



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS NÃO
FAGOCÍTICAS NA FASE INICIAL DA INFECÇÃO
POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

Hialy Cristina Camargos Poli

Brasília – DF

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE CÉLULAS NÃO
FAGOCÍTICAS NA FASE INICIAL DA INFECÇÃO
POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

Hialy Cristina Camargos Poli

Orientador: Prof. Carlos André Ornelas Ricart
Co-orientador: Dr. Rayner Myr Lauterjung Queiroz

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia Molecular da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre

Brasília, 2015

Agradecimentos

À Deus que pra mim foi meu alicerce, foi quem me deu forças e me proporcionou em toda a vida chegar até onde estou, quem me abriu portas e colocou pessoas certas em meu caminho. Ao meu orientador Carlos André por acreditar em minha capacidade, por ser realmente um orientador, saber incentivar, motivar e corrigir sempre com muita paciência e sabedoria, é um exemplo de pesquisador e de pessoa. Ao meu co-orientador Rayner Myr, por inicialmente sua amizade ao longo do trabalho, pelos ensinamentos, paciência, por me propor esse projeto e dividir diariamente minhas expectativas, frustrações e conquistas.

Ao meu esposo André, por sempre me apoiar, estar ao meu lado e sonhar meus sonhos desde minha graduação, Sempre me proporciona muitos momentos de felicidade, risos e carinho, me sinto mais feliz, mais amada e mais forte com ele ao meu lado. Ao meu filho Davi, pessoa que entrou em minha vida durante a produção desse trabalho, e que mesmo ainda tão pequeno, já mudou minhas motivações e me deixou ainda mais perseverante. Seu sorriso sincero e amor puro me ecnhe de uma felicidade e amor que nunca imaginei sentir.

Aos meus pais, que desde minha infância investiram e acreditaram em meus planos. Suas batalhas diárias me proporcionaram conquistar todos os resultados que colho hoje. Agradeço muito pela paciência, dedicação, amor incondicional e apoio.

Aos meus irmãos Allyson e Diego, que sempre torceram por mim, e se alegram com minhas conquistas. Obrigada por todos os momentos que passamos, mesmo com desentendimentos de irmãos, sei que nosso amor e parceria são sinceros e acima de toda e qualquer circunstância.

Aos meus familiares que de forma indireta me impulsionaram a chegar sempre mais longe, em especial minha prima Jéssika que se tornou mais que uma irmã pra mim, é uma parceira, e sempre me escuta e me dá conselhos importantes em todas as áreas da minha vida, ter você ao meu lado torna minha vida ainda mais leve.

À minha amiga Thuany que me incentivou, ajudou em todos os momentos durante o mestrado de forma direta e indireta. Na reta final da produção desse trabalho teve importância essencial. Em pouco tempo se tornou uma pessoa tão especial. Obrigada pela amizade, pela parceria, por se tornar uma pessoa exemplo pra mim.

Exemplo de lealdade, caráter inabalável, amizade, doação, sabedoria, inteligência, organização e amor de um jeito único e raro.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Elaine e Anne, que foram as primeiras pesquisadoras que tive contato, e se tornaram um exemplo. Guiaram-me nos primeiros passos nessa área e toda a habilidade em bancada e cuidado que hoje tenho foram espelhados nelas. Também agradeço ao Jaques e ao Allan, que além da amizade e paciência foram essenciais para a organização de resultados e procedimentos que eu levaria um tempo muito maior entender e aplicar. Obrigada pelos ensinamentos e parceria. Também agradeço à toda a família LBQP pelos momentos diários, por me acolherem e se tornarem parte de minha história. Já são muitos anos participando desse laboratório, cresci e me desenvolvi muito como pessoa e pesquisadora.

Aos professores, em especial ao professor Sebastien, um dos idealizadores desse projeto, sempre me guiando e aconselhando em relação aos procedimentos que deveria adotar. Ao professor Wagner, que além da ajuda direta durante a fase final desse estudo, foi meu orientador durante dois projetos de iniciação científica. Foi quem me ensinou a pensar, planejar e desenvolver características essenciais para a pesquisa.

Ao Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro, pelos materiais e equipamentos utilizados durante a cultura celular. Ao Cnpq pela custeio desse projeto.

Resumo

A Doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada, endêmica na América Latina, e com tratamento ainda ineficaz. Estima-se que existam atualmente entre 6 e 7 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (agente causador da doença) em todo o mundo. Esforços têm sido feitos na busca da produção de medicamentos efetivos e seguros além da necessidade na produção de uma vacina, tendo em vista a dificuldade do diagnóstico. Durante a transmissão vetorial, mais comum em regiões endêmicas Triatomíneos liberam formas tripomastigotas na corrente sanguínea que logo após contato com vários tipos celulares, inicia um processo de interação e infecção celular. Essa fase inicial é fundamental para a continuidade do ciclo biológico do parasito e instalação da doença. Dada a importância dessa fase, e pouco conhecimento sobre a modulação da célula hospedeira, o presente estudo realizou uma análise da célula hospedeira após interação inicial, utilizando para isso uma abordagem proteômica.

Para essa investigação foi realizada análise comparativa por LC-MS/MS do extrato proteico de células HeLa (não fagocíticas) controle com extrato proteico de células HeLa após uma hora em contato com formas tripomastigotas (forma infectiva). Nossos resultados mostraram alteração em proteínas já conhecidas como por exemplo, proteínas de ligação ao cálcio e ao citoesqueleto.

Ao se observar de forma detalhada proteínas com diminuição na abundância, foram encontradas proteínas constituintes do fator de histocompatibilidade de classe I (MHC1), subunidades importantes na montagem e função catalítica do proteassoma. Foram encontradas proteínas até então não descritas na literatura como moduladas pelo *T. cruzi*. Uma delas foi o aumento da Rpn11, uma subunidade do proteassoma com função de desubiquitinase, e a diminuição da cullina associada a NEDD8, uma proteína envolvida na identificação e ubiquitinação de proteínas que devem ser degradadas. O processo de interação do *T. cruzi* com células HeLa também propiciou a modulação de proteínas participantes de outros processos celulares, como metabolismo, ligação ao DNA e chaperonas

O presente trabalho reforça a necessidade de futuros estudos sobre os processos de ubiquitinação, degradação e direcionamento de proteínas do *T. cruzi* ao MHC1 pela célula hospedeira, os quais podem ser utilizados para a eliminação do parasito pelo sistema imune.

Abstract

Chagas disease is regarded as a neglected illness endemic from Latin America and, furthermore, available drugs have limited efficacy and high toxicity. It is estimated that 6 to 7 million people worldwide are infected by *Trypanosoma cruzi* (the etiologic agent of the disease). Nonetheless, efforts toward more effective treatment have been made as well as a vaccine is being pursued. In the vectorial transmission of the parasite, the most common in endemic regions, triatominean bugs release trypomastigotes in the mammal host's blood stream. The parasites through the contact with several host cell types initiate biochemical processes for cell interaction and infection. This early stage is crucial for the continuity of the parasite's biological cycle and disease progression. Given its importance, and the limited information available regarding the modulation of the host cell, this study analyzed the *T. cruzi* infection effects in mammalian host cells at the early stages of the process through high-throughput proteomic approach.

Therefore, a comparative quantitative proteome analysis by means of LC-MS/MS was carried out between HeLa cells which were incubated or not with trypomastigote forms (the main infective life form) The resulting list of regulated proteins showed known proteins, e.g calcium and cytoskeleton binding proteins.

Regarding proteins with decreased expression, there were Major Histocompatibility Complex I proteins and subunits of the proteasome machinery important to its assembly and catalytic functions. This also corroborates with recent studies demonstrating its relevance on escaping the immune system's surveillance by jeopardizing the host cell antigen presentation. Also there were proteins related to the ubiquitination process. And among those with no expression modulation reported so far, here we observed an increase in Rpn11, a proteasome subunit with deubiquitinase function, and decrease in cullin associated to NEDD8, a protein involved recognition and ubiquitination of proteins to be degraded. The interaction process between *T. cruzi* and HeLa cells also caused the modulation of proteins involved in metabolism, DNA binding and chaperones.

