (Nijman, 2005).

A *ataxin-3*, uma proteína com domínio MJD (Doença Machado-Joseph), representa o terceiro grupo de cisteíno-proteases. Instabilidade de um nucleotídeo nas repetições CAG no gene da *ataxin-3* leva a uma condição neurológica hereditária conhecida como ataxia espinocerebelar tipo 3 ou doença de Machado Joseph. A *ataxin-3* se associa ao proteassoma, participando da via ubiquitina-proteassoma, e apresenta propriedades típicas das DUBs (Nijman, 2005; Amerik e Hochstrasser, 2004). Alguns experimentos indicam que a função normal da *ataxin-3* está envolvida na regulação transcricional, mas se a atividade desta DUB tem um papel neste processo não se sabe ao certo.

As proteases OTU compreendem um grupo pontual de cisteíno-proteases que são homólogas ao gene do tumor ovariano de *Drosophila*. *Otubain-1* e *otubain-2* foram as duas primeiras proteínas OTU onde a atividade DUB foi verificada *in vitro*. Cézanne, outra proteína contendo o domínio OTU, regula negativamente o NF- κ B clivando cadeias de poliubiquitina *in vitro* (Balakirev, 2003; Evans, 2003).

O grupo das cisteíno-metaloproteases JAMM/MNP+ pode ser representado por um constituinte da tampa do proteassoma 26S, a subunidade Rpn11, que é de extrema importância para a degradação de substratos poliubiquitinados. Outra proteína com motivo JAMM/MPN+ foi recentemente encontrada, a AMSH (molécula associada com o domínio SH3 de STAM), que também tem atividade desubiquitinadora (Amerik e Hochstrasser, 2004).

A subfamília de enzimas desubiquitinadoras-símile que reconhecem a molécula SUMO/Smt3, chamadas Sentrininas, clivam o precursor SUMO para sua forma ativa que contém o duplo resíduo de glicina no motivo C-terminal, necessário para sua ligação ao substrato (Johnson, 2004). A conservação da via entre as leveduras e mamíferos sugerem que esta molécula é um forte candidato à regulação da transcrição e na progressão do ciclo celular de parasitos. É caracterizada a presença de dois subgrupos de cisteíno-proteases que clivam o substrato SUMO, conhecidas como ULP1 e ULP2, sendo ambas homólogas encontradas em *Plasmodium* (Wu, 2003). Caracterizações genômicas e funcionais das ULPs são necessárias para o melhor entendimento das origens evolucionárias assim como de suas funções em genes correspondentes de parasitos protozoários.

A proteína relacionada com autofagina 4 (*autophagy-related protein 4 – Atg4*), um dos membros da subfamília autofagina, é uma cisteíno-protease que processa Atg8 para expor a glicina C-terminal para conjugação, e cliva Atg8 de seu conjugado PE na membrana externa do autofagossoma (Kirisako, 2000; Klionsky, 2004). Homólogos de Atg8 em organismos apicomplexos e parasitos da ordem Kinetoplastidae foram identificados (tabela 1), apresentando de 16,5 a 21,8% de conservação entre seus ortólogos. A inibição da expressão para Atg4 em *L. major* leva a defeitos no tráfego dos autofagossomas. Adicionalmente, parasitos que expressão um mutante ATPase, acumulam autofagossomas e tem sua susceptibilidade aumentada à falta de nutrientes, e são incapazes de realizar a transição da forma promastigota para o estágio metacíclico infectivo (Besteiro, 2006). Atg8 e Atg4 são altamente conservadas nos protozoários, enquanto não é observada a presença da variante Atg12 nos mesmos, o que vai ao encontro dos resultados prévios obtidos por Herman, 2006, em seus estudos de bioinformática em tripanossomatídeos.

Uma subclasse adicional de DUBs preditas identificadas com ferramentas de bioinformática foi a família PPPDE (Iyer, 2004). Seu protótipo foi uma proteína hipotética encontrada no parasito apicomplexo *Cryptosporidium parvum*. Embora os estudos não confirmaram nenhuma atividade DUB intrínseca para nenhum dos membros desta classe, as ferramentas de bioinformática identificaram a maiorias das classes de enzimas aceitas como DUBs (revisado por Nijman, 2005). Os estudos têm

potencial de identificar o papel da interação com vias assim como membros que tenham novas funções relacionadas às já conhecidas desempenhadas pelas DUBs clássicas.

A subfamília WLM é representada em plantas, fungos, parasitos apicomplexos e tripanossomatídeos. Em contraste, estas proteínas encontram-se ausentes em mamíferos, *Cryptosporidium*, e microsporídios, sugerindo que estes foram perdidos em ocasiões distintas durante a evolução dos eucariotos. As árvores filogenéticas dividem a subfamília WLM em dois grandes clados: (i) proteínas que contém 1 ou 2 pequenos dedos na porção C-terminal, os quais incluem membros de fungos, plantas e *Trypanosoma*; e (ii), proteínas que contém um domínio Ubiquitina na porção N-terminal, e ocasionalmente, um domínio PUG na porção C-terminal, compreendidos por diversos fungos e plantas. A subfamília WLM de metaloproteases preditas parece ser mais relacionada com homólogos bacterianos do que com metaloproteases tipo zincin-símiles de eucariotos. Assim, o ancestral de WLM parece ter sido adquirido por transferência horizontal genética de bactérias e recrutados para a função do sistema ubiquitina, independente de outros organismos eucarióticos (Iyer , 2004).

2. OBJETIVOS

Considerando que uma das características marcantes dos tripanossomatídeos é a grande heterogeneidade tanto genômica quanto fenotípica entre espécies e cepas, entendemos que estes parasitos protozoários constituem não só bons modelos para avaliar a relevância biológica da regulação exercida pelas enzimas desubiquitinadoras, como também bons exemplos de organismos onde alterações nas taxas de ubiquitinação/desubiquitinação poderiam influenciar comportamentos biológicos como taxa de crescimento, patogenicidade e susceptibilidade às drogas.

Diante destas considerações, este trabalho teve como objetivo geral reconstituir o repertório de enzimas desubiquitinadoras em tripanossomatídeos, bem como estudar aspectos moleculares e bioquímicos das enzimas desubiquitinadoras em diferentes cepas de *T. cruzi*. De modo a estabelecer correlações, foi utilizado para as análises *in silico* as seguintes espécies: *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, e *L. major*. Para as análises moleculares iniciais, foram utilizadas as cepas Berenice-62 (Be-62), Berenice-78 (be-78), CL, Colombiana (Col) e Y do *T. cruzi*.

Para isso, foram realizados os seguintes objetivos específicos:

- 1- Recuperar sequências dos bancos de dados públicos;
- 2- Analisar comparativamente as sequências supostamente codificadoras para enzimas desubiquitinadoras e desubiquitinadoras-símile, tanto suas parálogas quanto suas ortólogas;
- 3- Padronizar a técnica do RT-qPCR;
- 4- Determinar o padrão de expressão dos genes *TcUSP7*, *TcUSP10*, *TcUSP14*, *TcUSP15* e *TcUCH-L3* utilizando a técnica de RT-qPCR;
- 5- Padronizar a metodologia de enriquecimento de núcleos a partir de formas epimastigotas das cepas de *T. cruzi* analisadas neste trabalho;
- 6- Determinar conjugados ubiquitinados e sumorilados nas frações nuclear e ciplasmáticas de formas epimastigotas nas cepas de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho;
- 7- Determinar a atividade desubiquitinadora total na fração nuclear e citoplasmática em formas epimastigotas das cepas de *T. cruzi* estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises utilizando ferramentas de bioinformática

3.1.1. Obtenção das sequências

As sequências utilizadas neste trabalho foram geradas por iniciativas tanto nacionais quanto internacionais de sequenciamento em larga escala do genoma dos parasitos protozoários pertencentes à família dos tripanossomatídeos, disponíveis basicamente nos seguintes bancos de dados:

- GeneDB Version 2.1 (www.genedb.org),
- TriTrypDB Version 1.0 (tritrypdb.org),
- TcruziDB Release 5.1 (tcruziDB.org),
- The TIGR *T. cruzi* Genome Project (www.tigr.org/tdb/e2k1/tca1),
- The TIGR *T. brucei* Genome Project (www.tigr.org/tdb/e2k1/tba1),
- The TIGR *L. braziliensis* Genome Project (www.sanger.ac.uk/Projects/L_braziliensis),
- The TIGR *L. infantum* Genome Project (www.sanger.ac.uk/Projects/L_infantum),
- The TIGR *L. major* Friedlin Genome Project (www.sanger.ac.uk/Projects/L_major) e
- National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.1.2. Análise e anotação das sequências

Para a identificação das sequências codificadoras para DUBs e DUB-símile nos genomas dos parasitos protozoários *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*, e *L. major*, foi realizada uma busca por domínios PFAM v23.0 (Finn, 2008) em seus respectivos bancos de proteínas preditas pelo método hidden Markov model (HMM), utilizando como motivos de busca os seguintes domínios: UCH (PF00443), zf-UBP (PF02148), Peptidase_C12 (PF01088), Mov34 (PF01398), Mov34 (PF01398), Peptidase_C48 (PF02902), DUF862 (PF05903), Peptidase_C54 (PF03416), e WLM (PF08325).

3.1.3. Caracterização das sequências

Após a recuperação das ORFs preditas, partiu-se para uma análise de similaridade por BLASTp (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) visando

identificar ortólogos tanto com outros eucariotos, assim como entre os próprios tripanosomatídeos. Essa mesma metodologia foi utilizada para pesquisa de parálogos nas espécies citadas.

Em seguida, as sequências que apresentaram similaridade por BLASTp (e-Value <5) com ortólogos de proteínas que não foram previamente anotadas como DUBs ou DUB-símiles foram excluídas das análises posteriores. Também foram excluídas parálogas que apresentaram mais de 97% de similaridade quando alinhadas com a ferramenta ClustalW (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>). Outro critério adotado foi utilizar as maiores ORFs preditas entre parálogas para garantir melhor cobertura nas análises posteriores.

Para a comparação entre as ORFs preditas dos ortólogos e parálogos recuperados nos bancos de dados, os alinhamentos foram realizados utilizando o software ClustalX 2.0 (Larkin, 2007), e formatados com o auxílio do software BOXSHADE v3.2 (Hofmann e Baron, disponível em http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

3.1.4. Análises filogenéticas

O alinhamento múltiplo das proteínas preditas para a inferência filogenética foi realizado com o software ClustalX 2.0 (Larkin, 2007) e as análises filogenéticas foram calculadas pelo software MEGA 4.1 (Tamura, 2007). As árvores filogenéticas das seqüências foram inferidas utilizando o método Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987). A árvore filogenética consenso foi montada utilizando a análise de *bootstrap* de 2000 réplicas para representar a história evolutiva das taxas analisadas. Os braços das árvores correspondendo a partes que repetiram em menos de 50% das réplicas de *bootstrap* foram colapsados. As árvores foram desenhadas em escala, sendo o tamanho dos ramos correspondente às distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. A distância evolutiva foi calculada utilizando o método baseado na matrix JTT (Jones, 1992) e estão em unidades do número de substituições de aminoácidos por posição. Todas as posições contendo *gaps* e porções sem cobertura foram eliminadas do conjunto de final dados (opção de deleção completa).

3.2. Validação experimental das análises *in silico*

3.2.1. Obtenção das formas epimastigotas do *T. cruzi*

As cepas utilizadas neste trabalho são pertencentes à linhagem genética *T. cruzi* I e II. A cepa Y foi isolada de um caso humano agudo por Freitas e cols (1953), sendo estudada e descrita por Silva e Nussenzweig (1953) e as cepas Be-62 e Be-78, isoladas da mesma paciente, através de xenodiagnóstico por Salgado e cols (1962) e Lana e Chiari (1986), respectivamente. As formas epimastigotas, utilizadas nos experimentos foram mantidas em meio LIT (Camargo, 1964) à 28°C, e coletadas a cada 3 dias em sua fase exponencial de crescimento.

3.2.2. Extração de DNA genômico

Cerca de 2×10^8 epimastigotas foram homogeneizados em 1mL de tampão de lise (Tris 50mM pH 7,5, N-laurilsarcosina 1%, EDTA 1mM, proteinase K 100µg/mL), e mantidos a 37°C durante 2 horas. A seguir, foi acrescentado 100µL de NaCl 5M e a mistura foi incubada por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foi adicionado 100µL de uma solução de CTAB/NaCl a 10%, seguido por uma incubação de 20 minutos a 65°C.

O DNA foi extraído com clorofórmio (v/v) e posteriormente precipitado pela adição de isopropanol (v/v) com conseguinte incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 10000g, lavado com etanol 70%, seco, ressuspenso em água e armazenado a 4°C. A figura 5 mostra uma preparação de DNA genômico realizada como descrito acima e analisada em gel de agarose 0,6%. A quantificação foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro com leitura a 260nm.

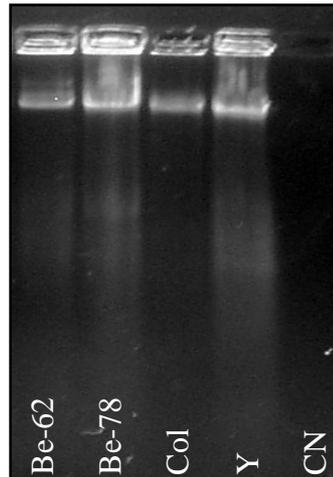


Figura 5: Gel de agarose (0,6%) em TBE, corado com brometo de etídeo, mostrando extrações de DNA genômico de formas epimastigota de *T. cruzi*. Cerca de 5 μ g de DNAg de cada cepa foram utilizados na corrida eletroforética, e para visualização o gel foi corado com brometo de etídeo. A extração do DNAg e a montagem do gel foram realizadas segundo o método descrito anteriormente. – cepa Be-62; – cepa Be-78; Col – cepa Colombiana; Y – cepa Y; CN – controle negativo.

3.2.3. Extração do RNA total em formas epimastigotas de cepas do *T. cruzi*

Todos os instrumentos utilizados foram esterilizados por autoclavação por 40 minutos ou limpos com inibidor de nucleases (RNAses) RNaseAway (InvitrogenTM).

Aproximadamente 1×10^8 epimastigotas foram homogeneizados em 1mL de TRIzol[®] Reagent (InvitrogenTM). Posteriormente o homogeneizado foi transferido para tubos *ependorf* de 1,5 mL e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram então adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma) para cada 1,0mL de Trizol nos tubos contendo o homogeneizado e em seguida agitados vigorosamente durante 15 segundos, e incubados novamente por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 12.000g em microcentrífuga (Centrífuga Eppendorf 5418) a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo seguido da adição de volume equivalente de etanol 95% v/v (preparado com água tratada com DEPC) e homogeneizado suavemente invertendo o tubo por três vezes para precipitação do RNA.

Para purificação do RNA foi utilizado o kit de extração de RNA total (SV total RNA Isolation System - PromegaTM) seguindo o protocolo do fabricante.

Resumidamente, a amostra foi transferida para um *spin basket* acoplado a um tubo coletor de 2mL e centrifugado a 12.000g por 1,5 minutos em microcentrifuga. O líquido residual no tubo coletor foi descartado após as sucessivas centrifugações. Foram adicionados 600µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*) e em seguida centrifugado a 12.000g por 1,5 minutos. As amostras de RNA foram tratadas com DNase para assegurar a ausência de contaminação por DNAg. Para isso, foi preparado uma mistura contendo 40µL de *yellow core buffer*, 5,0µL MnCl₂ 0,09M e 5µL de DNase aplicados sobre a membrana do *spin basket* e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 200µL de *SV DNase Stop Solution* para inibição da atividade enzimática da DNase. O tubo foi então centrifugado a 12.000g por 1,5 minutos e o líquido contido no tubo coletor descartado. Foi adicionado então 600µL de solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*) e centrifugado por 12.000g por 1,5 minutos. Adicionou-se novamente 250µL dessa solução de lavagem no tubo seguido de centrifugação a 14.000g por 2,5 minutos, e posteriormente o *spin basket* foi transferido para um tubo de eluição e adicionado 100µL de água livre de nucleases e centrifugado a 12.000g por 1,5 minutos. As amostras foram armazenadas imediatamente a -80°C até o momento do uso.

A seguir, uma alíquota desta preparação foi analisada por espectrofotometria para quantificar o grau de contaminação por proteínas, utilizando a razão das leituras realizadas a 260 e 280nm, conforme descrito por Sambrook, 1989.

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 500mL, pH 7,0), representado pela figura 6. Antes de aplicar as amostras no gel, 10µg de RNA foram adicionados a 15µl de tampão de amostra (formamida 187,5µL, formaldeído 27,5µL, MOPS 10X 37,5µL, azul de bromofenol [100mg/mL] 1µL, água DEPC 42µL e brometo de etídeo 0,5µL). 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 50V, sendo o tampão de corrida MOPS 1X.

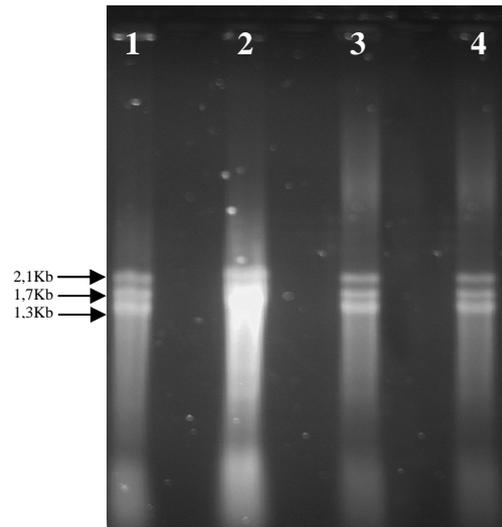


Figura 6: Análise da integridade do RNA total obtido a partir de formas epimastigotas de cepas do *T. cruzi*. Aproximadamente 10 μ g de RNA total, obtidos como descrito acima, foram analisados em gel de agarose/formaldeído e corados com brometo de etídeo. Em 1 – cepa Be-62; 2 – cepa Be-78; 3 – cepa Colombiana e 4 – cepa Y. Os RNAs ribossomais estão indicados por setas e apresentam seus respectivos pesos moleculares.

3.2.4. Obtenção da primeira fita

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando o Kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, foi utilizado 1 μ g de RNA total, 50pmol de oligo-dT, 10mM de dNTPs e água livre de RNase para um volume final de 10 μ L. A desnaturação do RNA foi realizada através da incubação da mistura a 65°C em termociclador durante 5 minutos, seguido de banho de gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados o tampão da enzima, 0,1M de DTT e 15 unidades da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, essa mistura foi incubada novamente em termociclador a 42°C durante 60 minutos e 85°C por 5 minutos. Por fim, a amostra foi estocada a -20°C até o momento do uso.

3.2.5. Idealização dos *primers*

Os *primers* para a análise da expressão gênica foram idealizados utilizando as sequências depositadas no banco que codificavam para cada DUB, como mostra a tabela 2. Foi utilizado o *software GeneRunner* (disponível em <http://www.generunner.com>), obedecendo os critérios para sua utilização em análises

por RT-qPCR, ou seja, o percentual GC de cada *primer* foi maior ou igual a 50%, para não hibridizar entre si, ou formar grampos. Como gene constitutivo, foi utilizada a enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase - HGPRT (Allen e Ullman, 1994).

Tabela 2: Entradas correspondentes aos primers utilizados na reação de RT-qPCR em cepas de *T. cruzi*. São apresentadas as respectivas entradas do banco de dados GeneDB, os oligonucleotídeos e o respectivo tamanho do produto gênico esperado. bp – pares de base; F – fita direta; R – fita reversa.

Enzima	Entrada	Primers (5' – 3')	Produto esperado
<i>TcUSP7</i>	Tc00.1047053510761.70	F – GCGTGCTCAAGACCTAAG R – GAAGTTGGCGTTGGTAAG	150pb
<i>TcUSP10</i>	Tc00.1047053507507.40	F – CATGCCTCGGTTCTTGTC R – CTGTGCTAAACTCGCTCAC	102pb
<i>TcUSP14</i>	Tc00.1047053506569.10	F – ATGCTGATTCGGCTTGTG R – ATGCTGGAGACTGGATTG	104pb
<i>TcUSP15</i>	Tc00.1047053508707.180	F – CGCACTTTGGAGGTAATC R – CCGTGGTGTAACATCAC	102pb
<i>TcUCH-L3</i>	Tc00.1047053504109.90	F – TTAAGGAGGGAGGGACTC R – CGGCTGATTCCTTGTGAC	103pb
<i>HGPRT</i>	Tc00.1047053506457.30	F – CACGGGAGTACGAGTTTG R – GAGCACAAGAGGGTTGAC	137pb

3.2.6. Amplificação utilizando PCR convencional

Cerca de 500ng de DNA genômico de formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram utilizados nas reações de PCR para posterior clonagem. Foi realizado um programa de amplificação que consistiu de: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos formados por uma etapa de desnaturação a 94°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 60°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão a 72°C, terminando com uma etapa de extensão final a 72°C por 6 minutos. Nestas reações foi utilizado o kit *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) segundo especificações do fabricante, com uma concentração final de 1,5mM de MgCl₂.

