

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Milton César de Almeida Pereira

**Identificação de proteínas de *Trypanosoma
cruzi* modificadas por S-nitrosilação e
nitração após adesão com matriz extracelular**

Versão corrigida da dissertação defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
13/11/2013

Milton César de Almeida Pereira

**Identificação de proteínas de *Trypanosoma
cruzi* modificadas por S-nitrosilação e
nitração após adesão com matriz
extracelular**

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

Orientador: Profa. Dra. Maria Julia Manso Alves

São Paulo

2013

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

Pereira, Milton César de Almeida

P436i Identificação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* modificadas por S-nitrosilação e nitração após adesão com matriz extracelular / Milton César de Almeida Pereira . -- São Paulo, 2013. 99p.

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

Orientador : Alves, Maria Julia Manso

1. Proteína : Modificações de pós-tradução : Bioquímica
2. Proteína : Trypanosoma : Bioquímica animal I. T. II. Alves, Maria Julia Manso, orientador.

574.19245

CDD

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e parentes.

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

Ao Dr. Ivan Schumacher, por todas as recomendações científicas ou não, tal como o clássico “Robinson Crusoe em Marte”.

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

Ao Roberto, Célia e Maria Luiza, Eliciane, Chrislaine, Darlene, Mariana, Matheus, e a todos os colegas de laboratório.

A todas as pessoas que me aturaram fora do laboratório ao longo desse período: Caroline, Luiza, Renan, Thiago, Ariel, Isabela, Marina, entre muitos outros.

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

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

*“Wenn ist das Nunstück git und
Slotermeyer? Ja! Beiherhund das Oder die
Flipperwaldt gersput!”*

- Ernest Scribbler

RESUMO

(Pereira, M. C. A.) **Identificação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* modificadas por S-nitrosilação e nitração após adesão com matriz extracelular.** 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Óxido nítrico (NO) é um segundo mensageiro biosintetizado a partir de L-Arginina e envolvido em sinalização celular por diferentes mecanismos: ativação da produção de cGMP pela Guanilil Ciclase; regulação de enzimas pela interação com seus centros metálicos; ou pela S-nitrosilação de cisteína e nitração de tirosina, modificações pós-traducionais, capazes de modular a atividade de diversas proteínas.

Neste trabalho buscou-se investigar se a interação de *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas, com a matriz extracelular (ECM) era capaz de modular a sinalização por NO em *T. cruzi*. Tripomastigotas de *T. cruzi* incubados com ECM apresentaram diminuição na atividade de NOS e menor produção de NO. Da mesma maneira, observou-se, por imunofluorescência indireta e *immunoblotting*, uma diminuição no padrão geral de S-nitrosilação e nitração de proteínas do parasita incubado com ECM. Além disto, os perfis de proteínas S-nitrosiladas e nitradas foram modificados, predominando a denitrosilação e denitração (de 40 para 22 proteínas nitradas após a adesão a ECM), embora em alguns casos tenha sido observado um aumento de nitração, como em proteínas de citoesqueleto (de 2,5% para 9,1% após adesão). O mesmo padrão foi observado em relação a proteínas nitradas, com diminuição de 48 para 20 proteínas após adesão a ECM e novamente com modificação no percentual de proteínas nitradas pertencentes a processos biológicos distintos, como proteínas relacionadas à síntese proteica (35,4% das proteínas nitradas no grupo controle e apenas 5,0% no grupo incubado com ECM). Apesar do perfil de denitração, algumas classes de proteínas têm aumento no número de alvos nitrados, como proteínas relacionadas a metabolismo (de 18,8% para 35,0%), além de alguns alvos específicos que têm aumento na nitração, como enolase.

Em suma, os resultados sugerem que a sinalização intracelular por NO em tripomastigotas de *T. cruzi* é modulada durante a adesão do parasita a componentes da matrix extracelular, tanto através da via clássica de produção de óxido nítrico, quanto por modificações pós-traducionais induzidas por NO.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, óxido nítrico, S-nitrosilação, nitração

ABSTRACT

(Pereira, M. C. A.) **Identification of proteins modified by S-nitrosylation and tyrosine nitration after adhesion of *Trypanosoma cruzi* to the extracellular matrix.** 2013. 96 p. Master's Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nitric oxide (NO) is a second messenger biosynthesized from L-Arginine and involved in cell signaling by different mechanisms: activation of cGMP production by guanylyl cyclase; regulation of enzymes by interaction with their metallic centers; or by S-nitrosylation of cysteine and nitration of tyrosine, posttranslational modifications capable of modulating the activity of several proteins.

In this work, we sought to investigate whether the interaction between extracellular matrix (ECM) and *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, was capable of modulating NO signaling in the parasite. Trypomastigotes incubated with ECM presented a decrease in NOS activity and NO production. Accordingly, a decrease in S-nitrosylation and tyrosine nitration of proteins from ECM-incubated parasites was also observed, as evidenced by indirect immunofluorescence and immunoblotting. In addition, S-nitrosylated and tyrosine nitrated proteins profiles were modified in ECM-incubated parasites, with an enhancement in protein denitrosylation and denitration. A decrease from 40 to 22 of S-nitrosylated proteins was detected after parasite adhesion to ECM, more evident in some protein groups (as for example 52.5% hypothetical proteins modified in the control group against 36.4% after adhesion). On the other hand, an increase of S-nitrosylation was detected in other groups of proteins, such as cytoskeleton proteins (from 2.5% of total S-nitrosylated proteins to 9.1% after adhesion). The same general pattern was observed in relation to tyrosine-nitrated proteins, with a decrease in the number of modified proteins from 48 to 20 after incubation with ECM, exemplified by those related to protein synthesis, with a contribution of 35.4% in the control group versus 5.0% after treatment with ECM. Despite this general denitration profile, some protein classes have an increase in nitration, such as metabolic proteins (from 18.8% to 35.0%), in addition to some specific targets, such as enolase.

Taken together, the results suggest that NO signaling is modulated during adhesion of *T. cruzi* to components of the extracellular matrix, probably by the classical nitric oxide pathway and by NO-induced post translational modifications. **Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, nitric oxide, S-nitrosylation, nitration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1.1	Principais vias de sinalização envolvendo NO	19
Figura 1.2	Estrutura de cisteína e s-nitroso cisteína	21
Figura 1.3	Denitrosilação dependente de glutatona	22
Figura 1.4	Denitrosilação dependente de tioredoxina	23
Figura 1.5	<i>Biotin switch</i>	25
Figura 1.6	Estrutura de tirosina e 3-nitro-tirosina	26
Figura 1.7	Triptofano e sua forma nitrada na posição 6	28
Figura 3.1	Fluxograma de purificação de CYP450 redutase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
Figura 3.2	Fluxograma resumido das estratégias utilizadas na identificação de proteínas nitradas em tirosina e S-nitrosiladas em cisteína	52
Figura 4.1	Efeito da incubação de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> com ECM na produção de NO	53
Figura 4.2	Atividade de síntese de NO em extrato de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 4.3	Produção de L-Citrulina a partir de L-Arginina	55
Figura 4.4	Concentração de L-Arginina e L-Citrulina em extrato de <i>Trypanosoma cruzi</i> após adesão por duas horas com ECM	56
Figura 4.5	Concentração de proteínas S-NO em extrato de <i>Trypanosoma cruzi</i> após adesão por duas horas com ECM	56
Figura 4.6	Reatividade de extratos de <i>Trypanosoma cruzi</i> com anticorpos contra diferentes isoformas de NOS	57
Figura 4.7	Visualização por imunofluorescência da expressão de nNOS putativa após duas horas de incubação do parasita com ECM	58
Figura 4.8	Cinética de expressão da proteína reconhecida por anticorpos anti-nNOS ao longo de incubação de tripomastigotas com matriz extracelular	59
Figura 4.9	Cinética de expressão de nNOS putativa ao longo de incubação de tripomastigotas com matriz extracelular	59
Figura 4.10	Ensaio de atividade NOS em produtos de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-nNOS e anti-HSP85 ligados covalentemente à resina de proteína A	60
Figura 4.11	Imunoprecipitação seguido de <i>immunoblotting</i> : anti HSP85 e nNOS	61
Tabela 4.1	Síntese de NO no extrato bruto e frações eluídas da coluna de DEAE-Sepharose após <i>pull down</i> em resina de ADP-Sepharose	62
Figura 4.12	Atividade específica de síntese de NO após cromatografia de extrato de <i>Trypanosoma cruzi</i> em coluna de DEAE-Sepharose e pull-down por ADP-Sepharose	62
Figura 4.13	Atividade de síntese de NO em frações da purificação de enzima com atividade de síntese de NO	63
Tabela 4.2	Atividade específica de síntese de NO no extrato bruto e frações eluídas de coluna de DEAE-Sepharose após <i>pull down</i> em resina de ADP-Sepharose em presença ou ausência do inibidor L-NAME	63
Figura 4.14	Cinética de S-nitrosilação de proteínas de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em resposta à incubação com matriz extracelular	64
Figura 4.15	Cinética de nitração em resposta à incubação de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> com matriz extracelular ao longo do tempo	64

Figura 4.16	Padrão de proteínas nitradas em tirosina em resposta à incubação de <i>Trypanosoma cruzi</i> com matriz extracelular	65
Figura 4.17	Padrão de proteínas S-nitrosiladas em resposta à incubação de <i>Trypanosoma cruzi</i> com matriz extracelular	66
Figura 4.18	Eletoforese bidimensional e <i>immunoblotting</i> utilizando anticorpos contra nitro-tirosina	67
Tabela 4.3	Proteínas nitradas de <i>Trypanosoma cruzi</i> identificadas após excisão de gel bidimensional em condições não-redutoras	67
Tabela 4.4	Proteínas nitradas de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> identificadas após imunoprecipitação utilizando resina ligada covalentemente a anticorpo anti-nitro-tirosina	68
Figura 4.19	Perfil de proteínas nitradas em resíduos de tirosina em <i>Trypanosoma cruzi</i> no grupo controle e após adesão à matriz extracelular por duas horas	70
Figura 4.20	Nitração de tubulina de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
Figura 4.21	Nitração de histonas de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
Figura 4.22	Imunoprecipitação (IP) de enolase ,seguida de <i>immunoblotting</i> com anticorpos anti- nitro-tirosina	72
Figura 4.23	Imunoprecipitação (IP) contra proteína paraflagelar, seguida de <i>immunoblotting</i> contra nitro-tirosina	72
Figura 4.24	Proteínas modificadas por S-nitrosilação de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> incubadas com ECM	73
Tabela 4.5	Proteínas S-nitrosiladas de <i>T. cruzi</i> identificadas após excisão de gel bidimensional em condições não-redutoras	74
Tabela 4.6	Proteínas S-nitrosiladas de <i>T. cruzi</i> incubados ou não com matriz extracelular, identificadas por <i>biotin-switch</i> e nLC-MS/MS	75
Figura 4.25	Perfil de proteínas S-nitrosiladas de <i>Trypanosoma cruzi</i> no grupo controle e após adesão por duas horas à matriz extracelular	78
Figura 4.26	<i>Immunoblotting</i> contra Mucin II após realização de <i>biotin switch</i>	79
Figura 4.27	<i>Immunoblotting</i> contra proteínas S-nitrosiladas após imunoprecipitação utilizando anticorpos contra Mucina II	79
Figura 5.1	Etapas de transferências de elétrons em: A) Citocromo P450 Oxidoreductase B) NOS	81
Figura 5.2	Mecanismo de reação de Citocromo P450 Oxidoreductase e NOS	82
Tabela 5.1	Consequências funcionais de modificações por S-nitrosilação, nitração em tirosina ou triptofano em proteínas identificadas no presente projeto e já descritas na literatura	88

LISTA DE ABREVIações

AE1	<i>Anion Exchanger 1</i> (Trocador de ânions 1)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Albumina de soro bovino)
BSO	L-buthionine-(S,R)-sulfoximine
CaM	Calmodulina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CcO	Citocromo c oxidase
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CYP450	Citocromo P450
DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
DDR	<i>Discoidin domain receptor</i> (Domínio receptor de discoidina)
DEAE	dietilaminoetil
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DMF	Dimetil formamida
DMP	Dimetil pimelimidato
DNA	Ácido deoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (Matriz extracelular)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento endotelial)
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FDH	Formaldeído desidrogenase
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G6PDH	Glicose 6-Fosfato Desidrogenase
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutationa
GSSH	Glutationa oxidada
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxidase de raiz-forte)
HSP	<i>Heat shock protein</i> (Proteína do shock térmico)
IEF	<i>Isoelectric focusing</i> (focalização isoelétrica)

iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
L-NAME	<i>L-N⁶-Nitroarginine methyl ester</i>
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i> (Meio Modificado de Eagle)
MMTS	Metanotiosulfonato
MnSOD	Manganês Superoxido Dismutase
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocondrial
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida)
PBS	Tampão fosfato-salina
PDE	Fosfodiesterase
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteína Quinase C)
PKG	<i>Protein Kinase G</i> (Proteína Quinase G)
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
POPOP	1,4-bis(5-phenyloxazol-2-yl) benzene
PPO	2,5-Diphenyloxazole
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
sGC	Guanilato ciclase solúvel
Trxn	Tioredoxina
TrxnR	Tioredoxina redutase
Ty	<i>Trypanosoma cruzi</i> , forma tripomastigota, cepa Y

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Protozoários da ordem kinetoplastida	15
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	15
1.3 Óxido nítrico (NO [•])	17
1.4 Vias de sinalização por óxido nítrico	18
1.5 S-Nitrosilação	20
1.6 Nitração em tirosina	26
1.7 S-Nitrosilação e nitração em protozoários	29
1.8 <i>Interação entre Trypanosoma cruzi e componentes da matriz extracelular</i>	30
1.9 <i>Sinalização intracelular por NO em Trypanosoma cruzi</i>	33
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivos Específicos	36
3 Material e Métodos	37
3.1 Cultura celular	37
3.2 <i>Incubação de Trypanosoma cruzi com matriz extracelular</i>	37
3.3 Imunofluorescência	38
3.4 Ensaio de incorporação de metionina radioativa	38
3.5 <i>Preparação de extrato de Trypanosoma cruzi</i>	39
3.6 Dosagem de NO extracelular	40
3.7 Quantificação de S-nitrosotióis totais	41
3.8 Medida da atividade de NO Sintase	41
3.9 Quantificação de L-Arginina e L-Citrulina por eletroforese capilar	42
3.10 Purificação de enzima com atividade de síntese de NO	43
3.11 Ligação covalente de anticorpos a resina de Sepharose-proteína A ..	44
3.12 Imunoprecipitação	45

3.12.1	Resina – proteína A	45
3.12.2	Resina ligada covalentemente a anticorpo	46
3.13	Preparação de proteínas imunoprecipitadas para sequenciamento ..	46
3.14	Marcação de S-nitrosiltiois por <i>biotin switch</i>	47
3.15	Preparo de proteínas biotinizadas para sequenciamento	48
3.16	Sequenciamento de peptídeos por nLC-MS/MS	48
3.17	Predição de resíduos alvos de S-nitrosilação	49
3.18	Eletroforese bidimensional	49
3.19	<i>Immunoblotting</i>	50
3.20	Preparação dos <i>spots</i> para sequenciamento	51
3.21	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Produção de NO pelos parasitas	53
4.2	Identificação da isoforma de NOS presente em <i>Trypanosoma cruzi</i> ..	57
4.3	Expressão de proteína reconhecida por anti-NOS durante interação de tripomastigotas com matriz extracelular	58
4.4	Purificação parcial de enzima com atividade de síntese de NO	61
4.5	Nitração e S-nitrosilação de proteínas de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> em resposta à interação com a matriz extracelular	63
4.6	Identificação por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas de proteínas diferencialmente modificadas após incubação de tripomastigotas com ECM	66
4.7	Identificação por imunoprecipitação e espectrometria de massas de proteínas nitradas após incubação de tripomastigotas com ECM	68
4.8	Validação de nitração em proteínas de tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> por imunoprecipitação e <i>immunoblotting</i>	70
4.9	Identificação por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas de proteínas diferencialmente S-nitrosiladas	73

4.10	Identificação de proteínas modificadas por S-nitrosilação de <i>Trypanosoma cruzi</i> por biotin-switch e espectroscopia de massas	74
4.11	Validação de S-nitrosilação em proteínas específicas por biotin switch, pull down e imunoblotting	78
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÃO	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Protozoários da ordem Kinetoplastida

Kinetoplastida é uma ordem de protozoários caracterizada pela presença do cinetoplasto, uma região distinta de sua mitocôndria única e alongada contendo grande quantidade de DNA condensado, e associado ao corpo basal do flagelo. As espécies desta ordem são heterotróficas, de vida livre ou parasitas, possuem um (subordem Trypanosomatida) ou dois flagelos (subordem Bodonina) originados no bolso flagelar (MOREIRA et al., 2004). Outra característica de diversas espécies desta ordem é a capacidade de apresentar diferentes formas em diferentes condições ambientais, tais como amastigota, promastigota, coanomastigota, epimastigota, tripomastigota e opimastigota.

Dentro desta ordem, a família Trypanosomatidae caracteriza-se por conter apenas parasitas um único flagelo. Estes parasitas, dependendo da espécie, são capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros, como rotíferos, nematóides, anelídeos, moluscos, artrópodes, mamíferos, etc. Apesar de poucas espécies de protozoários da família Trypanosomatidae serem capazes de parasitar o homem, esta família possui um grande interesse médico e veterinário, devido ao impacto econômico e em saúde pública, tais como *Trypanosoma brucei* (*T.b. gambiensi*, *T.b. rhodensiense*, agentes etiológicos da doença do sono ou tripanossomíase africana humana); *Trypanosoma brucei brucei*, *T. congolense*, *T. equiperdum*, *T. simiae*, *T. suis* e *T. vivax* (causadores da tripanossomíase africana animal); protozoários do gênero *Leishmania*, tais como *Leishmania donovani* e *L. infantum* (agentes etiológicos da leishmaniose); além de *Trypanosoma cruzi*.

1.2 - *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico causador da doença de Chagas (triplanosomíase americana humana), transmitido pelas fezes e urina de insetos triatomíneos

infectados em contato com feridas, mucosas e ocasionalmente por alimentos. Cerca de 25 milhões de pessoas na América do Sul estão em áreas com risco de contrair a doença, sendo que de 5 a 6 milhões já estão infectadas, e destas, de 30 a 40% tem ou desenvolverão cardiomiopatia, megasíndromes digestivas ou ambas (RASSI e MARINETO, 2010; WHO, 2000). No Brasil, a doença afetava em 1985 cerca de 4,2% da população, com 32% da população em áreas de risco, distribuídas em 12 estados. Em 1999 esse número já havia sido grandemente reduzido, sendo erradicada em oito desses estados (WHO, 2000). No entanto, dados mostram infecções pelo parasita em diferentes áreas, com o aparecimento de microepidemias, causadas principalmente por infecção oral (PRATA, 2001).

Apesar de sua importância em saúde pública, as opções de tratamento farmacológico em doença de Chagas ainda é limitada a dois fármacos: benzimidazol e nifurtimox. Ambas as drogas possuem boa eficácia quando utilizadas na fase aguda da doença, com cerca de 70% de cura; no entanto, os efeitos colaterais destas drogas são consideráveis, incluindo náusea, vômitos, dores abdominais, anorexia, etc., chegando a atingir 40% dos usuários de nifurtimox. A eficácia destas drogas na fase crônica da doença é mais questionada, sendo que um número maior de testes clínicos estão sendo realizados no momento (detalhes sobre o estudo em andamento podem ser encontrados em MARINETO et al., 2009). Novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas vêm sendo desenvolvidos, porém a grande maioria encontra-se ainda em fase pré-clínica (BUCKNER e NAVABI, 2010). Os motivos para poucas drogas antichagásicas existirem no *pipeline* farmacêutico são complexas, incluindo-se aí lacunas no conhecimento de aspectos básicos da bioquímica do parasita e de sua relação com o hospedeiro: o estudo desses aspectos levaria à identificação de novos alvos potenciais de fármacos, que poderiam aumentar o repertório de drogas antichagásicas.

1.3 - Óxido nítrico (NO[•])

Monóxido de nitrogênio, NO[•], também conhecido como óxido nítrico, é um radical livre, possuindo um elétron desemparelhado no orbital antiligante pi*2p. No entanto, sua reatividade é relativamente baixa, sendo que as principais reações radicalares envolvendo NO[•] se devem a outras espécies originárias do mesmo. Um exemplo claro disto é o dióxido de nitrogênio, um radical livre muito mais reativo, que é formado através da reação com oxigênio:



$$R = k[\text{NO}^{\bullet}]^2[\text{O}_2] \quad k = 8,4 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1} (37 \text{ }^{\circ}\text{C})$$

Esta reação segue uma cinética de terceira ordem: segunda ordem com relação ao óxido nítrico e primeira ordem com relação ao oxigênio (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). Este fato tem relevância bioquímica, uma vez que a concentração de óxido nítrico terá grande influência em modificações pós-traducionais de proteínas, a serem discutidas adiante. Diversas outras reações envolvendo óxido nítrico também têm interesse do ponto de vista de modificações pós-traducionais, como é o caso da reação com superóxido (O₂^{•-}):



O peroxinitrito (ONOO^{•-}) é altamente reativo, podendo formar adutos com diversas biomoléculas relevantes, como proteínas, podendo alterar suas funções (ALVAREZ e RADI, 2003).

Além disso, NO[•] é gás incolor relativamente solúvel em água (1,6 mM a 37 °C) e muito solúvel em solventes orgânicos (HALLIWELL e GUTTERRIDGE, 2007), o que permite a difusão deste gás através de membranas celulares, altamente lipofílicas, participando desta maneira em comunicação celular, agindo por exemplo como neurotransmissor no sistema nervoso central.

1.4 – Vias de sinalização por óxido nítrico

NO[•] é um sinalizador químico sintetizado enzimaticamente a partir de L-Arginina em diversos tipos celulares de uma grande quantidade de organismos. Em mamíferos, esta biosíntese se dá pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), presente em três isoformas, com 51 a 57% de homologia em humanos (FORSTERMANN et al., 2003): NOS I, II e III, correspondentes respectivamente a nNOS (neuronal), iNOS (induzível) e eNOS (endotelial) na nomenclatura clássica. Além destas isoformas, discute-se a possibilidade da existência de uma NOS mitocondrial (mtNOS) em determinados tecidos (SCHILD et al., 2003), embora produção de NO[•] mitocondrial possa ocorrer de maneira independente de NOS (LACZA et al., 2006). Tanto NOS III quanto NOS I são dependentes de cálcio-calmodulina e produzem quantidades relativamente baixas de óxido nítrico. Por outro lado, NOS II é independente de cálcio, e capaz de produzir até 50 vezes mais NO[•] do que as outras isoenzimas. Sua atividade é regulada principalmente em nível de transcrição, através de cascatas iniciadas por citocinas (PAUTZ et al., 2010). Sua atividade também é influenciada pela disponibilidade de arginina e a regulação de seu transportador (CLOSS et al., 2000), bem como fosforilação em resíduos de tirosina (HAUSEL et al., 2006), e pela interação física com reguladores como a *heat shock protein 90* (HSP90) (SHAH et al., 1999; GRATTON et al., 2000). O óxido nítrico pode também ser produzido enzimaticamente a partir de nitrato ou nitrito redutases, como descrito em *Plasmodium falciparum*, onde NO[•] é produzido por uma enzima semelhante à nitrato redutase (OSTERA et al., 2008).

O aumento de óxido nítrico intracelular também pode ocorrer por denitrosilação de NO[•] ligado a grupos tióis, grupos heme de proteínas, bem como a outros grupos prostéticos contendo metais, e reserva quelável de ferro (CHVANOV et al., 2006), importante em vegetais (GUPTA, 2011) como *Arabidopsis thaliana* (BELENGHI et al., 2007).

Nas células, NO[•] age por meio de três vias diferentes: a via clássica, envolvendo síntese de GMP cíclico (cGMP) através da ativação de guanilato ciclase; uma via que

controla a atividade de proteínas pela ligação direta do NO^* ao grupo heme da proteína-alvo, como é o caso da citocromo c oxidase; e outra via que envolve a ligação covalente de NO^* com proteínas, em resíduos de tirosina (nitração) ou cisteína (S-nitrosilação), como resume a figura 1.1 (adaptado de MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2011). Note-se ainda na figura 1.1 a S-glutationilação, ligação covalente de glutatona ao grupo tiol de resíduos de cisteína.

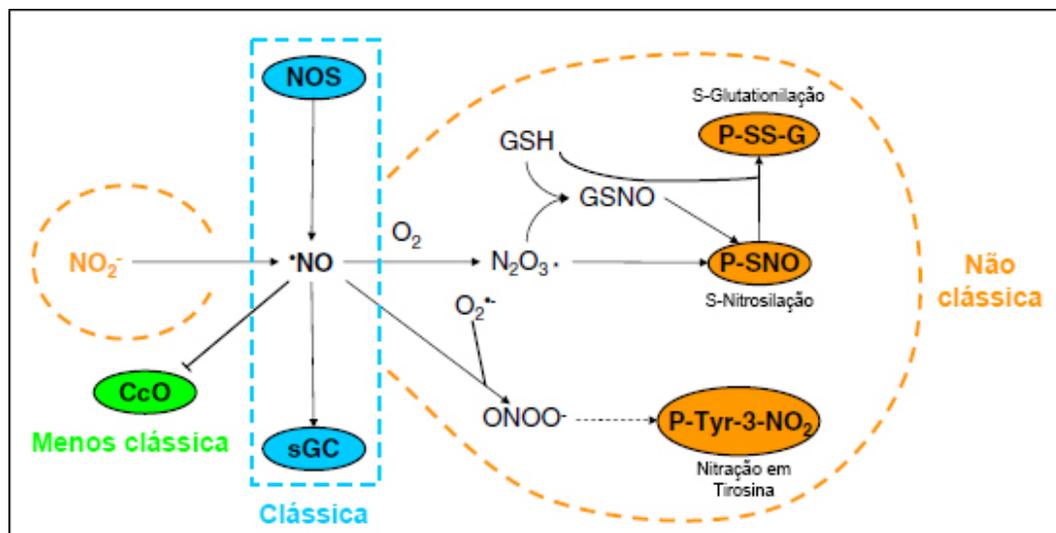


Figura 1.1: Principais vias de sinalização envolvendo NO . CcO: Citocromo c oxidase, sGC: Guanilato ciclase solúvel, NOS: óxido nítrico sintase (adaptado de MARTÍNEZ-RUIZ, 2011).

O NO^* , uma vez produzido ou liberado de seu ligante, difunde-se até interagir com o grupo heme da forma dimérica da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), sendo esta interação responsável por uma alteração conformacional que leva à dissociação do dímero, e consequente produção do segundo mensageiro cGMP, a partir de GTP (RUSSWURM et al., 2004). cGMP, por sua vez, age através da ativação ou inativação de canais de cátion e uma série de proteínas com atividade quinase/fosfatase dependentes de cGMP, como é o caso da PKG. Este segundo mensageiro é antagonizado pela atividade de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDE) (FRANCIS et al., 2010).