This work underlines the need for further studies on processes of ubiquitination, degradation and targeting of *T. cruzi* proteins to MHC1 by host cells, which may be used by the immune system for the elimination of the parasite.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Manifestação clínica no local de penetração do <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Figura 2: Distribuição mundial de casos de transmissão da doença de chagas de forma vetorial.	9
Figura 3: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro invertebrado (inseto vetor) e no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos).	12
Figura 4: Vias de sinalização para aumento de Ca ²⁺ e invasão na célula hospedeira por <i>T. cruzi</i>	14
Figura 5: Vias de sinalização gerais utilizadas no processo de invasão da célula hospedeira por <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 6 Fluxograma da sequência utilizada para marcação com iTRAQ.	20
Figura 7: Fluxograma geral do trabalho realizado	22
Figura 8 Determinação do tempo de interação.	24
Figura 9 Perfil eletroforético de extrato total das duas condições.	25
Figura 10 Vocano plot da análise estatística da expressão diferencial das proteínas.	26
Figura 11 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas de acordo com a Função Molecular.	27
Figura 12 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionada a função de ligação.	28
Figura 13 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionada a função de ligação a outras proteínas.	29
Figura 14 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionada a função de ligação a outras proteínas.	29
Figura 15 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a estrutura de moléculas da célula.	29
Figura 16 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a Processos Biológicos.	30

Lista de Tabelas

Tabela 1 Exemplos de moléculas participantes no processo de invasão do <i>T. cruzi</i>	15
Tabela 2 Proteínas com abundância diminuídas após o contato	41
Tabela 3 Proteínas com abundância aumentada após o contato.....	49

Sumário

Introdução	8
Doença de Chagas	8
Epidemiologia	9
Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Processo de interação parasito-célula hospedeira	13
Objetivos	16
Objetivos específicos	17
Materiais e Métodos	18
Cultura de parasitos.....	18
Determinação do tempo de interação do parasito com a célula hospedeira.....	18
Marcação com SILAC:	18
Interação parasito/célula hospedeira:	18
Obtenção do proteoma de células hospedeiras infectadas:	19
Marcação com iTRAQ:.....	19
Análise por LC-MS/MS e bioinformática.....	21
Resultados	23
Escolha do melhor tempo para interação:	23
Perfil eletroforético dos extratos proteicos	25
Análise bioinformática dos dados gerados pela espectrometria	26
Agrupamento de proteínas com abundância diferenciada	26
Proteínas agrupadas por Função Molecular	27
Proteínas agrupadas por Processos Biológicos:	30
Discussão	32
Colclusão.	36
Bibliografia	37
Materiais Suplementares	41

Introdução

Doença de Chagas.

A Doença de Chagas é uma doença sistêmica, crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e endêmica em 21 países (WHO). Essa doença pode ser dividida em duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda inicial pode durar de 4 a 8 semanas e, na maioria dos casos, é assintomática. Entretanto, as manifestações clínicas que podem ocorrer são: mal-estar, febre prolongada, aumento dos gânglios linfáticos, hepatomegalia e esplenomegalia. No local da inoculação parasitária pode ocorrer o chamado chagoma (pele) ou sinal de Romanã (mucosa ocular) (Dr Lorenzo Savioli, 2010; Rassi & Marin-Neto, 2010) como mostra a figura 1.

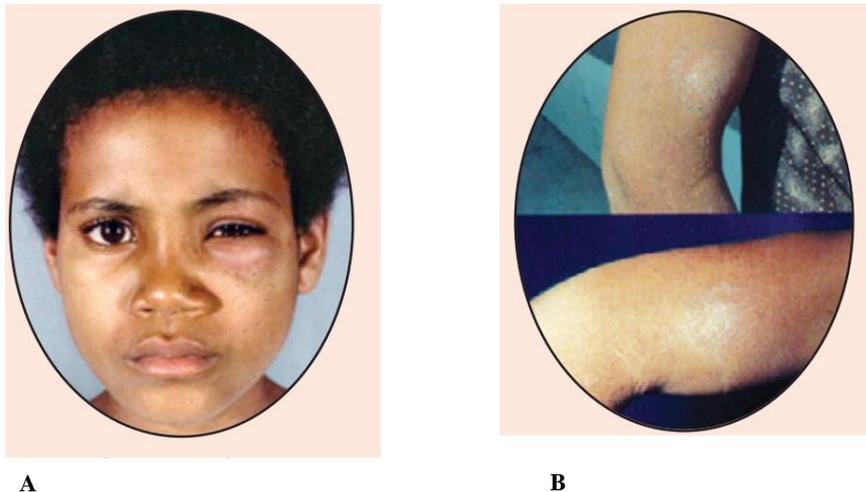


Figura 1: Manifestação clínica no local de penetração do *Trypanosoma cruzi*. Exemplos de (A) edema ocular conhecido como sinal de Romanã, e (B) edema endurecido subcutâneo denominado chagoma (Rassi & Marin-Neto, 2010)

No desenvolvimento clínico da doença, a presença do parasito desencadeia uma resposta imunológica, diminuindo a parasitemia, e a doença se desenvolve para o período sub-patente, evoluindo assim para fase crônica. Esta fase normalmente apresenta um período de tempo variável (fase indeterminada) em que não há sintomas, seguido de uma fase sintomática grave e com alta mortalidade. (Rassi & Marin-Neto, 2010).

Para o tratamento farmacológico desta doença, dois fármacos estão disponíveis: o benzonidazol e a nifurtimox. Entretanto estes fármacos têm apresentado baixa eficácia (principalmente durante a fase crônica), pois não impedem invasão celular pelos parasitos e possuem reações adversas consideráveis. O benzonidazol está associado a reações de

A transmissão nessas áreas ocorre de forma não vetorial como a transmissão congênita, transmissão por transplantes de órgãos e ainda por transfusão sanguínea. A falta de experiência de profissionais da saúde e a falta de obrigatoriedade de realização de testes diagnósticos para a doença, antes da doação de sangue em países não endêmicos, dificulta a identificação de portadores da doença de Chagas, seu tratamento e a contenção da transmissão (Schmunis, 2007).

A transmissão congênita, em que mães com a doença de Chagas contaminam seus filhos, é bastante comum na Argentina e sul da Bolívia, onde 40% das gestantes podem estar infectadas pelo *T. cruzi* (Francisco Javier Carod-Artal, 2013). Foi estimado o número de mais de 15.000 transmissões de *T. cruzi* de forma congênita por ano na América Latina, sem contar os casos relatados em países não endêmicos (Yves Carlier, 2011).

Uma estimativa do número de imigrantes legais que possam estar contaminados seria de 1.218 no Canadá, 1.067 na Austrália e 6.125 na Espanha. Nos Estados Unidos essa estimativa varia entre 38.777 a 339.954 de imigrantes legais, e de 33.193 à 336.097 de imigrantes não documentados (Schmunis, 2007). Esses dados podem estar sendo subestimados, sendo que muitos chagásicos não sabem que estão infectados. A falta de acesso ao diagnóstico da doença pela população rural pobre, a mais afetada, dificulta ainda mais o controle da doença (Francisco Javier Carod-Artal, 2013).

Além da preocupação com a saúde dessa população infectada, existe ainda a preocupação com a economia de alguns países onde existe alta taxa de infecção. Por exemplo, existe uma perda de US\$ 1.200 bilhões por ano causada pela diminuição da produtividade da força trabalhadora ocasionada pela doença em sete países ao sul da América Latina. Só no Brasil, o absenteísmo dos trabalhadores comprometidos pelas complicações da doença de Chagas, ocasiona uma perda estimada em US\$5,6 milhões por ano. O gasto médio mundial com assistência a pacientes com a fase crônica de doenças negligenciadas seria em torno de US\$ 267 milhões por ano, e as atividades de pulverização gastam em torno de US\$ 5 milhões por ano (WHO, 2010).

Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo biológico do *T. cruzi* ocorre em dois hospedeiros: um vertebrado (mamíferos) e o outro invertebrado (inseto vetor). As formas tripomastigotas são ingeridas pelo triatomíneo durante a picada e atingem o estômago do inseto (Fig 3, etapas 1 e 2). Ainda no estômago eles se diferenciam em epimastigotas e algumas esferomastigotas (Fig 3, etapa 3),

multiplicam-se (Fig 3, etapa 4) e, novamente, retornam a forma tripomastigota já no intestino do hospedeiro invertebrado (Fig 3, etapa 5).

O início do ciclo de vida no hospedeiro vertebrado se dá quando o inseto triatomíneo contaminado libera fezes durante o repasse, depositando, assim, sobre a pele ou mucosas formas tripomastigotas metacíclicas, forma infectiva (Fig 3, etapa 6). Estas, por sua vez, atingem à corrente sanguínea por meio das lesões causadas pela picada ou pelas mucosas (Fig 3, etapa 7).