Para avaliar se os iniciadores utilizados amplificavam a sequência de DNA específica para os genes avaliados nas condições em que será realizado o qPCR, foi realizado um programa de PCR com o reagente *SYBR GREEN PCR Master Mix* (Applied Biosystems) nas condições de termociclagem de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 60°C por 1 min e 95°C por 15 segundos utilizando o termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Para isto, foi utilizado 4µL de cDNA

diluído 5X, 1 μ M dos iniciadores *forward* e *reverse* de cada gene e 5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix para cada reação de PCR com volume final de 10 μ L.

Os *amplicons* gerados nesta etapa foram visualizados em gel de poli-acrilamida 10% utilizando 6 μ L de produto de reação para 1 μ L de tampão de amostra (concentrado 6X).

3.2.7. Purificação do produto de PCR

O produto obtido na reação de PCR a partir de DNAg foi transferido para um novo tubo tipo *ependorf* e em seguida foi adicionado 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M pH 7,0 e 2,5 vezes do volume de etanol absoluto. Posteriormente esta mistura foi incubada a -20°C por 30 minutos e em seguida, centrifugada a 10000g por 5 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e seco. O DNA foi ressuspensão em 10 μ L de água milli-Q estéril.

3.2.8. Preparo de células competentes

Células de *E. coli* (DH5 α) previamente estocadas a -80°C foram semeadas em meio LB-Ágar e incubadas à temperatura de 37°C durante 16h. Posteriormente foi retirado uma colônia isolada, e esta foi inoculada em 5mL de meio LB-caldo, incubando-se em shaker à 37°C sob agitação de 200rpm durante 16h. A seguir, 250 μ L desta cultura foram transferidos para 25 mL de meio LB-caldo e incubado em *shaker* à 37°C sob agitação de 200rpm até uma DO_{600nm} de 0,3 a 0,5. Em seguida, a cultura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e posteriormente centrifugado a 3000g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 10mL de tampão PIPES e novamente centrifugado a 3000g à 4°C por 10 minutos. Esta etapa foi repetida seguida de banho de gelo por 30 minutos e centrifugado a 2000g à 4°C por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspensão em 1,2 mL de tampão PIPES e estocado em alíquotas de 200 μ L à -80°C até a etapa de transformação.

3.2.9. Clonagem e obtenção do DNA plasmidial

O sistema utilizado para as reações de ligação foi o *p-GEM-T Easy Vector System* (Promega), segundo protocolo do fabricante. Resumindo, para cada reação de ligação, foi preparado um mix contendo 5µL de *2X Rapid Ligation Buffer*, 1µL de *p-GEM-T Easy Vector* e 1µL de *T4 DNA Ligase*, adicionando-se em um tubo de 0,2mL contendo 3µL de produto de PCR purificado. Após ser homogeneizado o tubo foi incubado à temperatura de 4°C por 16 horas para que ocorra a reação de ligação e posteriormente armazenado em geladeira até o momento de uso na etapa de transformação.

Para a transformação bacteriana, foi adicionado 5µL de produto de ligação em tubos de 1,5mL para cada 50µL de células competentes previamente armazenadas à -80°C. Em seguida, os tubos foram incubados em banho de gelo por 30 minutos seguido por banho maria à 42°C por 2 minutos e novamente incubados em banho de gelo por 2 minutos. Foi então adicionado 900µL de meio LB-caldo e incubado por 90 minutos à 37°C em *shaker* a 200rpm. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 2000g por 5 minutos, e as células mantidas em 100µL do meio inicial.

A seguir, esta suspensão de células foi plaqueada em meio LB-Ágar suplementado com ampicilina, IPTG e X-gal. Estas então foram incubadas por 16h à 37°C, e os clones recombinantes foram selecionados pela resistência ao antibiótico e incapacidade de hidrólise do substrato X-Gal.

Para a extração do DNA plasmidial, uma colônia recombinante foi transferida para 5mL de meio LB-caldo suplementado com ampicilina (100µg/mL). Após 16h de crescimento à 37°C sob agitação de 200rpm, foi retirada uma alíquota de 1µL para pesquisa de inserto, utilizando a técnica de PCR de colônia, seguindo o protocolo descrito no item 3.2.6. Após a análise em gel de agarose 1,2%, foram retirados 1,5mL da cultura, os quais foram centrifugados a 14000g por 3 minutos. O *pellet* resultante foi utilizado para a extração do DNA plasmidial, conforme descrito a seguir.

Inicialmente, o *pellet* foi resuspendido em 100µL de uma solução contendo glicose (50mM), EDTA (10mM), solução de Tris-HCl (25mM pH8,0) e 20µL de RNase 20mg/mL. Após 5 minutos de incubação em banho de gelo, foi adicionado 200µL de uma solução contendo NaCl (0,2M) e SDS 1% e homogeneizado por

inversão. Posteriormente os tubos foram incubados em banho de gelo por 5 minutos e em seguida adicionado 150µL de solução de acetato de potássio (3M pH4,8 gelado) e misturado por inversão. Os tubos foram então incubados por 5 minutos em banho de gelo e após esta etapa foram centrifugados a 12000g por 15 minutos. O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e adicionado 500µL de isopropanol. Os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura de -20°C e posteriormente centrifugados a 12000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1mL de etanol 70% e em seguida centrifugado a 12000g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi seco com o auxílio de um fluxo laminar, e em seguida resuspendidos em 50µL de água livre de nucleases e armazenado à -20°C. As amostras de plasmídeos purificados foram avaliadas em gel de agarose a 0,8% e coradas com brometo de etídeo.

3.2.10. Sequenciamento e análise das sequências

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big-Dye Terminator (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, e as reações analisadas no sequenciador automático de DNA, ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os plasmídeos foram sequenciados, nas direções “direta” e “reversa”, utilizando para isso, os *primers* M13. A sequência obtida foi analisada utilizando o algoritmo BLASTn contra o banco de dados do *T. cruzi*.

3.2.11. Padronização da técnica de RT-qPCR

Para análise da expressão dos genes *TcUSP7*, *TcUSP10*, *TcUSP14*, *TcUSP15* e *TcUCH-L3* foi utilizada a técnica de PCR quantitativo, também conhecida como *Real Time PCR*. As reações foram realizadas utilizando o kit SYBR[®] GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems). As análises foram realizadas utilizando o método do ΔC_T e o número de moléculas de RNA calculado em relação ao gene constitutivo pelo método do $2^{-\Delta C_t}$, conforme boletim técnico do fabricante, utilizando o aparelho ABI7300 (Applied Biosystems).

Para avaliar a eficiência da reação de qPCR para os diversos pares de *primers* utilizados neste trabalho, foram construídas curvas padrão utilizando diluições seriadas de 10X de diferentes amostras de cDNA. O ensaio foi realizado em duplicata e a concentração dos iniciadores foi de 100nM, e os valores foram plotados em um gráfico onde o eixo X representa o Log das concentrações de cDNA e no eixo Y o valor de C_T para cada diluição. Os *primers* foram considerados adequados para avaliar expressão gênica pelo sistema SYBR™ Green quando apresentavam eficiência de reação acima de 99%, calculado pelo *slope* da curva aplicado na seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência} = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100.$$

Os valores de *baseline* e *threshold* para os *primers* utilizados foram ajustados de acordo com cada par de *primers*, variando de 3 a 15 ciclos referentes à *baseline* e de 0,11 a 0,35 para *threshold* (tabela 3). Segue como exemplo os *plots* de amplificação e a curva de eficiência referente ao gene HGPRT demonstrado no anexo 1. A eficiência de reação dos *primers* utilizados está demonstrada na tabela 3, bem como seus respectivos coeficientes de linearidade. As curvas de dissociação para cada par de *primers* é mostrada no anexo 2.

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Como os dados apresentavam natureza paramétrica, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *p* foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

Tabela 3: Eficiência dos *primers* utilizados na técnica de RT-qPCR.

Gene	Threshold	Slope	R ²	Eficiência
<i>TcUSP7</i>	0,31	-3,328845	0,997797	99,71%
<i>TcUSP10</i>	0,11	-3,323556	0,999970	99,93%
<i>TcUSP14</i>	0,35	-3,329638	0,999861	99,68%
<i>TcUSP15</i>	0,34	-3,334141	0,999995	99,49%
<i>TcUCH-L3</i>	0,18	-3,343262	0,999196	99,12%
<i>HGPRT</i>	0,33	-3,324433	0,999970	99,90%

3.2.12. Obtenção do extrato protéico bruto e fração nuclear de formas epimastigota de *T. cruzi*

Inicialmente, 2×10^8 epimastigotas foram adicionados em 1mL do tampão de homogeneização (HEPES pH 7,9 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 1,5mM, sacarose 0,34M, glicerol 10%) acrescido de 0,2% de NP-40. A seguir, a mistura foi estocada em banho de gelo e sonicada utilizando o equipamento Sonifier 250 (Branson), adotando-se 4 pulsos de 45 segundos com intervalos de 1 minuto em banho de gelo.

Para o enriquecimento da fração nuclear de proteínas de formas epimastigotas do *T. cruzi*, adaptou-se o protocolo descrito por Shechter, 2007, conforme descrito a seguir.

Primeiramente, 1×10^8 epimastigotas, com 3 dias de cultivo, mantidas em meio LIT foram centrifugadas a 3000g por 15 minutos à 4°C. Descartado o sobrenadante, estas foram ressuspensas em tampão PBS 1X gelado e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Em seguida, o *pellet* foi cuidadosamente ressuspensado em 1mL de tampão de homogeneização (HEPES pH7,9 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 1,5mM, sacarose 0,34M, glicerol 10%) acrescido de 0,2% de NP-40. Após incubação por 10 minutos em banho de gelo, a amostra foi submetida à centrifugação a 6500g por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi completamente removido (fração citoplasmática), e o *pellet* restante (fração nuclear) foi ressuspensado cuidadosamente no tampão de homogeneização, desta vez sem a adição de NP-40. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 800g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente recolhido com o auxílio de um pipetador automático para ser descartado. Para a confirmação da presença dos núcleos, o *pellet* com aspecto transparente e gelatinoso formado foi ressuspensado em 400µL do tampão de homogeneização, e a uma alíquota de 50µL foi adicionado 5µL de uma solução de Iodeto de Propídio (10ng/µL), e feito a leitura imediatamente no microscópio de fluorescência Leica DM 5000 B.

Para as extrações de proteína que seriam posteriormente utilizadas nos experimentos de *western blotting*, foi adicionado no tampão de homogeneização os inibidores de protease NEM (1mM), TPCK (10µM), TLCK (10µM) e PMSF (1mM).

A determinação da concentração protéica presente no extrato bruto foi realizada segundo o método do BCA (Smith, 1985). Para a construção da curva padrão foi utilizada a solução de soroalbumina bovina em diversas diluições.

3.2.13. Gel SDS-PAGE e *western blot*

Cerca de 20µg de extrato bruto ou 20µg das frações nuclear e citosólica foram fracionados em gel de SDS-PAGE 10% como descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado como padrão de peso molecular o PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). A amperagem durante a corrida foi de 30mA. Após a corrida, um dos géis foi corado com solução de azul de Coomassie 2% enquanto o outro gel foi preparado para a transferência de acordo com o método descrito por Towbin, 1979, com modificações no tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, etanol 18% e SDS 0,02%). Utilizou-se 25V a uma temperatura de 4°C com agitação 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 à 4°C com TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05% e leite desnatado em pó 5%) e submetida a *immunoblot*. Após o bloqueio, a membrana de PVDF foi lavada 3 vezes em TBS-T e incubada com anticorpo primário (anti-ubiquitina – Santa Cruz Biochem – para detectar a ubiquitina e proteínas ubiquitinadas e anti-SUMO – Santa Cruz Biochem – para detectar SUMO e proteínas SUMOriladas) numa diluição 1:250 em TBS-T durante 3 horas à 4°C. O anticorpo foi removido e a membrana lavada três vezes rapidamente com TBS-T. Na sequência a membrana foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina – Sigma – para a detecção de proteínas ubiquitinadas e anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina – Sigma – para a detecção de SUMO) na diluição 1:1000. Após este período, a membrana foi lavada por três vezes durante 5 minutos em tampão de revelação (Tris pH9,5, NaCl 5M, MgCl₂ 1M e H₂O q.s.p. 100mL). Finalmente, foram adicionados 5mL de tampão NBT/BCIP (Amresco) agitando-se por 30 minutos.

3.2.14. Atividade desubiquitinadora total

Nestes ensaios foi utilizado o substrato fluorogênico Z-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly-AMC para a determinação da atividade desubiquitinadora (endopeptidásica) nas frações citosólica e nuclear das formas epimastigotas nas cepas de *T. cruzi* em estudo.

Para isso, foram utilizados 20µg de proteínas totais conforme descrito no item 3.2.12. O tampão utilizado nos ensaios de atividade apresenta concentração final de Tris pH7,5 1M, MgCl₂ 1M, DTT 100mM e peptídeo fluorogênico 13mM, na presença (controle negativo) ou ausência de NEM 1mM. O ensaio foi realizado num volume final de 200µL com incubação de 30 minutos à 37°C. A seguir, a reação foi interrompida pela adição de 2mL de etanol absoluto e analisadas em espectrofluorímetro (RF-5301PC - Shimadzu) nos comprimentos de onda de 380nm (excitação) e 440nm (emissão). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência por µg de proteína por hora.

4. RESULTADOS

Para uma melhor avaliação dos resultados obtidos, esta sessão foi dividida em 2 partes. A primeira compreende os resultados das análises *in silico* correspondentes aos genomas dos organismos analisados: *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, e *L. major*. Na segunda, são apresentados os resultados das análises moleculares dos genes *TcUSP7*, *TcUSP10*, *TcUSP14*, *TcUSP15* e *TcUCH-L3*, bem como ensaios bioquímicos, denominado validação experimental.

4.1. Parte I - Análises *in silico*

4.1.1. Repertório das enzimas desubiquitinadoras e desubiquitinadoras-símile em *T. cruzi*

As sequências que apresentam os domínios relacionados às várias subfamílias de DUBs foram recuperadas dos bancos de dados como descritas em material e métodos, e estão listadas abaixo.

A tabela 4 mostra os 34 contigs encontrados, bem como as subfamílias, seus PFAMs e *e-Values* correspondentes. Sendo assim, podemos observar que este parasito apresenta 18 entradas para a subfamília USP, 2 entradas para a subfamília UCH, 2 entradas para a subfamília JAMM, 3 entradas para a subfamília Otubaína, 1 entrada para a subfamília Sentrina, 5 entradas para a subfamília PPPDE, 2 entradas para a subfamília Autofagina, e somente 1 entrada para a subfamília WLM. Podemos também notar que os valores de similaridade são significativos para todos os membros desta família de proteínas.

A figura 7 mostra o esquema posicionando os domínios presentes nas ORFs preditas obtidas no banco de dados do *T. cruzi*, bem como seu tamanho quando comparadas umas às outras. Podemos observar a distribuição aparentemente aleatória dos domínios ao longo das ORFs preditas. Em A, a subfamília USP mostra esta ocorrência, tendo em vista que os domínios UCH podem apresentar-se tanto na porção N-terminal, como, por exemplo, nas sequências Tc00.1047053510761.70, Tc00.1047053507053.100, ou na porção C-terminal, como por exemplo nas sequências Tc00.1047053510749.40, Tc00.1047053509965.40.

A figura 7 também mostra que as proteínas que contém o domínio UCH apresentam tamanhos semelhantes, sendo 201 aa para a entrada Tc00.1047053510945.10 e 217 aa para a entrada Tc00.1047053504109.90, ressaltando que estes ocupam uma grande porção do tamanho predito destas ORFs (310 e 236 aa respectivamente). Também é observado que as proteínas que contém o domínio OTU apresentam tamanhos semelhantes, sendo 85, 112 e 118 aa para as entradas Tc00.1047053508301.10, Tc00.1047053508723.59 e Tc00.1047053508839.50, respectivamente. Seus domínios apresentam diferentes localizações quando comparadas as distâncias das porções N e C-terminal nas ORFs preditas, mais precisamente compreendendo as posições 401 a 485, 105 a 216 e 342 a 459, respectivamente.

Também é mostrado na figura 7 que as ORFs preditas das enzimas que compreendem a subfamília PPPDE (domínios DUF862) apresentam tamanhos distintos, variando de 245 a 1004 resíduos de aminoácidos, com domínios de tamanho semelhantes (139~172 aa) que se mantêm preferencialmente na porção N-terminal. Já as entradas Tc00.1047053507017.150 e Tc00.1047053511527.50, que correspondem à proteínas da subfamília das autofaginas apresentam 328 aa e 357 aa, respectivamente. Seus domínios conservados apresentam tamanhos semelhantes, sendo 257 aa, com início na posição 32 e término na posição 288, e 260 aa, tendo início na posição 67 e término na posição 326, respectivamente.

A região que compreende o domínio Mov34, nas sequências mostradas pela figura 7, apresenta tamanhos similares entre as sequências, sendo 142 aa para a entrada Tc00.1047053507083.60 e 165 aa para a entrada Tc00.1047053506715.20, iniciando-se nas posições 56 e 5, e terminando nas posições 197 e 169, respectivamente.

A sequência que possui o domínio Peptidase_C48, correspondendo à família das sentrininas, mostrou, de acordo com a figura 7, ORF predita com 732 resíduos de aminoácidos, apresentando um domínio com 222 aa, tendo seu início na posição 498 e término na posição 719. Já a família WLM também mostrou na mesma figura, um membro, cuja ORF predita é composta por 539 resíduos de aminoácidos, com 2 domínios de tamanhos semelhantes em *tandem*. O primeiro domínio possui 169 aminoácidos e inicia-se na posição 12 e com término na posição 180, enquanto o segundo possui 177 aa e tem início e término nas posições 272 e 448, respectivamente.

Tabela 4: Entradas de prováveis enzimas desubiquitinadoras em *T. cruzi*. As sequências foram recuperadas do banco de dados geneDB (<http://www.genedb.org>). Os e-Values foram obtidos através da ferramenta BLASTp sob o modelo HMM no banco de dados PFAM v23.0.