Outras vias podem ser controladas por óxido nítrico sem a necessidade de um segundo mensageiro como cGMP. A interação entre NO e grupos metálicos de determinadas proteínas é capaz de modular suas atividades, sendo a citocromo c oxidase

(CcO) o exemplo clássico deste tipo de regulação: CcO é uma enzima que possui grupos prostéticos contendo cobre e ferro, e participa da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, catalisando a redução de O_2 a H_2O . NO é um análogo de O_2 , inibindo a respiração aeróbica de forma competitiva, sendo este fenômeno relevante em concentrações fisiológicas de NO^* , na faixa do nanomolar (BROWN, 1995).

As duas vias de sinalização supracitadas possuem como característica comum a interação de NO^* com metais como ferro e cobre. No entanto, NO^* é também capaz de regular a atividade de proteínas por modificações covalentes em seus aminoácidos, como é o caso da nitração de resíduos de tirosina e S-nitrosilação de resíduos de cisteína.

1.5 – S-Nitrosilação

S-nitrosilação consiste na adição de um grupo nitroso (-NO) em um resíduo de cisteína presente em proteínas (figura 1.2). Tal adição ocorre de forma não enzimática, e devido ao caráter pouco-reativo do óxido nítrico, os mecanismos mais aceitos dessa adição envolvem espécies mais reativas formadas a partir de NO^* , como NO_2^* , $ONOO^-$ e N_2O_3 , formados a partir de grandes concentrações locais de NO^* ou na presença de metais (IWAKIRI et al., 2006). Por se tratar de um mecanismo não-enzimático, a regulação deste fenômeno ocorre em níveis diferentes: compartimentalização (regulando concentração local de NO^*), especificidade por sítios da proteína, *turn-over* da proteína alvo, velocidade e especificidade das reações de denitrosilação e transnitrosilação.

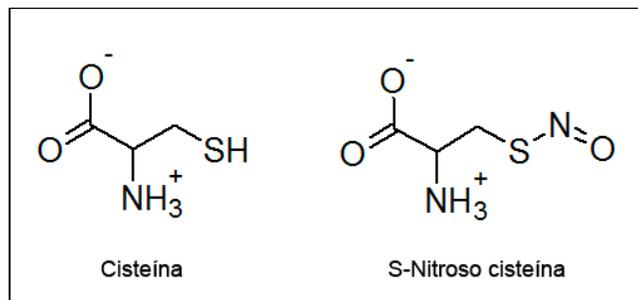


Figura 1.2: Estrutura de cisteína e s-nitroso cisteína

Como esperado, uma maior atividade de NOS está relacionada com uma maior concentração de espécies reativas de nitrogênio (RNS), o que contribui para a S-nitrosilação de proteínas (IWAKIRI et al., 2006). Proteínas localizadas próximas a NOS possuem maior quantidade de resíduos S-nitrosilados, sendo ainda mais comum em proteínas que interagem diretamente com NOS. O melhor exemplo desta regulação é a *heat shock protein 90* (HSP 90), que age estimulando a eNOS em um primeiro momento, contribuindo assim com a vasodilatação (SHAH et al., 1999). No entanto, a produção excessiva de NO leva à S-nitrosilação no resíduo de cisteína 597 da HSP90, fazendo com que esta chaperona aja como inibidor da eNOS, controlando desta maneira a produção de NO por um mecanismo de feedback negativo (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2005).

Reações de denitrosilação são importantes na regulação da S-nitrosilação, permitindo que alguns subgrupos de proteínas possuam grupos nitrosotíois estáveis enquanto que outros subgrupos de proteínas têm seus resíduos de S-nitrosil-cisteína rapidamente convertidos na forma denitrosilada: a S-nitrosilação possui meia-vida que varia de poucos segundos a algumas horas, dependendo da estrutura do composto em questão (MATHEWS e KERR, 1993). Dois mecanismos semelhantes de denitrosilação são conhecidos: o primeiro envolve a reação de glutatona (GSH) com proteínas S-nitrosiladas, formando GSNO, que é então convertido a GSSG pela enzima formaldeído desidrogenase (FDH); GSSH é subsequentemente reduzida a GSH pela ação da glutatona redutase, em

uma reação dependente de NADPH (HAQQANI et al., 2003). Desta forma, o controle da concentração de GSH permite ajustes na S-nitrosilação de proteínas: maiores concentrações de GSH levam a maior denitrosilação. A disponibilidade de NADPH também exerce importante efeito neste controle, por agir regenerando GSH (figura 1.3). Outra via descrita envolve a interação direta de tioredoxina (Trxn) com proteínas S-nitrosiladas, e subsequente eliminação do NO da tioredoxina, formando uma ponte dissulfeto intramolecular que é então reduzida pela tioredoxina redutase, fechando o ciclo (SENGUPTA et al., 2007). A figura 1.4 resume esta via.

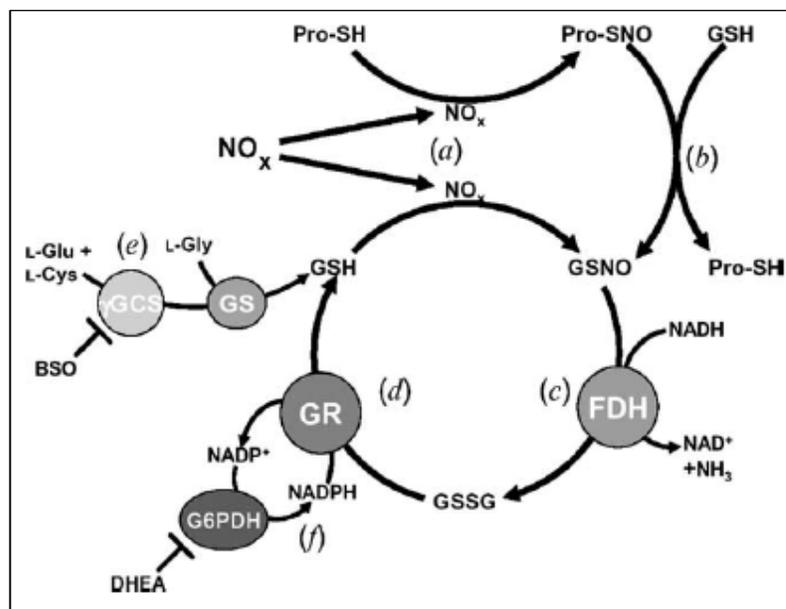


Figura 1.3: Denitrosilação dependente de glutatona. GSH: Glutatona; GSNO: S-nitrosoglutatona; BSO: L-buthionine-(S,R)-sulfoximine; G6PDH: Glicose 6-Fosfato Desidrogenase; FDH: Formaldeído Desidrogenase; GR: Glutatona Redutase; DHEA: dehidroepiandrosterona (reproduzido de HAQQANI, 2003).

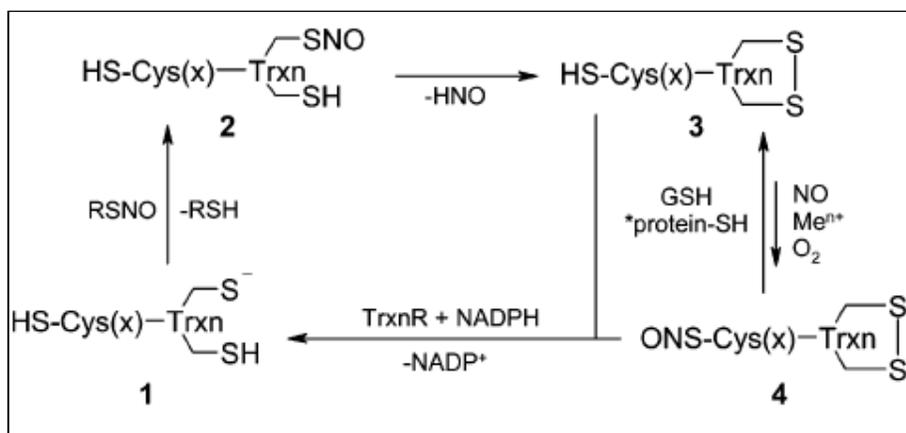


Figura 1.4: Denitrosilação dependente de tioredoxina. Trxn: Tioredoxina; TrxnR: tioredoxina redutase (reproduzido de SENGUPTA, 2007).

Além de participar do processo de denitrosilação, tanto glutatona quanto tioredoxina possuem papel na nitrosilação de proteínas: GSNO pode significativamente aumentar a formação de S-nitrosil-cisteína pela transferência do grupo nitrosil de seu tiol para o de um resíduo de cisteína, através do ataque nucleofílico do grupo tiol ao nitrogênio do GSNO, processo este conhecido como transnitrosilação (SINGH et al., 1996). De maneira análoga, a tioredoxina nitrosilada pode agir nitrosilando proteínas alvo, sendo este fenômeno importante na regulação da atividade de caspase-3, envolvida no processo de apoptose (BENHAR et al., 2008). Outras proteínas também são capazes de realizar transnitrosilação: hemoglobina pode ser S-nitrosilada na cisteína 93 de sua cadeia beta, e o grupo NO pode então ser transferido para a porção citoplasmática do trocador de ânions AE1 na membrana plasmática da hemácia, inibindo a entrada na hemácia de NO^{*} derivado do endotélio (PAWLOSKI et al., 2001). Mais recentemente, um exemplo de transnitrosilação conseguiu resolver um dos problemas do campo de modificações pós-traducionais por S-nitrosilação. NOS é uma enzima citoplasmática, sendo a concentração de NO^{*} no núcleo muito baixa para que ocorra S-nitrosilação de forma extensiva, e no entanto, diversas proteínas nucleares são encontradas S-nitrosiladas. Verificou-se que gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma enzima clássica da via glicolítica, é capaz de ser translocada ao núcleo após sua S-nitrosilação (HARA et al., 2005), podendo então nitrosilar diversos

alvos, como fatores de transcrição que regulam diversos processos biológicos (KORNBERG et al., 2010).

Fica claro que a S-nitrosilação é uma modificação pós-traducional importante na sinalização celular. Em plantas, já foi demonstrado o controle por S-nitrosilação de processos como trocas gasosas, defesa contra infecções, germinação e desenvolvimento de raiz (LINDERMAYR e DURNER, 2009). Em animais, S-nitrosilação parece também estar envolvida em um grande número de fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos relevantes: além de apoptose, mencionada acima, a relação de S-nitrosilação com o sistema nervoso central é particularmente estudada no momento, participando da fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas (NAKAMURA e LIPTON, 2011). Recentemente foi desenvolvido o dbSNO (<http://dbsno.mbc.nctu.edu.tw/>), um banco de dados que vem sendo compilado contendo informações relevantes quanto a proteínas S-nitrosiladas em uma grande variedade de organismos, incluindo, quando possível, resíduo modificado e função biológica (LEE et al., 2012).

Quanto à especificidade da S-nitrosilação, diferentes estudos demonstram a importância do ambiente tridimensional para que a reação ocorra, tornando difícil a previsão de regiões de S-nitrosilação a partir da estrutura primária de um polipeptídeo, embora progressos consideráveis vêm sendo realizados, sendo o software GPS-SNO particularmente promissor (XUE et al., 2010). No entanto, algoritmos para a identificação de sítios de S-nitrosilação ainda possuem baixo poder preditivo, devendo este problema ser abordado por técnicas de proteômica (MARINO e GLADYSHEV, 2010). Devido ao fato da S-nitrosilação ser uma modificação pós-traducional relativamente lábil, foi necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam a identificação de proteínas S-nitrosiladas em tempo adequado. A técnica mais utilizada para este fim é o *biotin-switch* (JAFFREY e SNYDER, 2001): esta técnica consiste no bloqueio de tióis livres por metanotiosulfonato de metila, seguido de redução de S-nitroso-cisteína por ascorbato e reação com HPDP-Biotina, sendo este grupo

consideravelmente mais estável e podendo ser identificado ou purificado pelo uso de estreptavidina (figura 1.5).

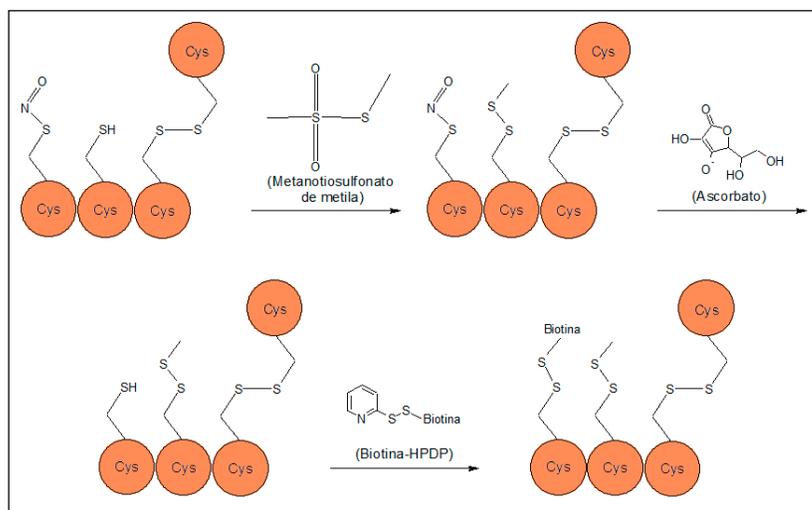


Figura 1.5: *Biotin-switch*. Grupos tióis livres são bloqueados por metanotiosulfonato de metila, em seguida S-nitroso-tióis são reduzidos de maneira branda a tióis, sem afetar pontes disulfeto presentes no polipeptídeo. Os grupos tiol agora presentes reagem então com Biotina-HPDP, sendo a afinidade de biotina por streptavidina explorada em etapas seguintes.

Esta técnica pode ainda ser utilizada para a identificação do resíduo S-nitrosilado: após a biotinilação, as proteínas são tratadas com tripsina ou outra protease adequada, purificadas por *pull-down* em resina de estreptavidina e, após numerosas lavagens, os peptídeos podem ser identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (nLC/MS-MS) (DERAKHSHAN et al., 2007). Apesar de sua grande especificidade para grupos SNO, não gerando produtos biotinizados a partir de outras modificações de tióis como pontes disulfeto e ácidos sulfênicos (FORRESTER et al., 2007), a técnica de *biotin-switch* pode levar à não detecção de algumas proteínas: devido às etapas de precipitação e lavagens em acetona (100% e 70% respectivamente), é provável que proteínas de baixa massa molecular e proteínas altamente lipofílicas sejam perdidas durante o processamento.

1.6 – Nitração em tirosina

Outra alteração pós-traducional que vem ganhando destaque na literatura é a nitração em resíduos de tirosina. Tal alteração consiste na incorporação de um grupo nitro (-NO_2) na posição 3 do anel aromático do aminoácido tirosina (figura 1.6). Esta adição se dá através do agente nitrante ONOO^- , que por sua vez é produzido intracelularmente a partir de NO por diversos mecanismos, de maneira análoga ao caso da S-nitrosilação, com a participação de espécies reativas de nitrogênio (RADI, 2004). É importante notar que ao contrário de cisteína S-nitrosilada, resíduos de tirosina nitrados tem meia vida longa *in vitro*, podendo chegar a anos.

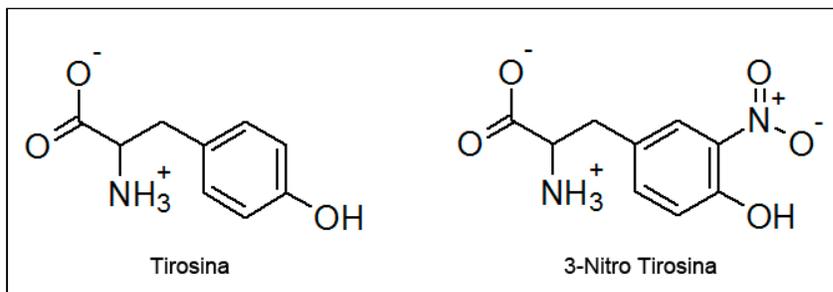


Figura 1.6: Estrutura de tirosina e 3-nitro-tirosina

A participação de 3-nitro-tirosina em vias de sinalização celular é um tópico ainda pouco explorado, pouco se conhecendo sobre sua regulação. Apesar desta classe de modificações ocorrer em um subgrupo específico de proteínas, pouco se sabe sobre os fatores que levam a uma maior nitração, e não foi identificada até o presente momento nenhuma enzima com atividade de denitração (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2011), embora tenha sido identificada atividade de tirosina-denitrase em extratos de baço e pulmão de rato (KAMISAKI et al., 1998), e uma possível atividade de tirosina-denitrase em proteínas específicas, como em Histona H1.2 (IRIE et al., 2003). Uma possibilidade aventada é que a nitração de proteínas seja um sinal para poliubiquitinação e posterior degradação por proteossomas (SOUZA et al., 2000). No entanto, evidências sugerem que nitração é capaz

de modular a atividade de enzimas, por diminuir o pKa da tirosina de 10,1 para 6,8 (pKa muito próximo da histidina, aminoácido importante em catálises ácido-base) e adicionar um substituinte relativamente volumoso (de 205 para 235 Å). Esse aumento da cadeia lateral da tirosina em cerca de 30 Å impediria a fosforilação da hidroxila da tirosina (ABELLO et al., 2009), sendo este um possível mecanismo de controle de fosforilação. Essas alterações são especialmente influentes quando ocorrem em um resíduo de tirosina presente no sítio ativo. Esse é o caso da enzima Manganês Superoxido Dismutase (MnSOD), presente nas mitocôndrias e cuja nitração no resíduo Tyr-34 leva a uma inibição da sua atividade de dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (MACMILLAN-CROW e THOMPSON, 1999).

Embora a maioria dos casos de nitração relatados na literatura envolvam perda de função, comumente associado com poliubiquitinação e direcionamento para o proteasoma (GRUNE, 1998), há trabalhos mostrando a ativação de proteínas após nitração em resíduos de tirosina. Um exemplo disto é proteína quinase C, isoforma ϵ (PKC ϵ): após nitração, PKC ϵ aumenta sua afinidade por RACK2, que ativa PKC ϵ permitindo a sua translocação para o núcleo e consequente fosforilação de proteínas alvo (BALAFANOVA et al., 2002). Outro caso de ganho de função biologicamente relevante acontece com a glutatona s-transferase 1 microsomal: após nitração no resíduo de tirosina 92, essa enzima tem um aumento de sua atividade de detoxicação. Desta maneira, glutatona s-transferase age como um sensor de dano por espécies reativas de nitrogênio, tais como ONOO $^-$, podendo responder rapidamente a esse tipo de lesão (JI et al., 2006).

Assim como em S-nitrosilação, verificou-se alteração no perfil de proteínas nitradas em diversas situações fisiológicas e fisiopatológicas, como na defesa em vegetais como *A. thaliana* (CECCONI et al., 2009) e em diferentes fases do ciclo em células de mamíferos (JIA et al., 2011), embora em ambos os casos não fique claro se a nitração destas proteínas participa de algum evento relevante ou se ela é consequência de, por exemplo, uma maior atividade NOS. Em outro exemplo de função, a nitração em diferentes resíduos de tirosina da α -sinucleína é fundamental para essa proteína interagir com integrinas de membrana,

levando à sinalização de morte celular em neurônios, sendo este mecanismo uma possível causa de doenças neurodegenerativas (LIU et al., 2011).

O estudo de modificações pós-tradução por nitração em tirosina possui menos ferramentas do que o estudo de S-nitrosilação: apesar da tentativa de se desenvolver métodos químicos eficazes para a detecção de tirosina nitrada em proteínas, usando derivatização, de forma análoga ao *biotin-switch* (TSUMOTO et al., 2010), a aplicabilidade de tais técnicas permanece limitada. Por outro lado, a grande estabilidade de nitro-tirosina (que pode chegar a anos *in vitro*, ao contrário da meia-vida de segundos a minutos de S-nitroso-cisteína) e o desenvolvimento de anticorpos específicos contra esta modificação permitem que a detecção dessas alterações possa ser realizada por técnicas imunológicas, tais como imunoprecipitação e eletroforese bidimensional seguida de *immunoblotting*.

Vale ressaltar que 3-nitro-tirosina não é a única modificação pós-traducional envolvendo o grupo nitro: há relatos na literatura de nitração na posição 6 de triptofano (figura 1.7), com possível papel fisiológico: diversas proteínas ribossomais foram encontradas nitradas em triptofano, levantando-se a hipótese de sua participação em diferenciação celular (KAWASAKI et al., 2011). No entanto, o estudo de tais modificações é dificultado pela inexistência de ferramentas adequadas, tais como anticorpos, que embora tenham sido desenvolvidos contra esta modificação não estão disponíveis comercialmente (IKEDA et al., 2007).

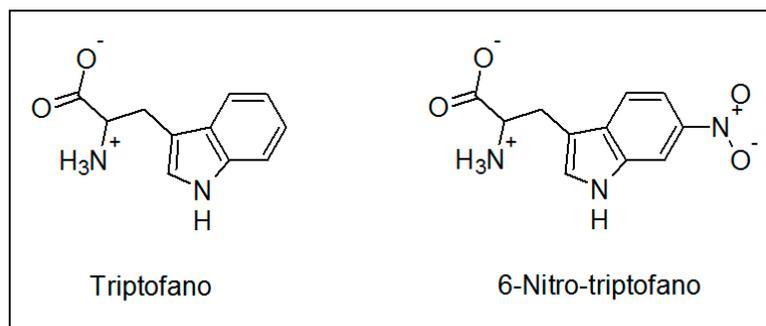


Figura 1.7: Triptofano e sua forma nitrada na posição 6.

1.7 - S-nitrosilação e nitração em protozoários

É importante ressaltar que os exemplos e vias metabólicas discutidas acima foram estudados em mamíferos e plantas.

Em parasitas, além da modificação de proteínas com possível papel fisiológico, é necessário se considerar também as suas estratégias de sobrevivência contra os danos oxidativos desencadeados pela célula hospedeira, como a presença de tripanotiona e tripanotiona redutase, tioredoxina e tioredoxina redutase, entre outras, que poderiam agir revertendo modificações indesejadas em proteínas.

Parasitas interagem com concentrações relativamente altas e potencialmente nocivas de óxido nítrico exógeno, gerado por exemplo durante o *burst* oxidativo de fagócitos. No entanto, seu papel em sinalização celular não deve ser desprezado: a presença de NOS foi descrita em tripanosomatídeos, mais especificamente em *Leishmania donovani* (BASU et al., 1997), e outros parasitas humanos, tais como *Toxoplasma gondii* e *Schistosoma* (JORTZIK et al., 2012). Em *T. cruzi*, foi descrita inicialmente a atividade de NOS em extratos proteicos do parasita, passível de ser inibida por *L-N^G-Nitroarginine methyl ester* (L-NAME), um inibidor competitivo da NOS (PAVETO et al., 1995). Em trabalho subsequente, especulou-se que essa atividade seria realizada por uma NOS análoga à isoforma neuronal de mamíferos, sendo essa conclusão baseada em dados de microscopia eletrônica de transmissão utilizando anticorpos policlonais anti-nNOS conjugados a ouro coloidal (GOLDSTEIN et al., 2000). É interessante ressaltar que ao se analisar o genoma de *T. cruzi*, não há anotada uma enzima NO Sintase típica. A proteína mais próxima seria a Citocromo P450 redutase (71 kDa) (CYP450 Redutase), com uma homologia de 52% com a nNOS de mamífero.

Em *T. cruzi*, o controle da atividade protéica devido a alterações em proteínas por S-nitrosilação ou nitração é incipiente, o mesmo acontecendo em outros parasitas. Sabe-se, porém, que compostos doadores de óxido nítrico são capazes de nitrosilar proteínas-chave

de diversos parasitas, como *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum*, inibindo-as e tornando os parasitas inviáveis (JORTZIK et al., 2012). É o caso da S-nitrosilação de cisteína proteases, como cruzipaína, essenciais a esses parasitas (VENTURINI et al., 2000). É interessante notar que a infecção por *T. cruzi* leva a uma maior nitração em tirosina nas proteínas no hospedeiro, possivelmente uma consequência da maior produção de NO e superóxido, que reagem formando peroxinitrito, um agente nitrante. No entanto, o perfil das proteínas modificadas sugere que as proteínas nitradas favoreceriam a sobrevivência do parasita, por influenciarem negativamente as funções destas proteínas da célula hospedeira (DHIMAN et al., 2008).

Também se conhecem várias outras alterações covalentes em tióis (prenilação, palmitoilação, S-glutationação), especialmente em resíduos de cisteína presentes em proteínas que participam de processos como transdução de sinais, localização celular e regulação redox de proteínas. Porém, novamente, o conhecimento destas alterações pós-traducionais em *T. cruzi* é limitado. Em plasmódio, um grande número de proteínas S-glutationiladas (modificação por glutatona em resíduos de cisteína da proteína-alvo) foi descrito, correspondendo em condições fisiológicas, a aproximadamente a 10% do proteoma desse parasita (KEHR et al., 2011).

Em resumo, as modificações descritas - nitração, S-nitrosilação ou S-glutationilação - foram muito pouco estudadas em parasitas, como é o caso de *T. cruzi*, incluindo-se aí a identificação de proteínas com essas modificações.

1.8 - Interação entre *Trypanosoma cruzi* e componentes da matriz extracelular

A matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM) é a porção de um tecido animal vista classicamente como a responsável por seu suporte estrutural e arranjo tridimensional. É constituída por mais de 300 proteínas e glicoproteínas contendo domínios repetitivos. O “matrisoma” de mamíferos contém 43 monômeros diferentes de colágeno, envolvido na

resistência do tecido à tensão, mais de 30 diferentes proteoglicanos (glicoproteínas com glicosaminoglicanos ligados covalentemente), envolvidos na viscosidade e hidratação do tecido, e cerca de 200 diferentes glicoproteínas com funções diversas, como elastina, fibrilina, fibronectina, laminina, trombospondina, etc. (HYNES et al., 2012).

No entanto, o papel da matriz extracelular não está restrito a aspectos estruturais: diferentes componentes da ECM são capazes de interagir com diferentes receptores celulares, como integrinas, sendo capaz de agir em sinalização celular. De fato, a ECM parece ser um componente essencial em processos como migração, proliferação, polaridade e diferenciação celular, desencadeando diferentes respostas nas células tanto por sua rigidez quanto por sua composição química, por ser capaz de expor em momentos distintos moléculas diferentes, tais como fatores de crescimento (KIM et al., 2011). Diversos fatores de crescimento possuem afinidade por heparan sulfato, fibronectina e vitronectina, e de fato, devido à sua natureza semi-sólida, a matriz extracelular é capaz de agir como reservatório de fatores de crescimento, formando gradientes de concentração desses fatores, relevantes para a geração da organização heterogênea de diferentes tecidos. Além disso, a ECM é reorganizada constantemente por dois mecanismos principais: síntese diferenciada de componentes da ECM em momentos distintos e *turn-over* de certos componentes pela atividade de metaloproteinases e heparanases presentes tanto no tecido, quanto na superfície de diferentes tipos celulares; tal degradação de componentes da ECM também possui importância em sinalização, por expor diferentes fatores de crescimento às células que constituem o tecido (HYNES, 2009).