Após o acesso à corrente sanguínea, estes parasitos podem invadir vários tipos celulares (Fig 3, etapa 8 e 9), e em pouco tempo se diferenciam intracelularmente nas formas replicativas amastigotas (Fig 3, etapa 10). Esta forma adquire formato arredondado e diminuição do flagelo. Ainda no interior da célula, os amastigotas sofrem várias replicações (Fig 3, etapa 11) e retornam à forma tripomastigota (Fig 3, etapa 12), rompem a membrana da célula e novamente são liberados para a corrente sanguínea (Fig 3, etapa 13).

A ruptura da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigotas para tripomastigotas, gerando o aparecimento de diferentes formas no meio externo (Fig 3, etapa 14). Existem ainda indícios de uma infectividade de amastigotas que seja comparável ao de tripomastigotas (Magalhães, 2006). Na corrente sanguínea, os tripomastigotas (Fig 3, etapa 15a) e amastigotas (Fig 3, etapa 15b) podem infectar novas células ou reiniciarem seu ciclo, quando ingeridos pelo inseto vetor (Fig 3, etapa 1) (Conrad, 2010).

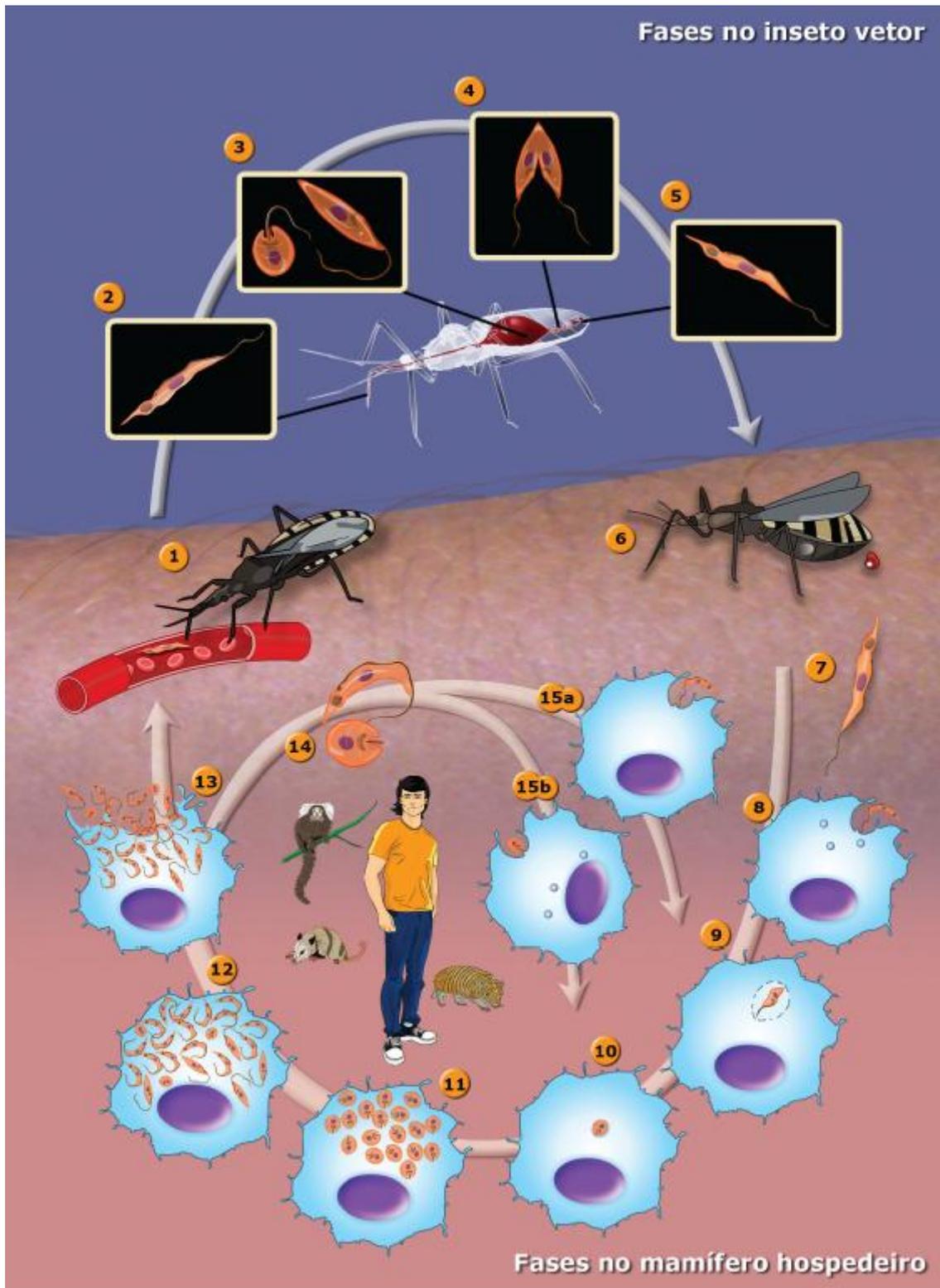


Figura 3 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado (inseto vetor) e no hospedeiro vertebrado (homem e mamíferos) (Teixeira, Dirceu E.).

Processo de interação parasito-célula hospedeira

O início do processo de infecção em células de mamíferos é caracterizado por interações entre moléculas de superfície do parasito e da célula hospedeira. Essa interação gera uma adesão entre as células e desencadeia uma cascata de sinalização celular (Yoshida & Cortez, 2008).

Muitos estudos atuais vêm sendo direcionados para identificação de moléculas de superfície, em especial do parasito, que possam ter papel importante na interação e infecção pelo *T. cruzi*. As moléculas de superfície mais estudadas, e conseqüentemente, mais bem descritas são as mucinas de superfície, um subconjunto das proteínas GPI-ancoradas (Erdmann, Steeg, Koch-Nolte, Fleischer, & Jacobs, 2009), entre outras glicoproteínas (Snary, 1985; Villalta & Kierszenbaum, 1983).

Ademais, outras proteínas na membrana do parasito também são responsáveis pela interação com moléculas de superfície de células hospedeiras. Essas moléculas possuem papel crucial no processo de invasão do parasito tais como, à ativação da cascata de sinalização para liberação de cálcio (Ca^{2+}) em ambas as células. Por exemplo sabe-se que a glicoproteína gp82 de tripomastigotas metacíclicos ao interagir com um receptor de membrana da célula hospedeira, desencadeia um processo que ativa uma proteína tirosina quinase e uma fosfolipase C, estimulando um reservatório dependente de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que libera o Ca^{2+} . Outro exemplo se dá pela ligação da gp35/50 a outro ligante desconhecido. Nesse caso, a interação dessas moléculas parece liberar o Ca^{2+} de acidocalcisomas pela ativação da adenilato ciclase, como mostra a figura 4 (de Morais et al., 2015). O aumento de Ca^{2+} na célula hospedeira também têm se mostrado essencial em outros eventos celulares, como por exemplo, a despolimerização dos filamentos de actina e a fusão de lisossomos já localizados na membrana celular na região em contato com o parasito (Morais et al., 2015). Esse processo gera uma reorganização do citoesqueleto da célula hospedeira, que resulta na formação do vacúolo ácido, denominado vacúolo parasitóforo, que envolve o parasito para internalização do mesmo (Epting, Coates, & Engman, 2010; Maeda, Cortez, & Yoshida, 2012; Tardieux, Nathanson, & Andrews, 1994a).