Domínio	Entrada	Pfam	e-Value Domínio
USP (18 entradas)	Tc00.1047053510749.40	UCH (PF00443)	> 4.2e-13
	Tc00.1047053510761.70	zf-UBP (PF02148)	(PF00443)
	Tc00.1047053507053.100	ubiquitin (PF00240)	
	Tc00.1047053509965.40		
	Tc00.1047053508355.380		
	Tc00.1047053511307.20		
	Tc00.1047053504131.170		
	Tc00.1047053506569.10		
	Tc00.1047053509023.120		
	Tc00.1047053509429.250		
	Tc00.1047053511367.260		
	Tc00.1047053506871.50		
	Tc00.1047053506747.30		
	Tc00.1047053509073.30		
	Tc00.1047053508277.360		
	Tc00.1047053508153.120		
Tc00.1047053506593.40			
Tc00.1047053511003.80			
UCH (2 entradas)	Tc00.1047053510945.10	Peptidase_C12 (PF01088)	>7.5e-46
	Tc00.1047053504109.90		
JAMM (2 entradas)	Tc00.1047053507083.60	Mov34 (PF01398)	>3.7e-5
	Tc00.1047053506715.20		
Otubaina (3 entradas)	Tc00.1047053508301.10	OTU (PF02338)	>2.13-21
	Tc00.1047053508723.59		
	Tc00.1047053508839.50		
Sentrin (1 entrada)	Tc00.1047053505193.40	Peptidase_C48 (PF02902)	1.6e-05
Permuted papain fold peptidase (5 entradas)	Tc00.1047053503693.20	DUF862 (PF05903)	>1.1e-19
	Tc00.1047053504797.80		
	Tc00.1047053506755.50		
	Tc00.1047053506755.90		
	Tc00.1047053506871.130		
Autophaginas (2 entradas)	Tc00.1047053507017.150	Peptidase_C54 (PF03416)	>1.1e-14
	Tc00.1047053511527.50		
WLM (1 entradas)	Tc00.1047053507509.60	WLM (PF08325)	2.1e-08

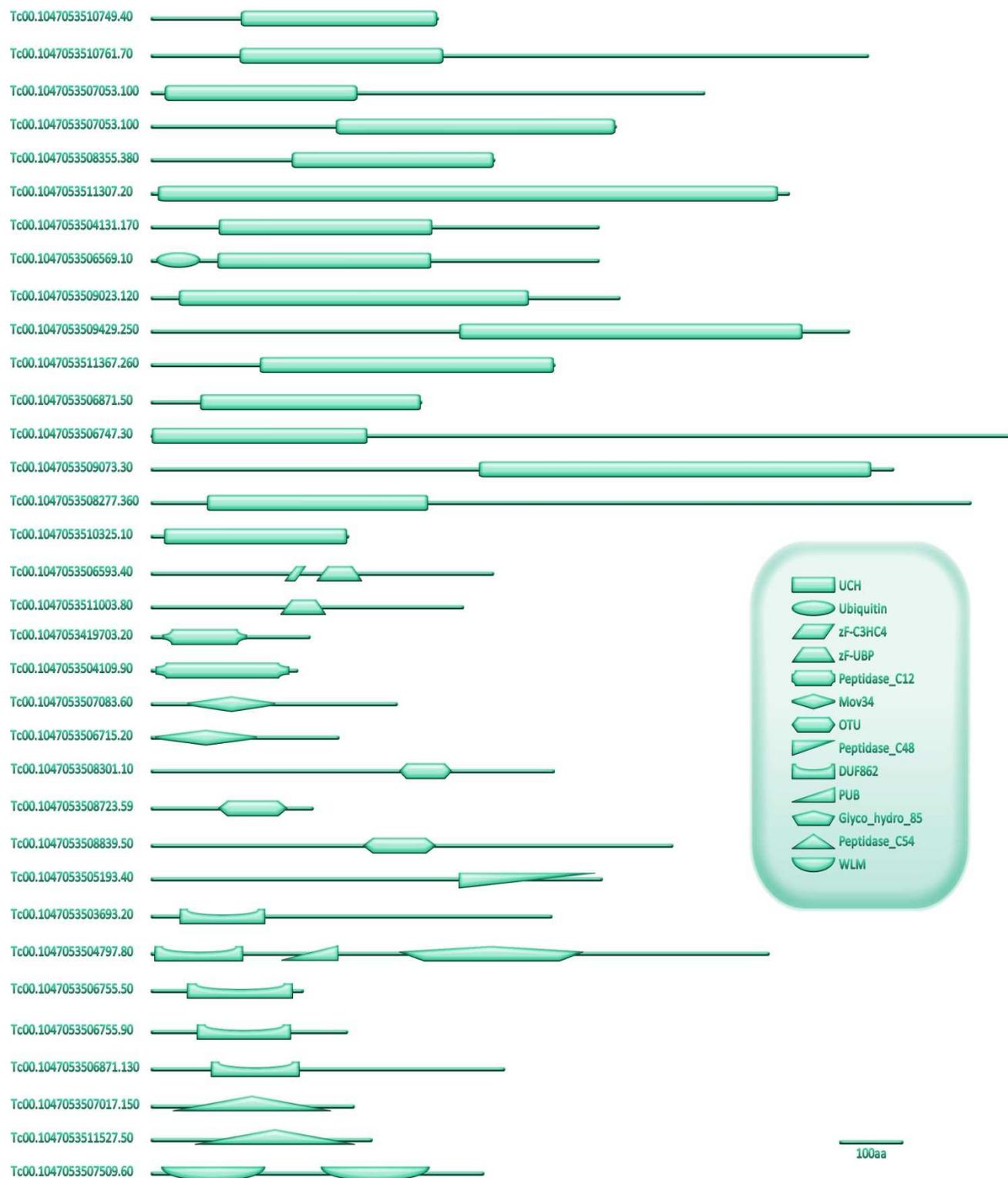


Figura 7: Representação esquemática dos domínios conservados em ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras de *T. cruzi*. As sequências foram recuperadas do banco de dados GeneDB. As linhas horizontais representam a estrutura primária da ORF predita. Domínios conservados das subfamílias UCH (PF00443), zF-UBP (PF02148), Peptidase_C12 (PF01088), Mov34 (PF01398), OTU (PF02338), Peptidase_C48 (PF02902), DUF862 (PF05903), Peptidase_C54 (PF03416) e WLM (PF08325).

4.1.2. Subfamília USP em *T. cruzi*

A figura 8 mostra a divergência entre os membros da subfamília USP de DUBs em *T. cruzi*, indicando que estes se dividem em dois grandes grupos. Dos 18 membros, 16 apresentam o domínio UCH e 2 o domínio Zf-UBP, sendo este representado pelas entradas Tc00.1047053506593.40 e Tc00.1047053511003.80. Também pode ser observado a presença do domínio Ubiquitin na entrada Tc00.1047053506569.10. São mostrados baixos valores de *bootstrap* para as seqüências analisadas.

Outra característica observada entre os membros da subfamília USP foi uma grande conservação dos resíduos de aminoácidos presentes próximos à tríade catalítica (C-H-H), característico do domínio UCH, como mostrado na figura 9. Os resíduos que compõem a tríade catalítica estão realçados com círculos. A distância entre estes resíduos varia em tamanho na seqüência da ORF predita, assim como a distância da porção N-terminal onde o domínio se encontra.

A figura 10 mostra o alinhamento de ortólogos de USP7-símile. As entradas apresentadas possuem o domínio conservado UCH, e para o *T. cruzi* (entrada Tc00.1047053510761.70) este contém 331 aa, iniciando na posição 142 com término na posição 472, estando os resíduos catalíticos identificados com uma seta vermelha nas posições C154/H408/H417.

A figura 11 mostra o alinhamento de ortólogos de USP10-símile. As entradas apresentadas possuem o domínio conservado UCH, e para o *T. cruzi* (entrada Tc00.1047053507507.40) este contém 438 aa, iniciando na posição 77 com término na posição 434, estando os resíduos catalíticos identificados com uma seta vermelha nas posições C89/H376/H385. As seqüências Dr e Hs apresentam em sua porção N-terminal um braço de 250 aa que não possui cobertura com os ortólogos de tripanosomatídeos.

A figura 12 mostra o alinhamento de ortólogos de USP14-símile. As entradas apresentadas possuem o domínio conservado UCH, e para o *T. cruzi* (entrada Tc00.1047053506569.10) este contém 464 aa, iniciando na posição 104 com término na posição 450, estando os resíduos catalíticos identificados com uma seta vermelha nas posições C116/H397/H406.

A figura 13 mostra o alinhamento de ortólogos de USP15-símile. As entradas apresentadas possuem o domínio conservado UCH, e para o *T. cruzi* (entrada

Tc00.1047053508707.180) este contém 1207 aa, iniciando na posição 531 com término na posição 1168, estando os resíduos catalíticos identificados com uma seta vermelha nas posições C543/H1142/H1150.

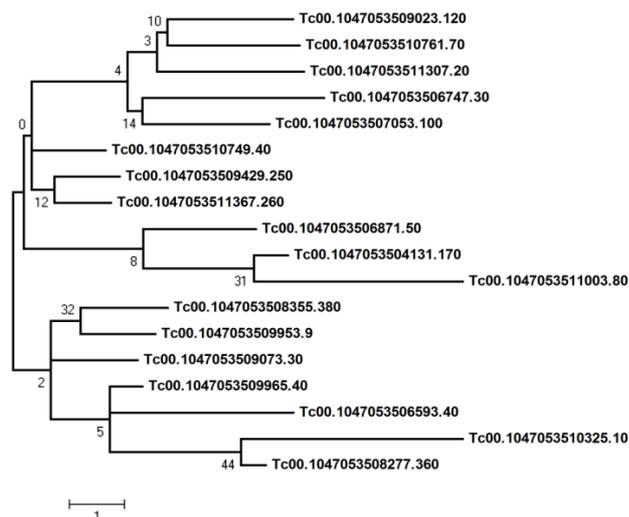


Figura 8: Árvore filogenética consenso baseada nas seqüências de aminoácidos que contém o domínio UCH (PF00443). A construção da árvore e a análise do "bootstrap" foram realizadas nos programas ClustalX 2.0 e MEGA 4.1 respectivamente. Para árvore consenso e confiabilidade dos ramos formados foi utilizado o teste de filogenia *bootstrap*, utilizando 2000 réplicas para cada seqüência, como descrito em material e métodos. A barra representa o número de aminoácidos que foram substituídos de uma seqüência para outra. Os códigos de acesso referentes às sequencias foram obtidos no banco de dados Genedb.

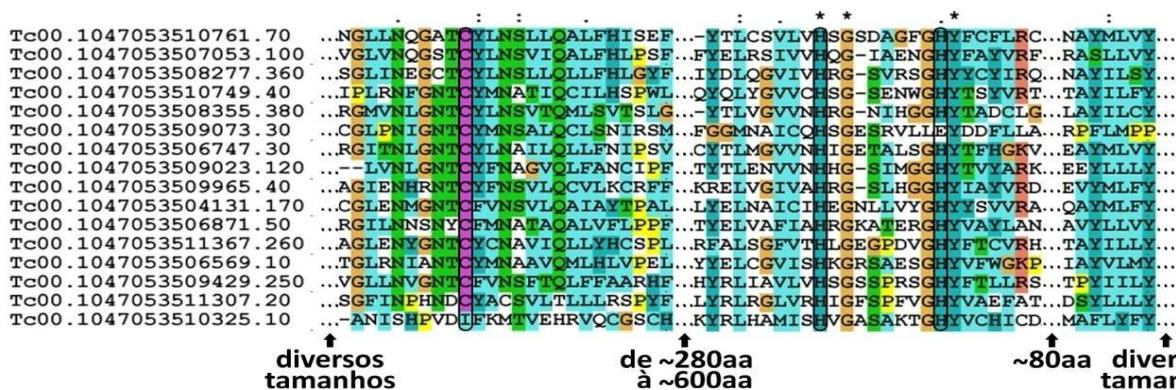


Figura 9: Alinhamento da região compreendendo os resíduos catalíticos de domínios UCH (PF00443) em ORFs preditas de *T. cruzi*. O alinhamento mostra a região dos resíduos catalíticos cisteína/histidina/histidina (C/H/H – realçados com um quadrado) característicos desse domínio. Os pontilhados localizados na porção N e C-terminal representam a porção extra-domínio da proteína. Os pontilhados dentro da seqüência divergem em tamanho de acordo com a entrada, sendo o menor correspondente à seqüência Tc00.1047053507053.100 (~280 aa) e o maior à Tc00.1047053509073.30 (~600 aa) – dados não mostrados. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB e os domínios conservados foram localizados utilizando a ferramenta BLASTp sob o modelo HMM do banco PFAM v23.0. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam posições em que todas as seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

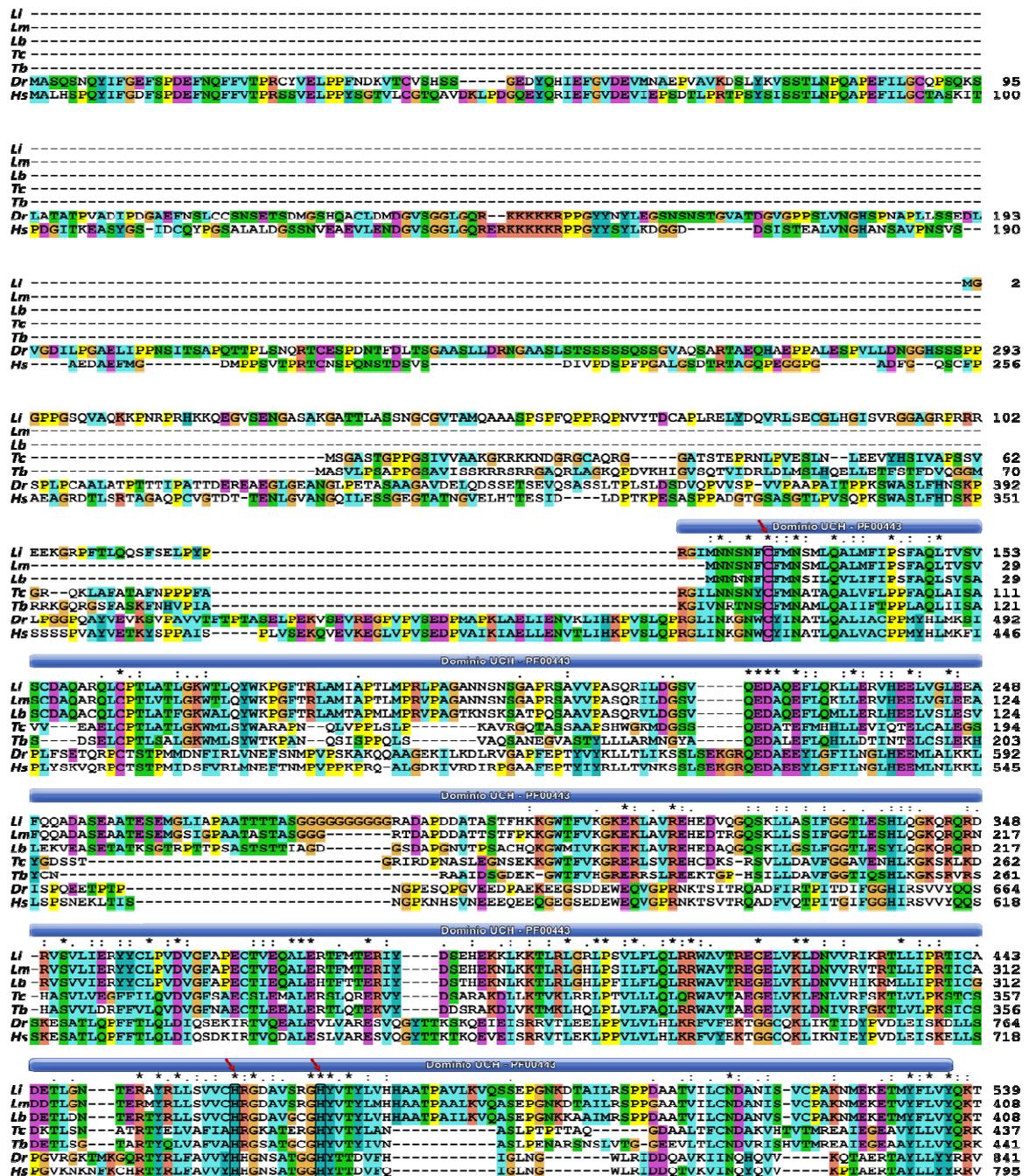


Figura 11: Alinhamento das ORFs previstas de USP10-símile em eucariotos. A caixa azul mostra a região compreendida pelo domínio UCH (PF00443). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053507507.40; Tb - *T. brucei*, Tb11.01.6080; Li - *L. infantum*, LinJ32_V3.1310; Lm - *L. major*, LmjF32.1250; Lb - *L. braziliensis*, LbrM32_V2.1400) e NCBI (Dr - *Danio rerio*, XP_685621.3; Hs - *Homo sapiens*, NP_005144.2). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam posições em que todas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

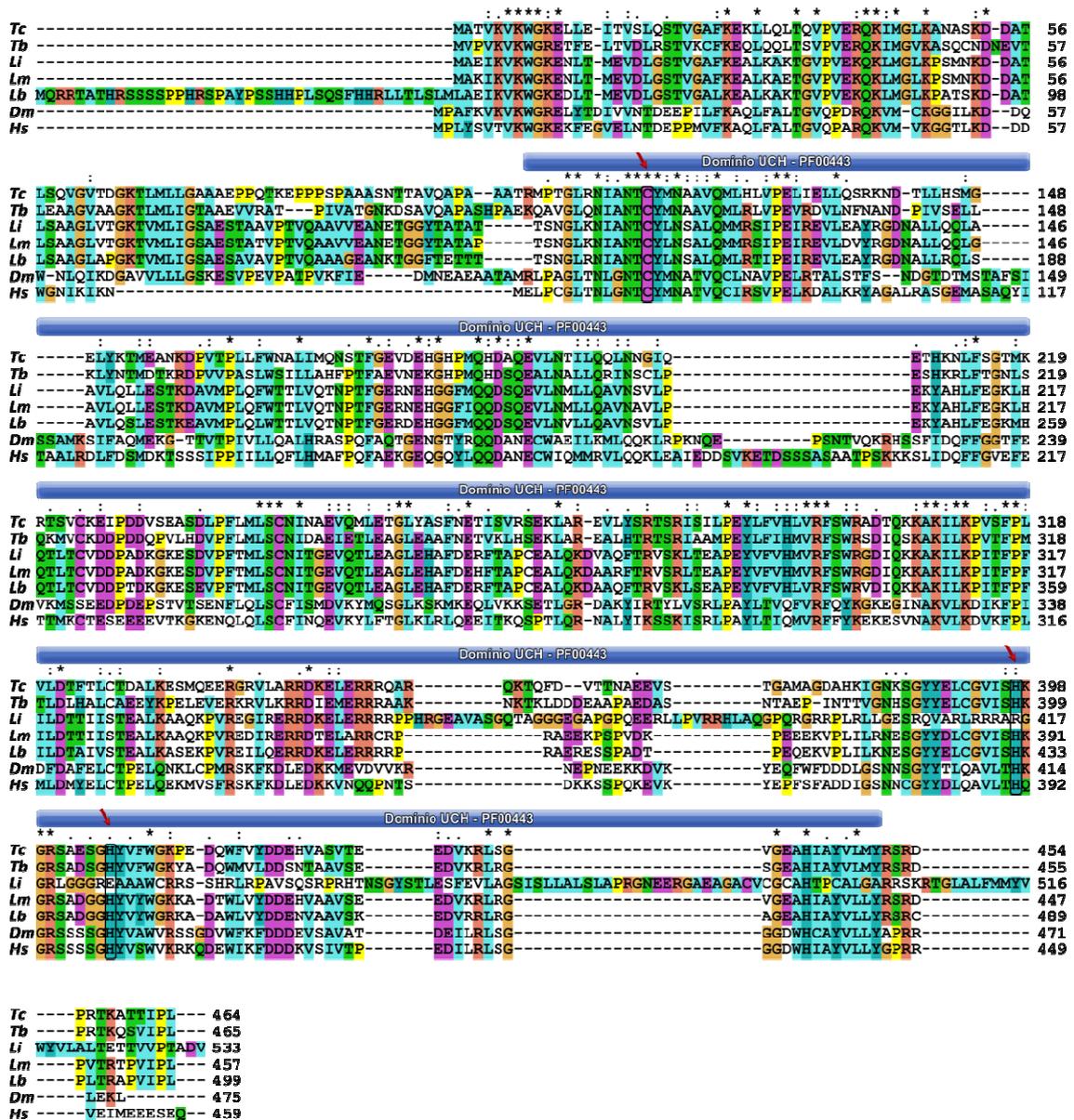


Figura 12: Alinhamento das ORFs preditas de USP14-símile em eucariotos. A caixa azul mostra a região compreendida pelo domínio UCH (PF00443). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053506569.10; Tb - *T. brucei*, Tb927.4.3790; Li - *L. infantum*, LinJ31_V3.0150; Lm - *L. major*, LmjF31.0140; Lb - *L. braziliensis*, LbrM31_V2.0140) e NCBI (Dm - *Drosophila melanogaster*, NP_609377.1; Hs - *Homo sapiens*, NP_001032411.1). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

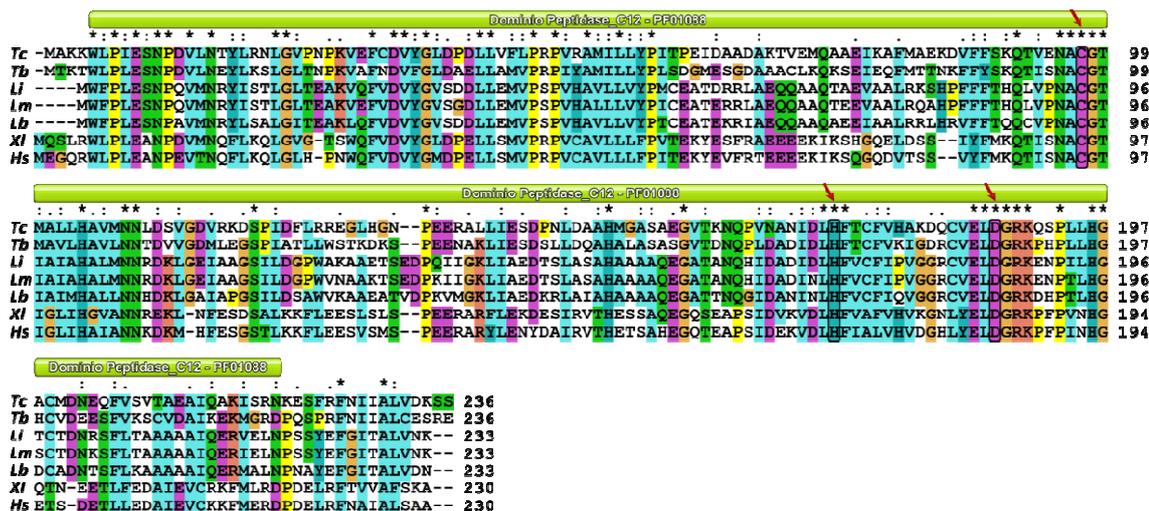


Figura 15: Alinhamento das ORFs preditas de UCH-L3-símile em eucariotos. A caixa verde mostra a região compreendida pelo domínio Peptidase_C12 (PF01088). As setas vermelhas, juntamente com os quadrados não preenchidos, indicam os resíduos da tríade catalítica. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (Tc - *T. cruzi*, Tc00.1047053504109.90; Tb - *T. brucei*, Tb11.03.0890; Li - *L. infantum*, LinJ25_V3.0190; Lm - *L. major*, LmjF25.0190; Lb - *L. braziliensis*, LbrM25_V2.0190) e NCBI (Xl - *Xenopus laevis*, NP_001088200.1; Hs - *Homo sapiens*, NP_005993.1). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas as sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

4.1.4. Subfamília JAMM em *T. cruzi*

A subfamília JAMM, cujos membros apresentam o domínio Mov34 (PF01398), possui 2 representantes no genoma do *T. cruzi*. Observa-se 6% de identidade entre seus membros, calculados pelo software ClustalW, como descrito em material e métodos.