Integrinas fornecem um bom exemplo do tipo de resposta que componentes da matriz extracelular são capazes de induzir na célula alvo. Essas moléculas são receptores de membrana heterodiméricos, compostos por uma subunidade alfa e uma subunidade beta ligadas não-covalentemente, formando 28 combinações diferentes, com afinidades distintas por diversos componentes da ECM, embora com certa sobreposição entre diferentes receptores e seus ligantes. Tais receptores estão ligados fisicamente, de maneira direta ou

indireta, a cerca de 180 diferentes proteínas adaptoras e/ou envolvidas em sinalização celular, tais como diferentes tirosinas quinase e fosfatases, actina, GTPases, etc., sendo este conjunto de interações conhecido como o adesoma de integrina. A interação de integrina com seu ligante extracelular leva a alterações estruturais que permitem a ligação de adaptadores diferentes em sua porção citoplasmática, regulando desta maneira respostas diferentes (WOLFENSON et al., 2013). Apesar destes receptores serem capazes de transduzir sinais provenientes de fatores de crescimento, é importante ressaltar que tais fatores possuem muitas vezes receptores específicos na membrana celular, ocorrendo portanto um complexo processo de *cross-talk*, que ajusta de maneira fina a resposta celular (ALAM et al., 2007).

Diversos componentes da matriz extracelular são capazes de agir como ligantes não-canônicos de diversos receptores, ativando-os. Exemplos incluem as proteínas da ECM laminina, tenascina, trombospondina e fibrilina, todas elas incluindo domínios semelhantes ao do fator de crescimento endotelial (*endotelial growth factor*, EGF), sendo capazes de se ligarem diretamente ao receptor de EGF e darem início à cascata de sinalização (KIM et al., 2011). Outras proteínas da ECM são capazes de se ligarem a receptores específicos na superfície celular, desencadeando respostas. Exemplos incluem o receptor distroglicano (capaz de se ligar a laminina, agrinina e perlecano), *discoidin domain receptor* (DDR, capaz de se ligar a diferentes colágenos) e CD44 (com afinidade por ácido hialurônico) (HYNES et al., 2012).

Diversas proteínas de *T. cruzi* são capazes de interagir com componentes da matriz extracelular e moléculas da superfície da célula hospedeira, sendo importantes para o processo de invasão. Um exemplo muito estudado em nosso laboratório é o da família de glicoproteínas Tc85, capazes de interagir com laminina em uma interação potencializada por galectina-3 (GIORDANO et al., 1999; MOODY et al., 2000; MARROQUIN-QUELOPANA et al., 2004). Tais glicoproteínas são importantes no processo patológico, uma vez que anticorpos monoclonais contra Tc85 são capazes de inibir a invasão (ALVES et al., 1986).

Outras proteínas desta superfamília interagem com fibronectina ou colágeno (OUASSI et al., 1984; VELGE, 1988), heparan sulfato (ORTEGA-BARRIA e PEREIRA, 1991) ou galectina-3 (KLESHCHENKO e MOODY 2004). Além disso, proteínas de *T. cruzi* são capazes de interagir com componentes da célula hospedeira, modulando a expressão de genes da matriz extracelular, facilitando a invasão pelo parasita. É o caso da gp83, que se liga à célula hospedeira aumentando sua transcrição de LAMC1, e conseqüentemente facilitando a invasão (NDE et al., 2006). Trombospondina-1 também sofre aumento de expressão, conseqüentemente facilitando a infecção por *T. cruzi* pela interação desta proteína de matrix com calreticulina presente na superfície do parasita (SIMMONS et al., 2006; JOHNSON et al., 2012), embora ainda seja desconhecido o ligante responsável por essa sinalização.

Outros exemplos de interações entre moléculas de *T. cruzi* e componentes da matriz extracelular ou da membrana da célula hospedeira, e subsequente modulação de vias de sinalização da célula hospedeira, foram descritos na literatura e têm sido alvo de revisões (ALVES e COLLI, 2007; CÁRDENAS et al., 2010; NDE et al., 2012). No entanto, apesar da interação ECM e *T. cruzi* também desencadear alterações no parasita, poucos estudos exploram este aspecto, permanecendo a sinalização intracelular em *T. cruzi* em resposta a componentes da matriz extracelular, em grande parte, desconhecida: a interação do parasita com laminina e fibronectina, componentes da ECM, é capaz de alterar o perfil de fosforilação de proteínas do parasita, levando a diversas adaptações da maquinaria molecular do parasita durante o processo de infecção (MATTOS et al., 2012).

1.9 - Sinalização intracelular por NO em *Trypanosoma cruzi*

Pouco se conhece sobre a sinalização intracelular desencadeada em *T. cruzi* no momento da invasão. Por essa razão, nosso laboratório iniciou recentemente um projeto mais geral, procurando modificações pós-traducionais de proteínas de *T. cruzi* ocasionadas pela adesão a ECM ou seus elementos isolados (no caso, fibronectina e laminina). Esse

sistema tem a grande vantagem de permitir o estudo da resposta do parasita na ausência de células hospedeiras, separando de forma inequívoca a sinalização do *T. cruzi*, embora que restrita à etapa de adesão e não de adesão/ invasão. A interação do parasita com laminina e fibronectina altera o perfil de fosforilação de proteínas do parasita, bem como sua localização celular, levando a diversas adaptações da maquinaria molecular do parasita durante o processo de infecção (MATTOS et al., 2012). Estudos preliminares em nosso laboratório com relação a alterações desencadeadas em proteínas por NO^{*} (S-nitrosilação em cisteína e nitração em tirosina) foram detectadas, mas estas últimas não foram exploradas.

Apesar de se supor a existência de uma enzima equivalente a NOS neuronal em tripanosomatídeos (GOLDESTEIN et al., 2000), capaz de induzir um aumento de cGMP (PAVETO et al., 1995) não se conhece ao certo a importância da produção de NO^{*} intracelular em *T. cruzi*, uma vez que não foi identificado uma guanilato ciclase típica em seu genoma, especulando-se que esta atividade seria exercida por uma adenilato ciclase, uma vez que esta enzima possui um domínio putativo de guanilil ciclase (ALEXANDRE et al., 1990; LAXMAN e BEAVO, 2007). Em *T. cruzi*, a adenilato ciclase é importante em processos como a diferenciação celular (RANGEL-ALDAO et al., 1988), tendo o cAMP a capacidade de ativar uma PKA no parasita, que por sua vez é capaz de modular a atividade de diversas proteínas (BAO et al., 2008).

A degradação de mononucleotídeos cíclicos se dá por fosfodiesterases, sendo que em *T. cruzi* quatro famílias desta enzima já foram identificadas. É interessante notar que dentre as fosfodiesterases descritas, uma delas possui atividade dupla, sendo capaz de clivar tanto cAMP quanto cGMP, com *K_m* semelhantes (KUNZ et al., 2005).

Em resumo, existem evidências que demonstram a importância da via clássica de sinalização por NO^{*} em *T. cruzi*, embora os detalhes sejam em grande parte desconhecidos e existam algumas peculiaridades próprias deste microorganismo, como a ausência de uma

guanilato ciclase típica e a presença de tripanotiona, sintetizada a partir de espermidina e glutatona. A tripanotiona possui atividades biológicas semelhantes à glutatona e é capaz de coordenar dois grupos NO[•] em um átomo de ferro em sua molécula, podendo ser importante em reações envolvendo esse radical (BOCEDI et al., 2010). Além do pouco conhecimento envolvendo a via clássica de sinalização por NO[•] em *T. cruzi*, permanecem inexploradas outras possibilidades de sinalização, como S-nitrosilação e nitração.

2 – OBJETIVOS

Tendo em vista a carência de informações com relação à sinalização celular desencadeado por óxido nítrico em *T. cruzi* durante o processo de infecção, o objetivo do presente trabalho foi a identificação de proteínas de formas tripomastigotas de *T. cruzi* modificadas por S-nitrosilação e nitração após incubação com matriz extracelular.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a atividade de NO Sintase e a concentração de NO[•] produzido por tripomastigotas de *T. cruzi* durante incubação com ECM;
2. Identificação de proteínas modificadas por S-nitrosilação (cisteína) e nitração (tirosina) após interação de tripomastigotas com ECM, partir de gel 2D e MS/MS;
3. Identificação de proteínas S-nitrosiladas, e seu respectivo resíduo modificado, através de *biotin-switch*;
4. Identificação de proteínas nitradas em tirosina por imunoprecipitação seguido de espectrometria de massas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Cultura celular

Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, foram mantidas por infecção de células LLC-MK2 em meio DME suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) (ANDREWS e COLLI, 1982). Após cinco dias de infecção, os parasitas liberados para o meio foram coletados, lavados três vezes em PBS, ressuspensos na densidade celular adequada em meio DME- 2% SFB e utilizados nos respectivos experimentos.

A forma epimastigota de *T. cruzi*, cepa Y, foi mantida a 28 °C em meio LIT (*Liver infusion tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (CAMARGO, 1964) em densidades celulares variando entre 10^5 e 10^7 células por mL.

3.2 - Incubação de *Trypanosoma cruzi* com matriz extracelular

A matriz extracelular (matrigel) derivado de tumor EHS (fibroblasto) utilizada nos experimentos foi adquirida comercialmente (GIBCO, Estados Unidos).

Matriz extracelular (concentração final de 10 mg/mL) e parasitas foram incubados a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em concentrações e tempos específicos em cada experimento. Em determinados experimentos foi adicionado um grupo experimental com a mesma quantidade de parasitas contendo 10 mM de L-NAME, inibidor competitivo de NOS. Em seguida, os parasitas foram coletados, lavados em PBS contendo inibidores de fosfatase (5 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄ e 50 µM Na β-Glicerofosfato) e coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) acrescido de 1 mM de *phenylmethanesulfonylfluoride* (PMSF).

3.3 - Imunofluorescência

Os parasitas submetidos às diferentes condições experimentais foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos, lavados três vezes com PBS (3000 x g, 10 minutos) e fixados em 2% paraformaldeído por 30 min. à temperatura ambiente. As células foram permeabilizadas em tampão PBS contendo 1% albumina e 0,1% Triton X-100 à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, os parasitas foram lavados mais três vezes em PBS e incubadas a 8 °C por 14 a 16 horas em anticorpo primário comercial (anti-nitrosocisteína, anti-nitrotirosina ou anti-nNOS, todos em diluição de 1:200), e após novas lavagens, incubados por mais uma hora a 37 °C com anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 555 ou isotiocianato de fluoresceína (FITC). Em determinados experimentos, um segundo anticorpo primário foi também utilizado para demarcar a morfologia do parasita (anti-tubulina em diluição de 1:500).

Cerca de 10^7 parasitas de *T. cruzi* foram ressuspensos em Fluor Save® (Merck) contendo 10 µg/mL de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e visualizados em microscopia de fluorescência.

As imagens adquiridas foram deconvoluídas utilizando-se algoritmo de deconvolução cega pelo software Huygens Essential (Scientific Volume Imaging).

3.4 – Ensaio de incorporação de metionina radioativa

Para análise da velocidade de síntese proteica de nNOS durante a incubação de tripomastigotas com ECM foram realizados ensaios de incorporação de ^{35}S -metionina. Inicialmente os parasitas foram ressuspensos em meio MEM sem metionina, contendo 5% de SFB e incubados por 20 min a 37 °C e 5% CO_2 . Em seguida, foram adicionados 500 µCi de ^{35}S -metionina para cada 1×10^9 parasitas, seguida de nova incubação. 1×10^9 parasitas marcados foram incubados com 1 mL de ECM em garrafas de 25cm² durante os tempos de

5, 30, 60 e 120 min. Após incubação, os parasitas foram coletados e os precipitados foram lavados duas vezes com PBS acrescido dos inibidores de protease e fosfatase descritos previamente. Finalmente, os precipitados foram congelados para posterior imunoprecipitação de nNOS, como descrito no item 3.9. Após a imunoprecipitação, as amostras foram separadas em SDS-PAGE 12%. O gel foi seco utilizando-se o secador Gel Dryer (Bio-rad), exposto a filme de raio X a -80 °C por 30 dias e revelado.

3.5 – Preparação de extrato proteico de *Trypanosoma cruzi*

O precipitado de parasitas foi ressuspensão no tampão adequado, indicados abaixo, e em seguida submetidos a sonicação por 15 min. em gelo e centrifugados a 20000 x g por 10 min. a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e as proteínas dosadas por Bradford (BRADFORD, 1976). Dependendo do experimento, a fração insolúvel foi também processada, sendo especificada em cada caso.

Géis bidimensionais (2D): o precipitado de parasitas foi ressuspensão em tampão DeSTREAK (GE Healthcare) contendo inibidores de fosfatase (5 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄ e 50 µM Na β-Glicerofosfato) e coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) acrescido de 1 mM de PMSF.

Géis unidimensionais (SDS-PAGE): o precipitado foi ressuspenso diretamente em tampão de Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris-HCl com 10% de β-Mercaptoetanol para condição redutora, ou sem β-Mercaptoetanol para condição não-redutora). As amostras foram fervidas a 100 °C por 5 min.

Imunoprecipitação: o precipitado de parasitas foi ressuspensão em pequeno volume de tampão RIPA (150 mM NaCl, 1% IGEPAL® CA-630, 0,5% Deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS e 50 mM Tris pH 8,0) contendo inibidores de fosfatases e proteases como no item

anterior, e após sonicação e centrifugação, o sobrenadante foi diluído cerca de 10 vezes em Tris-HCl 20 mM.

Atividade da enzima NOS: 5×10^8 parasitas foram ressuspensos em 150 μ L de tampão Tris-HCl 250 mM, pH 7,4, contendo 10 mM de EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) e 10 mM de EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*).

Biotin-switch: o precipitado foi resuspendido em tampão contendo 25 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1% NP-40 além de inibidores de fosfatases (5 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 e 50 μ M Na β -Glicerofosfato) e coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) acrescido de 1 mM de PMSF.

Purificação de enzima com atividade de síntese de NO e dosagem de SNO: o precipitado de epimastigotas foi ressuspensado em PBS pH 7,4 contendo 1% de NP-40 e inibidores de fosfatases (5 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 e 50 μ M Na β -Glicerofosfato) e coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) acrescido de 1 mM de PMSF.

3.6 - Dosagem de NO extracelular

10^9 tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubados em diferentes tempos (0, 30, 60 e 120 min.) com matriz extracelular ou apenas com meio contendo 2% de soro fetal bovino contendo ou não 10 mM de L-NAME (Piacenza et al., 2001). O sobrenadante foi coletado e, após remoção dos parasitas por centrifugação a 14000 x g por 10 min., o NO^* foi dosado utilizando-se o kit Measure iT High-Sensitivity Nitrite Assay Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O tempo de uma hora foi escolhido para experimentos subsequentes, por revelar maior diferença na concentração de NO^* .

3.7 - Quantificação de S-nitrosotiois totais

Nitrosotiois totais foram quantificados através do método de Griess após redução de SNO por HgCl_2 , como descrito por Cook (COOK et al., 1996). Em resumo, 10^9 tripomastigotas de *T. cruzi*, foram incubados por duas horas com matriz extracelular ou apenas com meio contendo 2% de soro fetal bovino. Após lavagens e extração de proteínas como descrito no item 3.5 (utilizando cerca de 200 μL de solução de extração), após remoção da fração insolúvel por centrifugação a 14000 x g por 10 min., o sobrenadante foi coletado. Em seguida, misturou-se o extrato proteico em solução de 57 mM de sulfanilamida e 1,2 mM de *N*-(1-Naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDD) em PBS pH 7,4, na proporção de 1:10. Em seguida, 200 μL desta mistura foram aplicados em placa de 96 poços, e a reação foi iniciada pela adição de 2 μL de 10 mM de HgCl_2 (concentração final 100 μM). Para cada grupo, foram feitos controles sem a adição de cloreto de mercúrio, utilizados para se descontar a absorbância causada por NO presente na amostra antes da redução de SNO a NO. A curva padrão de SNO foi realizada com concentrações crescentes de nitrosoglutatona adquiridas comercialmente (SIGMA).

3.8 - Medida da atividade de NO Sintase

5×10^8 parasitas foram ressuspensos em 150 μL de tampão Tris-HCl 250 mM, pH 7,4, contendo 10 mM de EDTA e 10 mM de EGTA e lisados em ultrassom por 20 minutos. Após centrifugação a 20000 x g por 10 min. a 4 °C, o sobrenadante foi coletado para realização dos testes de atividade.

Cada reação foi realizada adicionando-se 20 μL do extrato proteico a 50 μL de solução de reação (tampão Tris-HCl 250 mM, pH 7,4, contendo, 2 mM de NADPH, 1,2 mM de CaCl_2 , 1,6 mM de MgCl_2 e 0,1 μM de Calmodulina). Em seguida, adicionou-se 1 μL de [3H] Arginina (1 mCi/mL) a cada tubo (concentração final de 0,3 μM) e, após 2, 10 ou 30 min. de reação à temperatura ambiente, a reação foi finalizada pela adição de 400 μL de

tampão pH 5,5 contendo 50 mM de HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) e 5 mM de EDTA. Optou-se por utilizar nestes ensaios o tempo de incubação de 2 min., como descrito anteriormente na literatura (GOLDSTEIN et al., 2000), pela dificuldade em utilizar tempos menores e pelo fato de que neste tempo ainda não houve conversão excessiva de arginina em citrulina.

Após a remoção da arginina remanescente incubando-se cada amostra por cinco minutos com 500 µL de resina de troca catiônica (Bio-Rex[®] 70), 500 µL do sobrenadante foram utilizados para a determinação de radioatividade após a adição de 5 mL de líquido de cintilação (Tolueno/Triton X-100 1:1 v/v, PPO (2,5-Diphenyloxazole) 4 g/L e POPOP (1,4-bis(5-phenyloxazol-2-yl) benzene) 0,3 g/L). Como controle positivo da reação de conversão de arginina para citrulina, utilizou-se mesma massa de extrato de células LLCMK2, e, como controle negativo, tampão contendo 50 mM de HEPES e 5 mM de EDTA.

A formação de citrulina, produto da reação a partir de arginina com liberação de NO, foi confirmada por cromatografia em camada delgada em placa de sílica e fase móvel contendo 85% metanol e 15% hidróxido de amônio. Utilizaram-se como padrões 1 mM de arginina, citrulina e ornitina. Após secagem, a placa foi corada com ninhidrina (2 mg/mL em 3% de ácido acético) e a sílica nas regiões correspondentes aos padrões cada amostra foi removida e utilizada para a determinação de radioatividade.

3.9 – Quantificação de L-Arginina e L-Citrulina por eletroforese capilar

1×10^9 tripomastigotas de *T. cruzi* foram incubados ou não com matriz extracelular por duas horas a 37 °C, e após lavagens sucessivas em PBS contendo inibidores de protease e fosfatase (5 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 50 µM Na β-Glicerofosfato, coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) e de 1 mM de PMSF), os parasitas foram lisados em metanol:água (1:1), centrifugados a 4 °C e 14000 x G por 10 minutos, e o sobrenadante coletado e seco em SpeedVac. 200 µL de água MilliQ foi então adicionado ao precipitado seco, e submetido

a centrifugação (4 °C e 14000 x G por 10 minutos) para remoção de impurezas. O sobrenadante foi coletado e submetido à análise por eletroforese capilar (modelo PA 800, Beckman Couter Instruments, Fullerton, USA), com detector UV, aquisição e tratamento de dados pelo software 32 Karat versão 8.0 (Beckman Couter), utilizando um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) de 50,2 cm de tamanho total, 40,0 de tamanho efetivo e 50 µm de diâmetro interno. O capilar foi previamente acondicionado em: 1 M NaOH (5 min/20 psi), água MilliQ (5 min/20 psi) e solução “background”, contendo 50 mM dihidrogênio fosfato de sódio pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente aplicando-se uma pressão de 0,5 psi por 2 segundos. Durante a separação, a voltagem aplicada foi de 25 kV e a detecção a 200 nm. Para quantificar arginina e citrulina presente nas amostras, curvas analíticas foram construídas na faixa linear: 50 a 200 mg/mL e 1 a 50 mg/mL respectivamente. Imidazol foi usado como padrão interno (50 mg/mL). As análises foram realizadas em colaboração com a Professora Doutora Marina Tavares (departamento de Química Fundamental, IQ-USP).

3.10 – Purificação de enzima com atividade de síntese de NO

A purificação de enzima com atividade de síntese de NO foi feita segundo o protocolo descrito anteriormente para a citocromo P450 Redutase (CYP450 Redutase (SHET et al., 1993), que é basicamente o utilizado para a purificação de NOS de *T. cruzi* (PAVETTO et al., 1995). Em resumo, extrato de *T. cruzi*, na forma epimastigota, foi lisado como descrito acima, e submetido a cromatografia de troca iônica utilizando-se a resina de dietilaminoetilcelulose (DEAE-Celulose) e eluição das proteínas aderidas por gradiente linear de cloreto de sódio (0 a 400 mM). Após leitura das absorbâncias em 405 e 418 nanômetros (pico de absorção do grupo heme), as frações com absorbância nesses comprimentos de onda foram incubadas por 16 horas a 12 °C em resina de ADP-Sepharose, para adsorver proteínas capazes de ligar NAD(P)H. Após três lavagens em 10 mM Tris-HCl

pH 7,4, as proteínas foram eluídas em 10 mM Tris-HCl pH 7,4 acrescido de 25 mM AMP, 1 mM EDTA e 5 mM 2-Mercaptoetanol, por 10 min. à temperatura ambiente. Ensaio de atividade de NO Sintase foram realizados com o eluato de cada fração selecionada. A figura 3.1 resume as etapas de purificação.

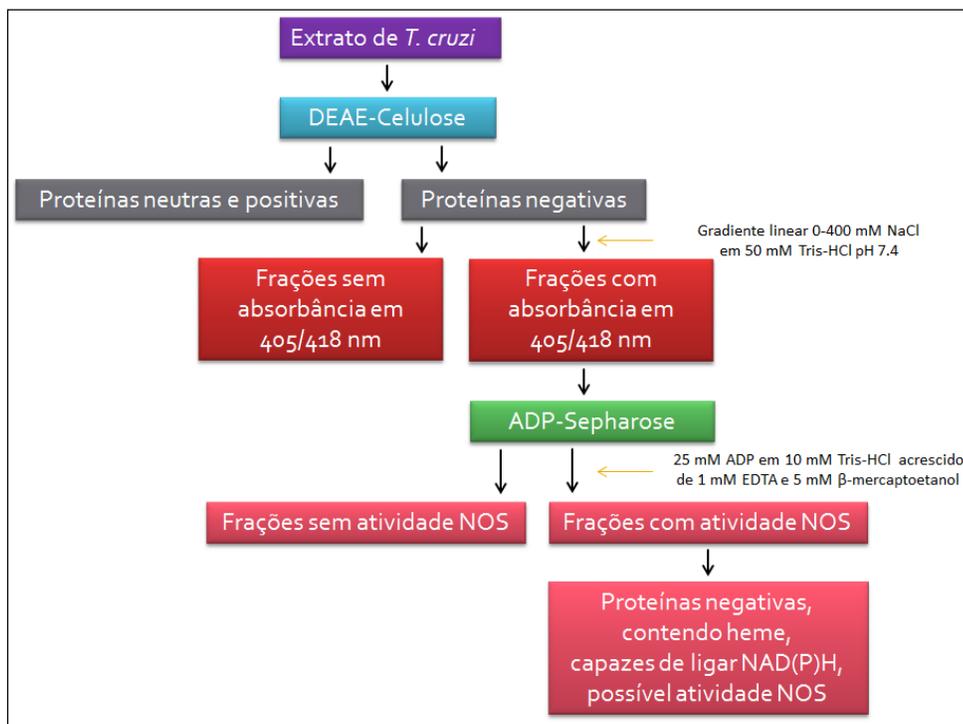


Figura 3.1: Fluxograma de purificação de CYP450 redutase de *Trypanosoma cruzi*

3.11 – Ligação covalente de anticorpos a resina de Sepharose- proteína A

Anticorpos policlonais contra NOS (isoforma neuronal) e *heat shock protein 85*, produzidos em coelho, foram conjugados covalentemente a resina Sepharose- proteína A da seguinte maneira: 100 μ L da resina foram lavados três vezes em solução de diluição (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, contendo 1% de BSA), e incubados por duas horas a 12 °C com 3 μ L do anticorpo em questão, para a ligação anticorpo à proteína A. Após a ligação, a resina foi lavada três vezes em tampão de diluição e uma vez em Tris-HCl 20 mM, pH 7,4.

O *cross-link* foi realizado diluindo-se 1:1 (v/v) uma solução estoque contendo 13 mg de dimetil pimelimidato (DMP) em solução de lavagem (trietanolamina 0,2 M em PBS) e adicionando-se 100 µL dessa solução à resina contendo o anticorpo ligado. Após a incubação por 30 min. à temperatura ambiente com agitação branda, a resina foi decantada, o sobrenadante removido, e tratada por cinco minutos em solução de lavagem sob agitação branda. Após decantação e remoção da solução sobrenadante, o procedimento de *cross-link* com DMP seguido de lavagem foi repetido mais duas vezes.

O bloqueio da reação foi realizado utilizando-se 100 µL de solução 50 mM de etanolamina em PBS por 5 min., sob agitação branda, seguido por lavagem em PBS. O anticorpo não ligado covalentemente à resina foi removido por duas incubações sequenciais com 1 mL de glicina 1 M, pH 3,0 por 10 min., centrifugado a baixa rotação e o sobrenadante removido. Em seguida, a resina foi lavada três vezes em Tris-HCl 20 mM e, quando necessário, armazenada a 4 °C em Tris-HCl 20 mM contendo 20% de metanol. Mais três lavagens em Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 foram realizadas antes do uso, para remoção do metanol.

3.12 – Imunoprecipitação

3.11.1 – Resina - proteína A.

Um volume de 50 µL de agarose conjugados a proteína A foram lavados três vezes em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 e incubados com o anticorpo comercial de interesse (concentração utilizada de acordo com o fabricante) ou com 1 mL de sobrenadante de cultura de hibridoma, por 2 horas a 25 °C. Após novas lavagens com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6, a resina foi incubada com o extrato protéico (cerca de 10 mg de proteína) a 8 °C por 16 horas e em seguida lavada novamente em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6. A resina foi em ressuspendida em tampão de Laemmli (4% SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris-HCl e, quando em condições redutoras, 10% de 2-Mercaptoetanol)

e fervida por 5 minutos a 100 °C. As proteínas foram então separadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida.

3.11.2. Resina ligada covalentemente a anticorpo

O extrato proteico foi incubado previamente com a resina de Sepharose-proteína A, sem anticorpos, por duas horas a 25 °C, com a finalidade de se remover da amostra proteínas que se ligam inespecificamente. Após centrifugação por 1 min. a 10000 rpm, o sobrenadante foi separado e utilizado para as etapas seguintes.