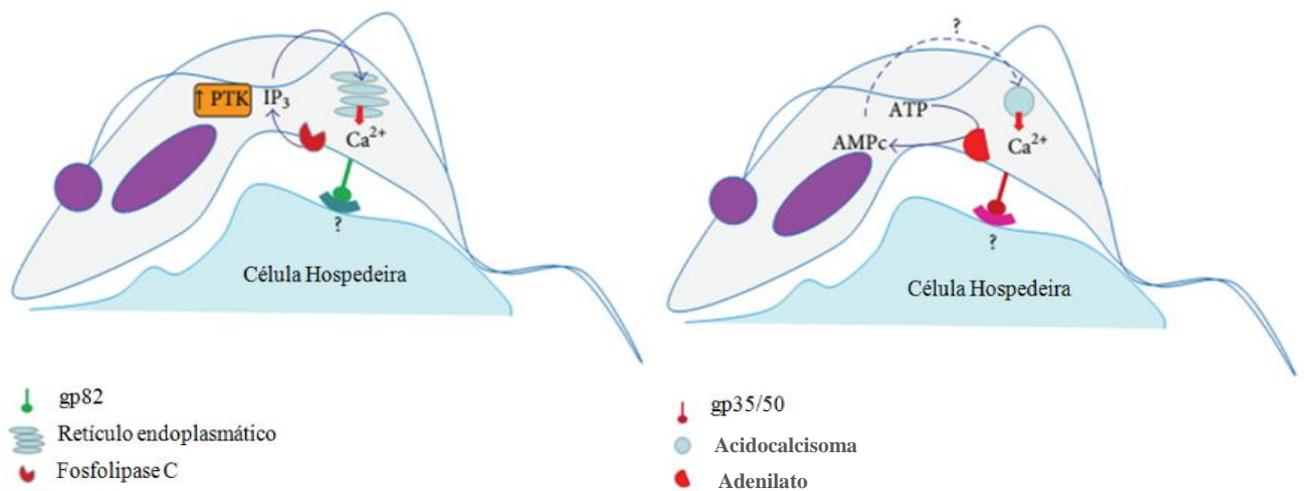


Figura 4 Vias de sinalização para aumento de Ca^{2+} e invasão na célula hospedeira pelo *T. cruzi*. (a) A ligação entre a gp82 e um receptor desconhecido da célula hospedeira ativa a proteína tirosina-quinase e a fosfolipase C, o que ativa o reservatório inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) para liberação de Ca^{2+} . (b) A ligação da gp35 /50 ao seu receptor parece estimular a atividade da adenilato ciclase e participa na libertação de Ca^{2+} a partir de acidocalcisomas (Adaptado de Morais et al., 2015).

Durante a invasão do *T. cruzi* no citoplasma parece haver um rompimento da membrana do vacúolo através da liberação de uma enzima trans-sialidase. Esse rompimento da membrana vacuolar ocorre por meio da ação da proteína TcTox, que é dependente de pH ácido permitindo, assim, a liberação do parasito (Tardieux, Nathanson, & Andrews, 1994). Ao invadir o citoplasma da célula hospedeira, ocorre então a diferenciação da forma tripomastigota para amastigota. O ambiente ácido auxilia nesse processo que acontece em um período entre 2 a 8 horas (Tomlinson, Vandekerckhove, Frevert, & Nussenzweig, 1995). Já são conhecidas algumas moléculas participantes do processo de aumento de Ca^{2+} na célula hospedeira e fuga do vacúolo parasitóforo (Tabela 1).

Tabela 1 Exemplos de moléculas participantes no processo de invasão do *T. cruzi*(de Morais et al., 2015, Flávia Nader Motta, 2012);

Molécula	Origem	Resposta gerada	Implicação no mecanismo celular
Transialidase	Parasito	Transferência de ácido siálico da célula hospedeira para mucinas de superfície do parasito	Interação com receptor ainda não conhecido da célula hospedeira para início do processo de invasão e persistência nas células hospedeiras
Gp83 e gp85	Parasito	Ligação a receptores, tais como P74	Interação parasito com célula hospedeira
Tc85	Parasito	Ligação a receptor específico	Mudança na organização do citoesqueleto auxiliando na invasão
Cruzipaína	Parasito	Clivagem de quininogênio da célula hospedeira para liberação de bradiquinina	Ativação do receptor de bradiquinina ativa PLC na célula hospedeira e auxilia no aumento de Ca ²⁺ via IP ₃ .
TcTox	Parasito	Formação de poros e lise do vacúolo parasitóforo.	Acesso do parasito ao citoplasma da célula hospedeira
Oligopeptidase B	Parasito	Envolvida na geração de Ca ²⁺ na célula hospedeira	Considerada importante no fator de virulência do parasito
Adenilato ciclase	Célula Hospedeira	Produção de AMPc	Liberação de Ca ²⁺ do retículo endoplasmático. Possível mecanismo de reparo da membrana plasmática usada pela célula hospedeira.
PIP3	Célula hospedeira	Formação de invaginação	Contribui para entrada do parasito na célula hospedeira

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na interação inicial do *T. cruzi* com a célula hospedeira se torna de grande importância, uma vez que este processo está diretamente relacionado com a eficiência da invasão do parasito, e consequentemente, na progressão da doença. Sendo assim, constituem importantes alvos para o desenvolvimento de drogas. Uma visualização esquemática de todas essas moléculas anteriormente descritas e as vias de sinalização que participam da interação da forma tripomastigota de *T. cruzi* com a célula hospedeira é apresentada na Figura 5.