Na figura 16 é mostrado que as sequências apresentam tamanhos variados, sendo 398 aa e 303 aa para as entradas Tc00.1047053507083.60 e Tc00.1047053506715.20 respectivamente. Também são mostradas regiões onde não há cobertura entre as sequências parálogas.

4.1.5. Subfamília otubaína em *T. cruzi*

Esta subfamília é compreendida por 3 membros que possuem o domínio OTU (PF02338). As ORFs preditas apresentam tamanhos variados (figura 17), com 654, 261 e 847 resíduos de aminoácidos para as entradas Tc00.1047053508301.10, Tc00.1047053508723.59 e Tc00.1047053508839.50, respectivamente.



Figura 16: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio Mov34 (PF01398) de *T. cruzi*. O alinhamento ressalta a baixa similaridade entre as sequências. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

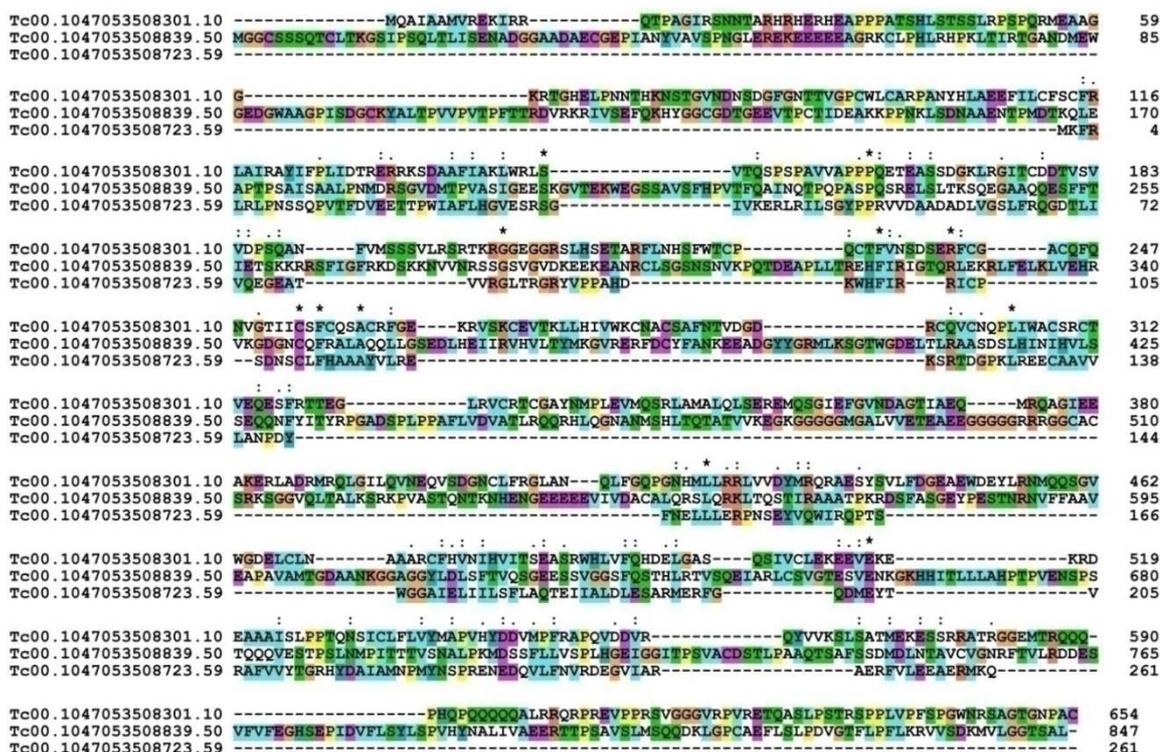


Figura 17: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio OTU (PF02338) de *T. cruzi*. O alinhamento ressalta a baixa cobertura entre as sequências. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org>). Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

4.1.6. Subfamília sentrina em *T. cruzi*

Observa-se uma única sequência previamente anotada do banco de dados GeneDB contendo o domínio Peptidase_C48 (PF02902), responsável pela remoção da ubiquitina-símile sentrina/Smt3.

A figura 18 mostra os resíduos da tríade catalítica característicos desta família, representados por uma histidina, seguido de um ácido aspártico, e por fim uma cisteína, nas posições 588, 605 e 680, respectivamente.

```
#HMM      1*->ewlndtvidfyklklaerleskdedsknervhffntfFyskLtklfkdFkkc
#MATCH      +wlnd+vi++yl ++ ++ + + + +k e v + + fF+  ++l +d+ k
#SEQ      498  QWLNDQVINAYLSMI-CDERNN-TSGKEEAVSLGTHFFARVEQELKGDLSKV

#HMM      kskkkfkegkklkdfyngvrrwtrkvnkkdlfdkDiiyiPinldgkHWvlli
#MATCH      + ++ +++++ + ++ ++r  +++      + +i+iP+nI + HW l++
#SEQ      VQLPSLQKDSGILRWLRRRRNILQPG-----ATRVILIPVNLSTHAWALVV

#HMM      InlpkpsctItilDSlislhtkesavkkqirpidnllpyLveeW..alkke
#MATCH      n + + t ++DS i ++ a + + i+++ l +e+W+ +++e+
#SEQ      FNWEVH---TWFYDHSYIRGKA---AMTRGILVLQQLSHVFLESWriLCDSE

#HMM      nkdlIpiskvqydltpfeierltkV.....PQQpnsGDCGiyv
#MATCH      + + l + + ++++++++ + + + PQQ+n +DCG++v
#SEQ      GGNA-----CHLADCKLVVAEPLrgnersydggfafaPQQSNLYDHSGVFV

#HMM      lkfiellaegvpqefsqakdltekdvdrfrkklavdiyeilrsrl<-*237
#MATCH      ++ + + +gv f+q +dv + r+ l +l+++
#SEQ      CHMAWCAVHG VATVFTQ-----EDVTAHRRALL----HELLCQK 719
```

Figura 18: Alinhamento da região do domínio Peptidase_C48 (PF02902) da entrada Tc00.1047053505193.40 de *T. cruzi* com seu correspondente HMM. Os domínios catalíticos estão realçados por quadrados nas posições H588/D605/C680 (considerando a posição na ORF completa). Os *matches* quando + representam a conservação da função do resíduo de aminoácido quando comparado a sequência (#SEQ) ao domínio conservado (#HMM) depositado no banco; quando há a repetição do aminoácido significa identidade entre os resíduos representados. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (#SEQ) e PFAM (#HMM), e o alinhamento foi obtido com o auxílio do software PFAM.

4.1.7. Subfamília autofagina em *T. cruzi*

A família das autofaginas, caracterizadas pela presença do domínio Peptidase_C54 (PF03416), é representada no genoma do parasito *T. cruzi* por 2 possíveis membros.

A figura 19 mostra a presença de uma díade catalítica nas posições C68/H234 para a sequência Tc00.1047053507017.150, e para a sequência Tc00.1047053511527.50 nas posições C97/H272, marcadas com um quadrado vazado na cor preta.

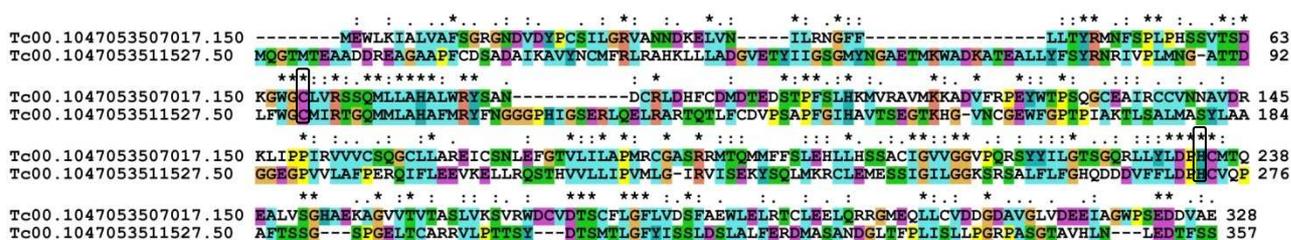


Figura 19: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio Peptidase_C54 (PF03416) de *T. cruzi*. O alinhamento ressalta a alta similaridade entre as sequências obtidas no banco, bem como a presença de regiões onde não há cobertura entre as parálogas. Estão marcados com um quadrado os resíduos catalíticos cisteína e histidina (C/H), característicos deste domínio. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as sequências, dois pontos (:) indicam posições em que todas as sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas sequências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

4.1.8. Subfamília PPPDE em *T. cruzi*

A subfamília PPPDE, é caracterizada pela presença do domínio DUF862 (PF05903), apresenta 5 possíveis membros no genoma do *T. cruzi*.

A árvore filogenética apresentada na figura 20 sugere a ocorrência de duplicações gênicas que resultaram em 3 clados distintos. A figura 21 mostra a ocorrência de diversas regiões onde não há pareamento entre as seqüências parálogas de PPPDE no *T. cruzi*. Observa-se também um melhor alinhamento na região N-terminal das proteínas, onde estão localizados os domínios conservados, enquanto a região C-terminal apresenta alto grau de diversificação.

As figuras 20 e 21 mostram a maior similaridade entre as sequências Tc00.1047053506755.50 e Tc00.1047053506755.90, as quais apresentam a relação ‘tamanho do domínio’/‘ORF completa’ maior que as outras entradas.

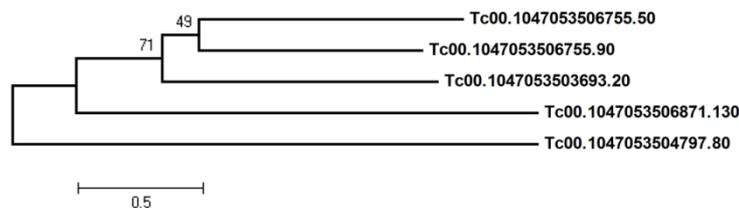


Figura 20: Árvore filogenética consenso baseada nas seqüências de aminoácidos que apresentam o domínio DUF862 (PF05903). A construção da árvore e a análise do “bootstrap” foram realizadas nos programas ClustalX 2.0 e MEGA 4.1. Para árvore consenso e confiabilidade dos ramos formados foi utilizado o teste de filogenia bootstrap, utilizando 2000 réplicas para cada seqüência. A barra representa o número de aminoácidos que foram substituídos de uma seqüência para outra. Os códigos de acesso referentes às seqüências foram obtidos no banco de dados GeneDB.

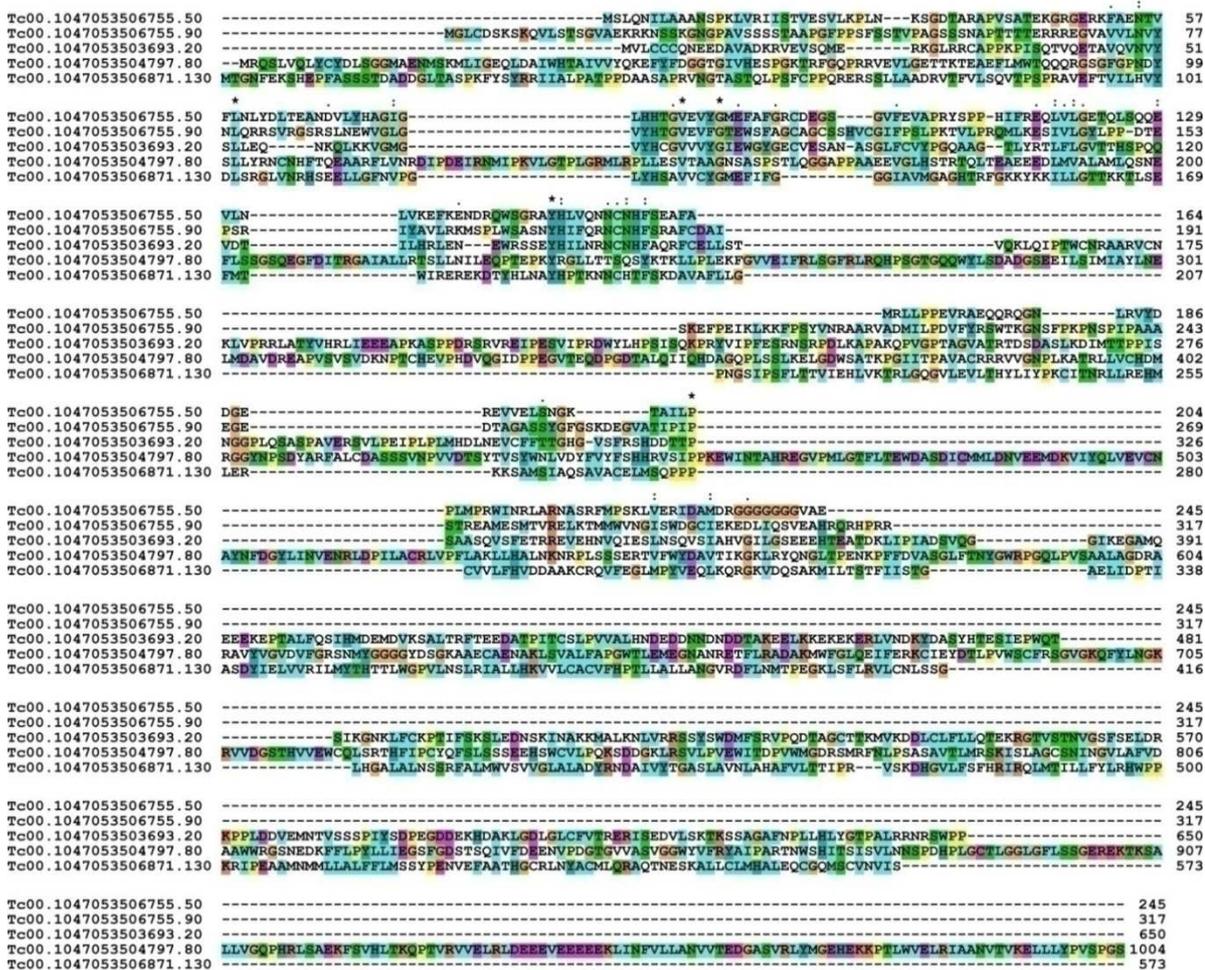


Figura 21: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras contendo o domínio DUF862 (PF05903) de *T. cruzi*. O alinhamento ressalta a diversidade entre as possíveis enzimas desubiquitinadora-símiles seqüências obtidas no banco GeneDB. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as seqüências obtidas no banco GeneDB. Os pontos (:) indicam posições em que todas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

4.1.9. Subfamília WLM em *T. cruzi*

A subfamília WLM, caracterizada pela presença do domínio WLM (PF08325), é representada no *T. cruzi* por apenas 1 membro, com o número de acesso Tc00.1047053507509.60 no banco de dados GeneDB.

A figura 22A mostra identidade entre o primeiro domínio e a sequência consenso depositada no banco de dados PFAM. Podemos notar um e-Value de 5.5e-52.

A figura 22B mostra que o segundo domínio apresenta e-Value de 2.3e-08.

A	
#HMM	1*->phvsnikalkilpLrkPdksrAldlLkrlAadpGvrpIMkehrfrVglLtEfyPrnpr
#MATCH	++++ ++l+ + +++++A++++r1 +I+ +h++++ L+EfyPr++r
#SEQ	12 STIGAATTLG----WAGDEYAREYMQRLLR--AHAILSAHNWKIRHLKEFYPR SAR
#HMM	vssrLLGLNvNkGekIeLRLRtpsddkgFLpyesImgTLLHELaHnvghpHDakFyal
#MATCH	LLGLNvN+G++++ R+R ps ++ FLp+++++T+LHELaH+ +++HD+ F+ l
#SEQ	----LLGLNVNRGDEVCFRFRAPSAKNTFLPFTDICTMLHELAHCRYSRHDKYFWGL
#HMM	ldeLekEveeLdarGytgtGdgFlstGrrlggrgvnygvPlslreaaereaeervldg
#MATCH	+++L E+e L++ G+ G+ +g ++ +
#SEQ	YSQLVTECEQLEV-GIA-----CGKIVGTASQQF-----
#HMM	tgleGgrrrLGRGnssvsrpkkaktkakkalrtklkkrriegekvkkEeggksvaksr
#MATCH	+++G+ +rLG G+ ++ p
#SEQ	-RFTGS-HRLG-GSGPSLHP-----
#HMM	vrsgasaRelaaeAAerRle<-*252
#MATCH	++ s+R+++a+AA +R++
#SEQ	-NCLTSMRKILADAALKRIQ 180
B	
#HMM	1*->phvsnikalkilpLrkPdksrAldlLkrlAadpGvrpIMkehrfrVglLtEfyPrnpr
#MATCH	+v+ ik+ + + A lL r1A+ pI++e++++V +L Ef P +
#SEQ	272 CAVQHIVVFG---AQTGNLSAHGLLGR LADV--LDPILRERGWQVICLNEFSPTTLT
#HMM	vs.....srLLGLNvNkGekIeLRLRtpsddkgFLpyesImgTLLHELaHnvghp
#MATCH	v++++ ++r ++ RLR+p+ +++FL++ ++ LH+LaH+v
#SEQ	VMsqgefidsRR-----AVLRVRLRSPNTPSEFLSFAYVCTAALHQLAHMVERH
#HMM	HDakFyalldeLekEveeLdarGytgtGdgFlstGrrlggrgvnygvPlslreaaere
#MATCH	H+ F++++ + ++L ++ + + + ++
#SEQ	HGVAFFEVVVSM LN--CCLMT-----EKVQEDVVMSEDIKGS L-----
#HMM	aeervldgtgleGgrrrLGRGnssvsrpkkaktkakkalrtklkkrriegekvkkEeg
#MATCH	++ ++r G G ++
#SEQ	--LQFTRRLE TILEDQ RGG-GKRP-----
#HMM	gksvaksrvrsgasaRelaaeAAerRle<-*252
#MATCH	+ s+ l a+ ++
#SEQ	-----LTMTSMHSLVADCGNVVKR 448

Figura 22: Alinhamento da região dos domínios WLM (PF08325) da entrada Tc00.1047053507509.60 de *T. cruzi* com seu correspondente HMM. Os matches quando + representam a conservação da função do resíduo de aminoácido comparando a sequência (#SEQ) ao domínio conservado (#HMM) depositado no banco; a repetição do aminoácido significa identidade entre as posições. A – primeiro domínio, apresentado pela sequência, com 169 aminoácidos, iniciando na posição 12 e terminando na posição 180 em relação à ORF completa; B – segundo domínio, apresentado pela sequência possuindo 177 aa, com início na posição 272 e término na posição 448 em relação à ORF completa. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (#SEQ) e PFAM (#HMM), e o alinhamento foi obtido com o auxílio do software PFAM.

4.1.10. DUBs e DUBs-símile no TriTryp

A tabela 5 mostra o repertório de DUBs em *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Podemos notar que *T. cruzi* apresenta o maior repertório de DUBs e *L. major* a menor, com 30 membros. Além disso, verificou-se também que não há representantes da subfamília Josephin (PF02099) no genoma destes parasitos. Também podemos observar que as espécies *L. braziliensis* e *L. chagasi* compartilham no menor número de membros da subfamília USP.

A espécie *L. braziliensis* apresenta o menor número de membros da subfamília PPPDE, contando com 4 membros, contra 5 das outras espécies analisadas. As subfamílias UCH, JAMM, Otubaina, Sentrina, Autofagina e WLM compartilham do mesmo número de membros entre essas espécies.

As tabelas 6 a 9 mostram os contigs correspondentes às subfamílias de DUBs e DUBs-símile, bem como seus PFAMs e *e-Values* correspondentes, nas espécies *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, e *T. brucei*.

Tabela 5: Número de contigs que possivelmente codificam para enzimas desubiquitinadoras e desubiquitinadoras-símile em diversos tripanosomatídeos. As sequências foram recuperadas do banco de dados geneDB.

Espécie Subfamília	<i>L. major</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>
USP	17	16	16	18	17
UCH	2	2	2	2	2
JAMM	2	2	2	2	2
Otubaina	3	3	3	3	3
Josephin	0	0	0	0	0
Sentrina	1	1	1	1	1
PPPDE	5	4	5	5	5
Autofagina	2	2	2	2	2
WLM	1	1	1	1	1
Total	33	31	32	34	33

Tabela 6: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *L. braziliensis*.

Domínio	Entrada	Pfam	e-Value Domínio
USP (16 entradas)	LbrM09_V2.0240	UCH (PF00443)	>2.5e-18 (PF00443)
	LbrM12_V2.0210	zf-UBP (PF02148)	
	LbrM15_V2.1240	ubiquitin (PF00240)	
	LbrM16_V2.0720		
	LbrM17_V2.1200		
	LbrM20_V2.3690		
	LbrM21_V2.0460		
	LbrM24_V2.0630		
	LbrM27_V2.1390		
	LbrM30_V2.1320		
	LbrM32_V2.1400		
	LbrM32_V2.3160		
	LbrM34_V2.1640		
	LbrM34_V2.2360		
	LbrM29_V2.2270		
	LbrM31_V2.0140		
UCH (1 entrada)	LbrM24_V2.0420	Peptidase_C12 (PF01088)	>9e-72
JAMM (2 entradas)	LbrM16_V2.0860	Mov34 (PF01398)	>2.9e-10
	LbrM26_V2.2360		
Otubaina (3 entradas)	LbrM16_V2.1440	OTU (PF02338)	>3.2e-17
	LbrM34_V2.1310		
	LbrM35_V2.6330		
Sentrin (1 entrada)	LbrM26_V2.1990	Peptidase_C48 (PF02902)	8.8e-08
Permuted papain fold peptidase (4 entradas)	LbrM09_V2.1350	DUF862 (PF05903)	>1.5e-17
	LbrM24_V2.0660		
	LbrM32_V2.1490		
	LbrM33_V2.2550		
Autophaginas (2 entradas)	LbrM30_V2.0280	Peptidase_C54 (PF03416)	>5.4e-15
	LbrM32_V2.4130		
WLM (1 entrada)	LbrM32_V2.1470	WLM (PF08325)	1.8e-26

Tabela 7: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *L. infantum*.