As resinas contendo o anticorpo foram lavadas previamente três vezes em Tris-HCl 20 mM e incubadas com os extratos por 16 horas a 12 °C sob agitação suave. Após três novas lavagens, as proteínas ligadas foram eluídas com ácido acético 1 M por 5 min. à temperatura ambiente. Após breve centrifugação, ao eluído foi adicionado igual volume de tampão contendo NaHCO_3 0,1 M e NaCl 0,5 M, pH 8,4.

As resinas foram recuperadas para nova utilização realizando-se três ciclos de lavagens em solução de glicina 1 M pH 3,0 seguido de solução tampão pH 8,4 contendo NaHCO_3 0,1 M e NaCl 0,5 M, e armazenadas em solução de Tris-HCl pH 7,4 contendo 20% de metanol.

3.13 – Preparação de proteínas imunoprecipitadas para sequenciamento

As amostras imunoprecipitadas com anti-nitrotirosina ou preparadas a partir de *pull down* com resina de ADP (para purificação de citocromo P450 redutase) foram secas em *speed vac* e ressuspensas em 20 ml da solução Tris-HCl 0,1M e uréia 8M, pH 8.5. A preparação da amostra para a análise por LC-MS/MS consistiu em 3 etapas: i) redução e alquilação das proteínas, ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina e iii) “clean up /

desalting” da amostra. Inicialmente, a amostra foi submetida a redução e alquilação das proteínas pela adição de 100 µg de ditioneitol (DTT) por 1 hora à temperatura ambiente, seguida da adição de 500 µg de iodoacetamida e incubação por 30 min. à temperatura ambiente, protegido da luz. O volume da amostra foi diluído seis vezes em solução de bicarbonato de amônio 0,1 M obtendo-se um volume final de 300 µL. A amostra foi então incubada com 2 µg de tripsina, grau de sequenciamento (Promega). A digestão foi realizada a 37°C por 16 horas e finalizada pela adição de 100 µL de ácido fórmico 10%. Previamente à aplicação da amostra no espectrômetro de massas foi realizado o *clean-up/desalting* da amostra, utilizando-se a coluna OASIS HLB Cartridge 1cc (Waters), conforme descrição do fabricante. Brevemente, a coluna foi equilibrada com solução 5% de acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1% e a eluição do material de interesse foi realizada com acetonitrila 80%. A amostra foi em seguida seca em *speed vac* e aplicada em espectrômetro de massas, conforme descrito no item “Sequenciamento de peptídeos por nLC-MS/MS”.

3.14 - Marcação de S-nitrosotios por *biotin switch*

A conversão de s-nitrosotios em grupos biotinilados foi realizada como descrita por Jaffrey (JAFFREY e SNYDER, 2001). Em ausência de luz, o extrato protéico foi bloqueado através de incubação, sob agitação, com quatro volumes de tampão de bloqueio (250 mM Hepes-NaOH pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproína, 2,5% SDS e 20 mM metil metanotiosulfonato (MMTS)) por 20 minutos a 50 °C. Em seguida, as proteínas foram precipitadas pela adição de seis volumes de acetona a -20 °C e, após agitação, a solução foi mantida a -20 °C por 30 minutos. A solução foi então centrifugada a 2000 x g por 10 min. a 4 °C e o precipitado foi lavado três vezes em acetona 70% a -20 °C. Em seguida, as proteínas foram ressuspensas em 0,1 mL de tampão HENS (250 mM Hepes-NaOH pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproína, 1% SDS).

À amostra bloqueada foi adicionado um terço de seu volume de solução de marcação (4 mM Biotina-HPDP em DMF) e a reação foi iniciada com a adição de ascorbato de sódio a 1 mM e incubada por uma hora a 25 °C sob agitação constante. Nova precipitação em acetona a -20 °C por 30 min. foi realizada, e, após centrifugação a 2000 x g por 10 min. a 4 °C, o precipitado foi lavado novamente três vezes em acetona 70% a -20 °C. A figura 1.5 esquematiza as reações realizadas.

3.15 - Preparo de proteínas biotiniladas para sequenciamento

As proteínas biotiniladas do item anterior foram ressuspensas em tampão 20mM Tris-HCl, pH 7,6, e o precipitado de proteínas foi solubilizado com a ajuda de uma agulha de 26 G. Em seguida, tripsina modificada foi adicionada à amostra em concentração de 1:100 (massa/massa) e as amostras foram digeridas a 37 °C por 16 horas. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mM PMSF.

100 µL de agarose conjugados a estreptavidina, pré-lavados em tampão 20mM Tris-HCl pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,4% Triton X-100, foram incubados por uma hora à temperatura ambiente com as proteínas digeridas, e em seguida, lavados três vezes utilizando a mesma solução tampão. A resina foi ressuspensa em tampão 5 mM bicarbonato em 20% de acetonitrila e as proteínas biotiniladas removidas por incubação com 150 µL de β-Mercaptoetanol por 5 minutos e agitação branda. (DERAKHSHAN et al., 2007).

A solução contendo as proteínas foi então liofilizada e submetida à análise em nLC-MS/MS, conforme item a seguir.

3.16 – Sequenciamento de peptídeos por nLC-MS/MS

As amostras preparadas conforme descrito nos itens “*Biotin-switch*” e amostras imunoprecipitadas com anti-nitro-tirosina foram enviadas para análise para a empresa

Veritas Life Sciences (Ribeirão Preto, São Paulo). Tais amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ-ORBITRAP (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS). Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS” (RAUCH, 2006). Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade (*expect score* <0.2) foram considerados como de alta confiabilidade. Para as buscas, foi utilizado o banco de dados de *T. cruzi* do TryTrypDB combinando as sequências de proteínas do *T. cruzi* “Esmeraldo-like”, “non-Esmeraldo like” e aquelas consideradas “unassigned”. No banco de dados também foram adicionados possíveis contaminantes comuns, como queratinas e tripsina.

3.17 - Predição de resíduos alvos de S-nitrosilação

Para a predição de resíduos de cisteína possíveis de serem S-nitrosilados, utilizou-se o software “GPS-NO: S-nitrosylation sites prediction” (XUE et al., 2010), disponível gratuitamente em <http://sno.biocuckoo.org>.

As sequências das proteínas foram obtidas do banco de dados TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>) e inseridas no software com um limiar de predição médio.

3.18 - Eletroforese bidimensional

A primeira dimensão (IEF) foi realizada utilizando o sistema de Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Immobiline DryStrip de 13 cm (pH 4-7) (GE Healthcare) foram carregadas com 1 mg de proteínas de *T. cruzi*, e, após rehidratação da fita por aproximadamente 18 horas à temperatura ambiente, a fita foi focalizada de forma gradiente, da seguinte maneira: 500 V por 500 V x hora, 1000 V por 800 V x hora, 8000 V por 11300 V x hora e então mantida num patamar de 8000 V por 7400 V x hora.

Para a segunda dimensão, fitas IPG foram incubadas em tampão de equilíbrio (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6M uréia; 29% glicerol e 2% SDS) por 30 min. As fitas foram lavadas com água e transferidas para o topo de um gel gradiente de 7 a 16% de poliacrilamida e submetida à eletroforese.

Em paralelo foram feitos dois géis com as mesmas amostras, sendo que um deles foi corado com azul de coomassie coloidal (G250), e o outro foi transferido para membrana de nitrocelulose, como descrito abaixo.

O perfil de spots obtidos foi então analisado utilizando-se o software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare), e os *spots* com diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos no teste de ANOVA ($p < 0,05$) foram assinalados para posterior análise.

3.19 - Immunoblotting

As proteínas presentes no gel foram transferidas em tampão de transferência (50 mM Tris, 40 mM Glicina, 20%, Metanol, pH 8,4) para membrana de nitrocelulose a 4 °C por 15 horas e voltagem constante de 15 V. Em seguida, a membrana foi bloqueada em solução de PBS, pH 7,4, 1% de albumina de soro bovino (BSA) por uma hora e meia à temperatura ambiente e lavada em PBS Tween 20 0,1%, pH 7,4.

Para a identificação de proteínas contendo nitrotirosina ou S-nitroso-cisteína, além da identificação de proteínas com reatividade com anticorpos anti nNOS, eNOS e iNOS, a membrana foi incubada com o anticorpo primário adequado por 16 horas a 8 °C e sob agitação constante. Após lavagens, a membrana foi incubada por uma hora em solução contendo anticorpo anti-IgG de camundongo ou de coelho (diluição 1:8000), conforme cada caso, conjugado a HRP, e após novas lavagens, a membrana foi revelada por ECL. Para se verificar a especificidade dos anticorpos na identificação de nitrosocisteína e nitro-tirosina, após revelação, a membrana foi incubada por 30 min. a 60 °C em solução fortemente

reduzora, contendo 100 mM de 2-Mercaptoetanol, 2% de SDS e 62,5 mM Tris HCl, pH 6,7, e após lavagens, incubada novamente com anticorpos anti-nitrotirosina ou anti-nitrosocisteína e respectivo anticorpo secundário, descartando-se *spots* que foram detectados após redução, por se tratarem de ligações inespecíficas.

.3.20 – Preparação dos *spots* para sequenciamento

Os *spots* de interesse foram excisados dos géis manualmente e descorados à temperatura ambiente em solução de 50% de metanol e 2,5% de ácido acético, com três trocas de solução, uma a cada 20 min. Em seguida, os *spots* foram incubados com 10 mM DTT por 30 minutos e acetilados por 50 mM de iodocetamida por 30 minutos. Em seguida, os *spots* foram lavados duas vezes em solução contendo 50% de acetonitrila e 50 mM de bicarbonato de amônio, e desidratados em acetonitrila 100% por 20 minutos. Após ressuspensão em 50 mM bicarbonato de amônia, as amostras foram digeridas com 0,4 a 0,8 µg de tripsina (grau de sequenciamento, PROMEGA), de acordo com o tamanho dos *spots* excisados. A figura 3.2 ilustra as estratégias utilizadas na identificação de ambas as modificações pós-tradução estudadas.

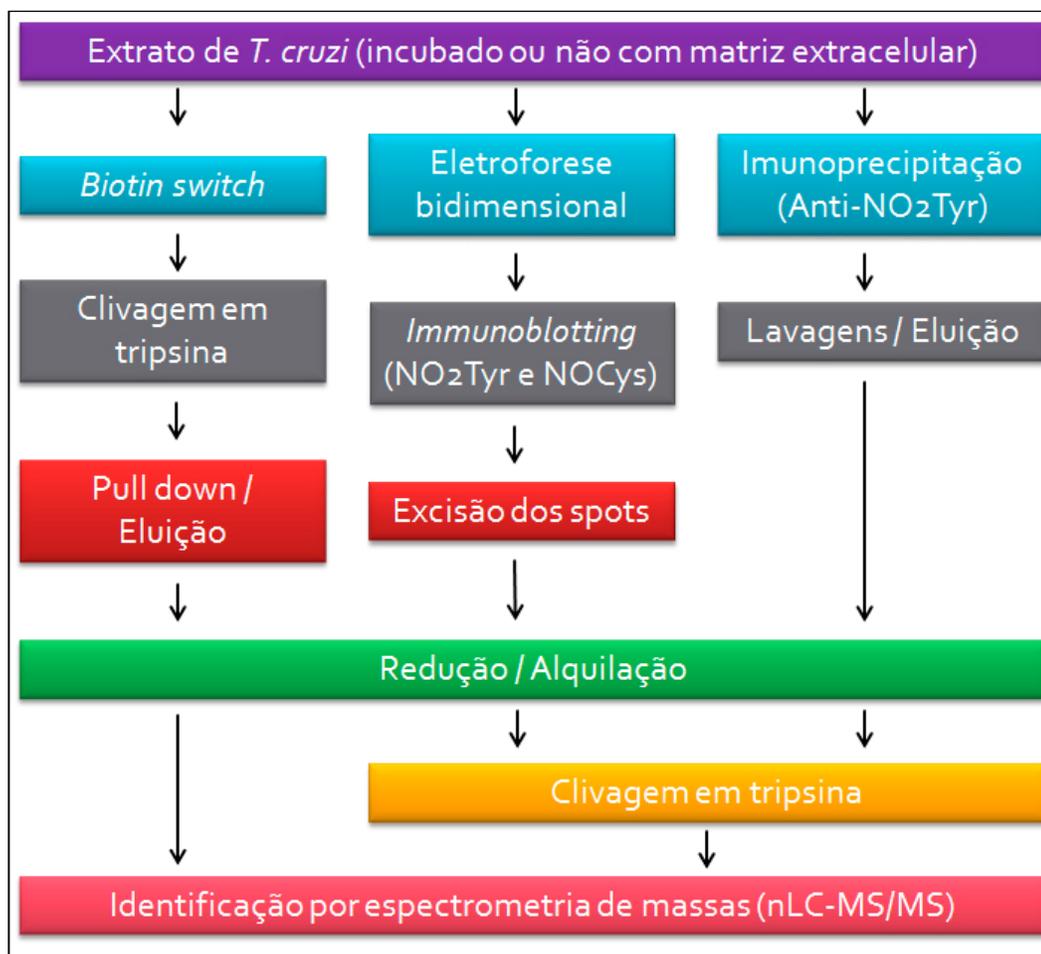


Figura 3.2: Fluxograma resumido das estratégias utilizadas na identificação de proteínas nitradas em tirosina e S-nitrosiladas em cisteína.

.3.21 – Análise estatística

Em experimentos comparando-se três ou mais grupos, as análises estatísticas foram realizadas utilizando *one-way* ANOVA (*analysis of variance*) com um intervalo de confiança de 95% e pós-teste de Tukey. Ao se comparar dois grupos, utilizou-se t-test não-pareado com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1 - Produção de NO pelos parasitas

A incubação de *T. cruzi* com matriz extracelular leva a uma diminuição, dependente do tempo de incubação, na produção de óxido nítrico, sendo a maior diferença observada após uma hora de incubação (figura 4.1).

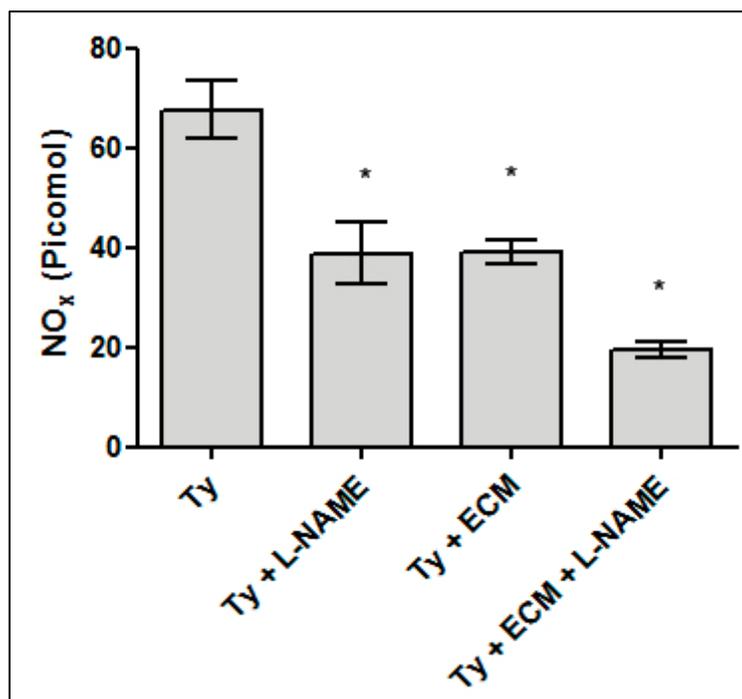


Figura 4.1: Efeito da incubação de tripomastigotas de *T. cruzi* com ECM na produção de óxido nítrico. Os parasitas foram incubados por uma hora em meio de cultura apenas (Ty), em presença de 10 µg/mL de ECM (Ty+ECM), em presença de 10 mM L-NAME (Ty + L-NAME) e em presença de 10 mM de L-NAME e 10 µg/mL ECM (Ty + ECM + L-NAME) . Experimento realizado em sextuplicata. *p < 0,05.

Por ter sido observada uma maior quantidade de NO_x extracelular após uma hora de incubação, esse tempo foi escolhido para se analisar a atividade de NO Sintase no extrato protéico do parasita incubados com matriz extracelular.

A medida da atividade de NO Sintase nos extratos de *T. cruzi* incubados ou não com ECM segue um padrão semelhante à quantidade de NO_x medido no meio extracelular, com

cerca de 50% de diminuição na atividade desta enzima após incubação com matriz extracelular por uma hora, diminuição semelhante àquela produzida por L-NAME (figura 4.2). L-NAME produziu o efeito inibitório cumulativo com a matriz extracelular. Interessante notar a grande diminuição na atividade NOS após se ferver a amostra a 100 °C por 10 minutos, evidência de que tal atividade é de origem enzimática. Como controle da quantidade de proteína dos extratos de *T. cruzi* utilizada nos ensaios, foi realizado um immunoblotting empregando anticorpos anti-tubulina (figura 4.2).

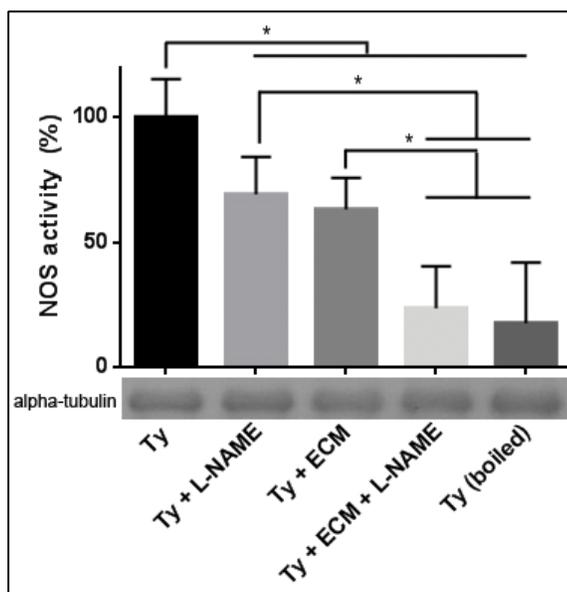


Figura 4.2: Atividade de síntese de NO em extrato de *T. cruzi*. Atividade de síntese de NO em extratos de tripomastigotas de *T. cruzi* previamente incubados ou não com L-NAME, ECM ou ECM + L-NAME, ou extrato pré-fervido. Média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Controle de proteína adicionada por canaleta de extratos utilizados no experimento de atividade de NOS de *T. cruzi* após incubação com ECM ou L-NAME por uma hora. *p < 0,05.

Para se confirmar a especificidade da NOS a partir de extratos de tripomastigotas de *T. cruzi*, isto é, a formação de citrulina, utilizou-se como substrato [3H] L-Arginina e o produto da reação foi submetido a cromatografia em camada delgada. Como controle, o mesmo ensaio foi realizado com extrato de células LLCMK2, capazes de produzir NO a partir de arginina. Após a cromatografia, coloração e contagem de radioatividade, este

ensaio revelou que, apesar de existir arginina residual não removida pela resina de troca catiônica, a maior parte da radioatividade provém de citrulina. A faixa da amostra do parasita correspondente à ornitina não continha radioatividade, como esperado, uma vez que não é produto da reação de NOS (figura 4.3).

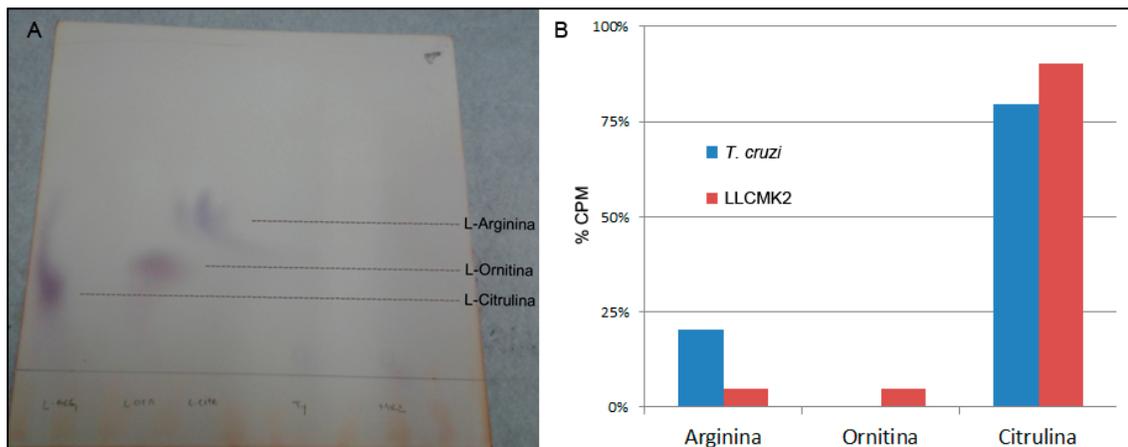


Figura 4.3: Produção de L-Citrulina a partir de L-Arginina. A) Cromatografia em camada delgada. Padrões de L-Arginina, L-Ornitina e L-Citrulina identificados por coloração com ninhidrina. Regiões destacadas (arginina, ornitina e citrulina) nos grupos de *T. cruzi* e LLCMK2 foram quantificadas quanto à radiação. B) Identificação do produto de reação de NOS hipotética por cromatografia em camada delgada e cintilografia. A radioatividade medida está representada em porcentagem em relação à quantificação total. Extrato de LLCMK2 foi utilizado como controle positivo da atividade de NOS. 100% CPM equivalem a 339 CPM para TY e 61 CPM para LLCMK2.

Em seguida realizou-se, por eletroforese capilar, a quantificação de L-Arginina e L-Citrulina livres presentes no parasita após incubação ou não com ECM. Tal quantificação revelou uma menor concentração de L-Citrulina no parasita incubado com ECM, enquanto que existe um ligeiro aumento na concentração de L-Arginina, mas não estatisticamente significativo. Essa quantificação é mais uma evidência de que a produção de NO pela conversão de Arginina em Citrulina é inibida no parasita incubado com ECM (figura 4.4).

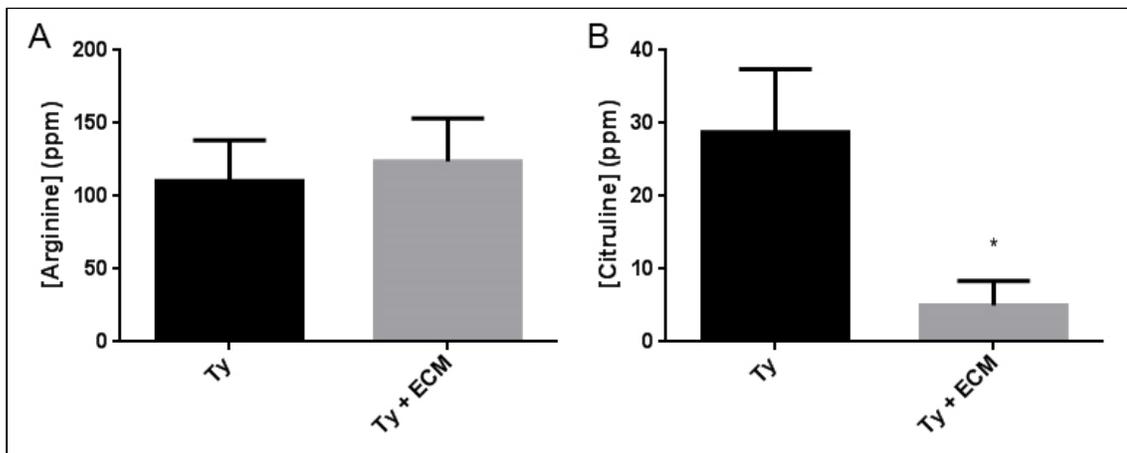


Figura 4.4: Concentração de L-Arginina e L-Citrulina em extrato de *T. cruzi* após adesão do parasita por duas horas com ECM. Média de seis experimentos independentes. * $p < 0,05$.

Condizente com os resultados anteriores, a quantificação de SNO totais revelou uma grande diminuição na concentração de proteínas S-nitrosiladas após a adesão do parasita à ECM (figura 4.5).

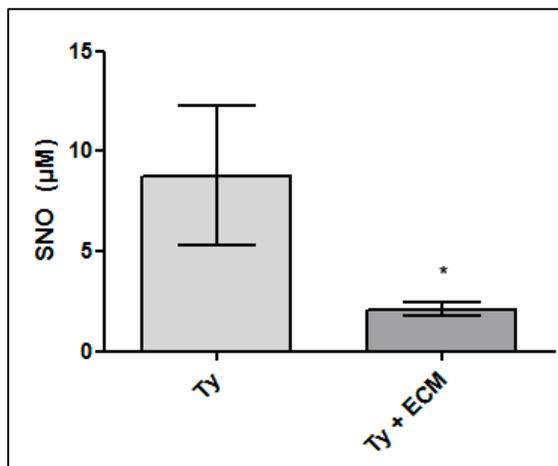


Figura 4.5: Concentração de proteínas S-NO em extrato de *T. cruzi* após adesão por duas horas com ECM.

* $p < 0,05$.

4.2 - Identificação da isoforma de NOS presente em *Trypanosoma cruzi*

Para identificar a isoforma de NOS presente em *T. cruzi*, foi feito um experimento de *immunoblotting* contra as três diferentes isoformas de NO sintase de mamífero: endotelial, induzível e neuronal (eNOS, iNOS e nNOS, respectivamente). Os anticorpos anti-eNOS e anti-iNOS comerciais utilizados reconheceram um grande número de proteínas, mostrando grande inespecificidade para as isoformas em análise. Apenas a isoforma neuronal reconheceu um pequeno número de antígenos, embora o de maior massa molecular, de 85 kDa aproximadamente, tenha ficado muito abaixo do esperado, tomando como base a isoforma de mamíferos de 160 kDa, como (nNOS putativa) (figura 4.6). Apesar da literatura descrever a existência de uma isoforma de NOS semelhante à neuronal de mamíferos (GOLDSTEIN et al., 2000), os dados experimentais descritos só mostram que o anticorpo contra nNOS reconhece um número menor de antígenos quando comparado ao anticorpo contra as demais isoformas.

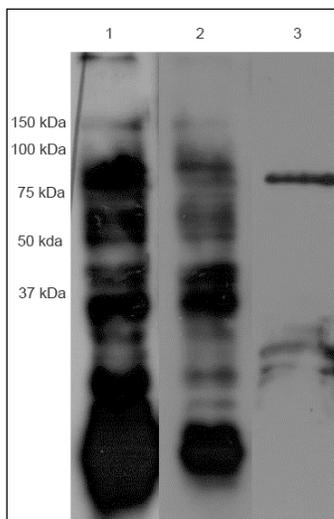


Figura 4.6: Reatividade de extratos de *T. cruzi* (50 μ g de proteína por canaleta) com anticorpos contra diferentes isoformas de NOS: 1. Anti-eNOS; 2. Anti-iNOS; 3. Anti-nNOS. A eletroforese foi realizada em gel de 12% de poliacrilamida com o mesmo extrato para as três canaletas. Após transferência para membrana de nitrocelulose, as tiras foram recortadas e incubadas com os respectivos anticorpos primários.