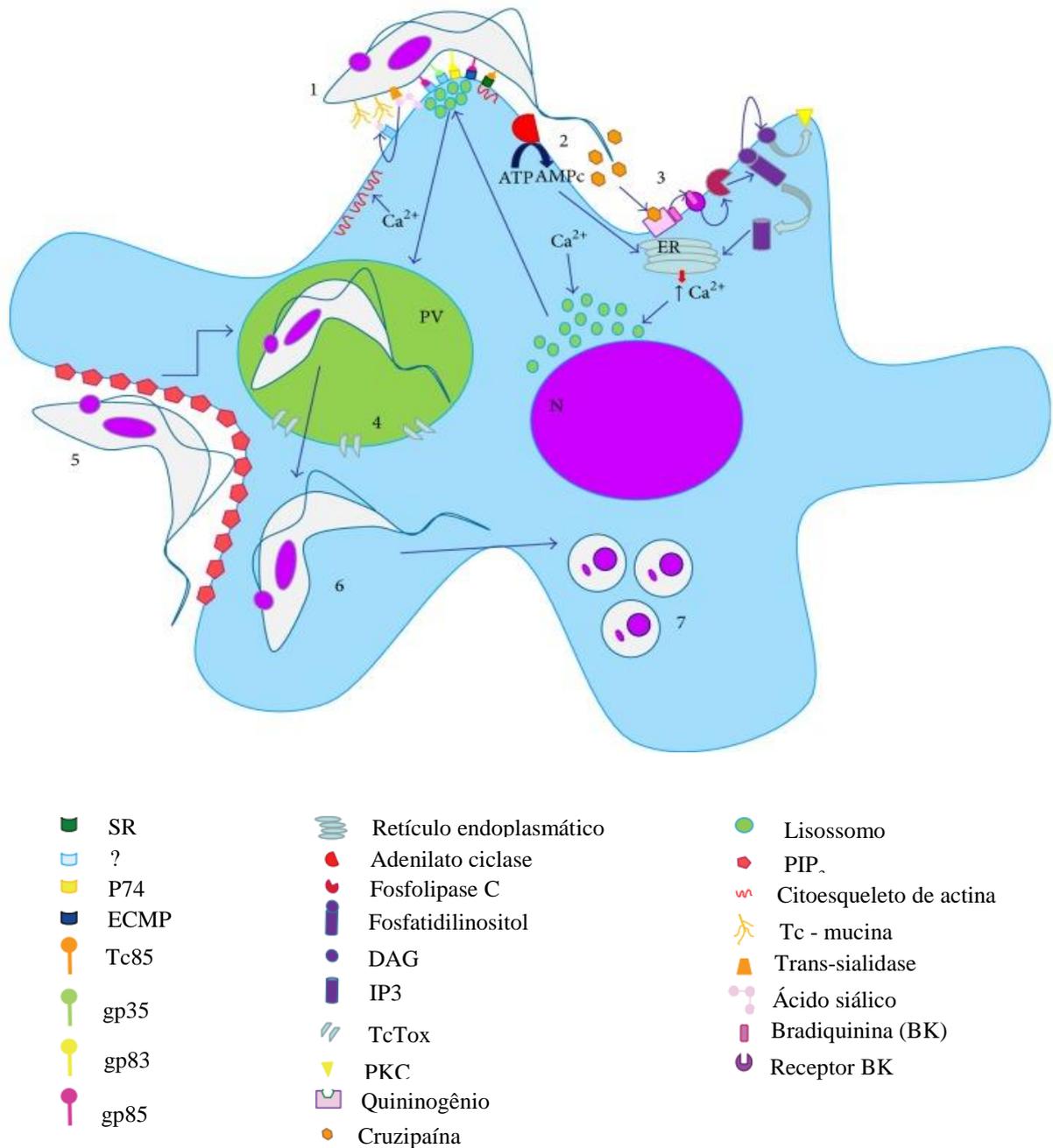


Figura 5 Vias de sinalização gerais utilizadas no processo de invasão da célula hospedeira por *T. cruzi*: (1) A transferência do ácido siálico da célula hospedeira pela transialidase para mucinas de superfície do parasito, e consequente interação dessas mucinas sialiladas com receptor desconhecido da célula hospedeira parece ser importante para o processo de internalização. Na reorganização do citoesqueleto para a invasão do parasito, temos a ligação da gp83 e gp85 a receptores da célula hospedeira como P74 ou EMCP, e a Tc85 à um receptor específico (SR). (2) O aumento da AMPc que induz a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático é desencadeada pela ativação da adenilato ciclase. (3) A liberação da bradiquinina que se liga à seu receptor é desencadeada pela ligação da cruzipaína (liberada pelo parasito) com o quinino gênio. A estimulação do receptor de bradiquinina ativa a fosfolipase da célula hospedeira, contribuindo para a liberação de Ca^{2+} por meio de PIP₃. (4) O aumento de Ca^{2+} promove o recrutamento de lisossomos, posterior formação do vacúolo parasitóforo (VP) reorganização do citoesqueleto de actina e ruptura de microfilamentos do VP. (5) Existe ainda uma outra via para a formação de invaginação da membrana plasmática através do acúmulo de PIP₃. (6) Para os tripomastigotas terem acesso ao citoplasma, a TcTox cria poros na membrana do VP. (7) Tripomastigotas se diferenciam em formas amastigota que se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira (Modificado de de Moraes et al., 2015).

OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo geral a observação das alterações induzidas pelo contato inicial do *Trypanosoma cruzi* com célula hospedeira não fagocítica, HeLa,

Objetivos específicos

- Induzir um processo de infecção inicial em que tripomastigotas interajam com células não fagocítica, sem uma possível internalização. O foco é a análise das primeiras alterações geradas pelo contato do parasito.
- Realizar uma análise proteômica comparativa entre células que entraram em contato com o parasito e células controles;
- Gerar lista de proteínas com abundância diferenciada entre as duas condições;
- Identificar possíveis alterações biológicas na célula que sejam essenciais para o processo de invasão;

Materiais e Métodos

Cultura de parasitas

Formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas através de cultura em monocamadas células HeLa (Andrews, 1982) em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) 5% e 100 µg/mL de gentamicina a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂, e propagados a cada dez dias após digestão com tripsina 0,1%.

Determinação do tempo de interação do parasito com a célula hospedeira

Células de tripomastigotas em meio DMEM foram adicionadas à monocamadas de células Hela e incubados à temperatura de 37°C em diferentes tempos (30 min, 1 h e 3 h), Após esse tempo as amostras foram observadas em microscópio invertido a fim de verificar a condição em que pelo menos 90% das células Hela apresentassem contato aparente com o parasito, porém sem internalização.

Marcação com SILAC:

Células HeLa foram crescidas em meio DMEM contendo SFB dialisado e posteriormente suplementado com aminoácidos L-arginina e L-lisina em cuja estrutura seis átomos de ¹²C foram substituídos por ¹³C ("aminoácidos pesados") (Tedia Brazil). Após as células atingirem uma confluência de pelo menos 90%, uma pequena alíquota foi retirada e depositada em nova garrafa de cultura, e adicionado novamente o meio DMEM com os isótopos pesados. Esse processo foi repetido mais quatro vezes, atingindo cinco ciclos para a incorporação completa dos isótopos pesados, (SILAC ProteinQuantitation Kit – Sigma/Aldrich). Antes dos experimentos de incubação com formas tripomastigotas essas células marcadas foram lavadas com meio DMEM (sem lisina, arginina e SFB dialisado) por três vezes.

Interação parasito/célula hospedeira:

Para o processo de interação, tripomastigotas lavados, e não marcados foram adicionados as células HeLa marcadas com SILAC e incubados por 1 hora na proporção de 40 parasitos por célula (Camargo et al., 2014). Também foram preparadas células HeLa marcadas sem contato com tripomastigotas como controle. Para cada uma dessas condições foram feitas quatro replicatas.

Obtenção do proteoma de células hospedeiras infectadas:

As células HeLa que entraram em contato com o parasito e as células HeLa controle foram lavadas 3 vezes com DMEM não suplementado. As quatro replicatas de cada condição foram lisadas por fricção com espátula em 8M de uréia contendo coquetel completo de inibidores de fosfatases e de proteases (*CompleteTM, Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, USA). O extrato proteico foi precipitado com etanol/acetona, ressuscitado em tampão 100 mM bicarbonato de amônio (ABC), reduzido com 20 mM DTT (ditiotreitól) por uma hora, alquilado com 40 mM IAA (Iodoacetamida) por uma hora no escuro e digeridos *overnight* a 37 °C com tripsina modificada (Promega) na proporção 1:100.

Marcação com iTRAQ:

Foi feita a marcação com o *Amine-Modifying Labeling Reagents for Multiplexed Relative and Absolute Protein Quantitation* (iTRAQ/Sciex) de acordo com instruções do fabricante. De forma resumida: 23µg do digesto dessalinizado e seco de cada condição foi ressuscitado em 30 µL de 300 mM TEAB (brometo de tetraetilamônio). Cada frasco de reagente iTRAQ (isóbaros contendo *ion reporter* 114 ou 115) foi ressuscitado em 70 µL de etanol e o volume dividido em quatro aliquotas de 17,5 µL que foram usadas para marcar as replicatas de cada condição. Para os peptídeos dos extratos de células HeLa controle (RC1, RC2, RC3 e RC4), a marcação foi feita com o reagente 114 enquanto os peptídeos de células que passaram pelo processo de interação inicial com parasitos (RI1, RI2, RI3 e RI4) foram marcadas com o reagente 115. As amostras foram agitadas e incubadas a temperatura ambiente por 1-2 horas. Em seguida foram misturados (proporção 1:1) cada replicata de amostra controle marcada com reagente iTRAQ 114 com uma replicata da amostra da interação marcada com reagente 115 formando os multiplex M1, M2, M3 e M4 (Fig. 6). Os peptídeos foram posteriormente submetidos a processo cromatográfico em matriz combinada de resinas POROS[®] R2 e OLIGO R3 (applied biosystems) empacotadas em ponteiras (Gel Loader[®]).