Domínio	Entrada	Pfam	e-Value Domínio
USP (16 entradas)	LinJ09_V3.0390	UCH (PF00443) zf-UBP (PF02148) ubiquitin (PF00240)	>9.6e-14 (PF00443)
	LinJ12_V3.0170		
	LinJ15_V3.1320		
	LinJ16_V30730		
	LinJ17_V3.1190		
	LinJ21_V3.0460		
	LinJ24_V3.0630		
	LinJ27_V3.1170		
	LinJ30_V3.1260		
	LinJ32_V3.1310		
	LinJ32_V3.3060		
	LinJ34_V3.3890		
	LinJ35_V3.1730		
	LinJ35_V3.2460		
LinJ29_V3.2410			
LinJ31_V3.0150			
UCH (2 entradas)	LinJ24_V3.0420	Peptidase_C12 (PF01088)	>7.0e-64
	LinJ25_V3.0190		
JAMM (2 entradas)	LinJ16_V30850	Mov34 (PF01398)	>8.7e-07
	LinJ26_V3.2450		
Otubaina (3 entradas)	LinJ16_V31460	OTU (PF02338)	>2.7e-22
	LinJ35_V3.1400		
	LinJ36_V3.6280		
Sentrin (1 entrada)	LinJ26_V3.2070	Peptidase_C48 (PF02902)	4e-05
Permuted papain fold peptidase (5 entradas)	LinJ09_V3.1360	DUF862 (PF05903)	>8.5e-14
	LinJ09_V3.1370		
	LinJ24_V3.0660		
	LinJ32_V3.1390		
	LinJ33_V3.2390		
Autophaginas (2 entradas)	LinJ30_V3.0270	Peptidase_C54 (PF03416)	>7.9e-15
	LinJ32_V3.4040		
WLM (1 entrada)	LinJ32_V3.1370	WLM (PF08325)	8e-31

Tabela 8: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *L. major*.

Domínio	Entrada	Pfam	e-Value Domínio
USP (17 entradas)	LmjF09.0240	UCH (PF00443) zf-UBP (PF02148) ubiquitin (PF00240)	>2.8e-17 (PF00443)
	LmjF12.0190		
	LmjF15.1300		
	LmjF16.0730		
	LmjF17.1090		
	LmjF21.0400		
	LmjF24.0620		
	LmjF27.1270		
	LmjF29.2300		
	LmjF30.1200		
	LmjF31.0140		
	LmjF32.1250		
	LmjF32.2910		
	LmjF34.4060		
	LmjF35.1740		
LmjF35.2410			
LmjF34.3280			
UCH (2 entradas)	LmjF24.0420	Peptidase_C12 (PF01088)	>2.5e-63
	LmjF25.0190		
JAMM (2 entradas)	LmjF16.0850	Mov34 (PF01398)	>5.7e-09
	LmjF26.2430		
Otubaina (3 entradas)	LmjF35.1390	OTU (PF02338)	>3.1e-16
	LmjF36.6020		
	LmjF16.1385		
Sentrin (1 entrada)	LmjF26.2070	Peptidase_C48 (PF02902)	1.9e-08
Permuted papain fold peptidase (5 entradas)	LmjF09.1300	DUF862 (PF05903)	>2.6e-15
	LmjF09.1310		
	LmjF24.0650		
	LmjF32.1330		
LmjF33.2260			
Autophaginas (2 entradas)	LmjF30.0270	Peptidase_C54 (PF03416)	>1.2e-14
	LmjF32.3890		
WLM (1 entrada)	LmjF32.1310	WLM (PF08325)	1.5e-31

Tabela 9: Entradas de enzimas desubiquitinadoras em *T. brucei*.

Domínio	Entrada	Pfam	e-Value Domínio
USP (17 entradas)	Tb09.160.4020	UCH (PF00443) zf-UBP (PF02148) ubiquitin (PF00240)	>6.4e-16 (PF00443)
	Tb09.211.4270		
	Tb09.211.4910		
	Tb10.70.5540		
	Tb11.01.4060		
	Tb11.01.6080		
	Tb11.02.2940		
	Tb11.46.0014		
	Tb927.3.4840		
	Tb927.4.3790		
	Tb927.5.2400		
	Tb927.6.1110		
	Tb927.6.2690		
	Tb927.8.5620		
	Tb11.01.7760		
	Tb09.160.2620		
	Tb927.4.1460		
UCH (2 entradas)	Tb11.02.2800	Peptidase_C12 (PF01088)	>5.8e-66
	Tb11.03.0890		
JAMM (6 entradas)	Tb09.160.0580	Mov34 (PF01398)	>8.1e-06
	Tb927.8.5530		
Otubaina (3 entradas)	Tb10.6k15.1750	OTU (PF02338)	>1.0e-19
	Tb927.5.1070		
	Tb927.8.5050		
Sentrin (1 entrada)	Tb09.160.0970	Peptidase_C48 (PF02902)	5.0e-10
Permuted papain fold peptidase (5 entradas)	Tb09.160.2050	DUF862 (PF05903)	>1.8e-18
	Tb11.01.5020		
	Tb11.01.5070		
	Tb11.01.6150		
	Tb11.02.2980		
Autophaginas (2 entradas)	Tb11.01.7970	Peptidase_C54 (PF03416)	>7.3e-14
	Tb927.6.1690		
WLM (1 entrada)	Tb11.01.6130	WLM (PF08325)	1.5e-54

4.1.12. Membros das subfamílias UCH/JAMM/OTU no TriTryp

A Figura 24A, B e C, mostram respectivamente a identidade entre os membros das subfamílias UCH, JAMM e OTU entre seus parálogos e ortólogos.

A subfamília UCH apresenta dois parálogos em cada um dos genomas estudados. Podemos notar que a identidade compartilhada entre os parálogos de *T. cruzi* foi de 15%. Este mesmo padrão foi encontrado para as espécies de *Leishmania* estudadas, com 5, 19 e 18% para *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, respectivamente. Em *T. brucei*, a identidade detectada foi de 21%. Além disso, também foi possível evidenciar que a identidade compartilhada entre os ortólogos foi de 43 a 97%.

A família JAMM também possui dois membros em cada um dos genomas estudados. A análise comparada entre os parálogos de *T. cruzi* mostram uma identidade de 6%. Este mesmo padrão foi encontrado para as espécies de *Leishmania* estudadas, com 9, 11 e 10% para *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. major*, respectivamente. Em *T. brucei* a identidade detectada foi de 9%. Entre os seus respectivos ortólogos, a identidade compartilhada variou de 31 a 93%.

A família OTU possui três membros em cada um dos genomas estudados. A análise comparada entre os parálogos de *T. cruzi* mostram uma identidade de 5, 11 e 10%. Este mesmo padrão foi encontrado para as espécies de *Leishmania* estudadas, com 7, 11 e 12% para *L. braziliensis*, 7, 11 e 12% para *L. infantum* e para *L. major*, 9, 10, 11%, respectivamente. Em *T. brucei* a identidade detectada foi de 9, 10 e 11%. Entre os seus respectivos ortólogos, a identidade compartilhada variou de 23 a 93%.

A- Subfamília UCH (domínio Peptidase_C12)

	Tc00.1047053 419703.20	Tc00.1047053 504109.90	Tb11.02.2800	Tb11.03.0890	LbrM24_V2.0 420	LbrM16_V2.0 860	LinJ24_V3.04 20	LinJ25_V3.01 90	LmjF24.0420	LmjF25.0190
Tc00.1047053419703.20	100									
Tc00.1047053504109.90	15	100								
Tb11.02.2800	65	19	100							
Tb11.03.0890	15	57	21	100						
LbrM24_V2.0420	50	20	50	22	100					
LbrM16_V2.0860	8	8	8	6	5	100				
LinJ24_V3.0420	50	19	50	22	91	10	100			
LinJ25_V3.0190	12	43	21	43	23	9	19	100		
LmjF24.0420	51	19	50	23	92	9	97	19	100	
LmjF25.0190	12	43	21	43	23	6	17	92	18	100

B- Subfamília JAMM (domínio Mov34)

	Tc00.1047053 507083.60	Tc00.1047053 506715.20	Tb09.160.058 0	Tb927.8.5530	LbrM16_V2.0 860	LbrM26_V2.2 360	LinJ16_V3085 0	LinJ26_V3.24 50	LmjF16.0850	LmjF26.2430
Tc00.1047053507083.60	100									
Tc00.1047053506715.20	6	100								
Tb09.160.0580	9	62	100							
Tb927.8.5530	47	11	9	100						
LbrM16_V2.0860	32	12	10	31	100					
LbrM26_V2.2360	11	32	32	12	9	100				
LinJ16_V30850	33	12	10	30	78	13	100			
LinJ26_V3.2450	13	34	25	13	5	70	11	100		
LmjF16.0850	33	10	11	30	78	14	93	12	100	
LmjF26.2430	9	43	38	8	11	72	11	87	10	100

C- Subfamília Otubaína (domínio OTU)

	Tc00.1047053 508301.10	Tc00.1047053 508723.59	Tc00.1047053 508839.50	Tb10.6k15.175 0	Tb927.5.1070	Tb927.8.5050	LbrM16_V2.1 440	LbrM34_V2.1 310	LbrM35_V2.6 330	LinJ16_V3146 0	LinJ35_V3.14 00	LinJ36_V3.62 80	LmjF35.1390	LmjF36.6020	LmjF16.1385
Tc00.1047053508301.10	100														
Tc00.1047053508723.59	10	100													
Tc00.1047053508839.50	11	5	100												
Tb10.6k15.1750	9	58	10	100											
Tb927.5.1070	30	12	7	9	100										
Tb927.8.5050	11	6	25	10	11	100									
LbrM16_V2.1440	14	10	23	8	10	19	100								
LbrM34_V2.1310	32	7	12	13	27	11	12	100							
LbrM35_V2.6330	12	54	5	49	8	9	7	11	100						
LinJ16_V31460	14	9	21	8	10	24	60	12	5	100					
LinJ35_V3.1400	32	12	12	12	29	11	14	70	12	12	100				
LinJ36_V3.6280	10	53	13	46	10	5	9	11	65	7	11	100			
LmjF35.1390	31	12	14	10	29	11	10	69	12	12	93	11	100		
LmjF36.6020	8	53	10	47	10	4	10	7	64	9	9	83	10	100	
LmjF16.1385	11	8	13	9	9	15	44	10	6	64	10	11	9	11	100

Figura 24: Percentual de identidade entre membros das subfamílias UCH, JAMM e OTU. A identidade foi determinada utilizando o *software* ClustalW, como descrito em material e métodos. Em A- membros da subfamília UCH que apresentam o domínio Peptidase_C12 (PF01088); B- membros da subfamília JAMM que apresentam o domínio Mov34 (PF01398); e C- membros da subfamília Otubaína que apresentam o domínio OTU (PF02338). Os números de entrada foram obtidos do banco de dados GeneDB.

4.1.13. DUBs-símile específicas para NEDD8/Smt3 no TriTryp

Foi encontrado uma única sequência previamente anotada do GeneDB para os genomas dos tripanossomatídeos relacionadas com a remoção de sentrina/Smt3 – chamadas enzimas ULP.

A figura 24 mostra a árvore filogenética feita com diversos membros da subfamília sentrina em eucariotos. Os membros encontrados nos tripanossomatídeos são mostrados em clados próximos a ULP1-símiles.

O alinhamento entre as ortólogas (figura 25) mostra que a região N-terminal varia entre os tripanossomatídeos, e a espécie *L. braziliensis* apresenta uma extensão N-terminal de 37 aminoácidos na ORF predita quando comparado com *L. major* e *L. Infantum*. Em relação a *T. cruzi* e *C. elegans* esta extensão é de 71 e 70 aminoácidos, respectivamente. Entre *D. melanogaster*, *G. gallus*, *S. parvum* e *S. cerevisiae*, a identidade compartilhada esta centrada na região C-terminal, próxima ao domínio típico desta família de proteínas. Também ficou evidenciado algumas inserções nas posições 610-660, 830-862 e 1270-1345 em relação às sequências comparadas do gênero *Leishmania*.

4.1.14. DUBs-símile específicas para Atg8 e/ou Atg12 no TriTryp

Foram encontradas duas sequências previamente anotadas no GeneDB para os genomas de cada tripanosomatídeo relacionadas com a remoção de Atg8/Atg12. O alinhamento entre as ortólogas mostra que a região C-terminal é variável entre *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum* quando comparado a *T. cruzi* e *T. brucei*. Também ficou evidenciado a presença de uma inserção na posição 485-515 em relação às sequências comparadas, bem como uma deleção na posição 210-235, conforme apresentado pela figura 27. Também é observado a presença de um braço na porção C-terminal na sequência LbrM30_V2.0280 que não apresenta cobertura com seus parálogos.

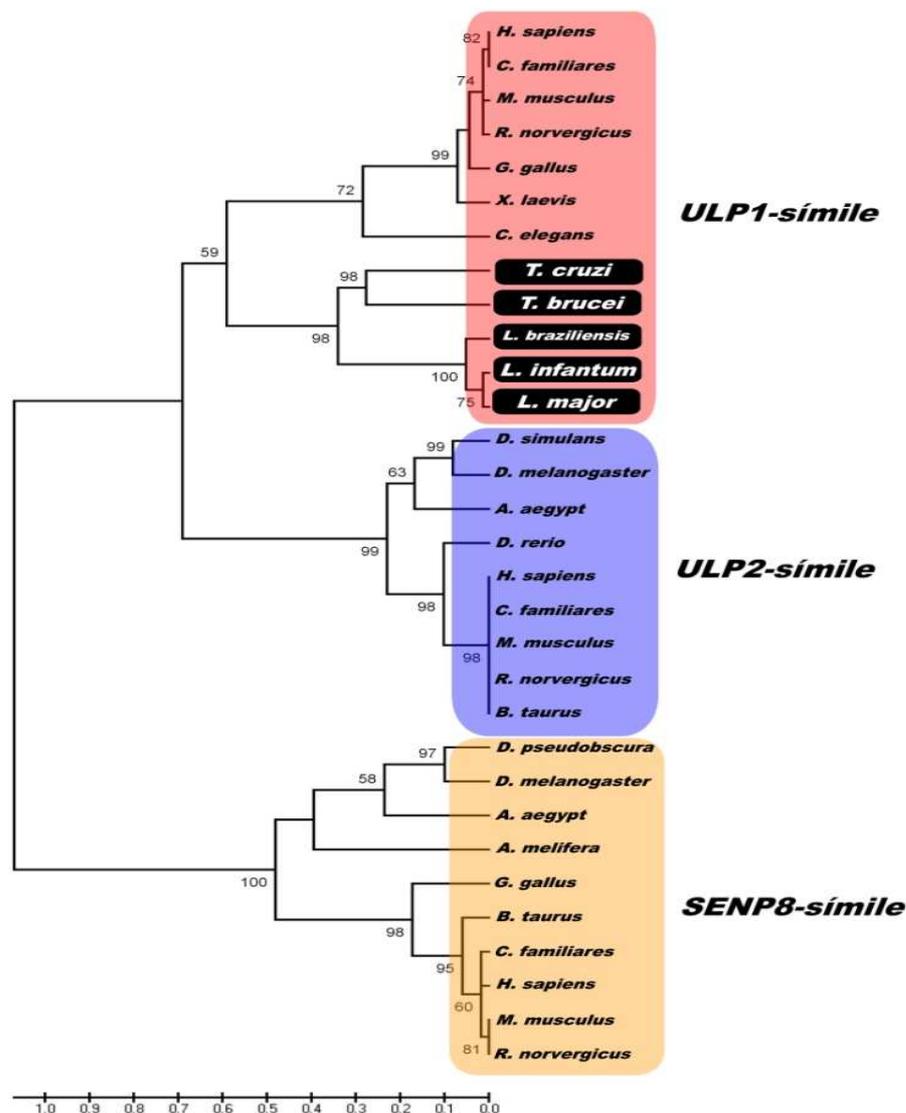


Figura 25: Alinhamento das ORFs previstas de possíveis enzimas desubiquitinadoras da subfamília sentrina/Smt3. O alinhamento ressalta a alta cobertura em determinadas regiões das seqüências obtidas nos bancos, bem como a presença de regiões onde quase não há cobertura entre as ortólogas. As entradas para as seqüências de ULP1-símile são: *H. sapiens* - NP_001070671.1; *Canis familiares* - XP_545077.2; *Mus musculus* - NP_001003971.1; *Rattus norvegicus* - NP_001099358.1; *Gallus gallus* - XP_001232523.1; *Xenopus laevis* - NP_001082507.1; *Caenorhabditis elegans* - NP_498095.3; *Trypanosoma cruzi* - Tc00.1047053505193.40; *Trypanosoma brucei* - Tb09.160.0970; *Leishmania braziliensis* - LbrM26_V2.1990; *Leishmania infantum* - LinJ26_V3.2070; *Leishmania major* - LmjF26.2070. As entradas para as seqüências de ULP2-símile são: *Drosophila simulans* - XP_002077300.1; *Drosophila melanogaster* - NP_572827.1; *Aedes aegypti* - XP_001653149.1; *Danio rerio* - CAM56615.1; *Homo sapiens* - NP_055369.1; *Canis familiares* - XP_534823.2; *Mus musculus* - NP_659100.1; *Rattus norvegicus* - XP_217046.4; *Bos taurus* - NP_001095358.1. Já as entradas para as seqüências caracterizadas como SENP8-símile são: *Drosophila pseudoobscura* - XP_001360346.2; *Drosophila melanogaster* - NP_610763.1; *Aedes aegypti* - XP_001650938.1; *Apis mellifera* - XP_001122332.1; *Gallus gallus* - XP_413710.1; *Bos taurus* - XP_001250987.1; *Canis familiares* - XP_544756.1; *Homo sapiens* - NP_660205.2; *Mus musculus* - NP_082114.1; *Rattus norvegicus* - NP_001012355.1.

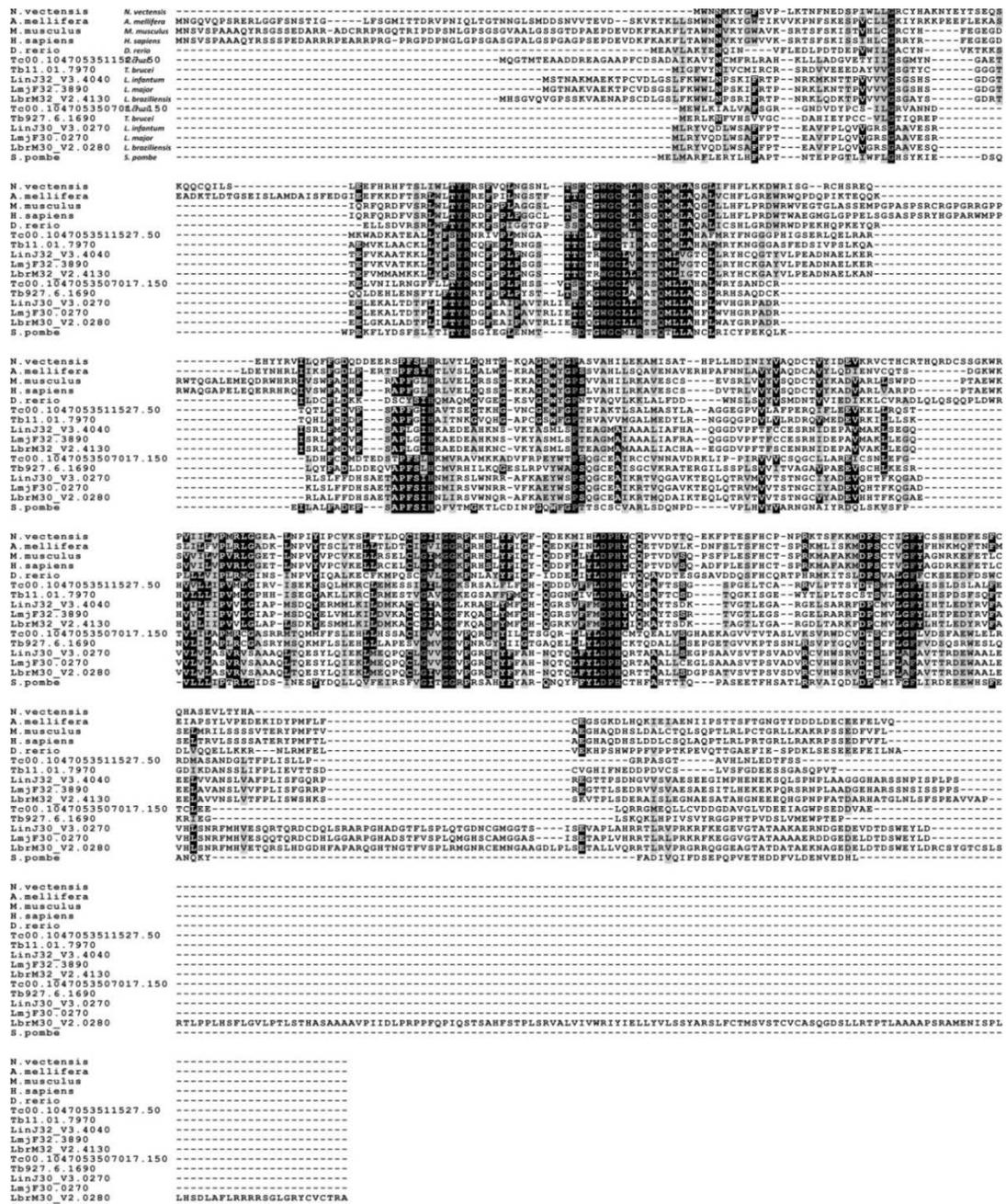


Figura 27: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras da subfamília autofagica. O alinhamento ressalta a alta cobertura em determinadas regiões das seqüências obtidas nos bancos, bem como a presença de regiões onde quase não há cobertura entre as ortólogas. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (*T. cruzi* - Tc00.1047053507509.60; *T. brucei* - Tb11.01.6130; *L. infantum* - LinJ32_V3.1370; *L. major* - LmjF32.1310; *L. braziliensis* - LbrM32_V2.1470) e NCBI (*O. sativa* - NP_001057027.1; *S. cerevisiae* - YHR134W; *P. falciparum* - PF10_0092). As cores indicam similaridade (cinza claro) e identidade (cinza escuro) entre os aminoácidos das seqüências analisadas. Os asteriscos (*) indicam conservação do resíduo de aminoácido em todas as seqüências, dois pontos (:) indicam posições em que todas as seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas muito similares, e um ponto (.) indica posições em que algumas seqüências apresentam resíduos de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes.