4.3 - Expressão de proteína reconhecida por anti-NOS durante interação de tripomastigotas com matriz extracelular

Para esta série de experimentos, utilizou-se como anticorpo primário a isoforma neuronal de NOS de mamífero, uma vez que está descrito na literatura que a proteína presente em *T. cruzi* é análoga a esta isoforma (GOLDSTEIN et al., 2000) (figura 4.6).

Por imunofluorescência, verificou-se um aumento na intensidade do sinal de fluorescência referente à nNOS putativa do parasita quando incubado por duas horas com ECM, mas não de localização celular da NOS (figura 4.7). Esse aumento aparente observado não é compatível com os dados mostrados da atividade da NOS ou com os dados de produção de NO, ambos reduzidos após incubação do parasita com ECM (figuras 4.1 e 4.2).

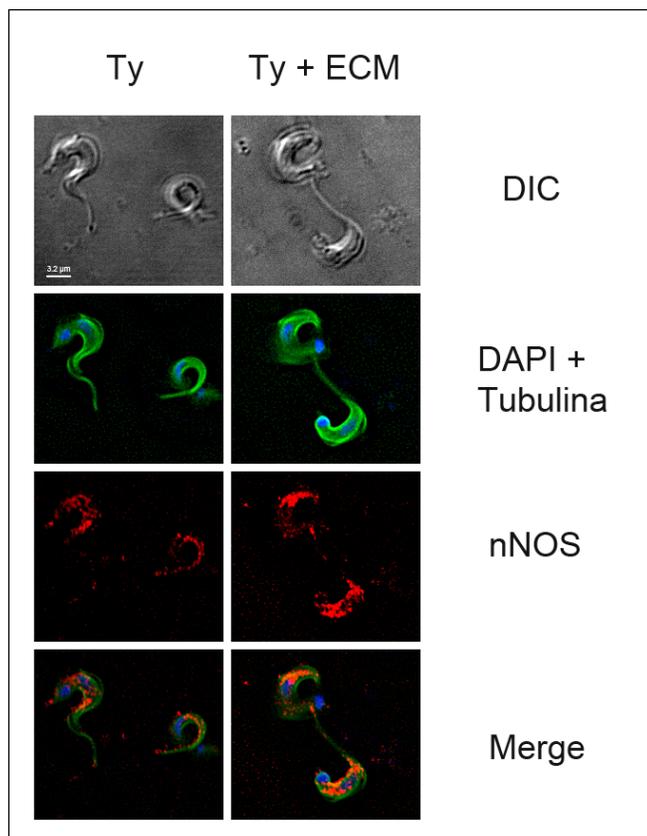


Figura 4.7: Visualização por imunofluorescência da expressão de nNOS putativa após uma hora de incubação do parasita com ECM.

Da mesma maneira, através de *immunoblotting*, verificou-se um aumento na expressão de proteína reconhecida pelo anticorpo contra nNOS em *T. cruzi* ao longo do tempo de interação com a matriz extracelular (figura 4.8).

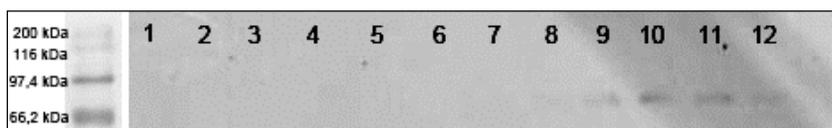


Figura 4.8: Cinética de expressão da proteína reconhecida por anticorpos anti-nNOS ao longo de incubação de tripomastigotas com matriz extracelular. 1. ECM; 2. *T. cruzi*; *T. cruzi* incubado (canaletas 8-12) ou não (canaletas 3 a 7) com ECM por diferentes tempos: 15 minutos (canaletas 3 e 8), 30 minutos (canaletas 4 e 9), 60 minutos (canaletas 5 e 10), 120 minutos (canaletas 6 e 11) e 180 minutos (canaletas 7 e 12). 50 µg de proteína por canaleta.

Resultado semelhante foi obtido pela incorporação de metionina radioativa de tripomastigotas incubados ou não com ECM, seguido de imunoprecipitação por anticorpo contra nNOS, obtendo-se o mesmo padrão de aumento da expressão desta proteína (abaixo de 100 kDa), ao longo do tempo de incubação (figura 4.9).

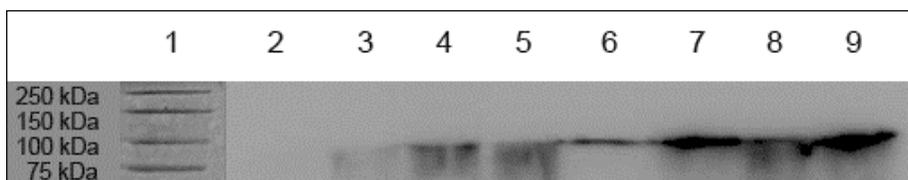


Figura 4.9: Cinética de expressão de nNOS putativa ao longo de incubação de tripomastigotas com matriz extracelular. O parasita marcado com ^{35}S -metionina foi incubado na ausência (canaletas 2-5) ou presença de ECM (canaletas 6-9) por diferentes tempos e em seguida o extrato foi imunoprecipitado com anticorpos anti-nNOS: canaletas 2 e 6, 5 minutos; 3 e 7, 15 minutos; 4 e 8, 30 minutos; 5 e 9, 60 minutos.

A banda em questão foi então excisada do gel e enviada para sequenciamento por ESI-QUAD-TOF. A proteína sequenciada foi identificada como HSP 85, análoga de *T. cruzi* a HSP 90, uma proteína importante na modulação da atividade de NOS, chegando a interagir fisicamente com a mesma (FLEMING et al., 2010). Em mamíferos, a isoforma neuronal da NOS apresenta uma massa molecular de 160 kDa, e analisando-se o genoma de *T. cruzi*, não há anotada uma enzima NO Sintase típica. Em *T. cruzi*, a enzima

Citocromo P450 Redutase (71 kDa), é a proteína com a maior similaridade com a NOS neuronal de mamífero, com uma identidade de 33%. No entanto, o anticorpo em questão não reconheceu uma banda em torno de 71 kDa (figura 4.8).

Para se verificar a possibilidade de que a banda reconhecida pelo anticorpo anti-nNOS sintetizaria NO em *T. cruzi*, foram feitos experimentos de imunoprecipitação de extratos de *T. cruzi* com anticorpos ligados covalentemente à resina de proteína A (anti-nNOS e anti-HSP 85, ambos policlonais produzidos em coelho), eluindo-se em seguida as proteínas precipitadas e rapidamente ajustando o pH para cerca de 7,0. Obteve-se em ambos os casos uma proteína imunoprecipitada com massa molecular de cerca de 80 kDa (figura 4.11). No entanto, não se detectou atividade de NOS apreciável em nenhum dos dois casos, não podendo ser a atividade de síntese de NO atribuída à proteína reconhecida pelo anticorpo anti-nNOS de mamífero (figuras 4.10 e 4.11), considerando-se ainda que praticamente toda a atividade de NOS foi recuperada no material não ligado à resina.

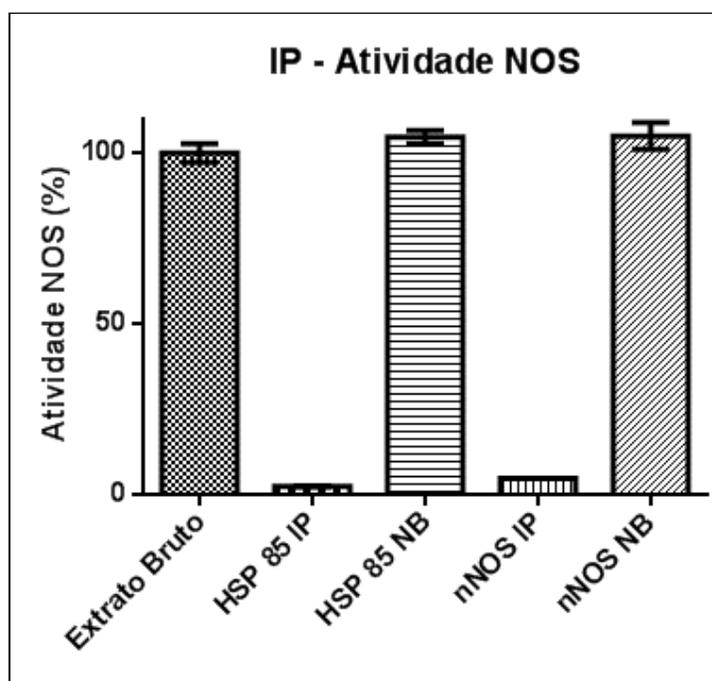


Figura 4.10: Ensaio de atividade NOS em produtos de imunoprecipitação utilizando anticorpos anti-nNOS e anti-HSP85 ligados covalentemente à resina de proteína A. Não se verificou atividade em nenhum dos imunoprecipitados (IP). Fração não-imunoprecipitada (NB) e tratada nas mesmas condições reteve a atividade NOS.

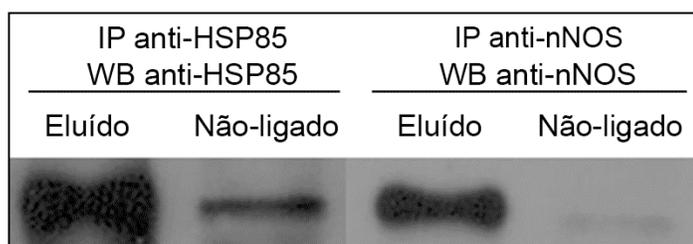


Figura 4.11: Immunoprecipitação seguido de *immunoblotting*: anti HSP85 e nNOS. Ensaio de atividade NOS em produtos de imunoprecipitação (IP) utilizando anticorpos anti-nNOS e anti-HSP85 ligados covalentemente a resina de proteína A. Ambos os anticorpos imunoprecipitam uma proteína de cerca de 80 kDa.

4.4 – Purificação parcial de enzima com atividade de síntese de NO*

Por ser a enzima Citocromo P450 Redutase a proteína em *T. cruzi* com a maior identidade com NOS de mamífero, e pelo fato das etapas de transferência de elétrons e mecanismo de reação serem muito semelhantes à de NOS (figuras 5.1 e 5.2, adaptadas de LYANAGI et al., 2012), aventou-se a possibilidade de que esta enzima poderia ser no parasita a responsável, pelo menos parcialmente, pela síntese de NO*. A metodologia para a purificação da Citocromo P450 (CYT P450) redutase é basicamente a mesma empregada para a purificação de NOS de *T. cruzi* (PAVETO et al., 1995): cromatografia de troca aniônica seguido da identificação de frações contendo grupo heme por espectrometria em 405 e 418 nm, e por fim, *pull down* em resina de ADP-Sepharose, capaz de precipitar proteínas com afinidade por NAD(P)H (SHET et al., 1993). A atividade de síntese de NO* foi medida e obtiveram-se frações que apresentaram um aumento de até 252 vezes na atividade específica (Tabela 4.1; Figura 4.12). Nessas frações, verificou-se por cromatografia em camada delgada, a formação de citrulina a partir de arginina (figura 4.13).

A fração 7 derivada desse método de purificação tem sua atividade de síntese de NO* parcialmente inibida (35%) por 1 mM de L-NAME um análogo de arginina, apontando para a presença de uma enzima com atividade semelhante a NOS (tabela 4.2). Embora a inibição por 1 mM de L-NAME tenha sido relativamente baixa, foi obtido resultado semelhante na dosagem de NOS em extratos de células epiteliais de mamífero (LLCMK2) na presença do inibidor e utilizado como controle do experimento (dados não apresentados).

É necessária portanto a identificação das proteínas presentes nas frações com atividade de síntese de NO por nLC-MS/MS, que não puderam ser realizadas até o presente momento.

Tabela 4.1: Síntese de NO no extrato bruto e frações eluídas da coluna de D EAE-Sepharose após *pull down* em resina de ADP-Sepharose.

Fração	Atividade (CPM)	Proteína (μg)	Atividade específica (AE) (CPM/mg)	AE Fração/ AE Extrato bruto
Extrato bruto	612511	9,320	65,72	1,00
F0	102406	0,054	1914,13	29,13
F7	325856	0,019	17456,57	265,62
F8	289948	0,018	16568,46	252,11

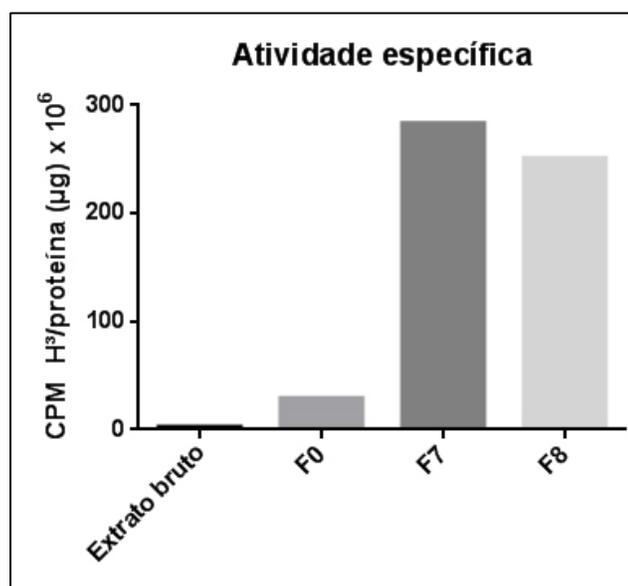


Figura 4.12: Atividade específica de síntese de NO após cromatografia de extrato de *T. cruzi* em coluna de DEAE-Sepharose e *pull-down* por ADP-Sepharose. A Fração F9 não foi mostrada por não ter sido possível quantificar as proteínas presentes na amostra.

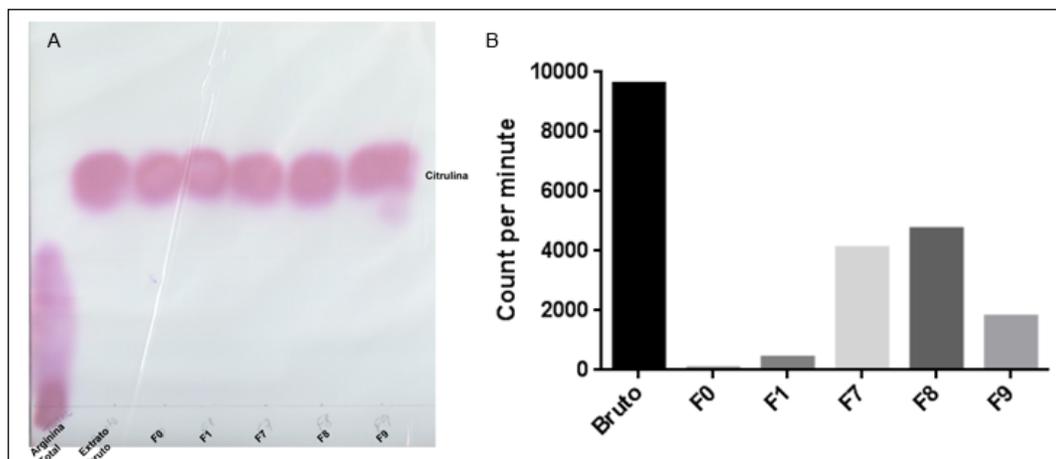


Figura 4.13: Atividade de síntese de NO^* em frações da purificação de enzima com atividade de síntese de NO^* .

A) Cromatografia em camada delgada com o produto da reação de NOS. B) Quantificação da radioatividade na faixa de citrulina após cromatografia em camada delgada como descrito na figura 4.3.

Tabela 4.2: Atividade específica de síntese de NO no extrato bruto e frações eluídas de coluna de DEAE-Sephacrose após *pull down* em resina de ADP-Sephacrose em presença ou ausência do inibidor L-NAME.

	Atividade CPM H^3	Proteína (μg)	Atividade específica (AE) (CPM/mg)	AE Fração/ AE Extrato bruto
Extrato bruto	199,1 +/- 18,4	8,29	24,1 +/- 2,2	1 +/- 0,1
F7	120,1 +/- 0,3	0,10	1245,9 +/- 2,9	51,9 +/- 0,1
F7 + L-NAME	78,8 +/- 3,7	0,10	817,1 +/- 38,1	34,0 +/- 1,6

4.5 - Nitração e S-nitrosilação de proteínas de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* em resposta à interação com a matriz extracelular

Immunoblotting utilizando extratos de tripomastigotas de *T. cruzi* previamente incubados ou não com ECM e anticorpos contra nitro-tirosina e S-nitroso-cisteína mostraram padrões semelhantes de proteínas modificadas ao longo do tempo de incubação do parasita, na presença ou ausência de matriz extracelular. No entanto, foram detetadas mudanças significativas quando os dois grupos experimentais- com ou sem ECM- foram comparados. Foi observado uma diminuição de proteínas modificadas por nitrotirosinação ou S- nitrosilação, especialmente de massa molecular abaixo dos 50 kDa, nos parasitas incubados com ECM (figuras 4.14 e 4.15).

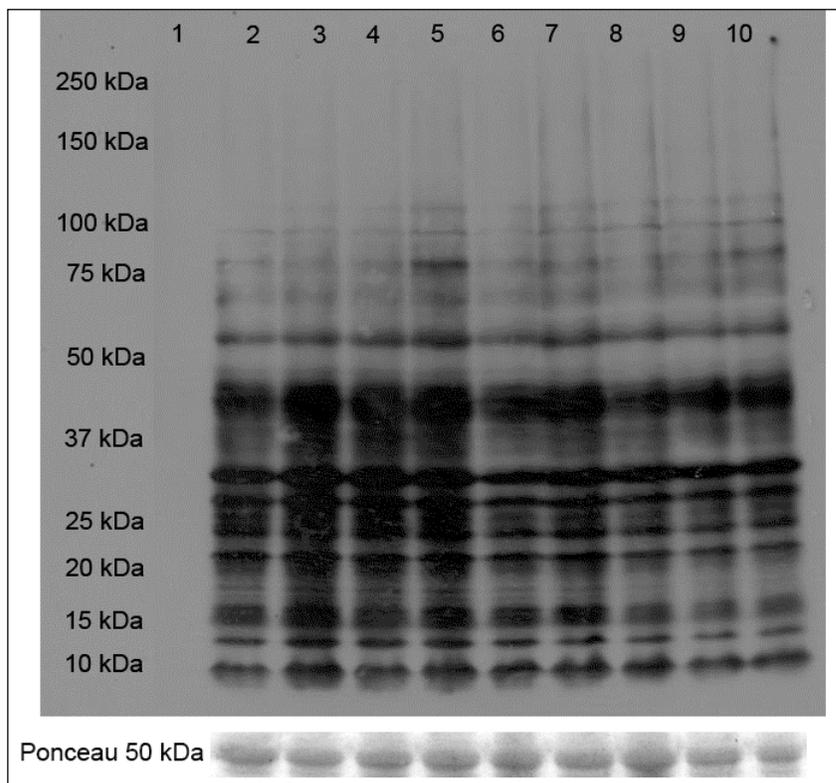


Figura 4.14: Cinética de S-nitrosilação de proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi* em resposta à incubação com matriz extracelular. As amostras foram preparadas em condições não redutoras. Os parasitas foram incubados em diferentes tempos na ausência (canaletas 2- 6) ou presença (canaletas 7- 9) de ECM. 1. ECM, 2. *T. cruzi* 0 minutos; (controle inicial). Tempos de incubação: 3. 30 min. (canaletas 3 e 7); 60 min. (canaletas 4 e 8); 120 minutos (canaletas 5 e 9). Ponceau 50 kDa- controle da proteína adicionada em cada canaleta.

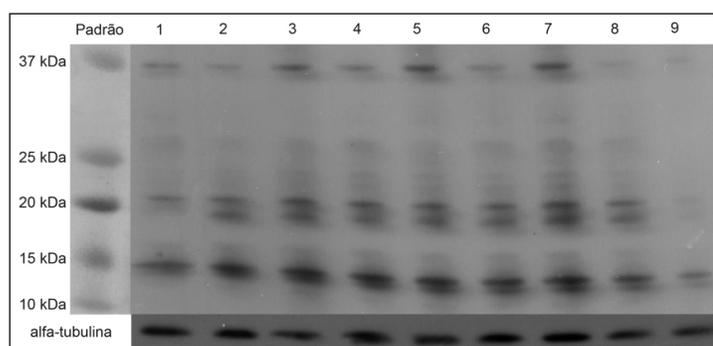


Figura 4.15: Cinética de nitratação em resposta à incubação de tripomastigotas de *T. cruzi* com matriz extracelular ao longo do tempo. As amostras foram analisadas em condições não redutoras. 1. Ty 0 min., 2. Ty 15 min., 3. Ty + ECM 15 min., 4. Ty 30 min., 5. Ty + ECM 30 min., 6. Ty 60 min., 7. Ty + ECM 60 min., 8. Ty 120 min., 9. Ty + ECM 120 min. A região correspondente à alfa-tubulina foi utilizada como controle de proteína adicionada por canaleta no gel.

Os resultados apresentados, associados à dificuldade técnica de se incubar os protozoários por tempos maiores, levou à escolha do tempo de duas horas de incubação nos demais experimentos que buscaram estudar as diferenças nas modificações pós-tradução em questão.

Os resultados descritos acima foram corroborados por resultado similar obtido por imunofluorescência. Tanto proteínas S-nitrosiladas quando nitradas apresentaram um padrão pontilhado nos parasitas e que foi bastante reduzido após a incubação do *T. cruzi* com ECM (figuras 4.16 e 4.17).

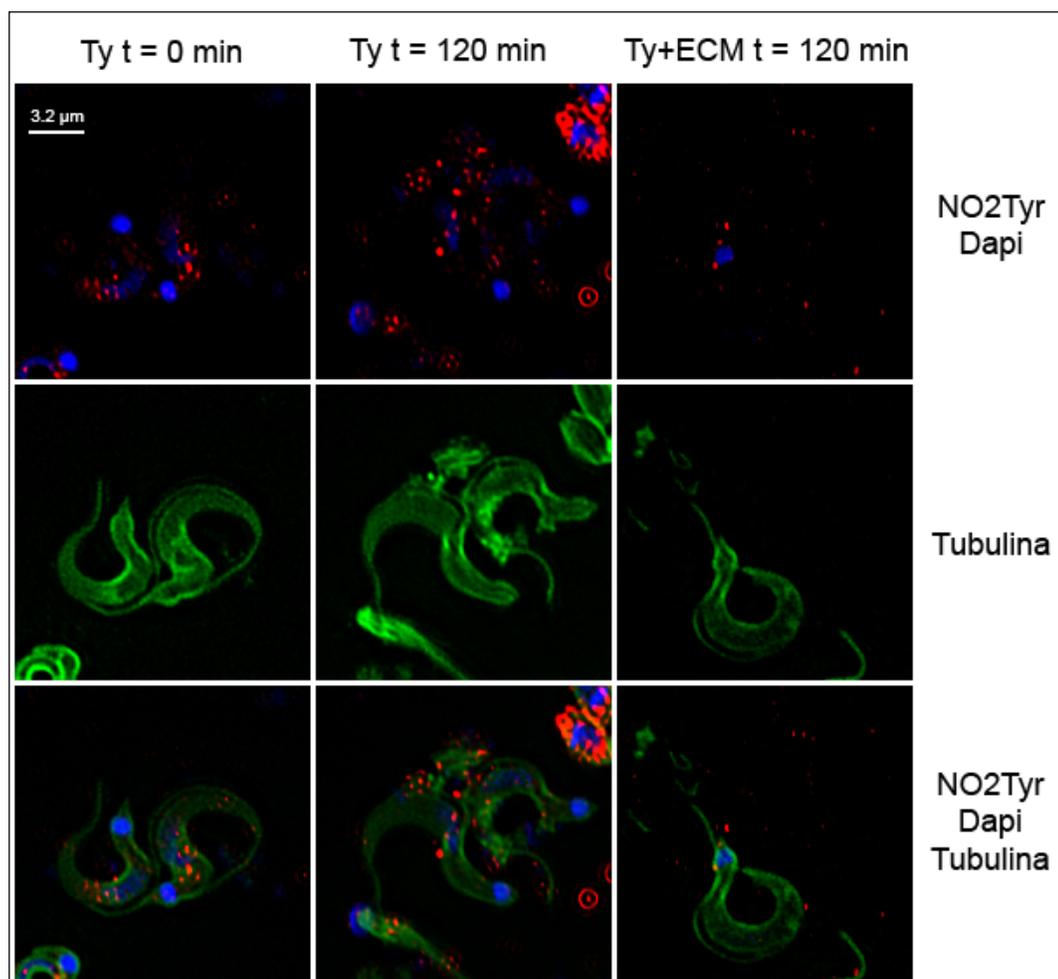


Figura 4.16: Padrão de proteínas nitradas em tirosina em resposta à incubação de *T. cruzi* com matriz extracelular. Imagens típicas de experimento realizado em duplicata.

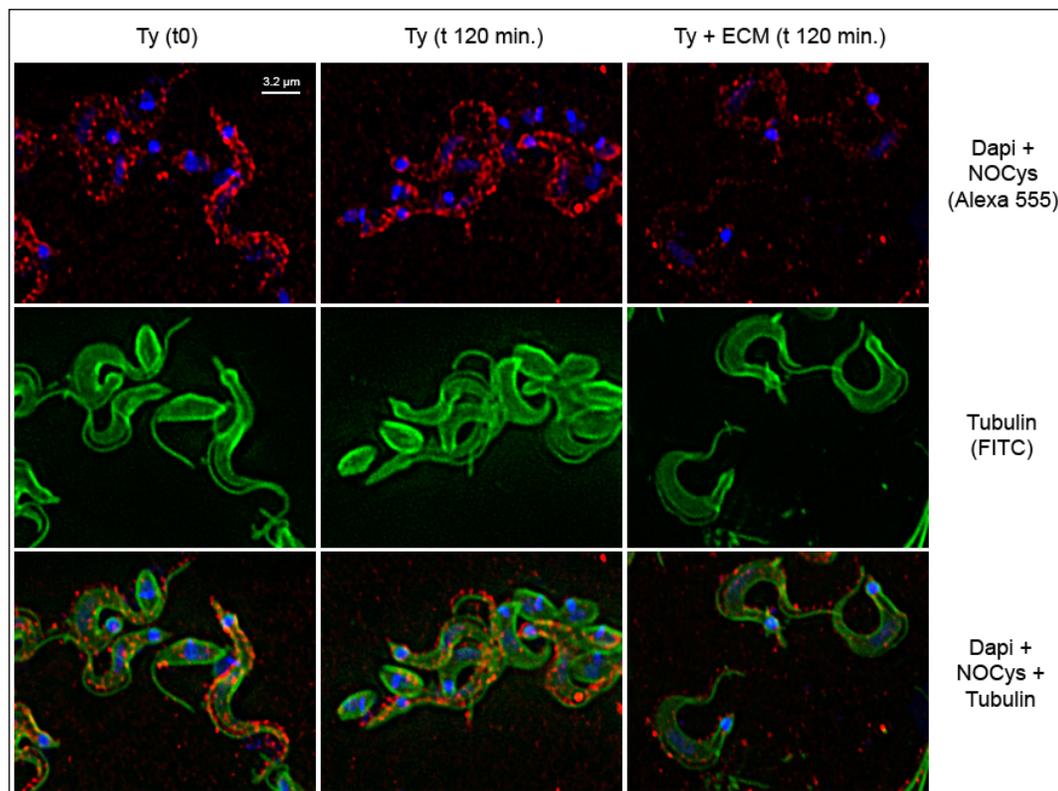


Figura 4.17: Padrão de proteínas S-nitrosiladas em resposta à incubação de *T. cruzi* com matriz extracelular.