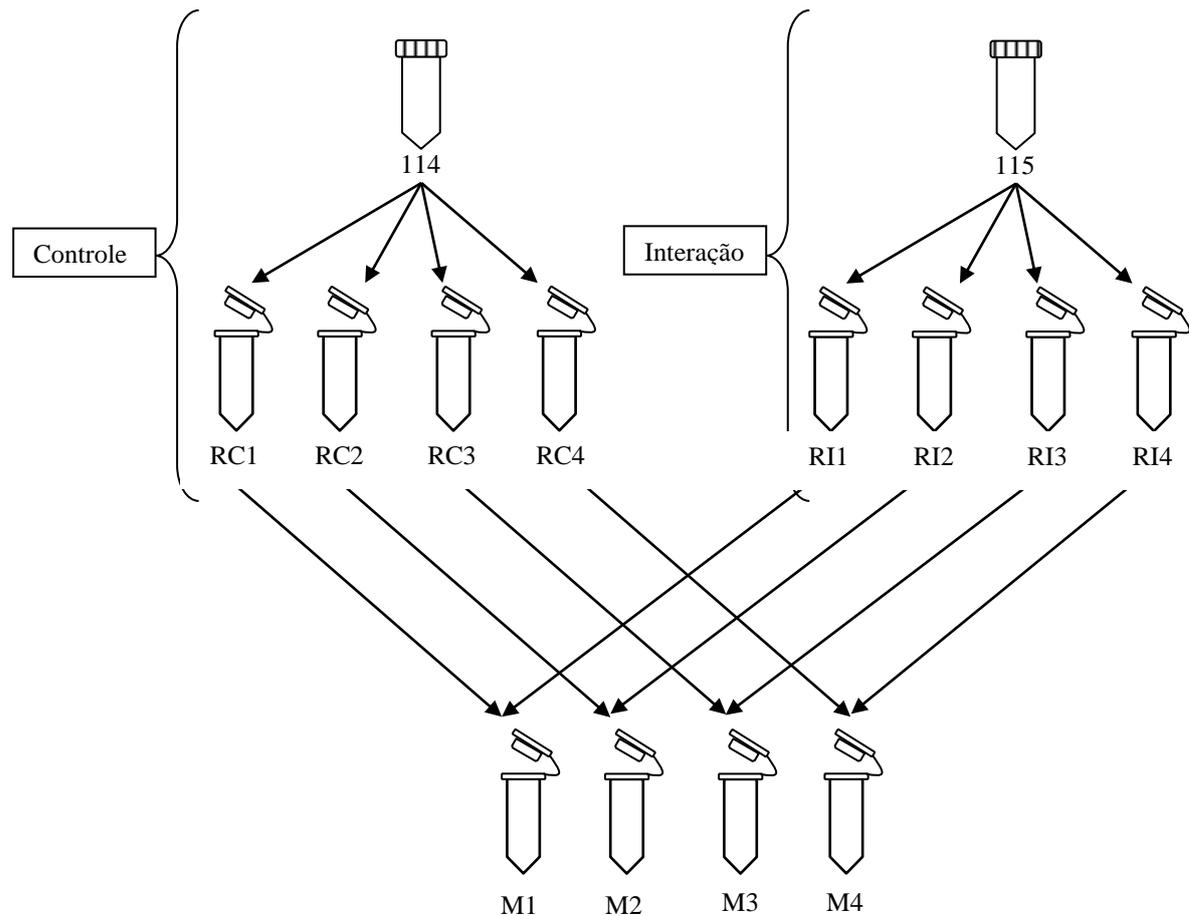


Figura 6 Fluxograma da sequência utilizada para marcação com iTRAQ: O reagente do iTRAQ 114 foi ressuspensionado em 70 μ l de etanol no próprio kit. Essa suspensão foi dividida para os quatro tubos contendo as replicatas referentes as células sem contato com parasito (RC1, RC2, RC3, e RC4). O mesmo procedimento foi feito com o marcador 115, porém dividido para as replicatas das células que interagiram por 1 hora com parasitos (RI1, RI2, RI3 e RI4). Para a obtenção do multiplex, foi feita combinação de uma replicata controle para uma replicata da Interação. Obtivemos no final quatro Multiplex (M1, M2, M3 E M4)

Análise por LC-MS/MS e bioinformática

As amostras foram analisadas com um sistema UHPLC-nano (Dionex) acoplado online com um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Elite (ThermoScientific). 2 µg de cada amostra foram carregados em uma pré coluna de 2 cm (diâmetro interno de 100µm) empacotada pelo usuário com resina de fase reversa ReproSil-Pur C18-AQ 5µm, e uma coluna capilar de sílica de 35 cm (diâmetro interno de 75 µm) empacotada pelo usuário com resina de fase reversa ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm (Dr. MaischGmbH, Alemanha) e eluídas usando um gradiente de 100% fase A (0.1% ác. fórmico) até 35% fase B (0.1% ác. fórmico, 95% acetonitrila) por 170 min, 35% até 90% fase B por 1 min. Após cada corrida, a coluna foi lavada com 90% fase B por 19 min e reequilibrada com 2% de fase B por 19 min. Os espectros de massa foram adquiridos no modo positivo aplicando-se data-dependent automatic survey MS scan e aquisição de espectros de massas em tandem (MS/MS). Cada MS scan no orbitrap (amplitude de massa: m/z 300-1650 e resolução: 120.000) foi seguido por MS/MS dos quinze íons mais intensos também no Orbitrap com resolução de 15.000. A fragmentação no LTQ ocorreu por colisão de alta energia (HCD) com NCE de 50 e threshold de 5.000 e as seqüências de íons selecionados foram excluídas dinamicamente por 90 segundos com janela de massa de mais ou menos 10 ppm. Foram excluídos da fragmentação íons com carga +1 e com carga indefinida. O processamento dos dados foi feito com o programa Proteome Discoverer v.1.4 beta (ThermoScientific). A busca e identificação das proteínas também usou o programa Proteome Discoverer com algoritmo Sequest contra um banco de dados de *Homo sapiens* instalado no servidor do laboratório obtido a partir do UniProt/SWISS-PROT e UniProt/TrEMBL em 06 de julho de 2015. Proteínas contaminantes (diversos tipos de queratinas humanas, BSA e tripsina porcina) foram adicionadas ao banco de dados e removidas manualmente das listas de identificações. As buscas foram feitas com os seguintes parâmetros: precisão no MS de 10 ppm, no MS/MS de 0.5 Da, até 2 sítios de clivagem perdidos, carbamidometilação de cisteínas e carbamidometilação de cisteínas, arginina (13C, 15N) e lisina (13C) como modificações fixas e oxidação da metionina e acetilação N-terminal da proteína como modificações variáveis. O número de proteínas, grupo de proteínas e número de peptídeos foram filtrados com uma taxa de detecção de falsos positivos (FDR) menor que 1% e peptídeos com rank 1 e mínimo de 2 peptídeos por proteínas foram aceitos para identificação com Proteome Discoverer. O software Panther (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) foi usado para interpretar os resultados a nível de proteínas (Gene Ontology).

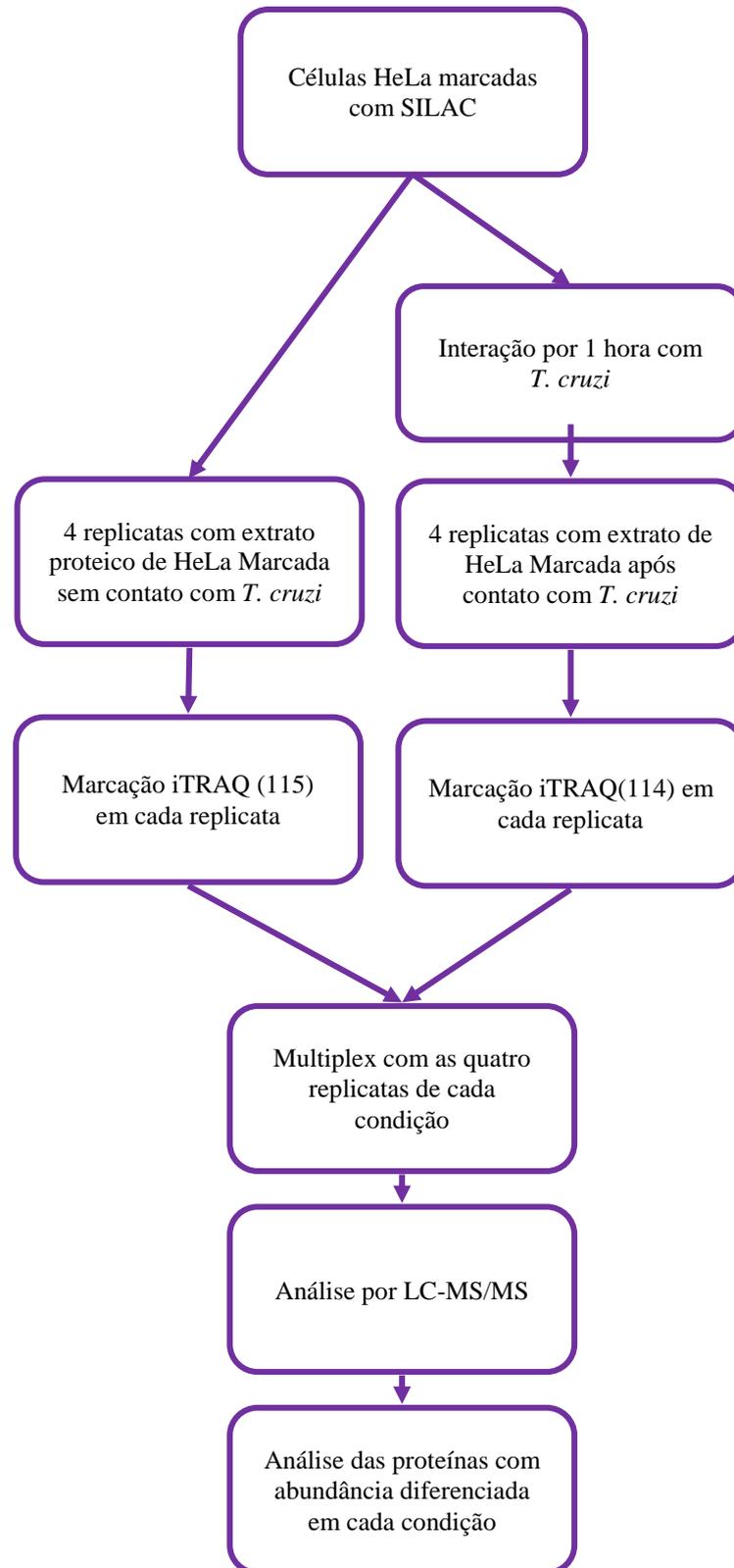


Figura 7: Fluxograma geral do trabalho realizado

Resultados

Escolha do melhor tempo para interação:

Durante o teste de determinação do tempo de interação do parasito com a célula hospedeira observou-se que, como mostrado na Figura 8, as células HeLa que permaneceram em contato com tripomastigotas por 30 min (proporção de 40 parasitos por célula), não foram observados parasitos aderidos (Fig. 8A). Já no tempo de 1 h foi possível encontrar tripomastigotas com aparente contato superficial (Fig. 8B, círculo preto). No tempo de 3 h, foram encontradas prováveis internalizações de formas tripomastigotas (Fig 8C, círculo preto), e supostas formas amastigotas intracelulares (Fig. 8C, círculo vermelho).