4.1.15. Subfamília PPPDE no TriTryp

Como mostrado na tabela 5, *L. braziliensis* possui 4 parálogos para PPPDE, enquanto os demais genomas analisados apresentam 5 membros. Sendo assim, podemos observar na figura 28 que *L. braziliensis* não apresenta ortólogos correspondentes às entradas LinJ09_V3.1370 e LmjF09.1310.

A árvore filogenética representada na figura 28 mostra a divisão desta subfamília em dois clados principais quando as sequências são submetidas à comparação. Os membros pertencentes ao clado superior apresentam os respectivos ortólogos entre os tripanossomatídeos analisados, enquanto os membros do clado inferior sugerem que as sequências de *T. cruzi* são mais relacionadas com *T. brucei* do que com as espécies do gênero *Leishmania* analisadas, sendo o inverso desta afirmação verdadeiro.

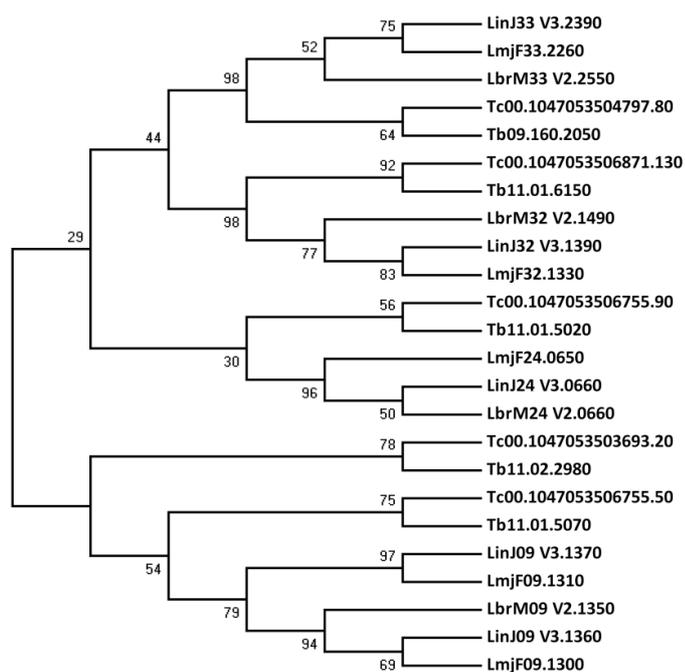


Figura 28: Árvore filogenética consenso baseada nas sequências de aminoácidos que apresentam o domínio DUF862 (PF05903) em 5 diferentes tripanossomatídeos. A construção da árvore e a análise do “bootstrap” foram realizadas nos programas ClustalX 2.0 e MEGA 4.1. Para árvore consenso e confiabilidade dos ramos formados foi utilizado o teste de filogenia bootstrap, utilizando 2000 réplicas para cada sequência. As sequências iniciadas pelas siglas Lbr, Lin, Lmj, Tc e Tb correspondem respectivamente às espécies *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei*. Os códigos de acesso referentes às sequências foram obtidos no banco de dados GeneDB.

4.1.18. Proteases com domínio WLM no TriTryp

A figura 29 mostra um alinhamento entre as proteases com domínio WLM em diversos tripanossomatídeos. Podemos notar uma extensão de 35 e 32 aminoácidos em *T. brucei* e *T. cruzi* respectivamente, quando comparado a *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*. Estas extensões também estão presentes na região C-terminal. Além disso, há inserções nas posições 217-233, 265-285, 317-345 e 430-447.

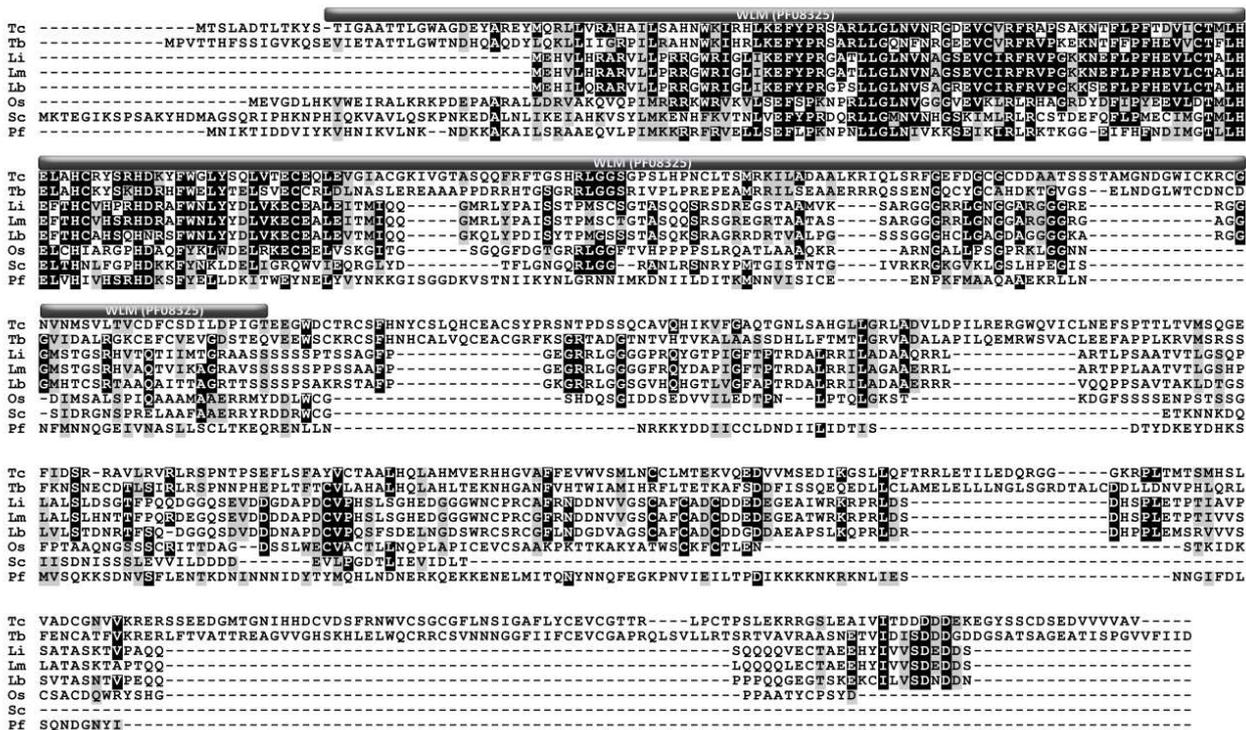


Figura 29: Alinhamento das ORFs preditas de possíveis enzimas desubiquitinadoras da subfamília WLM. O alinhamento ressalta a alta cobertura em determinadas regiões das seqüências obtidas nos bancos, bem como a presença de regiões onde quase não há cobertura entre as ortólogas. As entradas foram obtidas no banco de dados GeneDB (*T. cruzi* - Tc00.1047053507509.60; *T. brucei* - Tb11.01.6130; *L. infantum* - LinJ32_V3.1370; *L. major* - LmjF32.1310; *L. braziliensis* - LbrM32_V2.1470) e NCBI (*O. sativa* - NP_001057027.1; *S. cerevisiae* - YHR134W; *P. falciparum* - PF10_0092). As cores indicam similaridade (cinza claro) e identidade (cinza escuro) entre os aminoácidos das seqüências analisadas.

4.2. Parte II – Validação experimental

4.2.1. Determinação do perfil de expressão dos genes

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), conforme o manual do fabricante. A reação de PCR quantitativo foi conduzida conforme programação contida no aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems). Através dos gráficos das figuras 30, podemos verificar que os genes *UCH-L3* e *Tc-USP7* são mais abundantes quando comparado aos genes *Tc-USP10*, *-14* e *-15*. Também podemos notar que esses genes são mais abundantes na cepa Berenice-78 em relação às demais cepas em estudo. Todas as análises comparativas foram feitas em relação ao gene constitutivo HGPRT.

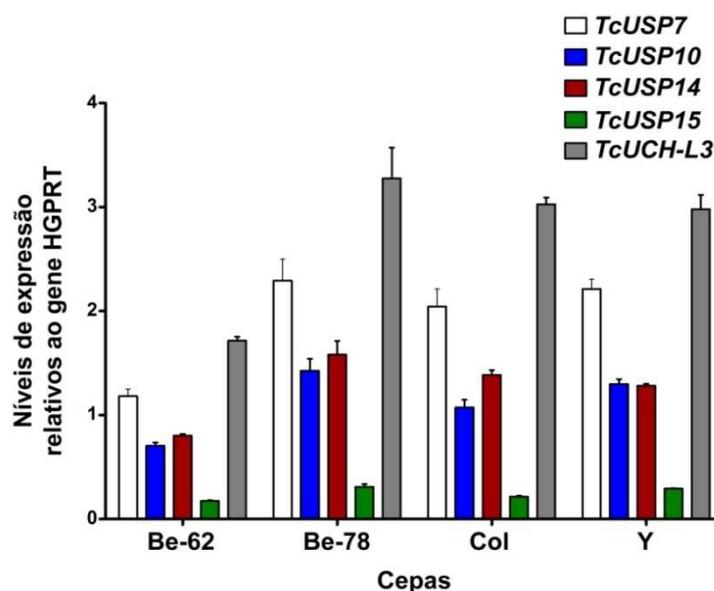


Figura 30: Níveis de expressão relativo de genes em formas epimastigotas de cepas do *T. cruzi*. São avaliadas as expressões relativas dos genes *TcUSP7*, *TcUSP10*, *TcUSP14*, *TcUSP15* e *TcUCH-L3*. Para o cálculo dos níveis relativos de expressão foi utilizado o método do $2^{-\Delta Ct}$, tendo como normalizador o gene HGPRT. Be-62 – Cepa Berenice-62; Be-78 – Cepa Berenice-78; Col – Cepa Colombiana; Y – Cepa Y.

4.2.2. Conjugados ubiquitinados e sumorilados

A figura 31A mostra o perfil em gel 1D de proteínas citosólicas e nucleares de epimastigotas das cepas em estudo. Em 31B e 31C a hibridização com anticorpo anti-ubiquitina e anti sumo-1. Os resultados mostram que nos dois compartimentos existem diferentes proteínas modificadas por ubiquitina e sumo.

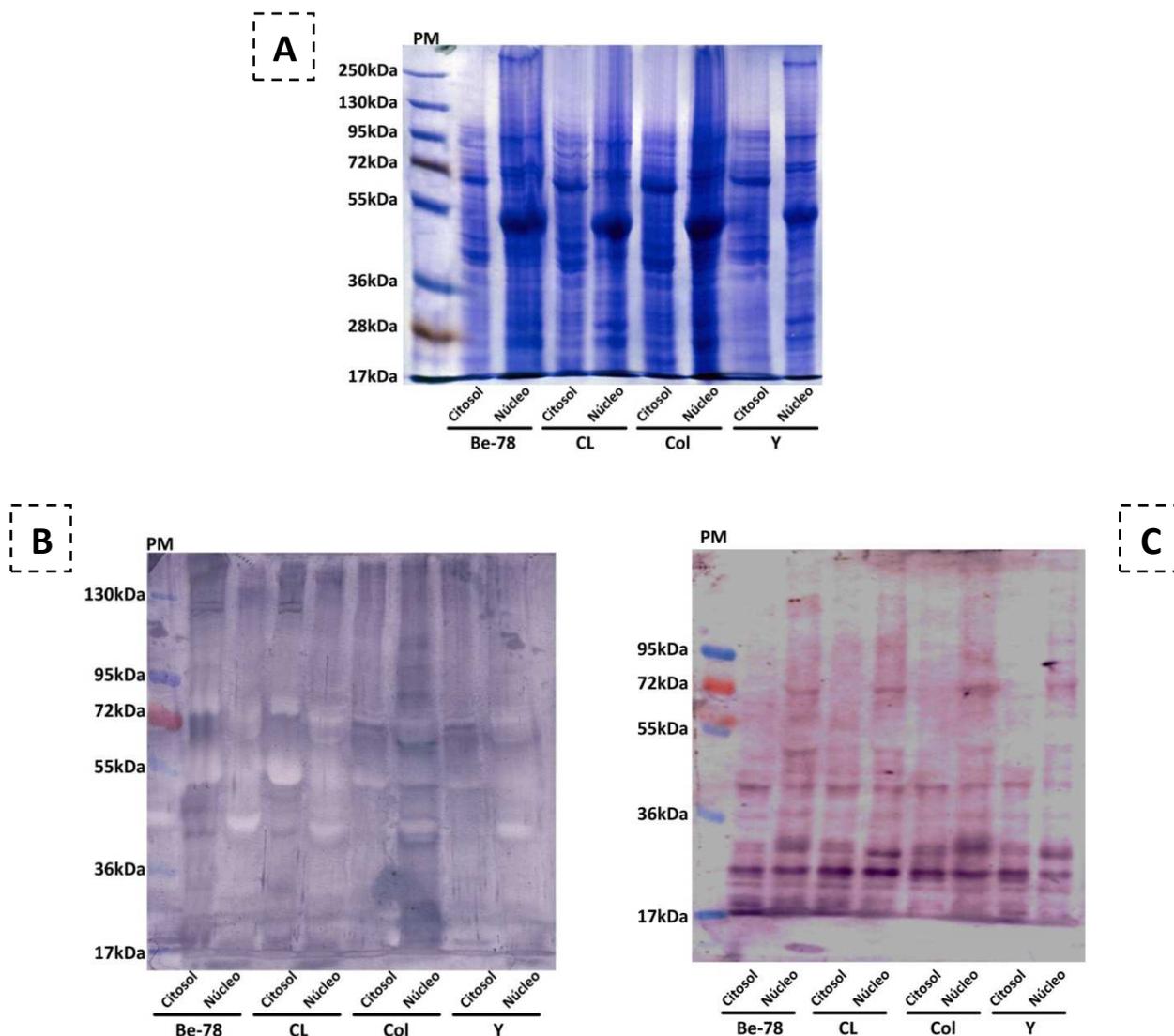


Figura 31: Detecção de conjugados protéicos modificados com ubiquitina e SUMO. Em A, as bandas protéicas (30 μ g de proteínas) após eletroforese em gel de acrilamida a 10% foram coradas com azul de Coomassie. Em B e C, as bandas protéicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e a seguir incubadas com anticorpos anti-ubiquitina humana e anti-SUMO1 de cabra, respectivamente, e posteriormente revelados como descrito em material e métodos. PM- padrão de peso molecular.

4.2.3. Determinação da atividade desubiquitinadora total

A figura 32 mostra o resultado da atividade DUB total. É observado que as cepas Be-62 e Y apresentaram níveis similares, enquanto a cepa Be-78 apresenta a maior atividade, sendo esta cerca de 2 vezes maior quando comparada a cepa CL. A cepa Colombiana apresenta nível intermediário entre as cepas Y e Be-78.

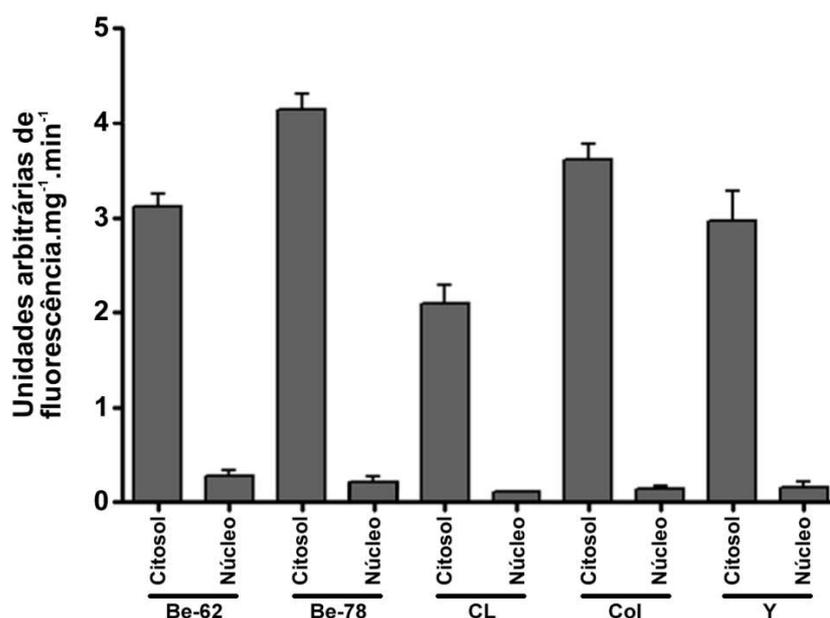


Figura 32: Atividade desubiquitinadora em frações citosólicas e nucleares em formas epimastigota de cepas do *T. cruzi*. 20µg do extrato bruto obtido como descrito em material e métodos foram utilizados em cada experimento. Como substrato foi utilizado o peptídeo (Cbz-Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina). Estes valores são resultados de no mínimo três experimentos independentes para cada situação apresentada.

5. DISCUSSÃO

A conclusão recente de vários projetos genoma de tripanossomatídeos oferece novas oportunidades de estudo de vias de modificação pós-traducionais nestes parasitos. A ênfase deste trabalho foi o *T. cruzi*, o agente causador da tripanossomíase americana, também chamada de doença de Chagas, cujo genoma foi concluído em 2005. O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, incluindo duas formas replicativas, as epimastigotas, presentes no intestino do inseto vetor, e as amastigotas, a forma intracelular em mamíferos infectados; e duas formas infectivas, não-replicativas, a tripomastigota metacíclica no inseto vetor e tripomastigota sanguíneo, liberado para a corrente sanguínea a partir de células infectadas no mamífero. As transições entre os hospedeiros, bem como as mudanças no ambiente são acompanhadas de extensas mudanças metabólicas e morfológicas do parasito (El-Sayed e cols, 2005).

Neste sentido, a nossa hipótese de trabalho é que, as modificações pós-traducionais de proteínas dependentes de ubiquitina e outras proteínas similares podem ser um dos mecanismos utilizados por este parasito que, possivelmente, estariam influenciando comportamentos biológicos, tais como taxa de crescimento, patogenicidade e susceptibilidade a drogas. De modo a estabelecer estas correlações, neste trabalho utilizamos duas abordagens: uma análise *in silico* e a caracterização molecular de algumas enzimas.

A ubiquitina é uma proteína altamente conservada onde sua conjugação a proteína alvo atua como sinal para a alteração da localização ou da função de proteínas e ou atua regulando a interação proteína-proteína. A conjugação de uma única ubiquitina à proteína alvo, a ubiquitinação, é requerida para vários processos, tais como eliminação de proteínas anormais, progressão do ciclo celular, transdução de sinal, ativação da transcrição, apresentação de antígeno, regulação da expressão gênica, modificações de receptores de superfície celular e reparo de DNA (Hernebring e cols, 2006; Glickman e Ciechanover, 2002).

Até o momento são conhecidos vários parálogos de ubiquitina em eucariotos superiores, dos quais destacam-se: SUMO/Smt3, NEDD8, Atg8. Dados de genômica comparada sugerem que a maioria dos apicomplexos possuem todos os tipos de parálogos de ubiquitina (Ponder e Bogyo, 2007; Horrocks e Newbold, 2000).