Imagens típicas de experimento realizado em duplicata.

4.6 - Identificação por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas de proteínas diferencialmente nitradas após incubação de tripomastigotas com ECM

Extratos de parasitas incubados ou não com matriz extracelular foram submetidos à eletroforese bidimensional e *immunoblotting* utilizando anticorpos contra resíduos de nitro-tirosina. Foram identificadas cinco proteínas nitradas apenas no grupo não incubado com ECM (*spots* 7, 8, 9, 10 e 13 da figura 4.18), enquanto que apenas duas proteínas nitradas foram identificadas no grupo de *T. cruzi* incubado com ECM, ausente no grupo controle (ponto 12 e 14 da figura 4.18). O número de proteínas modificadas e visualizadas neste intervalo de ponto isoelétrico é bastante reduzido e com massa molecular abaixo de 50 kDa. Os *spots* indicados foram então excisados e identificados por espectrometria de massas (tabela 4.3).

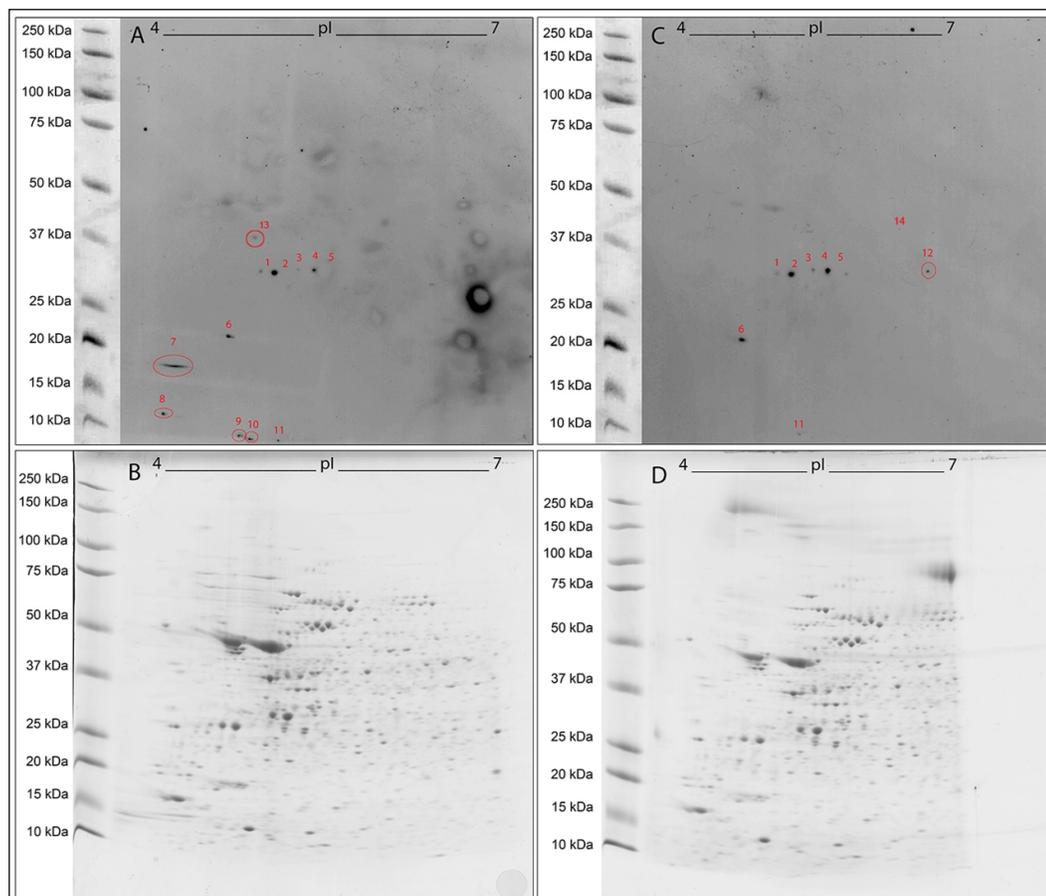


Figura 4.18: Eletroforese bidimensional e *immunoblotting* utilizando anticorpos contra nitro-tirosina. A, C: *Immunoblotting* anti-nitrotirosina; B, D: coloração do gel por coomassie G250. A, B: *T. cruzi*; C, D: *T. cruzi* incubados por duas horas com ECM.

Tabela 4.3: Proteínas nitradas de *T. cruzi* identificadas após excisão de gel bidimensional em condições não-redutoras.

Spot #	Ty	Ty + ECM	Proteína	Uniprot Entry #	Teórico	
					pI	MW (Da)
1/2/3	X	X	beta tubulin, putative	Q4DQP2	4,7	50352
4	X	X	alpha tubulin, putative	Q4CLA1	4,94	50395
8	X		hypothetical protein, conserved	Q4DUX0	4,67	22326
9	X		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	Q4DFL5	4,85	12280
11	X		hypothetical protein, conserved	Q4DQL2	4,74	11311
13	X		heat shock protein 85, putative	Q4CQS6	5,07	81132
5		X	cytochrome C oxidase subunit IV, putative	Q4E2P2	5,72	39095
6		X	S-phase kinase-associated protein, putative	Q4CXX4	4,57	21443
12		X	Enolase	Q4DZ98	5,92	46871
14		X	phosphoglycerate kinase, putative	Q4D193	6,19	44783

4.7 - Identificação por imunoprecipitação e espectrometria de massas de proteínas nitradas após incubação de tripomastigotas com ECM

Extratos de parasitas incubados com matriz extracelular (Ty + ECM) ou com meio apenas (Ty) foram submetidos a imunoprecipitação utilizando resinas de Sepharose ligadas covalentemente a anticorpo anti-nitro-tirosina. Após lavagens e eluição, as proteínas imunoprecipitadas foram identificadas por espectrometria de massas (tabela 4.4). Vale ressaltar que parte considerável das proteínas identificadas possuem ponto isoelétrico superior a 7,0, não sendo possível serem identificadas por eletroforese bidimensional no intervalo de pH de 4,0 a 7,0, como empregado nos experimentos já descritos.

Tabela 4.4: Proteínas nitradas de tripomastigotas de *T. cruzi* identificadas após imunoprecipitação utilizando resina ligada covalentemente a anticorpo anti-nitro-tirosina.

Proteína	Gene ID	Ty	Ty + ECM	Função	Teórico	
					MM (Da)	pI
10 kDa heat shock protein, putative	TcCLB.508209.90	X		Protein folding	10701	9.07
40S ribosomal protein S10, putative	TcCLB.506679.140	X		Translation	18250	10.83
40S ribosomal protein S14, putative	TcCLB.508823.50	X		Translation	15568	10.55
40S ribosomal protein S24E, putative	TcCLB.507681.150	X		Translation	15668	11.74
40S ribosomal protein S3a-1 OS	TcCLB.510999.39	X		Translation	28288	11.01
40S ribosomal protein S4, putative	TcCLB.509683.117	X		Translation	30876	11.06
40S ribosomal protein S6, putative	TcCLB.507709.50	X		Translation	21400	11.41
60S ribosomal protein L10a, putative	TcCLB.506963.10	X		Translation	25146	10.15
60S ribosomal protein L13, putative	TcCLB.508153.280	X		Translation	25294	11.88
60S ribosomal protein L18, putative	TcCLB.506181.50	X		Translation	34028	11.07
60S ribosomal protein L23a, putative	TcCLB.508175.146	X		Translation	21268	11.5
60S ribosomal protein L28, putative	TcCLB.510101.30	X		Translation	16368	12.18
60S ribosomal protein L6, putative	TcCLB.507709.50	X		Translation	21400	11.41
60S ribosomal protein L7a, putative	TcCLB.510835.40	X		Translation	34550	11.76
ADP, ATP Carrier protein 1, mitochondrial precursor, putative	TcCLB.506211.160	X	X	Transport	34955	10.28
alpha tubulin, putative	TcCLB.411235.9	X	X	Cytoskeleton	49800	4.7
ATP synthase, epsilon chain, putative	TcCLB.506945.240	X		Metabolism	20246	6.08
beta tubulin, putative	TcCLB.506563.40	X	X	Cytoskeleton	49701	4.43

beta-fructofuranosidase-like protein	TcCLB.506705.70	X		Metabolism	53584	7.79
chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	TcCLB.510187.551	X		Protein folding	30553	9.15
cytochrome c, putative	TcCLB.506949.50	X	X	Metabolism	12234	9.88
elongation factor 1-alpha, putative	TcCLB.511369.30	X	X	Translation	30736	9.33
enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor, putative	TcCLB.508185.10	X		Metabolism	28818	8.91
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	TcCLB.506943.50	X	X	Metabolism	39033	9.2
glycosomal malate dehydrogenase, putative	TcCLB.506503.69	X	X	Metabolism	34068	8.88
guanosine monophosphate reductase, putative	TcCLB.506519.130	X		Metabolism	52311	9.05
heat shock 70 kDa protein, putative	TcCLB.511211.170	X	X	Protein folding	73299	5.22
histone H2A, putative	TcCLB.510525.80	X	X	DNA packaging	14354	11.88
histone H2B, putative	TcCLB.511635.10	X	X	DNA packaging	12361	12.17
histone H3, putative	TcCLB.505931.50	X	X	DNA packaging	14762	11.85
histone H4, putative	TcCLB.510351.20	X	X	DNA packaging	11170	11.65
hypothetical protein, conserved (pseudogene)	TcCLB.511821.179		X	N/A	143829	4.19
hypothetical protein, conserved	TcCLB.504089.70	X		N/A	12959	8.48
hypothetical protein, conserved	TcCLB.504001.10	X		N/A	13465	9.78
hypothetical protein, conserved	TcCLB.510877.40		X	N/A	24454	10.24
hypothetical protein, conserved	TcCLB.510143.5	X		N/A	7311	6.52
hypothetical protein, conserved	TcCLB.508719.70	X		N/A	44107	10.64
kinetoplast DNA-associated protein, putative	TcCLB.508719.60	X	X	DNA packaging	14361	12.11
kinetoplast-associated protein 3	TcCLB.509791.120	X		DNA packaging	21245	11.89
mitochondrial oligo_U binding protein TBRGG1, putative	TcCLB.507927.20	X		RNA processing	97266	8.8
poly(A)-binding protein, putative	TcCLB.508461.140	X		RNA processing	61411	9.69
ribosomal protein I35a, putative	TcCLB.506559.470	X		Translation	16892	12.14
ribosomal protein L36, putative	TcCLB.509671.64	X		Translation	12948	12.07
ribosomal protein S25, putative	TcCLB.504105.94	X	X	Translation	12351	11.21
ribosomal protein S7, putative	TcCLB.506593.19	X		Translation	23915	11.9
RNA-binding protein, putative	TcCLB.508413.50	X		RNA Processing	31097	9.78

A figura 4.19 resume as funções das proteínas nitradas identificadas.

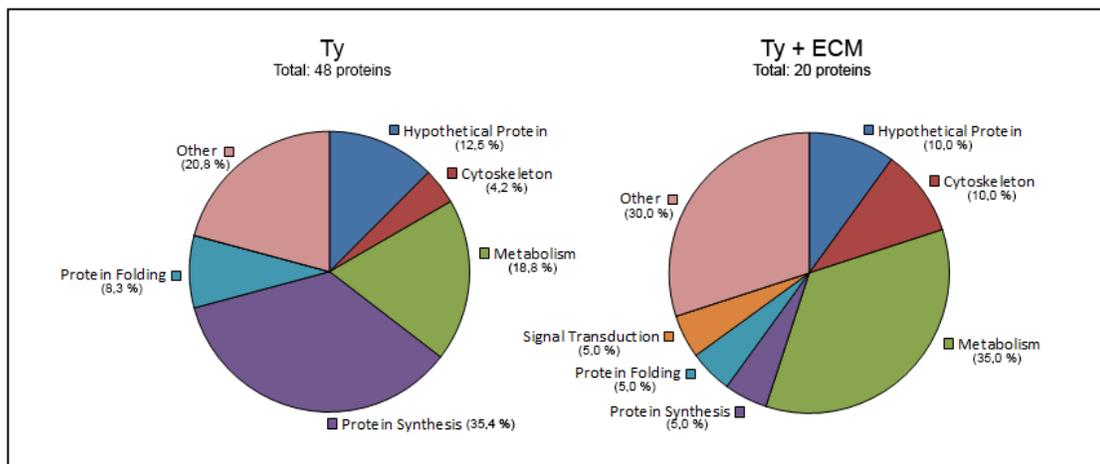


Figura 4.19: Perfil de proteínas nitradas em resíduos de tirosina em *T. cruzi* no grupo controle e após adesão à matriz extracelular por duas horas. Proteínas identificadas por imunoprecipitação, eletroforese bidimensional e MS/MS.

4.8 - Validação de nitração em proteínas de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* por imunoprecipitação e *immunoblotting*

Ambas as técnicas utilizadas para identificação de proteínas nitradas podem apresentar falso-positivos. Além disso, a imunoprecipitação seguida de identificação por espectrometria de massas não compara quantitativamente o nível de nitração de proteínas distintas. Com isto em mente, buscou-se validar individualmente algumas das proteínas identificadas através do uso de imunoprecipitação utilizando anticorpos específicos para a proteína em questão, seguido de *immunoblotting* contra resíduos de tirosina nitrados. Foram escolhidas para validação as proteínas: alfa e beta tubulina, histonas (H2A e H4) e enolase.

Alfa e beta tubulina foram identificadas pelas das duas técnicas empregadas, sendo que através da eletroforese bidimensional não foi verificada diferença na nitração destes alvos. A imunoprecipitação seguida de *immunoblotting* confirma esse resultado, identificando ambas as proteínas nitradas de maneira semelhante em ambas as condições, em presença ou ausência de matriz extracelular (figura 4.20).

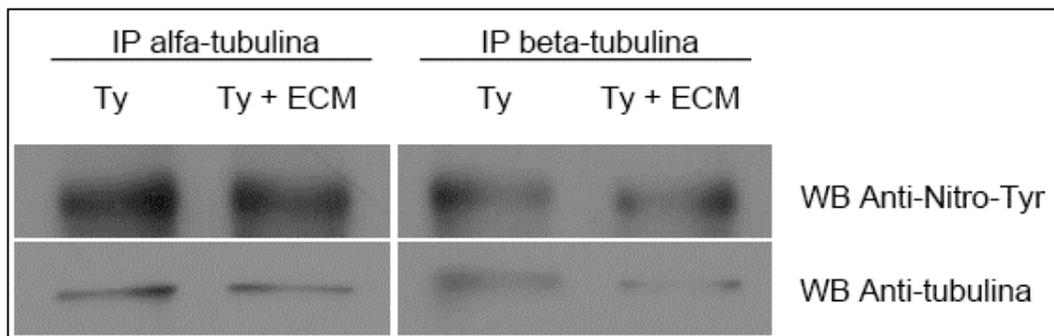


Figura 4.20: Nitração de tubulina de tripomastigotas de *T. cruzi*. Imunoprecipitação (IP) de alfa ou beta-tubulina com anticorpos específicos, seguido de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti- nitro-tirosina. Foram utilizados extratos de parasitas previamente incubados ou não com ECM.

Modificação por nitração de Histonas H2A e H4 também foi identificada de forma não-quantitativa por imunoprecipitação. Embora essas proteínas encontrem-se nitradas em ambos os grupos, observou-se um aumento na nitração de histonas após a incubação das formas tripomastigotas de *T.cruzi* com a matriz extracelular (figura 4.21), sugerindo a modulação da nitração em proteínas específicas, embora o perfil geral indique predominantemente denitração após a incubação do parasita com ECM.

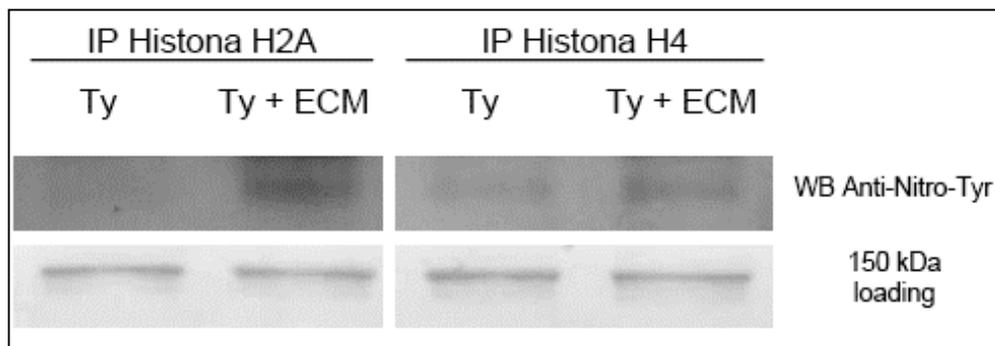


Figura 4.21: Nitração de histonas de tripomastigotas de *T. cruzi*. Imunoprecipitação (IP) de histona H2A ou histona H4 com anticorpos específicos, seguido de *immunoblotting* utilizando anticorpos anti- nitro-tirosina.

Foram utilizados extratos de parasitas previamente incubados ou não com ECM

Enolase, uma enzima da via glicolítica, apresentou aumento de nitração no grupo tratado com matriz extracelular verificada por eletroforese bidimensional (figura 4.18). A imunoprecipitação seguida de *immunoblotting* confirmou este resultado (figura 4.22).

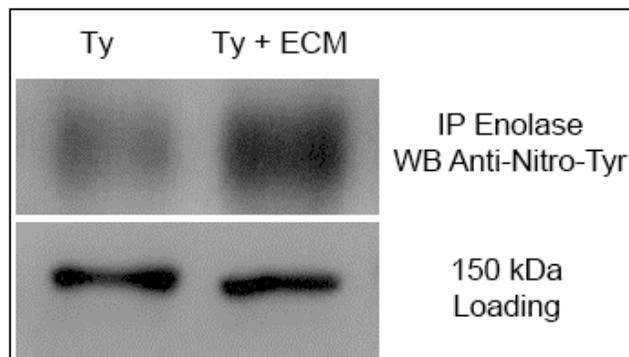


Figura 4.22: Imunoprecipitação (IP) de enolase ,seguida de *immunoblotting* com anticorpos anti- nitro-tirosina.

Finalmente, escolheu-se imunoprecipitar uma proteína paraflagelar, proteína presente no flagelo do parasita, que não foi identificada nitrada em nenhum dos experimentos. Após imunoprecipitação e revelação de *immunoblotting* contra nitro-tirosina, verificou-se apenas uma banda de intensidade fraca, que o anticorpo continua reconhecendo mesmo após redução das proteínas presentes na membrana de nitrocelulose por 2-mercaptoetanol. Esse resultado confirma que esta proteína não se encontra nitrada e a fraca reatividade com o anticorpo se deve a interações não específicas (figura 4.23).

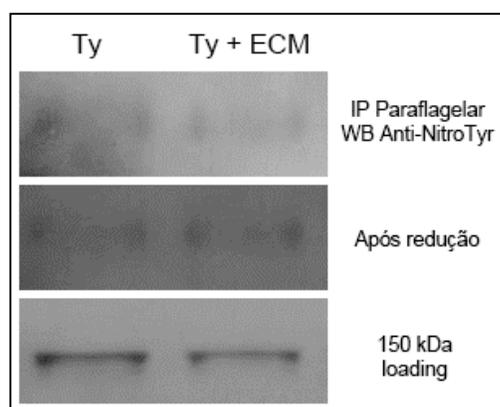


Figura 4.23: Imunoprecipitação (IP) contra proteína paraflagelar, seguida de *immunoblotting* contra nitro-tirosina. A fraca banda permanece mesmo após redução por 2-mercaptoetanol, indicando ausência de nitração.

4.9 - Identificação por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas de proteínas diferencialmente S-nitrosiladas

Extratos de parasitas incubados ou não com matriz extracelular foram submetidos a eletroforese bidimensional e em seguida, *immunoblotting* para a detecção de resíduos S-nitrosilados. Foram identificadas três regiões de proteínas S-nitrosiladas apenas no grupo sem tratamento com ECM (*spots* 60, 61 e 63 da figura 4.24) e sete de proteínas S-nitrosiladas no grupo de *T. cruzi* incubado com ECM, ausentes no grupo controle (*spots* 49, 51, 53, 54, 55, 58 e 59 da figura 4.22). É interessante notar que no grupo tratado com ECM existe um *spot* nitrosilado com cerca de 100 kDa (circulado em azul na Figura 4.24), que também é encontrado no gel 2D da ECM. A tabela 4.5 relaciona as proteínas identificadas.

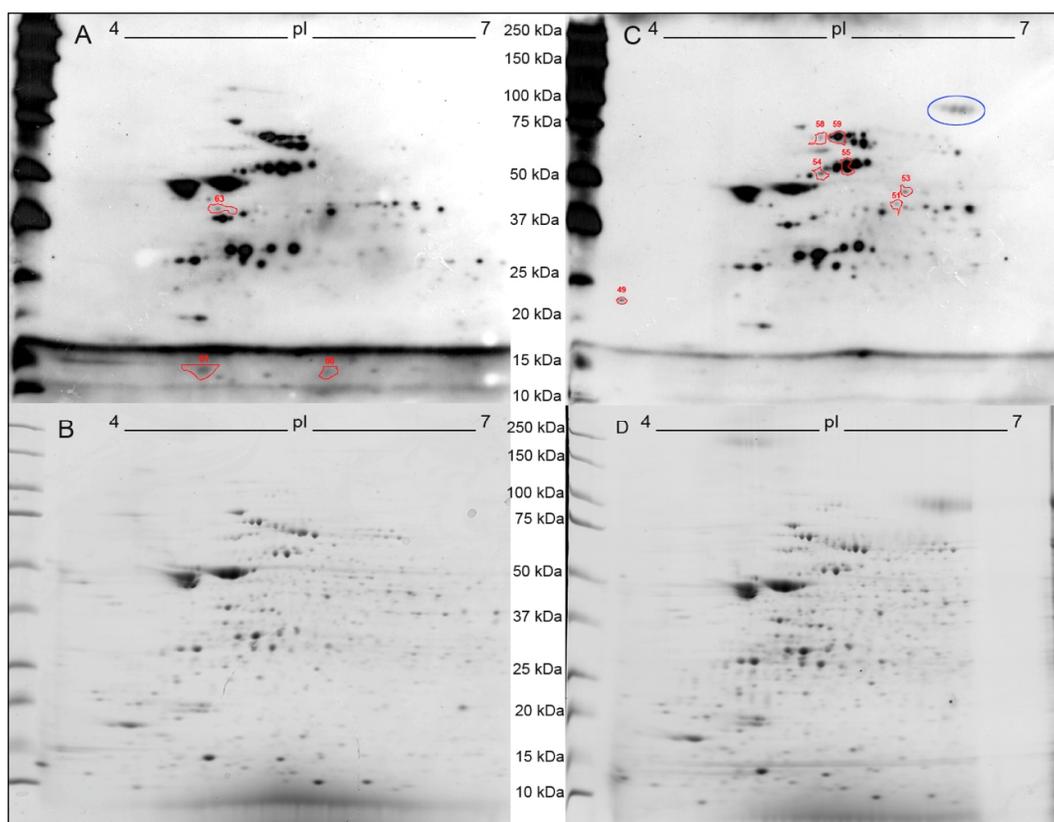


Figura 4.24: Proteínas modificadas por S-nitrosilação de tripomastigotas de *T. cruzi* incubadas com ECM. *T. cruzi* incubados ou não por duas horas com ECM, seguido de eletroforese bidimensional e *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-nitroso cisteína A, C: *Immunoblotting*- anti-nitroso-cisteína; B, D: coloração do gel por coomassie G250. A, B: *T. cruzi* sem incubação com ECM C, D: *T. cruzi* incubados por duas horas com ECM.

Tabela 4.5: Proteínas S-nitrosiladas de *T. cruzi* identificadas após excisão de gel bidimensional em condições não-redutoras.

Spot #	Ty	Ty + ECM	Proteína	Uniprot Entry #	Teórico	
					pI	MW (Da)
65	X		cytochrome C oxidase subunit IV, putative	Q4E5P5	5,72	39095
64	X		hypothetical protein, conserved	Q4CP97	4,92	14338
60	X		calpain-like cysteine peptidase, putative	Q4D066	5,07	12912
61	X		tryparedoxin, putative	Q4D1B8	5,27	16141
63	X		heat shock protein 85, putative	Q4CQS6	5,07	81132
49		X	hypothetical protein, conserved	Q4DJJ4	4,3	19572
51		X	69 kDa paraflagellar rod protein, putative	Q4DIF6	5,85	69975
53		X	69 kDa paraflagellar rod protein, putative	Q4DIF6	5,85	69975
54		X	Hsp60, mitochondrial precursor, groEL protein, heat shock protein 60	Q4DYP5	5,38	59357
55		X	Hsp60, mitochondrial precursor, groEL protein, heat shock protein 60	Q4DYP5	5,38	59357
58		X	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	Q4CVR9	5,75	71459
59		X	paraflagellar rod component, putative	Q4DWL5	5,25	68744

4.10 - Identificação de proteínas modificadas por S-nitrosilação de *Trypanosoma cruzi* por *biotin-switch* e espectroscopia de massas

A biotilação dos resíduos de cisteína S-nitrosilados, seguido de tripsinação e *pull-down* utilizando *beads* de streptavidina, permitiu o enriquecimento de diversas proteínas diferencialmente S-nitrosiladas nos dois grupos estudados. A metodologia permitiu também o sequenciamento do peptídeo que contém o resíduo que foi modificado. A tabela 4.6 resume os dados encontrados, de um experimento.

A figura 4.25 resume as funções das proteínas identificadas, utilizando-se tanto *biotin switch* quanto eletroforese bidimensional, sugerindo a modulação da S-nitrosilação após o tratamento do parasita com a matriz extracelular.

Tabela 4.6: Proteínas S-nitrosiladas de *T. cruzi* incubados ou não com matriz extracelular, identificadas por *biotin-switch* e nLC-MS/MS.