A partir desse resultado, foi definido que, durante processo de interação, as células HeLa permaneceriam em contato com formas tripomastigotas durante 1 h . Esse tempo parece retratar a interação e início da infecção, alvo central da análise desse estudo. Para complementar esses resultados, faz-se necessário a realização de um teste com técnicas mais sensíveis para uma comparação quantitativa entre esses tempos, e uma localização bem definida do parasito em relação à célula HeLa para identificação do estágio de infecção atingida por esse tempo.

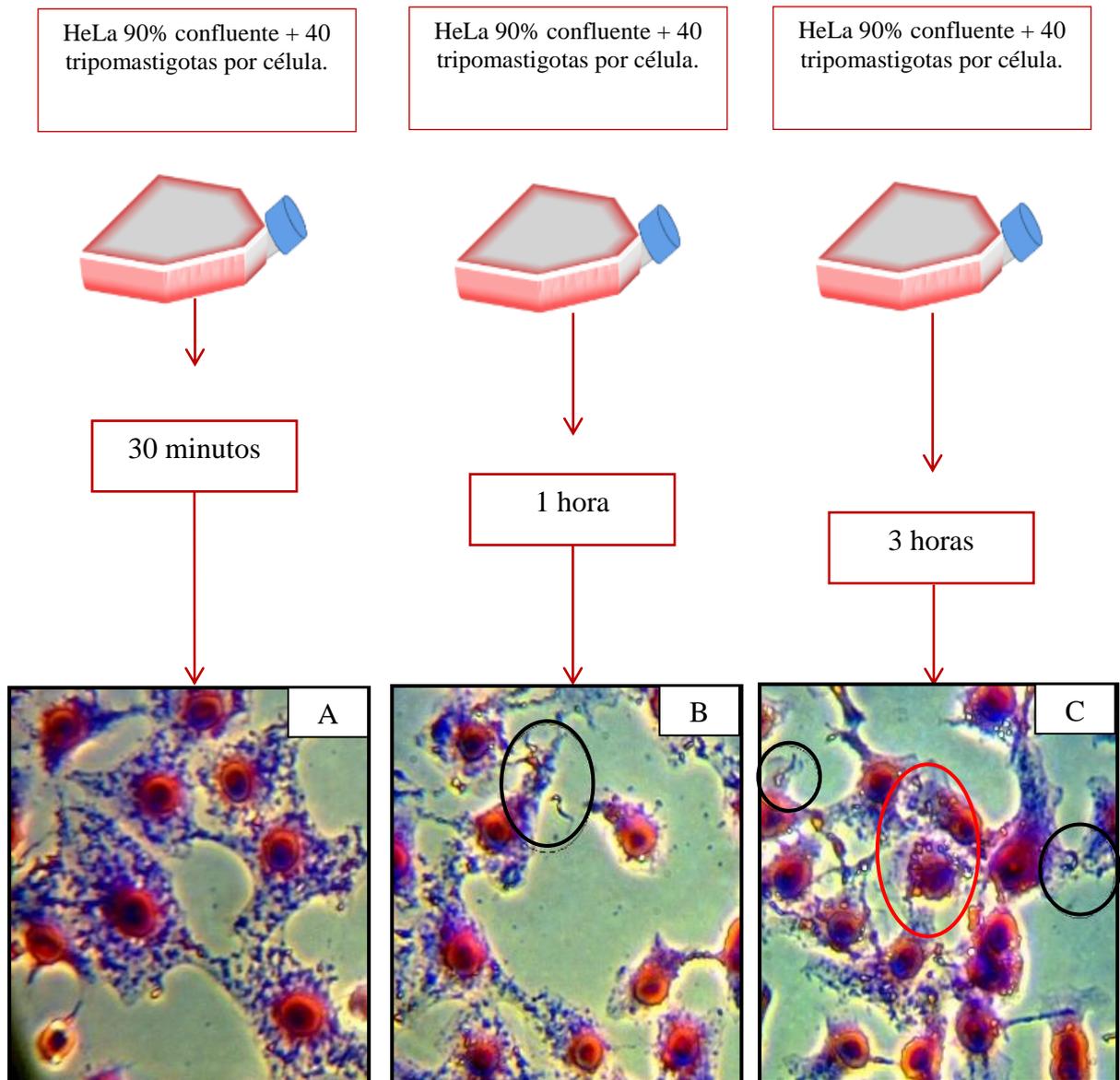


Figura 8 Determinação do tempo de interação. Foi feito três padrões diferentes, no primeiro as células HeLa permaneceram 30 min em contato com formas tripomastigotas na proporção de 40 parasitos por célula, no segundo o tempo de interação foi de 1 h, e outro com 3 h. Em cada um dos experimentos foi feita coloração com o conjunto de corantes panópticos para coloração diferencial rápida em hematologia (Instant Prov, Newprov Produtos para Laboratório LTDA, Brasil).

Perfil eletroforético dos extratos proteicos

Para a avaliação da qualidade das amostras, foi produzido um gel SDS-PAGE (Figura 9) com extrato de proteínas das células HeLa controle e células HeLa após 1h de interação com formas tripomastigotas. Constatou-se que os métodos utilizados para a obtenção do extrato proteico não degradaram as proteínas e, como esperado, o perfil geral das amostras se assemelham.

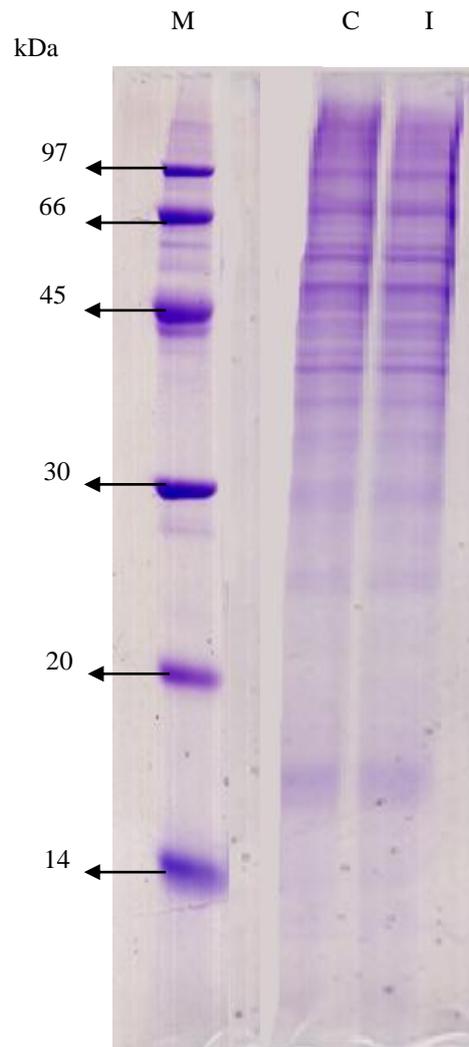


Figura 9 Perfil eletroforético de extrato total das duas condições SDS-PAGE 12% corado com coomassie R-350: (M) Marcador, (C) Controle: referente às células HeLa que não entraram em contato com parasitos, e (I) Interação: relacionada às células HeLa após 1 h de interação com os parasitos SDS-PAGE 12% corado com coomassie R-350.

Análise bioinformática dos dados gerados pela espectrometria

Os dados gerados pelo *Proteome Discoverer* (Thermo Scientific), foram analisados no ambiente e linguagem de programa R (R Development Core Team, 2015). Foi calculada a média das abundâncias das proteínas encontradas para as replicatas técnicas por, replicata biológica. Com a aquisição das quatro médias, as proteínas encontradas em pelo menos três das quatro replicatas biológicas foram analisadas estatisticamente pelo pacote *limma* (Ritchie et al., 2015). Foram consideradas diferencialmente expressas as proteínas que apresentaram p-valor corrigido pelo método *False Discovery Rate* (FDR) menor ou igual a 0,05. No total foram encontradas 388 proteínas com abundância diferenciada.