As DUBs possuem duas funções importantes: a primeira delas é responsável pela formação do *pool* livre de ubiquitina na célula, seja pela hidrólise de ligações

específicas no precursor de poliubiquitina, seja pela reciclagem das cadeias de ubiquitina ligadas aos substratos que são endereçados ao proteassoma. Nesta função, as DUBs estão associadas com subunidades do proteassoma (Borodovsky e cols, 2001; Verma e cols, 2002). Uma segunda função importante das DUBs está associada com o controle e degradação de proteínas de membrana via tráfico para o vacúolo/lisossoma (Haglund e cols, 2003; Hicke e cols, 2003; Kato e cols, 2000, Mizuno e cols, 2005).

Além disso, DUBs símile também apresentam papéis importantes na biologia celular eucariótica. Neste sentido, diversos relatos colocam SUMO em evidência como participante de um mecanismo emergente que permite o controle da atividade transcricional. Estudos envolvendo receptores nucleares, e a proteína Sp3 indicam que essas proteínas possuem um domínio chamado SC (*Sinergy Control*), que apresenta homologia de sequência com o sítio de sumorilação Ψ kxE (Iniguez-Lluhi e Pearce, 2000). Esses estudos também indicam que a mutação de cada um dos aminoácidos do sítio de sumorilação, leva a uma abolição da repressão, sugerindo que a sumorilação (ou ligação da Ubc9) está mecanisticamente envolvida na repressão (Yang e cols, 2002). O mecanismo, pelo qual SUMO inibe a transcrição, ainda não está completamente elucidado, mas um possível modelo é que a modificação por SUMO pode promover ou inibir as interações proteína-proteína e desta forma regular a montagem de complexos transcricionais (Verger e cols, 2003).

Devido ao fato da via de sumorilação estar envolvida em importantes aspectos da fisiologia celular, incluindo transcrição de genes, mitose, localização sub-celular, transporte núcleo-citoplasma e regulação da estabilidade protéica (Verger e cols, 2003), esta via pode ter um papel importante em *T. cruzi*, uma vez que o controle do mecanismo da expressão gênica é feito em sua maioria a nível pós-transcricional ou pós-traducional (Elias, 2001). Estes parasitos necessitam adaptar-se rapidamente às transições entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero fazendo uma reprogramação na expressão de seus genes (Teixeira e Darocha, 2003). Durante este processo muitas alterações podem estar associadas à seleção de proteínas estágio-específicas para a marcação com ubiquitina ou proteínas similares, contribuindo tanto para a estabilização como para o endereçamento correto de proteínas durante um ciclo biológico completo (De Diego e cols, 1996; Gonzalez e cols, 1997).

Similar ao mecanismo da desubiquitinação, o processo de sumorilação é reversível, mediado por um conjunto de proteases de SUMO, que apresentam duas funções nesse processo: estas removem SUMO das proteínas, fornecendo também uma fonte de SUMO livre para ser usada para conjugação a outras proteínas. A proteína SUMO em sua forma livre é gerada tanto da clivagem do pequeno peptídeo da porção C-terminal da pré-proteína quanto pela reciclagem de conjugados de SUMO com outras proteínas. De qualquer forma, ambas as fontes de SUMO livre são importantes para a manutenção dos níveis normais de SUMO intracelulares (Kurepa e cols, 2003; Johnson e cols, 1997).

Nos diversos organismos estudados, a subfamília USP está presente em grande número, sendo considerada a maior classe das DUBs (Hu e cols, 2002). Em *Schizosaccharomyces pombe* existem no mínimo 18 enzimas desubiquitinadoras (Stone e cols, 2004) e, no genoma de *Saccharomyces cerevisiae* aproximadamente 17 dessas enzimas podem ser encontradas (Amerik e cols, 2000), sendo que somente uma é ubiquitina C-terminal hidrolase (UCH) (Johnston e cols, 1999). Em *H. sapiens*, durante o projeto genoma humano, foram sequenciadas mais de 90 enzimas desubiquitinadoras e 80% delas pertencem à subfamília USP (Hu e cols, 2002).

A disponibilidade de dados de análises em larga escala de genomas e transcriptomas de parasitos têm possibilitado o uso de ferramentas de bioinformática no sentido da reconstituição de vias metabólicas. Estas estratégias vêm contribuindo tanto para um melhor entendimento da biologia celular de parasitos de grande impacto epidemiológico, como por exemplo o *T. cruzi*, e podem fornecer novas abordagens para o entendimento da patologia associada (El-Sayed e cols., 2005).

Como apresentado pela figura 9, a subfamília USP de proteínas é a que apresenta o maior número de membros, sugerindo que a grande diversidade pode ter relação com a especificidade das ligações. De fato, quando consideramos os principais resíduos potenciais para modificação envolvendo o substrato alvo e resíduos internos de lisina (K29, K48 e K63) e considerando a especificidade de enzimas com seus substratos, a diversidade desta sub-família de proteases em *T. cruzi* pode estar relacionada com estes mecanismos (Peng e cols, 2003; Pickart e Fushman, 2004).

Considerando outros modelos como humanos e protozoários intracelulares apicomplexos, também fica ressaltada a diversidade desta família (Ponts e cols, 2008).

Vale a pena ressaltar que esses resultados foram gerados a partir da análise em larga escala em bancos de dados e que a real importância desta família de proteínas necessita ser melhor explorada utilizando abordagens bioquímicas e modelos de nocaute.

As figuras 11, 12, 13 e 14 mostram os alinhamentos das proteínas preditas TcUSP7, -10, -14, e -15 com seus respectivos ortólogos. Estes alinhamentos permitiram inferir alta similaridade destas proteínas com seus ortólogos.

A ortóloga humana de TcUSP7 é denominada de HAUSP e está envolvida na via p53-Mdm2. Neste sistema, HAUSP estaria envolvida em mecanismos de estabilização da proteína supressora de tumor p53, um fator transcricional nuclear, ocasionando a inibição da proliferação celular e ativando a apoptose em resposta aos vários tipos de estresses. A HAUSP atua na estabilização endógena de Mdm2, uma E3-ligase que liga a ubiquitina à p53. Mdm2 também se auto-ubiquitina e não havendo sua ligação a p53 esta enzima é degradada *in vivo* (Li e cols, 2004; Hu e cols, 2002). Até o momento não se conhece a contribuição da via p53 em *T. cruzi*. Também não podemos descartar a possibilidade de que em *T. cruzi* a TcUSP7 teria como alvos proteínas de regulação transcricional. Esta hipótese será futuramente investigada.

Dados da literatura demonstram que USP14 de mamíferos está associada ao proteassoma se ligando a partícula reguladora 19S, tendo como função principal ajudar na remoção de ubiquitina ou poliubiquitinas ligadas a proteínas alvo destinadas à degradação proteassomal. Entretanto, as atividades do proteassoma e das DUBs podem ser interdependentes. Ensaio realizados verificaram que a inibição da proteólise proteassomal resulta no acúmulo de conjugados ubiquitinados e num aumento da atividade de USP14. O mecanismo proposto para a união funcional entre as atividades do proteassoma e de USP14 ligada a este complexo protéico, é de que a ativação de USP14 ocorre devido a mudanças conformacionais propagadas através do complexo inteiro do proteassoma 26S sob inibição. Por outro lado, a atividade de USP14 pode ser regulada também pelos níveis de substratos poliubiquitinados, que estão aumentados com o proteassoma inibido (Borodovsky e cols, 2001; Hu e cols, 2005).

Várias DUBs são associadas ao proteassoma 26S e esta associação é necessária para a plena atividade da enzima, como exemplo temos UCH37, USP14/Upb6 e Rpn11/POH. A enzima desubiquitinadora Rpn11/POH pertence a classe MPN+/JAMM, e constitui uma subunidade integrada ao complexo regulatório do proteassoma 19S, sua

atividade DUB requer a interação com outras subunidades do complexo 19S. Ubp6 liga-se a subunidade Rpn1 do complexo 19S, e interage fortemente estimulando a atividade de Ubp6. Assim a atividade de ambas Rpn11 e Ubp6 são delimitadas ao seu sítio de ação, o proteassoma. Mutações que eliminam a atividade DUB de Rpn11 ou de Ubp6 são letais em fungos, e leva também a um acúmulo de substratos ubiquitinados. As DUBs que não estão associadas ao proteassoma são reguladas de maneira diferente, pois elas apresentam uma alta especificidade por seus substratos (Hu e cols, 2005; Amerik e cols, 2006).

Wilson e cols (2002) verificaram que a atividade desubiquitinadora de USP14 associada à atividade proteassomal dependente de ubiquitina são essenciais em alguns processos celulares. Ratos com mutações em USP14 resultam em transmissão sináptica anormal, doença conhecida como ataxia. USP14 neste processo tem como função manter os níveis celulares de monômeros de ubiquitina, alterações nestes níveis podem contribuir para a ocorrência de doenças neurológicas.

Hangai (2007) e Oliveira (2007) demonstraram que a função normal dos proteassomas é fundamental para o desenvolvimento da doença de Chagas experimental e que existem níveis alterados desta protease em formas epimastigotas das cepas Y, Be-62, Be-78, CL, CL-Brener e Colombiana do *T. cruzi*, sugerindo que proteínas acessórias ao proteassoma poderiam modular diferentemente essa protease. Quando analisamos em conjunto o perfil de expressão dos genes *TcUSP7*, *-10*, *-14* e *-15* (figura 31) e da atividade DUB total (figura 33) juntamente com resultados de proteólise dependente de proteassoma 20S, fica ressaltado o papel regulador destas proteases. Futuros experimentos de co-imunoprecipitação serão realizados no sentido de evidenciar a interação direta entre TcUSP10, -14 e 15 com o proteassoma 20 e 26S nas cepas Be-62, Be-78, CL, Colombiana e Y do *T. cruzi*.

Além disso, resultados de análise de microarranjos representativos das formas amastigota, epimastigota, tripomastigota de cultura e tripomastigota metacíclico sugerem que estas enzimas são expressas em formas epimastigotas (resultados não mostrados), sugerindo uma possível especificidade de interação a alvos estágio-específicos. Esses resultados estão sendo validados utilizando a metodologia de RT-qPCR.

Como apresentado nas tabelas 4, 5, 6, 7 e 8, este trabalho também possibilitou a identificação de proteases envolvidas com o processamento e desconjugação da ubiquitina e suas parálogas SUMO, NEDD8 e Atg8 em *L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *T. brucei*, sugerindo que este sistema é bem complexo nestes parasitos. Quando analisado com os dados recentemente descritos por Ponts e cols (2008) fica evidenciado a complexidade destas subfamílias de proteínas. O que chama a atenção é o fato destes organismos serem eucariotos primitivos, de forma que esta grande variedade de enzimas pode estar relacionada a importantes processos biológicos como na transdução de sinal, na progressão do ciclo celular, na regulação da transcrição, nos mecanismos de reparo do DNA (Glickman e Ciechanover, 2002). Vários grupos independentes vêm mostrando nos últimos anos a relevância da desubiquitinação, que agora é reconhecida como uma importante estratégia regulatória, sugerindo que as proteínas desubiquitinadoras afetam numerosas funções celulares distintas.

A complexidade da subfamília USP de proteínas no TriTryp é apresentada pela figura 24. Também ficou ressaltada a grande heterogeneidade entre os membros das subfamílias UCH, JAMM, OTU, e PPPDE (figuras 25, 29 e 30). Uma característica marcante destas famílias é sua grande heterogeneidade, o que dificulta a sua anotação (Eisele e cols, 2006; Kim e cols, 2003; Chung e Baek, 1999). Esta mesma dificuldade foi encontrada para a anotação correta dos membros da família autofagica. Como mostra a figura 28, existem grandes deleções e inserções nas ORFs preditas que dificultam uma análise mais detalhada. Futuras análises serão realizadas para um melhor entendimento desta família de proteínas, tanto no *T. cruzi* quanto nos outros parasitos estudados.

Também foi possível determinar que o *T. cruzi* e os demais organismos analisados apresentam somente um tipo de Sentrina, uma ULP-1 símile, conforme figura 26, sugerindo que nos tripanossomatídeos existe apenas um tipo de SUMO. Já é descrito na literatura 4 parálogos de SUMO (revisado por Frauke, 2000). Dados do nosso laboratório sugerem que *T. cruzi* apresenta a isoforma Smt3-C (resultados não mostrados).

Em estudos anteriores do nosso laboratório, foram identificados nos bancos de dados as sequências que codificam tanto para as enzimas ubiquitinadoras (E1, E2 e E3) como para membros da família ubiquitina de proteínas, dentre elas uma semelhante a

NEDD8 e outra a SUMO (Olmo, 2005). Apesar de pouco compreendida ao nível molecular, vários trabalhos sugerem que NEDD8 possui um papel regulador na proteólise intracelular, enquanto SUMO, participa da manutenção da integridade do DNA, transporte nuclear, transdução de sinal, entre outros (revisado por Rabut, 2008). Sendo assim, a regulação extra fornecida pelas DUBs tende a aumentar a especificidade das vias dependentes, tendo em vista que a retirada da ubiquitina ou da poliubiquitina pode proteger o substrato alvo contra degradação ou então alterar sua via de endereçamento dentro da célula. Os resultados apresentados na figura 33 reforçam esta hipótese em *T. cruzi*, uma vez que o perfil 1D mostra uma maior abundância de conjugados sumorilados nas frações nucleares e ubiquitinados na fração citosólica. Experimentos estão sendo realizados para se determinar os conjugados nedilados neste parasito.

Os resultados obtidos com as análises dos perfis de expressão das enzimas desubiquitinadoras em *T. cruzi* sugerem a correlação entre o fenótipo apresentado pelas cepas e a expressão dos genes relacionados, já que é observado diferentes quantidades de mRNA para cada DUB de variadas cepas. É interessante observar que cepas relacionadas apresentaram perfis de expressão semelhantes, como pode ser observado nas cepas Be-62 e Be-78, enquanto cepas de classes diferentes apresentaram variações significativas nas quantidades de mRNA para algumas DUBs, como pode ser observado entre as cepas *T. cruzi* I (Be-62, Be-78, Y) e *T. cruzi* II (Colombiana).

Os dados da literatura mostram que a ubiquitina é codificada por uma família de múltiplos genes em muitos eucariotos. Por exemplo, há três mRNAs distintos para codificar ubiquitina em humanos e quatro em ratos e leveduras (Finley e cols, 1991). Em parasitos foi descrito existirem dez em *T. cruzi*, um em *L. donovani* (Kirchhoff e cols, 1998) e um em *G. lambia* (Krebber e cols, 1994), mas pelo menos um deles possui um ou diversos genes para poliubiquitina, sendo que o tamanho das repetições pode variar de 3 a 17 (Kirchhoff e cols, 1998).

Desta forma, pelo menos uma parte do conteúdo de ubiquitina livre presente no parasito deve ser gerada pelo processamento de um precursor, no qual várias repetições exatas da sequência de aminoácidos da ubiquitina são ligadas diretamente entre o último resíduo de glicina de uma molécula e a metionina inicial da próxima molécula de ubiquitina. Esta atividade é relacionada à enzima UCH-L3, também chamada de

isopeptidase-T, que apresenta como característica principal a clivagem específica destas ligações (Kurihara, 2000). A figura 31 mostra os níveis relativos de expressão do gene *TcUCH-L3*, que quando comparados aos outros genes estudados mostra-se aproximadamente 10 vezes mais abundante quando comparado ao gene *TcUSP15*. Esses dados corroboram com os descritos na literatura, sugerindo seu importante papel na manutenção do *pool* livre de ubiquitina.

Futuros estudos são necessários para determinar se este gene é de cópia única e demonstrar que se a entrada Tc00.1047053504109.90 codifica uma proteína específica do processamento de NEDD8, e desta forma evidenciar a natureza essencial desses genes, como demonstrado em *P. falciparum* por Artavanis-Tsakonas (2006). Além disso, esta mesma abordagem será adotada para verificar a especificidade do gene codificando para WLM, uma vez que análises de bioinformática sugerem que este também apresenta especificidade para esta molécula.

Como mostra a figura 33, as cepas Be-62, Be-78, CL, Colombiana e Y apresentam diferentes taxas de hidrólise do substrato Cbz- Gly-Gly-Arg-7-amido-4-metilcumarina. Tendo em vista que este substrato reflete a capacidade de hidrólise da ligação específica após dois resíduos de Gly-Gly seguidos de Met, e considerando que o gene de ubiquitina é codificado como um precursor maior (poliubiquitina), esta medida reflete a capacidade de gerar ubiquitina livre e assim manter o pool intracelular. Entretanto, para correlacionarmos a especificidade da enzima para a quebra de ligação isopeptídica ou endopeptídica, deve-se utilizar um conjunto de substratos (Ponder e Bogyo, 2007). Experimentos serão realizados para caracterizar estas atividades em cepas do *T. cruzi*.

A análise em conjunto dos resultados apresentados pelas figuras 30, 31 e 32 sugerem que a cepa Be-78 apresenta um metabolismo diferenciado com relação aos níveis de expressão, atividade DUB total, e perfil de conjugados ubiquitinados. Lana e cols (1986) mostraram que a amostra Berenice-78 de *T. cruzi* recém isolada apresentou características bem distintas da cepa Berenice-62, isolada 16 anos antes na mesma paciente. Foram verificadas sua alta infectividade e baixa virulência para camundongos C3H isogênicos que sobreviveram à fase aguda da infecção. Os parasitos desta cepa apresentaram tropismo para os músculos esquelético e cardíaco, ascensão gradual da parasitemia ao longo de 25 passagens sanguíneas sucessivas e estabilidade da curva de

parasitemia. A cepa Berenice apresentou as mesmas características descritas por Brener, Chiari e Alvarenga (1974) em relação ao tropismo e padrão da curva de parasitemia, sendo, no entanto, demonstrado que sua virulência para camundongos albinos continua aumentando com o decorrer do tempo.

Os resultados obtidos nesse trabalho abrem uma grande perspectiva no sentido de correlacionar o papel biológico das DUBs com o fenótipo diferenciado da doença de Chagas. Um outro aspecto de grande interesse na investigação dessas enzimas é a identificação dos seus alvos naturais, o que permitirá uma melhor compreensão da importância das modificações pós-traducionais dependentes de proteína na biologia celular destes parasitos.

6. CONCLUSÕES

Os principais resultados deste trabalho sugerem:

- A presença de muitos membros da família DUBs e DUBs-símile de proteínas no genoma do *T. cruzi* indica um possível papel destas enzimas na regulação da expressão protéica do parasito;
- A análise comparada no TriTryp mostrou um repertório equivalente para todas as subfamílias de DUBs;
- Os genes *TcUSP7*, *-10*, *-14*, *-15* e *TcUCH-L3* apresentam perfis comuns de expressão nas cepas Be-62, Be-78, Colombiana e Y, o que abre novas perspectivas para a investigação de possíveis interações das proteínas equivalentes com a via ubiquitina proteassoma;
- Foram observados compartimentalização de modificação pós-traducional de proteínas, ou seja, ubiquitinação predominante no citosol e sumorilação no núcleo.

Sendo assim, os resultados obtidos mostram que há compartimentalização de conjugados ubiquitinados e sumorilados neste parasito, bem como esta via está presente e ativa neste parasito protozoário.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados já obtidos, abrem-se as seguintes perspectivas:

- Determinar o padrão de expressão de todas DUBs e DUBs-símile preditas na fase epimastigota do *T. cruzi*;
- Determinar o padrão de expressão de todas DUBs e DUBs-símile preditas na fase promastigota de *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Determinar o padrão de expressão dos membros da família USP no ciclo biológico do *T. cruzi*;
- Avaliar o papel da TcUSP7 no proteoma do *T. cruzi*;
- Demonstrar a interação direta das peptidases TcUSP10, -14 e -15 com a subunidade alfa-7 do proteossoma 20S do *T. cruzi*;
- Obter as peptidases UCH-L3, UCH-L5 e WLM recombinantes para determinação da cinética enzimática frente aos substratos Ubiquitina-AMC e NEDD8-AMC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN T.E., & ULLMAN B. (1993). Cloning and Expression of the Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Gene from Trypanosoma-Brucei. *Nucleic Acids Research* **21**, 5431-5438.
- AMERIK A.Y., & HOCHSTRASSER M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 189-207.
- AMERIK A.Y., LI S.J., & HOCHSTRASSER M. (2000). Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Chemistry* **381**, 981-992.
- 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.
- AVILA A.R., YAMADA-OGATTA S.F., MONTEIRO V.D.S., KRIEGER M.A., NAKAMURA C.V., DE SOUZA W., & GOLDENBERG S. (2001). Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **117**, 169-177.
- AYMERICH S., & GOLDENBERG S. (1989). The Karyotype of *Trypanosoma-Cruzi* Dm-28c - Comparison with Other T-Cruzi Strains and Trypanosomatids. *Experimental Parasitology* **69**, 107-115.
- BALAKIREV M.Y., TCHERNIUK S.O., JAQUINOD M., & CHROBOCZEK J. (2003). Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep* **4**, 517-522.
- BESTEIRO S., WILLIAMS R.A.M., MORRISON L.S., COOMBS G.H., & MOTTRAM J.C. (2006). Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 11384-11396.
- BORODOVSKY A., KESSLER B.M., CASAGRANDE R., OVERKLEEF H.S., WILKINSON K.D., & PLOEGH H.L. (2001). A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *Embo Journal* **20**, 5187-5196.
- BOUCHER N., WU Y., DUMAS C., DUBE M., SERENO D., BRETON M., & PAPADOPOULOU B. (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 19511-19520.
- 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.Sao Paulo* **12**, 93-100.