Sequência	Proteína	Grupo	Uniprot ID	Sítio S-NO Predito	Sítio S-NO Experimental	Teorético	
						pI	MM (kDa)
VEQKAECILTISQESR	calpain cysteine peptidase, putative	Ty + ECM	Q4CL64	7	7	5,57	20,7
CEVQVPLATVLFVEGEPNGYK	calpain-like cysteine peptidase, putative	Ty	Q4CYU3	83	83	5,08	12,8
LVGESSSSDEMVKVCVAK	calpain-like cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	Ty	Q4DQN5	110 - 179	179	4,86	78,2
RSLTACAAAATAVWAR	dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative	Ty	Q4CQF	4 - 6 - 15 - 32 - 71 - 334 - 449 - 460 - 484 - 538 - 1078 - 1569 - 1588 - 1759	56	5,03	200,4
LPVSPMCNAANSAYNPGSSDFDVSVSSSSSSSR	dual specificity protein phosphatase, putative	Ty	Q4DBZ0	383 - 426	383	6,74	88,1
GVMEVYLDATECYLK	fatty acid elongase, putative	Ty	Q4DX62	4 - 246	246	10,34	56,0
RLPSYGPCGK	fucose kinase, putative	Ty + ECM	Q4D3V8	12 - 144	97	7,37	16,4
LPSYGPCGK	fucose kinase, putative	Ty + ECM	Q4D3V8	12 - 144	97	7,37	16,4
NPPNCSIVLER	glycerolphosphate mutase, putative	Ty + ECM	Q4CYT6	227	227	6,39	33,8
ATKTLPVEGNLGEICDKLVSLGQCEAVCNVYGLGSR	helicase (pseudogene), putative	Ty		4 - 18 - 85 - 157 - 705	31 - 40 - 44 *	6,80	104,0
NPPVCPVGGPRGCK	hypothetical protein	Ty + ECM	Q4CLG6	None	57 - 66	12,37	8,0
SSDADRTVICQLPPPR	hypothetical protein	Ty	Q4D844	12 - 221	80	8,44	24,0
KMSVGGKHVGSPPPPAGCR	hypothetical protein	Ty	Q4DFZ3	749	678	6,75	94,4
MYVVNLCNLPTAMAHAVHLASTIR	hypothetical protein	Ty	Q4DSF8	7	7	6,66	26,6
CQVIFVTVSDGETVLMMLAK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4CX24	None	40	5,58	16,3
DQHAMMQSPLKASITASTECATK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4CYE8	8 - 186 - 692	610	6,64	89,3
CVVNAGTPTIPAAAAAPSTK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4CZ17	62 - 256 - 1248	484	8,75	164,2

CVVNAGTPTIPAAAAAPSTK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4CZ17	62 - 256 - 1248	484	8,75	164,2
DSVEVSCEEDR	hypothetical protein, conserved	Ty + ECM	Q4D288	98	98	8,37	31,9
HGNYAMCDSAGKTMGFAEMSCRVVHIDER	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4D2Q	144 - 247 - 285 - 317 - 427	130 - 144 *	9,02	89,8
RTVTLPCCGARVIVLPSEK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4D4E1	86 - 198 - 247	247	5,74	37,2
NPLQLVPALILKTRNCR	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4D4L6	None	75	10,26	39,6
FAEDIAPLCHVAAR	hypothetical protein, conserved	Ty + ECM	Q4D5K8	82 - 107 - 142 - 379	297	8,23	66,0
GGECNRLLLFPOGGAAAVLNEK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4DBJ9	228 - 226 - 372 - 505 - 579 - 658	556	9,21	80,9
CLTTVAAGASVLGAPSLKSTVALSPSQWMR	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4DMP0	None	24	9,50	31,3
VCNNVEEALELSK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4DN98	5 - 351	5	6,80	67,1
RCAGGKFVEIK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4DQU3	10	10	9,70	69,4
CPCELPFIK	hypothetical protein, conserved	Ty + ECM	Q4DUX9	None	320 - 322 *	6,60	114,6
QMIYWCCILPGHANWWRGHR	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4DXR5	60 - 88 - 644 - 676 - 958 - 1330 - 1355 - 1697	1649 - 1650 *	6,31	197,3
FVSLEGGVMYVEMLGACR	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4DZR1	423	357	6,23	48,1
FVSLEGGVMYVEMLGACR	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4DZR1	423	357	6,23	48,1
RLSALEDCR	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4E2P0	421	421	9,38	64,9
GDEGELLDCVDPLK	hypothetical protein, conserved	Ty	Q4E2Q8	11 - 281	281	9,43	42,9
GVGELCGSHDK	hypothetical protein, conserved	Ty + ECM	Q9GZ29	181 - 246 - 578 - 657	620	10,04	74,2
LCALYFRACADGMQLFALSCDASCVP	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	Ty		294 - 561 - 584 - 1216	1093 - 1100 - 1111 - 1115 *	8,56	133,2
STMTAYEVRVCSGPDLFCSGR	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	Ty + ECM		431	906 - 913 *	10,35	99,2
RVMPGLSCPHR	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	Ty + ECM		474	573	8,73	86,9
SAMSCGSTLPPR	kinesin K39 (pseudogene), putative	Ty + ECM		15 - 531 - 541	1226	9,65	122,4

KGQQIVGTCITLSIRLLIPW	mucin TcMUCII, putative	Ty		4 - 17	72	8,90	21,4
EGAEIAVNPADCNSTVK	profilin, putative	Ty	Q4CZF5	134	134	4,82	16,1
EVVFVSSGACGIGR	pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein, putative	Ty	Q4CVK6	None	74	10,54	12,1
SGATEMVMNCPGESDVK	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	Ty	Q4E0N0	621 - 651	439	7,29	88,8
GCGILGIRLKR	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	Ty + ECM		241 - 356	241	10,17	56,4
EAGNVDVSLERCTSACSDSK	serine/threonine protein kinase, putative	Ty	Q4DGA1	245 - 953	35 - 39 *	5,75	110,1
ETVCLMLTSLPLLGHQVPK	surface protease GP63 (pseudogene), putative	Ty		133 - 452 - 551	269	12,51	68,4
CDFSAVAFILKYS	surface protease GP63 (pseudogene), putative	Ty + ECM		10 - 179	56	8,15	64,8
VDGWGFFVCMKVLIGSFAVAVLRTC	surface protease GP63, putative	Ty	Q4CMP1	5 - 364	427 - 443 *	7,81	48,9
LSLGSCMKK	surface protease GP63, putative	Ty + ECM	Q4CWF3	64	346	4,90	56,9
GVOGKIVCPAASLLCGDKER	surface protease GP63, putative	Ty	Q4DG31	8 - 192 - 528 - 577 - 583	528 - 535 *	7,42	74,7
LLASMVARGCTSR	trans-sialidase (pseudogene), putative	Ty + ECM		18 - 633	298	10,69	78,1
SICAADDAGAGER	trans-sialidase (pseudogene), putative	Ty + ECM		None	117	10,24	19,6
LFNSTVLLLFVLMCCGGAATAQVEK	trans-sialidase, putative	Ty	Q4DKM4	56 - 57 - 529	56 - 57 *	5,10	89,5
VGGSEECALNGASNEISHFYIGGDGENAANK	trans-sialidase, putative	Ty	Q4E0J4	None	668	4,62	97,0
* Pelo menos um dos resíduos indicados se encontram S-nitrosilados							

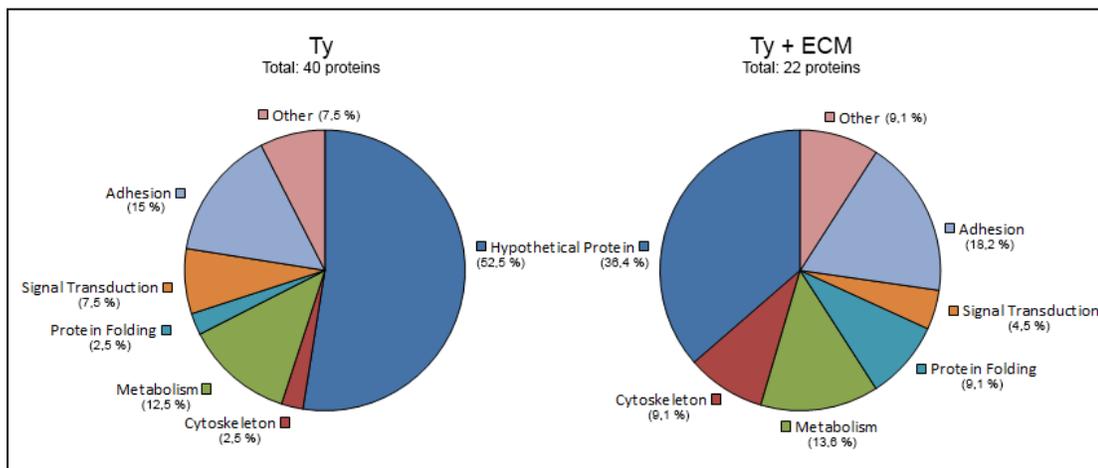


Figura 4.25: Perfil de proteínas S-nitrosiladas de *T. cruzi* no grupo controle e após adesão por duas horas à matriz extracelular. Proteínas identificadas por *biotin Switch*, eletroforese bidimensional e MS/MS.

4.11 - Validação de S-nitrosilação em proteínas específicas por *biotin switch*, *pull down* e *immunoblotting*

Para validar a modificação pós-traducional por S-nitrosilação foi selecionada a Mucina II, proteína de cerca de 20 kDa presente na superfície de *T. cruzi*. Mucina é uma família de proteínas em *T. cruzi* envolvidas na proteção do parasita contra o hospedeiro e também em interações com diversos receptores (BUSCAGLIA et al., 2006). Para tal, utilizou-se a técnica de *biotin switch* seguido de *pull down* com resina de streptavidina. Após lavagens e eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, realizou-se *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-mucin II. O uso do corante *Ponceau Red* após *pull down* não revelou nenhuma banda (figura 4.26). No entanto, após *immunoblotting*, foram detectadas bandas na faixa de 20 kDa, ausentes no controle sem ascorbato, confirmando que esta proteína encontra-se S-nitrosilada. O controle de reação sem ascorbato impede que ocorra a denitrosilação dos resíduos de cisteína, não ocorrendo desta forma a marcação por biotina das cisteínas previamente S-nitrosiladas: sinal positivo no controle sem ascorbato indicaria precipitação inespecífica ou biotinação inespecífica do alvo em questão.

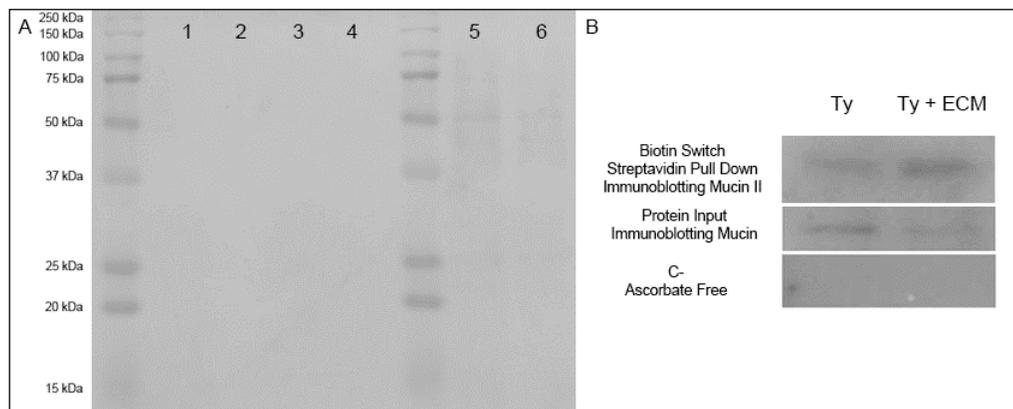


Figura 4.26: *Immunoblotting* contra Mucin II após realização de *biotin switch*. A) Marcação por Ponceau Red: 1. Ty Biotin Switch 2. Ty+ECM Biotin switch 3. Ty Biotin switch sem ascorbato 4. Ty+ECM Biotin switch sem ascorbato 5 e 6. Proteínas totais utilizadas na etapa de pull down (“Protein Input”); 5. Ty, 6. Ty+ECM. B) *Immunoblotting* contra Mucin II revela sinal em ambos os grupos

A mesma pergunta foi respondida por outra abordagem: a imunoprecipitação com anticorpos anti-Mucina II, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e posterior *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-S-nitroso-cisteína. Bandas de cerca de 20 kDa foram reconhecidas pelo anticorpo, corroborando os dados anteriores de modificação de Mucina II por S-nitrosilação (figura 4.27). No entanto, o biotin switch seguido por nLC-MS/MS identificou mucina II apenas no grupo controle (Ty), o que ilustra a necessidade de se validar individualmente proteínas específicas.

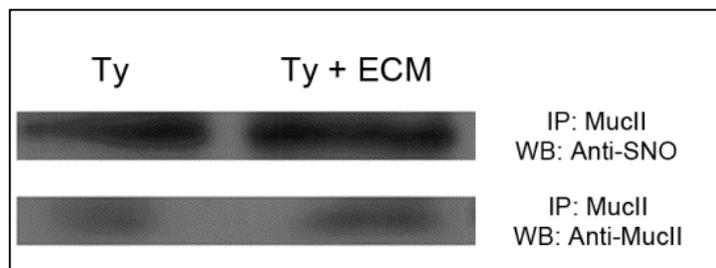


Figura 4.27: *Immunoblotting* contra proteínas S-nitrosiladas após imunoprecipitação utilizando anticorpos contra Mucina II, em extratos de *T. cruzi* previamente incubados (Ty+ECM) ou não (Ty) com ECM.

5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi estudar a sinalização por NO, tanto a via clássica (produção de NO e cGMP) quanto não-clássica (nitração em tirosina e S-nitrosilação em cisteína) em *T. cruzi* após interação com a matriz extracelular, um evento precoce no processo de infecção e responsável por desencadear diversas adaptações no parasita. No entanto, apesar da importância desta via em outros organismos, seu conhecimento é incompleto em *T. cruzi*, sujeito a questionamentos, uma vez que o parasita não possui anotado em seu genoma uma enzima NOS típica e tampouco guanilil ciclase. A atividade de guanilil ciclase poder ser assumida pela enzima adenilil ciclase, que teria dupla funcionalidade segundo hipótese formulada na literatura (ALEXANDRE et al., 1990; LAXMAN e BEAVO, 2007).

Dentre os poucos estudos realizados até o presente momento em relação à sinalização por NO^{*} em *T. cruzi*, pode ser afirmado de maneira conclusiva que o parasita possui atividade de NO Sintase, dependente de cálcio e calmodulina, e inibível por L-NAME, um análogo estrutural de L-Arginina, embora o produto esperado da reação- L-H³-Citrulina não tenha sido confirmado (PAVETO et al., 1995). Estes resultados foram reproduzidos com sucesso no presente trabalho (figura 4.2) e através do uso de cromatografia em camada delgada, confirmou-se a produção de L-H³-Citrulina a partir de L-H³-Arginina (figura 4.3). Em princípio, a conversão de arginina em citrulina por reações envolvendo enzimas do ciclo da uréia, poderia ocorrer pela desaminação de L-Arginina com produção de L-Ornitina pela arginase, seguido da condensação deste intermediário com carbamoil-fosfato pela Ornitina Carbamoiltransferase. No entanto esta via está ausente em *T. cruzi* e, como esperado, não se verificou a produção do intermediário L-H³-Ornitina.

A existência de NO sintase de *T. cruzi* semelhante à isoforma neuronal de mamíferos foi sugerida em trabalho realizado posteriormente por Goldstein e colaboradores (GOLDSTEIN et al., 2000) e, apesar da complexidade de reação com os anticorpos comerciais contra as demais isoformas, confirmou-se nesta dissertação que o anticorpo anti-

nNOS reconhece o menor número de alvos no parasita (figura 4.6). O padrão complexo obtido com os anticorpos restringiu a análise à isoforma neuronal e sua presença em *T. cruzi* foi mostrada por imunofluorescência, *immunoblotting* e imunoprecipitação (figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9). Apesar disto, a análise por espectrometria de massas do material imunoprecipitado com este anticorpo não identificou NOS, mas sim *heat shock protein 85* (HSP85).

Frente a esses resultados, procurou-se purificar parcialmente a enzima responsável pela síntese de NO para posterior identificação, considerando-se que parte da síntese de NO no parasita pode ser devida à enzima Citocromo P450 Redutase (CYP450 Redutase). O racional por trás desta hipótese consiste no fato de que CYP450 Redutase é a proteína em *T. cruzi* com a maior identidade com alguma isoforma de NOS de mamífero (neuronal, 33% de identidade) e pelo fato das etapas de transferência de elétrons por esta enzima e seus mecanismos de reação serem muito semelhantes aos de NOS (figuras 5.1 e 5.2, adaptadas de LYANAGI, 2012). Além disso, o método utilizado para a purificação de NOS em *T. cruzi* (PAVETO, 1995) é o mesmo utilizado para a purificação de CYP450 Redutase (SHET et al., 1993).

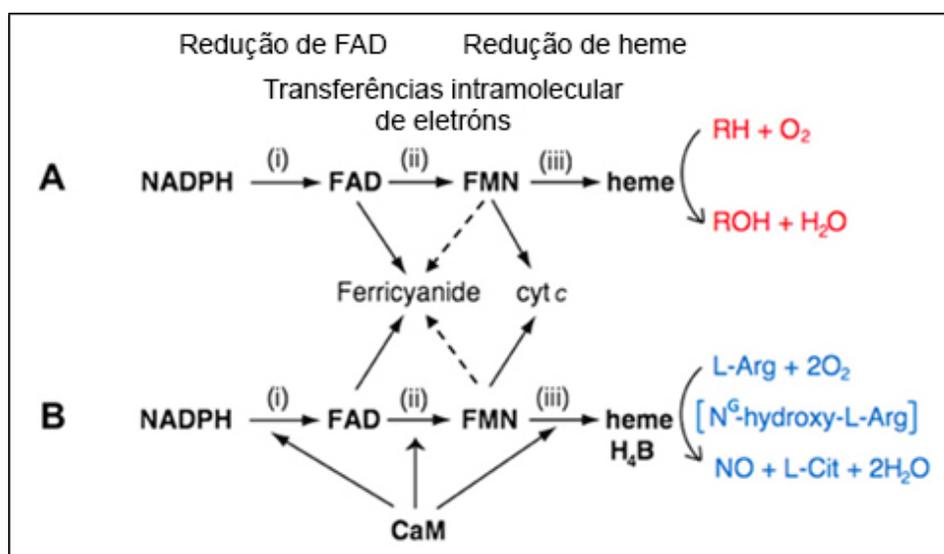


Figura 5.1: Etapas de transferências de elétrons em: A) Citocromo P450 Oxidoreductase B) NOS. Adaptado de LYANAGI, 2012.

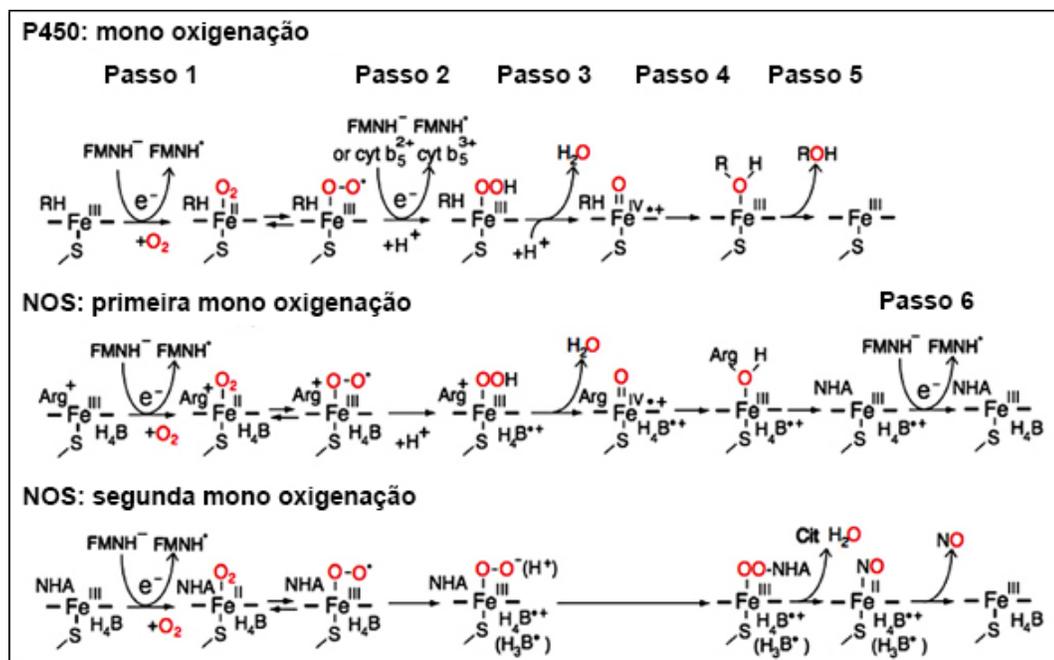


Figura 5.2: Mecanismo de reação de Citocromo P450 Oxidoreductase e NOS. Adaptado de LYANAGI, 2012.

Medindo-se a atividade de síntese de NO^* durante a purificação, sua inibição por L-NAME, um análogo de arginina, e a formação de citrulina utilizando arginina como substrato, (tabelas 4.1 e 4.2, figuras 4.12 e 4.13) a presença de NOS em tripomastigotas de *T. cruzi* pode ser sugerida, reforçando os dados da literatura. Apesar disso, a inibição da produção de NO^* por 1 mM de L-NAME é de no máximo 35%, o que poderia sugerir a presença de outras proteínas com essa atividade. A identificação das proteínas presentes nessas frações por nLC-MS/MS precisa ser realizada e poderá fornecer uma lista de possíveis candidatos a enzimas com atividade de síntese de NO e talvez contenha CYP450 Redutase entre os candidatos. Essa identificação está em andamento.

Independente da identidade da enzima responsável, a confirmação da presença de atividade de síntese de NO a partir de L-arginina possibilitou dar continuidade ao presente projeto, que parte do pressuposto de que vias de sinalização por NO estão presentes no parasita.

A adesão do parasita com a matriz extracelular levou a uma menor concentração de óxido nítrico presente no sobrenadante (figura 4.1), de modo semelhante à diminuição

observada na atividade NOS medida nos extratos do parasita após esta interação (figura 4.2), indicando uma inibição na via de sinalização clássica por NO[•]. Corroborando esta conclusão está o fato de que a concentração de cGMP medida no parasita após interação com ECM diminui cerca de quatro vezes, possivelmente devido à menor concentração de NO[•] no parasita (dados de Chrislaine Soares, não publicados). A inibição da via clássica de sinalização por NO por elementos da matriz extracelular não é algo inédito na literatura: trombospondina é capaz de interagir com o receptor CD47 presente em células de mamífero, desencadeando respostas que levam à inibição da atividade guanilil ciclase, segundo mensageiro na via de NO, impedindo que a PKG seja ativada (ISENBERG et al., 2008). É possível que trombospondina, elemento de ECM, também desencadeie evento análogo em *T. cruzi*, embora esta possibilidade não tenha sido verificada até o presente momento.

Após a interação entre ECM e tripomastigotas, de modo geral a quantidade de proteínas S-nitrosiladas diminui, como evidenciado por *immunoblotting* (figura 4.14) imunofluorescência (figura 4.17), pelo método de Griess após redução de SNO (figura 4.5) e pela identificação de proteínas S-nitrosiladas por *biotin switch* e eletroforese bidimensional, onde o número total de proteínas modificadas diminuiu de 40 para 22 após a incubação do parasita com ECM (figura 4.25). Além disso, o perfil de proteínas S-nitrosiladas foi modificado, indicando que a denitrosilação não acontece de maneira geral, inespecífica, sugerindo que alguns processos celulares poderiam ser controlados através dessa modificação pós-traducional. Por exemplo, proteínas hipotéticas S-nitrosiladas são mais comuns no parasita não incubado (52,5%) do que no incubado com ECM (36,4%). Por outro lado, proteínas de citoesqueleto S-nitrosiladas são mais comuns após interação do parasita com ECM (9,1%) quando comparadas com o parasita controle (2,5%).

É interessante notar que proteínas da família das trans-sialidases e gp63 também foram encontradas S-nitrosiladas nos parasitas incubados ou não com ECM, enquanto proteínas como fosfatases de especificidade dupla (*dual specificity protein phosphatase*, DUSP) e serina/treonina proteína quinases se encontraram S-nitrosiladas apenas no grupo

não tratado com matriz extracelular. Ambas as proteínas são importantes em vias de transdução de sinais, envolvendo a defosforilação e fosforilação, respectivamente, de diversos alvos. Embora essa possibilidade não tenha sido formalmente testada, é possível que a S-nitrosilação esteja modulando a atividade de ambas as proteínas, a exemplo do que acontece com a fosforilação de proteínas de *T. cruzi* após a adesão a diferentes elementos da ECM (MATTOS et al., 2012). Além disso, estudos recentes demonstram que proteínas da família da DUSP tem sua estabilidade, e conseqüentemente sua capacidade de defosforilação, aumentada após S-nitrosilação (GUAN et al., 2012), e diversas quinases de especificidade dupla (serina e treonina) são inibidas por S-nitrosilação, tais como a Proteína Quinase C (PKC) (CHOI et al., 2011), Proteína Quinase B (PKB) (YASUKAWA et al., 2005), além de outras (HESS e STAMLER 2012).

Dentre as outras proteínas identificadas que são modificadas por S-nitrosilação, nos chamou a atenção a triparedoxina. Esta proteína é análoga à glutaredoxina de outros organismos e participa na redução de glutathione, ou seja, regulando o estado redox da célula. Em *T. cruzi*, a triparedoxina teria uma função semelhante, controlando a redução de tripanotona, que por sua vez age como glutathione de mamíferos, regulando o estado redox de diversos alvos no parasita (CASTRO e TOMÁS, 2008). No caso da glutaredoxina, S-nitrosilação leva a uma inibição de sua atividade, ou seja, inibindo a redução de diversos alvos (HASHEMY et al., 2007). É interessante notar que triparedoxina foi encontrada S-nitrosilada apenas no grupo controle, o que pode ter conseqüências biológicas relevantes: sua S-nitrosilação pode levar à sua inibição, como ocorre com glutaredoxina, e após contato com a ECM, sua denitrosilação ativaria esta proteína, favorecendo desta forma a proteção a danos oxidativos causados pelo hospedeiro. No entanto esta hipótese não foi testada.

Outros alvos identificados no presente estudo já haviam sido relatados como S-nitrosilados em outros sistemas: calpaina (cisteína peptidase) é inibida por S-nitrosilação (KOH e TIDBALL 2000); proteína de choque térmico 90 (análogo de HSP85 identificada) quando S-nitrosilada, age inibindo a produção de NO (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2005); e por

fim, a S-nitrosilação de quinesina-símile já foi identificada mas sua função não foi estudada (ABAT et al., 2008).

Quanto à nitração em resíduos de tirosina, foi verificado um padrão semelhante ao de S-nitrosilação: predomínio de denitração, como evidenciado por *immunoblotting* (figura 4.15) imunofluorescência (figura 4.16) e com diminuição no número de proteínas nitradas identificadas por eletroforese bidimensional e imunoprecipitação após interação com matriz extracelular: de 48 para 20 proteínas identificadas (figura 4.19).