- CANO M.I., GRUBER A., VAZQUEZ M., CORTES A., LEVIN M.J., GONZALEZ A., DEGRAVE W., RONDINELLI E., ZINGALES B., RAMIREZ J.L., ALONSO C., REQUENA J.M., & DASILVEIRA J.F. (1995). Molecular Karyotype of Clone CI Brener Chosen for the Trypanosoma-Cruzi Genome Project. *Molecular and Biochemical Parasitology* **71**, 273-278.
- CARLE G.F., FRANK M., & OLSON M.V. (1986). Electrophoretic Separations of Large DNA-Molecules by Periodic Inversion of the Electric-Field. *Science* **232**, 65-68.
- 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.
- CHUNG C.H., & BAEK S.H. (1999). Deubiquitinating enzymes: Their diversity and emerging roles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **266**, 633-640.
- CLAYTON C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* **21**, 1881-1888.
- CLAYTON C.E., FUERI J.P., ITZHAKI J.E., BELLOFATTO V., SHERMAN D.R., WISDOM G.S., VIJAYASARATHY S., & MOWATT M.R. (1990). Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of Trypanosoma brucei. *Mol Cell Biol* **10**, 3036-3047.
- COUGHLIN B.C., TEIXEIRA S.M.R., KIRCHHOFF L.V., & DONELSON J.E. (2000). Amastin mRNA abundance in Trypanosoma cruzi is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 12051-12060.
- 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**, 7-16.
- DAVIS R.E. (1996). Spliced leader RNA trans-splicing in metazoa. *Parasitology Today* **12**, 33-40.
- 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.
- EISELE F., BRAUN B., PFIRRMANN T., & WOLF D.H. (2006). Mutants of the deubiquitinating enzyme Ubp14 decipher pathway diversity of ubiquitin-proteasome linked protein degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 329-333.
- EL-SAYED N.M., MYLER P.J., BLANDIN G., BERRIMAN M., CRABTREE J., AGGARWAL G., CALER E., RENAULD H., WORTHEY E.A., HERTZ-FOWLER C., GHEDIN E., PEACOCK C., BARTHOLOMEU D.C., HAAS B.J., TRAN A.N., WORTMAN J.R., ALSMARK U.C.M., ANGIUOLI S.,

- ANUPAMA A., BADGER J., BRINGAUD F., CADAG E., CARLTON J.M., CERQUEIRA G.C., CREASY T., DELCHER A.L., DJIKENG A., EMBLEY T.M., HAUSER C., IVENS A.C., KUMMERFELD S.K., PEREIRA-LEAL J.B., NILSSON D., PETERSON J., SALZBERG S.L., SHALLOM J., SILVA J.C., SUNDARAM J., WESTENBERGER S., WHITE O., METVILLE S.E., DONELSON J.E., ANDERSSON B., STUART K.D., & HALL N. (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309**, 404-409.
- ELIAS M.C.Q.B., MARQUES-PORTO R., FREYMULLER E., & SCHENKMAN S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Molecular and Biochemical Parasitology* **112**, 79-90.
- ENGMAN D.M., REDDY L.V., DONELSON J.E., & KIRCHHOFF L.V. (1987). *Trypanosoma-Cruzi* Exhibits Inter-Strain and Intra-Strain Heterogeneity in Molecular Karyotype and Chromosomal Gene Location. *Molecular and Biochemical Parasitology* **22**, 115-123.
- EVANS P.C., SMITH T.S., LAI M.J., WILLIAMS M.G., BURKE D.F., HEYNINCK K., KREIKE M.M., BEYAERT R., BLUNDELL T.L., & KILSHAW P.J. (2003). A novel type of deubiquitinating enzyme*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 23180-23186.
- FINLEY D., & CHAU V. (1991). Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 25-69.
- FINN R.D., TATE J., MISTRY J., COGGILL P.C., SAMMUT S.J., HOTZ H.R., CERIC G., FORSLUND K., EDDY S.R., SONNHAMMER E.L.L., & BATEMAN A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **36**, D281-D288.
- FRAGOSO S.P., & GOLDENBERG S. (1992). Cloning and Characterization of the Gene Encoding *Trypanosoma-Cruzi* DNA Topoisomerase-Ii. *Molecular and Biochemical Parasitology* **55**, 127-134.
- FRAGOSO S.P., MATTEI D., HINES J.C., RAY D., & GOLDENBERG S. (1998). Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **94**, 197-204.
- FRAGOSO S.P., PLAZANET-MENUT C., CARREIRA M.A.C., MOTTA M.C., DALLAGIOVANA B., KRIEGER M.A., & GOLDENBERG S. (2003). Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**, 113-117.
- GILINGER G., & BELLOFATTO V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Research* **29**, 1556-1564.
- GLICKMAN M.H., & CIECHANOVER A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* **82**, 373-428.

- GOLDENBERG S., SALLES J.M., CONTRERAS V.T., FRANCO M.P.L., KATZIN A.M., COLLI W., & MOREL C.M. (1985). Characterization of Messenger-Rna from Epimastigotes and Metacyclic Trypomastigotes of Trypanosoma-Cruzi. *Febs Letters* **180**, 265-270.
- 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., 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.
- HAGLUND K., SIGISMUND S., POLO S., SZYMKIEWICZ I., DI FIORE P.P., & DIKIC I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nature Cell Biology* **5**, 461-466.
- HENRIKSSON J., PORCEL B., RYDAKER M., RUIZ A., SABAJ V., GALANTI N., CAZZULO J.J., FRASCH A.C., & PETTERSSON U. (1995). Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in Trypanosoma cruzi. *Mol Biochem Parasitol* **73**, 63-74.
- HERMAN M., GILLIES S., MICHELS P.A., & RIGDEN D.L. (2006). Autophagy and related processes in trypanosomatids - Insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy* **2**, 107-118.
- HERNEBRING M., BROLEN G., AGUILANIU H., SEMB H., & NYSTROM T. (2006). Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7700-7705.
- HERSHKO A., & CIECHANOVER A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 425-479.
- HERTZ-FOWLER C., PEACOCK C.S., WOOD V., ASLETT M., KERHORNOU A., MOONEY P., TIVEY A., BERRIMAN M., HALL N., RUTHERFORD K., PARKHILL J., IVENS A.C., RAJANDREAM M.A., & BARRELL B. (2004). GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Research* **32**, D339-D343.
- HICKE L., & DUNN R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19**, 141-172.
- HORROCKS P., & NEWBOLD C.I. (2000). Intraerythrocytic polyubiquitin expression in Plasmodium falciparum is subjected to developmental and heat-shock control. *Mol Biochem Parasitol* **105**, 115-125.
- HU M., LI P., SONG L., JEFFREY P.D., CHENOVA T.A., WILKINSON K.D., COHEN R.E., & SHI Y. (2005). Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J* **24**, 3747-3756.

- HU M., LI P.W., LI M.Y., LI W.Y., YAO T.T., WU J.W., GU W., COHEN R.E., & SHI Y.G. (2002). Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell* **111**, 1041-1054.
- 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.
- IYER L.M., KOONIN E.V., & ARAVIND L. (2004). Novel predicted peptidases with a potential role in the ubiquitin signaling pathway. *Cell Cycle* **3**, 1440-1450.
- JOHNSON E.S., SCHWIENHORST I., DOHMEN R.J., & BLOBEL G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J* **16**, 5509-5519.
- JOHNSTON S.C., RIDDLE S.M., COHEN R.E., & HILL C.P. (1999). Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *Embo Journal* **18**, 3877-3887.
- KABLE M.L., HEIDMANN S., & STUART K.D. (1997). RNA editing: Getting U into RNA. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 162-166.
- KATO M., MIYAZAWA K., & KITAMURA N. (2000). A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 37481-37487.
- KIM J.H., PARK K.C., CHUNG S.S., BANG O., & CHUNG C.H. (2003). Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *Journal of Biochemistry* **134**, 9-18.
- KIRISAKO T., ICHIMURA Y., OKADA H., KABEYA Y., MIZUSHIMA N., YOSHIMORI T., OHSUMI M., TAKAO T., NODA T., & OHSUMI Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology* **151**, 263-275.
- KLIONSKY D.J. (2004). Cell biology - Regulated self-cannibalism. *Nature* **431**, 31-32.
- KREBBER H., WOSTMANN C., & BAKKER-GRUNWALD T. (1994). Evidence for the existence of a single ubiquitin gene in *Giardia lamblia*. *FEBS Lett* **343**, 234-236.
- KUREPA J., WALKER J.M., SMALLE J., GOSINK M.M., DAVIS S.J., DURHAM T.L., SUNG D.Y., & VIERSTRA R.D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* **278**, 6862-6872.
- 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. (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.

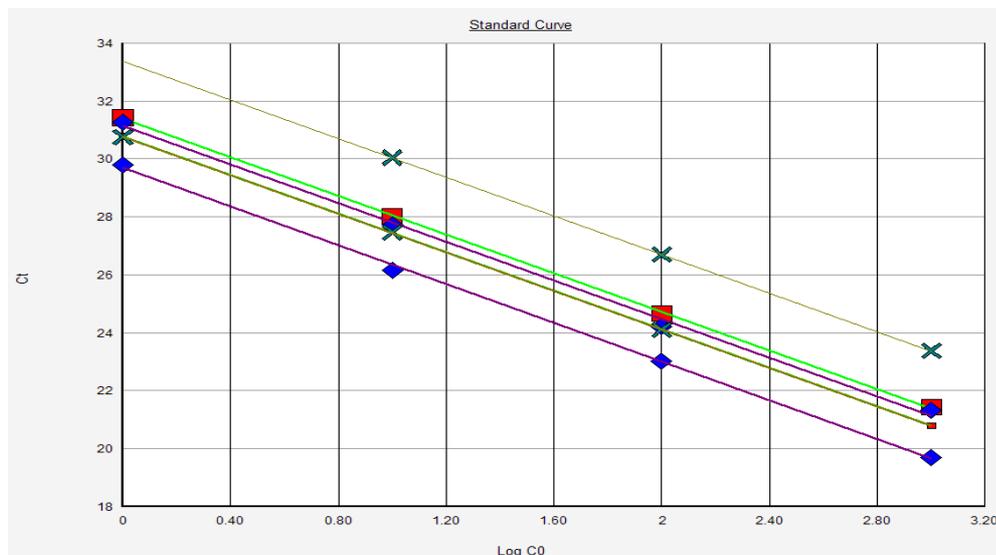
- LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., & HIGGINS D.G. (2007). Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- LEBOWITZ J.H., SMITH H.Q., RUSCHE L., & BEVERLEY S.M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. *Genes Dev* **7**, 996-1007.
- LEE M.G.S., & VANDERPLOEG L.H.T. (1997). Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. *Annual Review of Microbiology* **51**, 463-489.
- LI M., BROOKS C.L., KON N., & GU W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell* **13**, 879-886.
- 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.
- MACEDO A.M., & PENA S.D. (1998). Genetic Variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* **14**, 119-124.
- MATKIN A., DAS A., & BELLOFATTO V. (2001). The Leptomonas seymouri spliced leader RNA promoter requires a novel transcription factor. *Int J Parasitol* **31**, 545-549.
- MATSUI S.I., SANDBERG A.A., NEGORO S., SEON B.K., & GOLDSTEIN G. (1982). Isopeptidase - a Novel Eukaryotic Enzyme That Cleaves Isopeptide Bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **79**, 1535-1539.
- MELCHIOR F. (2000). SUMO - Nonclassical ubiquitin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 591-+.
- MIZUNO E., IURA T., MUKAI A., YOSHIMORI T., KITAMURA N., & KOMADA M. (2005). Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 5163-5174.
- MORRIS J.C., DREW M.E., KLINGBEIL M.M., MOTYKA S.A., SAXOWSKY T.T., WANG Z.F., & ENGLUND P.T. (2001). Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. *International Journal for Parasitology* **31**, 453-458.
- NIJMAN S.M.B., LUNA-VARGAS M.P.A., VELDS A., BRUMMELKAMP T.R., DIRAC A.M.G., SIXMA T.K., & BERNARDS R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773-786.
- NOZAKI T., & CROSS G.A.M. (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in Trypanosoma cruzi. *Molecular and Biochemical Parasitology* **75**, 55-67.

- PAYS E., COQUELET H., TEBABI P., PAYS A., JEFFERIES D., STEINERT M., KOENIG E., WILLIAMS R.O., & RODITI I. (1990). Trypanosoma-Brucei - Constitutive Activity of the Vsg and Procyclin Gene Promoters. *Embo Journal* **9**, 3145-3151.
- PICKART C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 503-533.
- PICKART C.M., & FUSHMAN D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**, 610-616.
- PONDER E.L., & BOGYO M. (2007). Ubiquitin-like modifiers and their deconjugating enzymes in medically important parasitic protozoa. *Eukaryotic Cell* **6**, 1943-1952.
- PONTS N., YANG J., CHUNG D.W., PRUDHOMME J., GIRKE T., HORROCKS P., & LE ROCH K.G. (2008). Deciphering the ubiquitin-mediated pathway in apicomplexan parasites: a potential strategy to interfere with parasite virulence. *PLoS ONE* **3**, e2386.
- PRATA A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* **1**, 92-100.
- QUESADA V., DIAZ-PERALES A., GUTIERREZ-FERNANDEZ A., GARABAYA C., CAL S., & LOPEZ-OTIN C. (2004). Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 54-62.
- RUDENKO G., LEBLANCO S., SMITH J., LEE M.G.S., RATTRAY A., & VANDERPLOEG L.H.T. (1990). Procyclic Acidic Repetitive Protein (Parp) Genes Located in an Unusually Small Alpha-Amanitin-Resistant Transcription Unit - Parp Promoter Activity Assayed by Transient DNA Transfection of Trypanosoma-Brucei. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 3492-3504.
- SAITO R.M., ELGORT M.G., & CAMPBELL D.A. (1994). A conserved upstream element is essential for transcription of the Leishmania tarentolae mini-exon gene. *EMBO J* **13**, 5460-5469.
- SAITOU N., & NEI M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- 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.
- SCHURCH N., HEHL A., VASSELLA E., BRAUN R., & RODITI I. (1994). Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in Trypanosoma brucei is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol Cell Biol* **14**, 3668-3675.
- SCHWARTZ D.C., & CANTOR C.R. (1984). Separation of Yeast Chromosome-Sized Dnas by Pulsed Field Gradient Gel-Electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.

- SCHWARTZ D.C., & HOCHSTRASSER M. (2003). A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 321-328.
- SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V. (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia clin.biol.* **20**, 191-207.
- SHAPIRO T.A., & ENGLUND P.T. (1995). The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology* **49**, 117-143.
- SLOOF P., & BENNE R. (1997). RNA editing in kinetoplastid parasites: What to do with U. *Trends in Microbiology* **5**, 189-195.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., & KUMAR S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- TANAKA K. (1998). Proteasomes: Structure and biology. *Journal of Biochemistry* **123**, 195-204.
- 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.
- TOMAS A.M., & KELLY J.M. (1996). Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. *Mol Biochem Parasitol* **76**, 91-103.
- VANHAMME L., & PAYS E. (1995). Control of Gene-Expression in Trypanosomes. *Microbiological Reviews* **59**, 223-240.
- VASSELLA E., REUNER B., YUTZY B., & BOSCHART M. (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci* **110** (Pt **21**), 2661-2671.
- VERGER A., PERDOMO J., & CROSSLEY M. (2003). Modification with SUMO - A role in transcriptional regulation. *Embo Reports* **4**, 137-142.
- VERMA R., ARAVIND L., OANIA R., MCDONALD W.H., YATES J.R., KOONIN E.V., & DESHAIES R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-615.
- WHO, The World Health Report, 2006 (World Health Organization, Geneva, 2006).
- WILKINSON K.D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 141-148.
- WILSON S.M., BHATTACHARYYA B., RACHEL R.A., COPPOLA V., TESSAROLLO L., HOUSEHOLDER D.B., FLETCHER C.F., MILLER R.J., COPELAND N.G., & JENKINS N.A. (2002). Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nature Genetics* **32**, 420-425.

- WING S.S. (2003). Deubiquitinating enzymes - the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 590-605.
- WU Y.M., WANG X.Y., LIU X., & WANG Y.F. (2003). Data-mining approaches reveal hidden families of proteases in the genome of malaria parasite. *Genome Research* **13**, 601-616.
- YANG S.J., WANG-SU S.T., CAI H.C., & WAGNER B.J. (2002). Changes in three types of ubiquitin mRNA and ubiquitin-protein conjugate levels during lens development. *Experimental Eye Research* **74**, 595-604.
- ZOMERDIJK J.C.B.M., OUELLETTE M., TENASBROEK A.L.M.A., KIEFT R., BOMMER A.M.M., CLAYTON C.E., & BORST P. (1990). The Promoter for a Variant Surface Glycoprotein Gene-Expression Site in Trypanosoma-Brucei. *Embo Journal* **9**, 2791-2801.

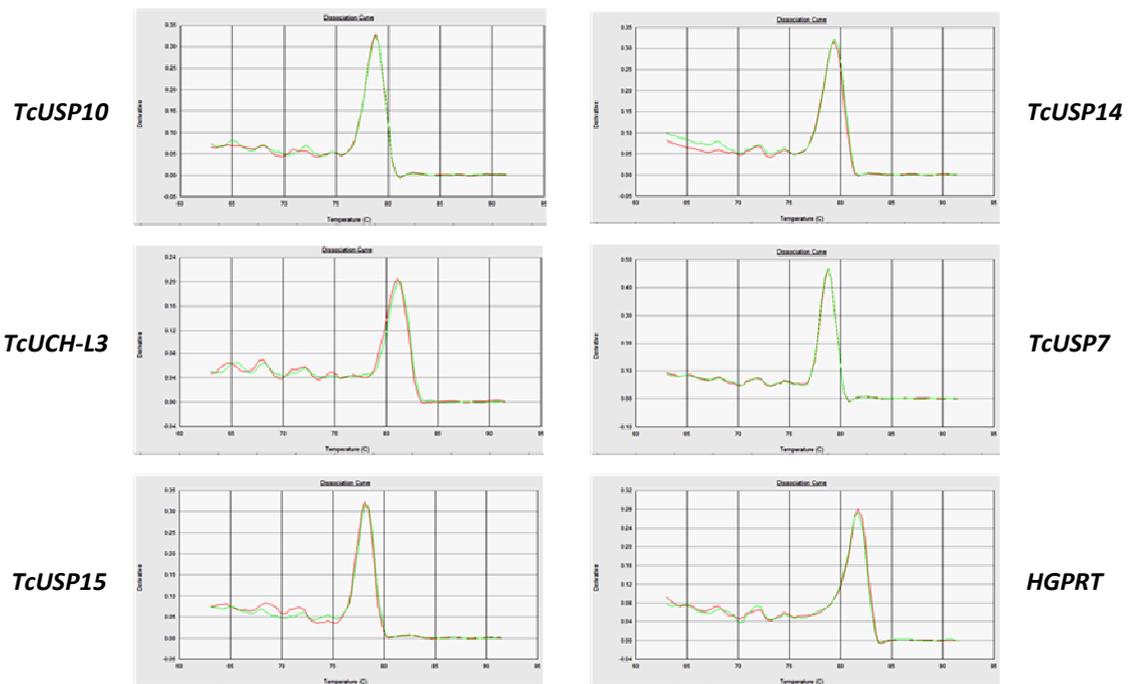
9. ANEXOS



Anexo 1: Figura representativa das curvas padrão dos *primers* específicos para os genes *TcUSP7*, *TcUSP10*, *TcUSP14*, *TcUSP15* e *TcUCH-L3*. As curvas de dissociação são geradas no final de cada reação de qPCR, de acordo com a programação padrão do termociclador. Foram utilizadas diluições de 10X a partir do cDNA da cepa Be-62. As linhas de tendência foram geradas a partir da média entre duplicatas biológicas.



Anexo 2: Figura mostrando a sobreposição de diversas corridas de RT-qPCR para o gene *HGPRT* do *T. cruzi*. A intercessão da linha verde com as curvas indicam o C_T da curva de amplificação. A sobreposição dos diversos *plots* de amplificação mostra que há grande sobreposição entre corridas diferentes para o mesmo mRNA analisado, ressaltando a confiabilidade apresentada pelo gene *HGPRT* como constitutivo para este parasito. Os cDNAs foram gerados a partir de 1µg de RNA total de cada cepa utilizada nos estudos.



Anexo 3: Figura mostrando as curvas de dissociação dos *primers* específicos para os genes *TcUSP7*, *TcUSP10*, *TcUSP14*, *TcUSP15* e *TcUCH-L3*. A presença de um único pico mostra que provavelmente não há formação de dímeros durante os ciclos de amplificação. A sobreposição das linhas demonstra a realização dos experimentos em duplicata.

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](#)