Assim como ocorre com S-nitrosilação, o fenômeno de denitração após interação com ECM não parece ser inespecífico. Há uma mudança no perfil de proteínas nitradas quando tripomastigotas de *T. cruzi* são ou não incubados com ECM. na incubação de. Por exemplo, verificou-se que 35,4% de proteínas nitradas estão relacionadas com a síntese proteica nos parasitas, sendo que essa porcentagem cai para 5,0% após adesão à ECM. O inverso é observado nas proteínas relacionadas ao metabolismo: um aumento de proteínas nitradas em tirosina nos parasitas após adesão à ECM (35% do total) em relação ao controle não incubado (18,8% do total)., sendo que proteínas relacionadas à glicólise são particularmente abundantes.

A função das modificações por nitração de proteínas em *T. cruzi* não foi determinada. Na literatura, a ocorrência de nitração em tirosina está geralmente associada com perda da função da proteína, destacando-se como exceções para esta regra a PKC isoforma ϵ (PKC ϵ) e glutathione s-transferase 1 microsomal, discutidas no item 1.5. No caso de tubulina, também modificada em *T. cruzi*, a nitração de tirosina está associada com parada no ciclo celular em G1/S, com diminuição na síntese de DNA (PHUNG et al., 2006). Estes resultados foram explicados pela incorporação de resíduos de tirosina nitrados na porção C-terminal da tubulina pela enzima *Tyrosine Tubulin Ligase* (TTL) (KALISZ et al., 2000) e que não podem ser removidos pela enzima tubulina carboxipeptidase, remoção essa essencial para que ocorra interação entre a tubulina e proteínas motoras (PHUNG et al., 2006). Não se sabe se efeito semelhante ocorre em *T. cruzi*, mas de qualquer maneira, alfa e beta tubulina foram

encontradas nitradas em níveis semelhantes em parasitas incubados ou não com ECM (figura 4.20).

Três enzimas da via glicolítica foram encontradas nitradas neste trabalho, provavelmente resultando em inibição desta via metabólica: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), enolase e fosfoglicerato quinase. GAPDH cataliza a conversão de gliceraldeído 3-fosfato a gliceraldeído 1,3-difosfato e já foi identificada em outros sistemas como alvo de nitração em tirosina, com perda de sua função. Neste caso, a nitração de um resíduo de tirosina em seu sítio ativo leva a uma perda na atividade da enzima por impedir, por motivos estéricos, a interação de GAPDH com NAD^+ , co-enzima desta reação (PALAMALAI e MIYAGI, 2010). No presente estudo, GAPDH foi encontrada nitrada em níveis semelhantes em ambos os grupos, isto é, incubados ou não com ECM. Enolase, responsável pela conversão reversível de 2-fosfo-glicerato a fosfoenolpiruvato, também foi encontrada nitrada no presente trabalho, com um aumento no nível de nitração após interação do parasita com a matriz extracelular. Na literatura, a nitração em resíduos de tirosina da enolase, está associada a um aumento na fosforilação da proteína e sua inativação (CASONI et al., 2005). É interessante notar que além de sua função na via glicolítica, a enolase é uma proteína associada com infecção em diversos parasitas. Por exemplo, em *Leishmania mexicana*, a enolase está localizada tanto no citoplasma quanto na membrana celular (QUIÑONES et al., 2007), sendo capaz de se ligar a plasminogênio (MILES, 1991) e laminina (CARNEIRO et al., 2004), ambos componentes da matriz extracelular. Não há no entanto estudos relacionando nitração desta enzima e sua influência na infectividade em *Leishmania* ou *T. cruzi*. A terceira proteína da via modificada, a Fosfoglicerato quinase, é a enzima responsável pela conversão reversível de 1-3-bifosfoglicerato a 3-fosfoglicerato. Essa proteína sofre aumento significativo de nitração na interação do parasita com a matriz extracelular. Embora utilizando-se agentes nitrantes, esta enzima foi um dos primeiros casos de nitração em tirosina com perda de ação enzimática relatados na literatura (MARKLAND et al., 1975). Verificou-se no estudo em questão que a nitração de um único resíduo de tirosina era capaz de inibir a enzima, sem modificação na

sua estrutura tridimensional, como verificado por difração circular. Levando-se em consideração os dados da literatura descritos e os dados de proteômica do presente trabalho, é razoável assumir que a via glicolítica encontra-se inibida como resultado da interação do parasita com a matriz extracelular, resultante da nitração em tirosina nas três enzimas descritas, embora a verificação formal desta hipótese ainda não tenha sido realizada.

Um dos resultados extremamente interessantes neste trabalho foi a grande quantidade de proteínas ribossomais nitradas em tripomastigotas do grupo controle, isto é, não incubado com ECM. A literatura não descreve casos de nitração em tirosina em proteínas ribossomais, não ficando claro qual seria sua função biológica. No entanto, existem relatos de nitração de proteínas ribossomais em resíduos de triptofano (KAWASAKI et al., 2011), com possível participação no processo de diferenciação celular. Devido à falta de ferramentas adequadas, não foi possível verificar se as proteínas identificadas em *T. cruzi* se encontram realmente nitradas em resíduos de tirosina ou se há reatividade cruzada do anticorpo anti-nitro-tirosina com resíduos de triptofano nitrados.

A detecção de modificação de Histonas por nitração em *T. cruzi* foi outro resultado interessante e que deve ser melhor explorado. As quatro isoformas de Histonas (H2A, H2B, H3 e H4) estão presentes em duas cópias cada no nucleossomo, participando da estrutura do cromossomo e da regulação de processos tais como replicação e transcrição gênica. A nitração de histonas já foi identificada em células tumorais (HAQQANI et al., 2002) e associada a modificações na estrutura tridimensional da proteína (DIXIT et al., 2010). No entanto, os estudos em questão não verificaram a afinidade de histonas nitradas pelo DNA. É possível especular que a nitração seria capaz de modificar a afinidade destas interações, devido às modificações na estrutura tridimensional de histonas, pela mudança de pKa da hidroxila da tirosina (o que levaria a repulsão eletrostática entre o oxigênio carregado negativamente e o DNA). Desta maneira, nitração em histonas seria um potencial mecanismo de controle de replicação e/ou transcrição gênica, semelhante à acetilação. No caso de *T. cruzi*, histonas foram encontradas nitradas com ou sem tratamento com a matriz

extracelular, mas o nível de nitração aumentou após a adesão com ECM (figura 4.21), sugerindo novamente que o processo de denitração que ocorre após interação com ECM não é inespecífico: apesar do perfil geral de denitração, é possível verificar aumento de nitração em proteínas específicas.

A Tabela 5.1 resume as modificações por S-nitrosilação e nitração em tirosina e triptofano descritas na literatura com relação às proteínas identificadas no presente trabalho e suas possíveis consequências funcionais.

Tabela 5.1: Consequências funcionais de modificações por S-nitrosilação, nitração em tirosina ou triptofano em proteínas identificadas no presente projeto e já descritas na literatura.

Proteína	Modificação	Função	Referência
ATP Sintase	Nitração Tirosina	Inibição síntese ATP	HAYNES, 2010
Calpaína cisteína peptidase	S-Nitrosilação	Inibição atividade peptidase	KOH, 2000
Citocromo C	Nitração Tirosina	Inibição apoptose pela via da caspase-9 (via ausente em <i>T. cruzi</i>)	NAKAGAWA, 2007
Fosfatase de dupla especificidade (DUSP)	S-Nitrosilação	Aumento de estabilidade	GUAN, 2012
Enolase	Nitração Tirosina	Inativação devido a aumento na fosforilação	CASONI, 2005
Enoil-CoA Hidratase	Nitração Tirosina	Desconhecida	KOECK, 2004
Fator de alongação 1-alfa	Nitração Tirosina	Desconhecida	LOZANO-JUSTE, 2011
Fosfoglicerato Quinase	Nitração Tirosina	Inibição da enzima	MARKLAND, 1975
Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase	Nitração Tirosina	Inibição da enzima	PALAMAI, 2010
Glutaredoxina (Análogo Triparedoxina)	S-Nitrosilação	Inibição atividade redutase	HASHEMY, 2007
Proteína de choque térmico 60	Nitração Tirosina	Inibição atividade chaperonina	KOECK, 2009
Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	Nitração Tirosina	Desconhecida	RODRÍGUEZ-ARIZA, 2005
Proteína de choque térmico 90 (HSP90) (Análogo HSP85)	S-Nitrosilação	Modificação função: de ativador a inibidor de NOS	MARTÍNEZ-RUIZ, 2005
Proteína de choque térmico 90 (HSP90) (Análogo HSP85)	Nitração Tirosina	Ativação via de morte celular por fas (via ausente em <i>T. cruzi</i>)	FRANCO, 2013
Histona	Nitração Tirosina	Desconhecida	HAQQANI, 2002; DIXIT, 2010
Kinesina	S-Nitrosilação	Desconhecida	ABAT, 2008
Proteínas ribossomais	Nitração Triptofano	Diferenciação celular (?)	KAWASAKI, 2011
Serina/Treonina proteína quinase	S-Nitrosilação	Inibição atividade quinase	CHOI, 2011; YUSUKAWA, 2005; HESS, 2011
Tubulina	Nitração Tirosina; Nitrotirosinação	Controle do ciclo celular	PHUNG, 2006; KALISZ, 2000

Estudos de proteômica comparativa são particularmente úteis para a identificação de um grande número de proteínas em resposta a um determinado estímulo, que impliquem em mudanças quantitativas ou mudanças pós-traducionais das proteínas, direcionando os estudos para alvos mais específicos. O presente trabalho não foi diferente: foi possível identificar diversas proteínas modificadas por nitração em resíduos de tirosina e S-nitrosilação em resíduos de cisteína em resposta à incubação de tripomastigotas de *T. cruzi* com a matriz extracelular. É possível agora levantar diversas questões de relevância biológica, tais como qual a influência de S-nitrosilação em proteínas de superfície como gp63 e trans-sialidase no processo infeccioso, se a nitração de determinadas enzimas leva à inibição da via glicolítica após interação do parasita com ECM ou se leva à dissociação do nucleossomo do cromossomo, controlando a transcrição gênica. São várias as possibilidades abertas, que necessariamente serão estudadas em futuro próximo.

6. CONCLUSÃO

A literatura com relação à sinalização por NO em *Trypanosoma cruzi* é incipiente e colocava em dúvida até mesmo a existência de vias de sinalização por NO nesse parasita. No presente trabalho foi possível reproduzir dados anteriores da literatura quanto à produção de NO e seu envolvimento na resposta à incubação de tripomastigotas de *T. cruzi* com a matriz extracelular.

A interação entre *T. cruzi* e a matriz extracelular é capaz de modular a sinalização por óxido nítrico evidenciado por: i) Menor concentração de NO no meio de cultura e menor concentração de cGMP em extratos do parasita após incubação com ECM, sugerindo a inibição da via de sinalização clássica por NO nessas condições ii) Modificação no perfil de S-nitrosilação após interação do parasita com a ECM, com predomínio de denitrosilação. iii) Modificação no perfil de nitração em resíduos de tirosina, novamente com predomínio de denitração.

Tal modulação pode levar a adaptações biológicas relevantes, tais como inativação de vias metabólicas, como sugere a nitração em tirosina de três diferentes enzimas da via glicolítica após adesão do parasita a ECM, e modulação em vias de sinalização, como sugere a denitrosilação em proteína quinase de especificidade dupla (serina/treonina) e fosfatase de especificidade dupla (DUSP).

As modificações pós-traducionais de proteínas por nitração ou S-nitrosilação vêm se somar às modificações descritas no fosfoproteoma de tripomastigotas em contato com a matriz extracelular. O papel de cada uma dessas modificações e sua possível interação, como por exemplo a S-nitrosilação de proteínas modulando a fosforilação, abre um caminho novo de investigação em *T. cruzi*. E, o mais interessante, abre a possibilidade de S-nitrosilação e Nitração de proteínas fazerem parte da sinalização celular em *T. cruzi*.

7. REFERÊNCIAS

ABAT, J. K.; MATTOO, A. K.; DESWAL, R. S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata*- ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. **The FEBS journal**, v. 275, n. 11, p. 2862–2872, jun. 2008.

ALAM, N.; GOEL, H.; ZARIF, M. The integrin—growth factor receptor duet. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. August, p. 649-653, 2007.

ALEXANDRE, S. et al. Differential expression of a family of putative adenylate/guanylate cyclase genes in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 43, n. 2, p. 279–288, dez. 1990.

ALVAREZ, B.; RADI, R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. **Amino acids**, v. 25, n. 3-4, p. 295-311, dez. 2003.

ALVES, M. J. et al. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*, **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 21 p. 75-82, 1986

ALVES, M. J. M.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB life**, v. 59, n. 4-5, p. 274–9, 2007.

ANDREWS. N.W., COLLI, W., Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. **Journal of Protozoology**, V. 29, p. 264–269, 2, maio, 1982.

BALAFANOVA, Z. et al. Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon -RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15021-15027, 26 abr. 2002.

BAO, Y. et al. Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 76, n. 10, p. 4757-4763, out. 2008.

BASU, N. et al. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. **FEMS microbiology letters**, v. 156, n. 1, p. 43-47, 1997.

BECKMAN, J.; KOPPENOL, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 271, n. 40, p. 1424-1437, 1996.

BELENGHI, B. et al. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1352-1358, 12 jan. 2007.

BENHAR, M. et al. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. **Science**, v. 320, n. 5879, p. 1050-1054, 2008.

BOCEDI, A. et al. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **FASEB journal**, v. 24, n. 4, p. 1035-42, abr. 2010.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 7 maio. 1976.

BROWN, G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. **FEBS letters**, v. 369, n. 2-3, p. 136-139, 1995.

BUCKNER, F.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Current opinion in infectious diseases**, v. 23, n. June 2010, p. 609-616, 2010.

BUSCAGLIA, C. A et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–36, mar. 2006.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 6, p. 93-100, 1964.

CÁRDENAS, T. C. et al. Regulation of the extracellular matrix interactome by *Trypanosoma cruzi*. **The open parasitology journal**, v. 4, p. 72-76, 2010.

CARNEIRO, C. R. W. et al. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. **Microbes and infection**, v. 6, n. 6, p. 604–608, maio. 2004.

CASONI, F. et al. Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: possible multifunctional role in the pathogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16295–16304, 22 abr. 2005.

CASTRO, H.; TOMÁS, A. M. Peroxidases of trypanosomatids. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 9, p. 1593–1606, set. 2008.

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

CHOI, H.; TOSTES, R.; WEBB, R. S-Nitrosylation inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta. **Journal of cardiovascular Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 65–71, 2011.

CHVANOV, M. et al. Calcium-dependent release of NO from intracellular S-nitrosothiols. **The EMBO journal**, v. 25, n. 13, p. 3024-3032, 12 jul. 2006.

CLOSS, E. I. et al. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. **Molecular pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 68-74, jan. 2000.

COOK, J. A. et al. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. **Analytical biochemistry**, v. 238, n. 2, p. 150–158, 1 jul. 1996.

DERAKHSHAN, B.; WILLE, P.; GROSS, S. Unbiased identification of cysteine S-nitrosylation sites on proteins. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1685 - 1691, 2007.

DHIMAN, M. et al. Enhanced nitrosative stress during *Trypanosoma cruzi* infection causes nitrotyrosine modification of host proteins: implications in Chagas' disease. **The American journal of pathology**, v. 173, n. 3, p. 728-40, set. 2008.

DIXIT, K. et al. Physicochemical studies on peroxyntirite-modified H3 histone. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 20–26, 1 jan. 2010.

FRANCIS, S.; BUSCH, J.; CORBIN, J. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525-563, 2010.

FRANCO, M. C. et al. Nitration of Hsp90 induces cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 12, p. E1102–1111, 19 mar. 2013.

FORRESTER, M. T.; FOSTER, M. W.; STAMLER, J. S. Assessment and application of the biotin switch technique for examining protein S-nitrosylation under conditions of pharmacologically induced oxidative stress. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 19, p. 13977–13983, 11 maio. 2007.

GIORDANO, R. et al. Cloning of a Surface Membrane Glycoprotein Specific for the Infective Form of *Trypanosoma cruzi* Having Adhesive Properties to Laminin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3461-3468, 5 fev. 1999.

GOLDSTEIN, J. et al. Immuno and Cytochemical Localization of *Trypanosoma cruzi* Nitric Oxide Synthase. **Biocell**, v. 24, n. 3, p. 217-222, 2000.

GRATTON, J. P. et al. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 29, p. 22268–22272, 21 jul. 2000.

GRUNE, T. et al. Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 18, p. 10857-62, 1 maio. 1998.

GUAN, W. et al. S-Nitrosylation of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 suppresses radiation-induced apoptosis. **Cancer letters**, v. 314, n. 2, p. 137–146, 28 jan. 2012.

GUPTA, K. J. Protein S-nitrosylation in plants: photorespiratory metabolism and NO signaling. **Science signaling**, v. 4, n. 154, p. jc1, jan. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th Edition. Oxford: Oxford University Press, 2007. 852.

HAQQANI, A. S.; KELLY, J. F.; BIRNBOIM, H. C. Selective nitration of histone tyrosine residues in vivo in mutatact tumors. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 5, p. 3614–3621, 1 fev. 2002.

HAAQANI, A. S.; DO, S. K.; BIRNBOIM, H. C. The role of a formaldehyde dehydrogenase-glutathione pathway in protein S-nitrosation in mammalian cells. **Nitric Oxide**, v. 9, n. 3, p. 172-181, nov. 2003.

HAYNES, V. et al. Nitration of specific tyrosines in FoF1 ATP synthase and activity loss in aging. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 298, n. 5, p. E978-987, maio. 2010.

HASHEMY, S. I. et al. Oxidation and S-nitrosylation of cysteines in human cytosolic and mitochondrial glutaredoxins: effects on structure and activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 19, p. 14428-14436, 11 maio. 2007.

HAUSEL, P. et al. Src-mediated phosphorylation regulates subcellular distribution and activity of human inducible nitric oxide synthase. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 198-206, 12 jan. 2006.

HARA, M. R. et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. **Nature cell biology**, v. 7, n. 7, p. 665-674, jul. 2005.

HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4411-4418, 10 fev. 2012.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1216-1219, 27 nov. 2009.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome-an inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 1, p. a004903, jan. 2012.

IKEDA, K. et al. Detection of 6-nitrotryptophan in proteins by Western blot analysis and its application for peroxynitrite-treated PC12 cells. **Nitric oxide**, v. 16, n. 1, p. 18-28, fev. 2007.

IRIE, Y. et al. Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5634-5639, 13 maio. 2003.

ISENBERG, J. S.; FRAZIER, W. A.; ROBERTS, D. D. Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 5, p. 728-742, mar. 2008.

IWAKIRI, Y. et al. Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 52, p. 19777-19782, 26 dez. 2006.

IYANAGI, T.; XIA, C.; KIM, J.-J. P. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: prototypic member of the diflavin reductase family. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 528, n. 1, p. 72-89, 1 dez. 2012.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2001, n. 86, p. p11, 12 jun. 2001.

Jl, Y. et al. Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione s-transferase by peroxynitrite. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 4, p. 1986-1991, 27 jan. 2006.

JIA, M.; MATEOIU, C.; SOUCHELNYTSKYI, S. Protein tyrosine nitration in the cell cycle. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 413, n. 2, p. 270-6, 23 set. 2011.

JOHNSON, C. A et al. Thrombospondin-1 interacts with *Trypanosoma cruzi* surface calreticulin to enhance cellular infection. **PLoS one**, v. 7, n. 7, p. e40614, jan. 2012.

JORTZIK, E.; WANG, L.; BECKER, K. Thiol-based posttranslational modifications in parasites. **Antioxidants & redox signaling**, v. 17, n. 4, p. 657-73, 15 ago. 2012.

KALISZ, H. M. et al. Incorporation of nitrotyrosine into alpha-tubulin by recombinant mammalian tubulin-tyrosine ligase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1481, n. 1, p. 131-8, 31 ago. 2000.

KAMISAKI, Y. et al. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. September, p. 11584-11589, 1998.

KAWASAKI, H. et al. Nitration of tryptophan in ribosomal proteins is a novel post-translational modification of differentiated and naive PC12 cells. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 2, p. 176-82, 1 ago. 2011.

KEHR, S. et al. Protein S-glutathionylation in malaria parasites. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 11, p. 2855-65, 1 dez. 2011.

KIM, S.-H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **The Journal of endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 139-51, maio. 2011.

KLESHCHENKO, Y.; MOODY, T. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infection and immunity**, v. 72, n. 11, p. 6717-6721, 2004.

KOECK, T. et al. Rapid and selective oxygen-regulated protein tyrosine denitration and nitration in mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27257-27262, 25 jun. 2004.

KOECK, T.; CORBETT, J.; CRABB, J. Glucose-modulated tyrosine nitration in beta cells: targets and consequences. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 484, n. 2, p. 221-231, 2009.

KOH, T.; TIDBALL, J. Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin in skeletal muscle cells. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 279, p. 806-812, 2000.

KORNBERG, M. D. et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 1094-1100, 2010.

KUNZ, S.; OBERHOLZER, M.; SEEBECK, T. A FYVE-containing unusual cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. **The FEBS journal**, v. 272, n. 24, p. 6412-6422, dez. 2005.

LACZA, Z. et al. Mitochondria produce reactive nitrogen species via an arginine-independent pathway. **Free radical research**, v. 40, n. 4, p. 369-378, abr. 2006.

LAXMAN S., BEAVO J.A., Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents, **Molecular Interventions**, v. 7 p. 203-215, 2007.

LEE, T.-Y. et al. dbSNO: a database of cysteine S-nitrosylation. **Bioinformatics**, v. 28, n. 17, p. 2293-5, 1 set. 2012.

LINDERMAYR, C.; DURNER, J. S-Nitrosylation in plants: pattern and function. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 1, p. 1-9, 2 nov. 2009.

LIU, Y. et al. A novel molecular mechanism for nitrated {alpha}-synuclein-induced cell death. **Journal of molecular cell biology**, v. 3, n. 4, p. 239-49, ago. 2011.

LOZANO-JUSTE, J.; COLOM-MORENO, R.; LEÓN, J. In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 10, p. 3501–3517, jun. 2011.

MACMILLAN-CROW, L. A; THOMPSON, J. A. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 366, n. 1, p. 82-88, 1 jun. 1999.

MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl , n. June, p. 319-324, jul. 2009.

MARINO, S.; GLADYSHEV, V. Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. **Journal of molecular biology**, v. 395, n. 4, p. 844-859, 2010.

MARKLAND, F. et al. Chemical modification of yeast 3-phosphoglycerate kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 4, p. 1301–1310, 1975.

MARROQUIN-QUELOPANA, M. et al. Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein and mapping the laminin-binding site. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 325, n. 2, p. 612-618, 10 dez. 2004.

MARTÍNEZ-RUIZ, A. et al. S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 24, p. 8525-30, 14 jun. 2005.

MATHEWS, W. R.; KERR, S. W. Biological Activity of S-Nitrosothiols: The Role of Nitric Oxide. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, n. 3, p. 1529 - 1537, 1993.

MATTOS, E. C. et al. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation. **PLoS one**, v. 7, n. 10, p. e46767, jan. 2012.

MILES, L. A. et al. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. **Biochemistry**, v. 30, n. 6, p. 1682-1691, fev. 1991

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS letters**, v. 470, n. 3, p. 305-308, 31 mar. 2000.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. Pt 5, p. 1861-1875, set. 2004.

NAKAGAWA, H. et al. Nitration of specific tyrosine residues of cytochrome C is associated with caspase-cascade inactivation. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 1, p. 15–20, jan. 2007.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 9, p. 1478-1486, set. 2011.

NDE, P. N. et al. Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. November, p. 337, jan. 2012.

NDE, P. N. et al. Silencing of the Laminin gamma-1 Gene Blocks *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and immunity**, v. 74, n. 3, p. 1643-1648, 2006.

ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. **Cell**, v. 67, n. 2, p. 411-421, 18 out. 1991.

OSTERA, G. et al. *Plasmodium falciparum*: Food vacuole localization of nitric oxide-derived species in intraerythrocytic stages of the malaria parasite. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 29-38, 2008.

OUAISSI, M. et al. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. **Nature**, v. 308, n. Mar 22-28, p. 380-382, 1984.

PALAMALAI, V.; MIYAGI, M. Mechanism of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by tyrosine nitration. **Protein science**, v. 19, n. 2, p. 255–262, fev. 2010.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 2, p. 75-93, 15 set. 2010.

PAVETO, C.; PEREIRA, C.; ESPINOSA, J. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16576-16579, 1995.

PAWLOSKI, J. R.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 622-626, 1 fev. 2001.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; RADI, R. L-Arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: Contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7301–7306, 2001.

PHUNG, A. D. et al. Posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells. **European journal of cell biology**, v. 85, n. 12, p. 1241–1252, dez. 2006.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, set. 2001.

RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4003-4008, 23 mar. 2004.

RANGEL-ALDAO R., et al., Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*, **Biochemical Interventions**, v. 17, p. 337-344, 1988

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, 17 abr. 2010.

RAUCH, A.; BELLEW, M.; ENG, J. Computational Proteomics Analysis System (CPAS): an extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput. **Journal of proteome research**, v. 5, n. 1, p. 112–121, 2006.

RODRÍGUEZ-ARIZA, A. et al. Altered protein expression and protein nitration pattern during d-galactosamine-induced cell death in human hepatocytes: a proteomic analysis. **Liver international**, v. 25, n. 6, p. 1259–1269, dez. 2005.

SCHILD, L. et al. Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 17, n. 15, p. 2194-2201, dez. 2003.

SENGUPTA, R. et al. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. **Biochemistry**, v. 46, n. 28, p. 8472-8483, 17 jul. 2007.

SHAH, V. et al. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. **American Journal of Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 277, p. 463-468, 1999.

SHET, M. S. et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of an NADPH-cytochrome P450 reductase from mung bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 7, p. 2890–2894, 1 abr. 1993.

SIMMONS, K. J. et al. Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks *Trypanosoma cruzi* infection. **FEBS letters**, v. 580, n. 9, p. 2365-2370, 17 abr. 2006.

SINGH, S. P. et al. The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14428-33, 10 dez. 1996.

SOUZA, J. M. et al. Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 380, n. 2, p. 360-366, 15 ago. 2000.

TSUMOTO, H.; TAGUCHI, R.; KOHDA, K. Efficient identification and quantification of peptides containing nitrotyrosine by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry after derivatization. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 4, p. 488-494, abr. 2010.

WHO, Expert Committee on the Control of Chagas Disease, 2000: Brasilia, Brazil

VELGE, P., Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interactions, **Parasitology**, v. 97, p. 255-268, oct. 1988

VENTURINI, G. et al. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 270, n. 2, p. 437-441, 13 abr. 2000.

XUE, Y. et al. GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11290, jan. 2010.

YASUKAWA, T. et al. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 7511-7518, 4 mar. 2005.