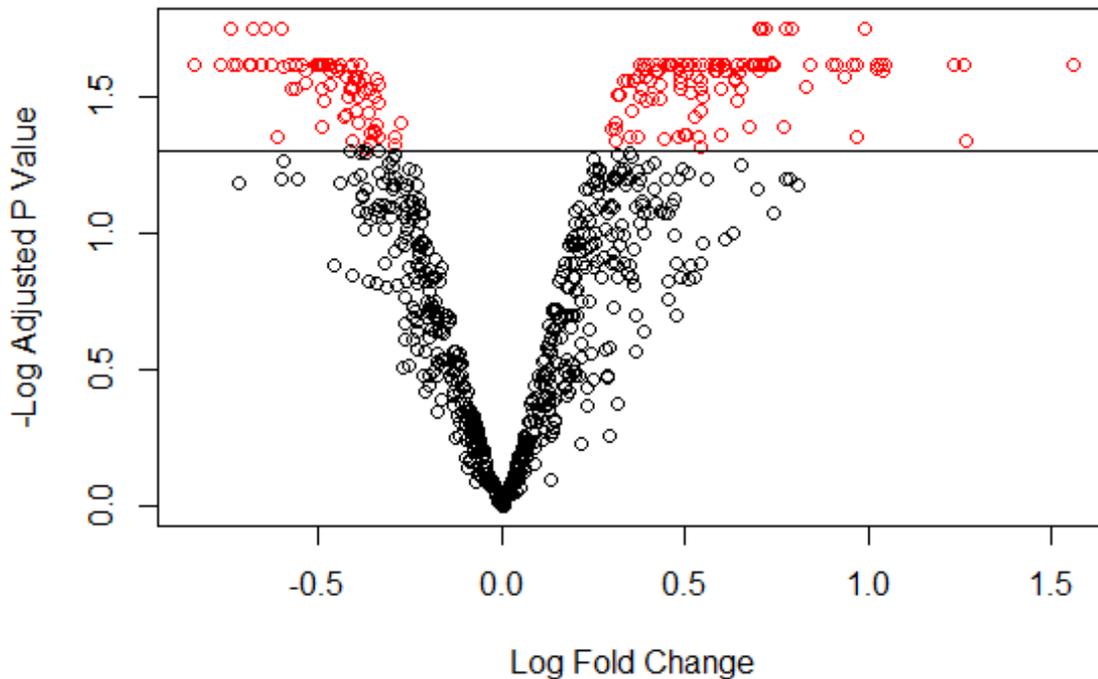


Figura 10 *Vocano plot* da análise estatística da expressão diferencial das proteínas. Os pontos em vermelho e acima da linha representam as proteínas que apresentaram p valor ajustado menor ou igual a 0,05. Os pontos mais distantes do zero no eixo x representam as proteínas com maior expressão diferencial.

Agrupamento de proteínas com abundância diferenciada

Proteínas validadas estatisticamente com abundância diferenciada entre as duas condições, controle e interação (expostas nas tabelas do material suplementar) foram enviadas ao programa *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships* (Panther). Esse programa agrupa as proteínas em termos *Gene Ontology* de acordo com: família e subfamília, função molecular, processo biológico e vias.

Para a interpretação dos dados, optamos por agrupamento de proteínas de acordo com sua função molecular e pelo processo biológico que participam.

Proteínas agrupadas por Função Molecular

As proteínas com abundâncias diferenciadas agrupadas em relação à função molecular (figura 11) estão relacionadas a processos de ligação, catálise, enzima regulatória, ligação ao fator de transcrição, receptores celulares, estrutura molecular, regulação na tradução e transportador.

GO Função Molecular

Genes totais: 265.

Total com função definida 294

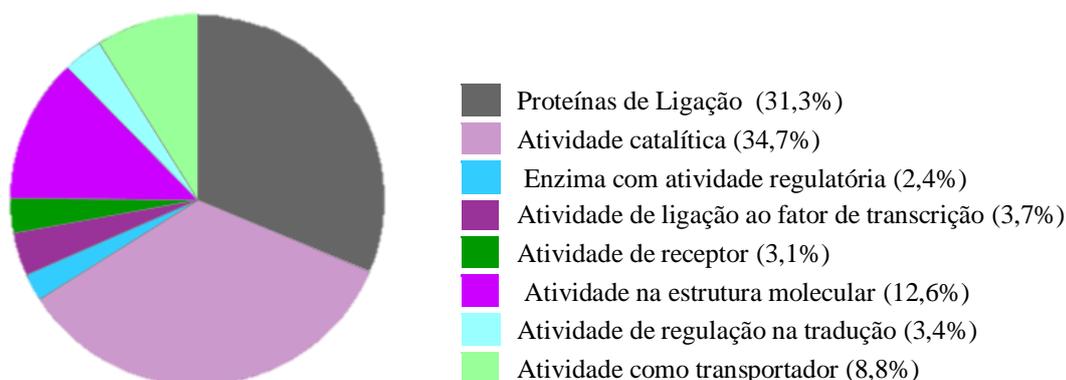


Figura 11 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas de acordo com a Função Molecular. O grupo de proteínas com função relacionada atividade catalítica e de Ligação foram as mais expressivas. Enquanto que as enzimas com atividade regulatórias e proteínas com atividade de receptor foram as menos expressivas.

Dentre esses grupos, o programa ainda permite isolar cada grupo, e então realizar nova classificação. Esse agrupamento em subgrupo é classificado pelo programa como Nível: 1.

1. Proteínas envolvidas no processo de ligação: Essa nova classificação é referente às proteínas anteriormente classificadas como proteínas de ligação mostradas na figura 11. Foram identificadas proteínas envolvidas na ligação ao cálcio (figura 12), entre elas está presente a Calreticulina, uma chaperona que, entre outras funções promove a dobragem, a montagem oligomérica e controle de qualidade na ligação ao cálcio no retículo endoplasmático, através do ciclo de calreticulina/calnexina (“UniProtKB”, [s.d.]). Ainda nesse subgrupo, também foi encontrada a Proteína S100-A6, que parece funcionar como sensor e modulador de cálcio, contribuindo para a sinalização celular de cálcio; pode, ainda, desempenhar um papel em muitos processos fisiológicos, tais como a reorganização do

GO Função Molecular

Nível 1: Ligação (GO 0005488)

Genes totais: 92. Total com função definida 99

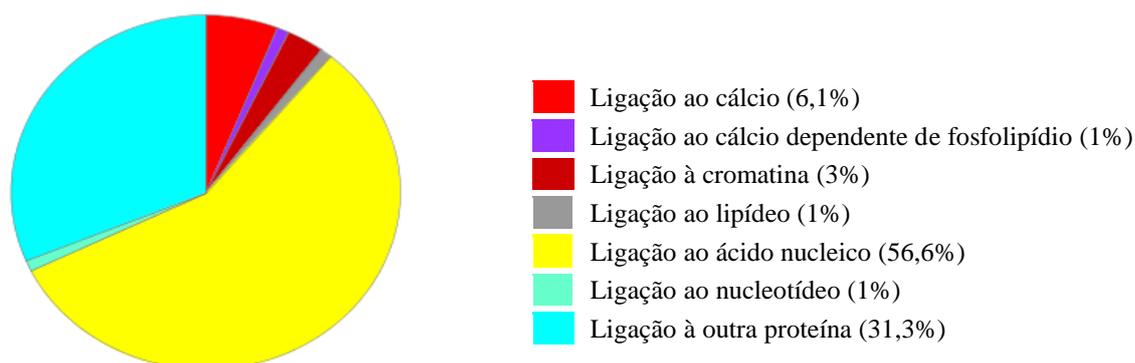


Figura 12 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionada a função de ligação. O grupo de proteínas de ligação ao ácido nucleico e com ligação a outra proteína foram mais expressivas. Enquanto que proteínas de ligação ao cálcio dependente de fosfolipídeo, ligação ao lipídeo e ligação ao nucleotídeo foram as menos expressivas. citoesqueleto de actina (“UniProtKB”, [s.d.]).

Ainda nesse subgrupo, foi isolado outro subgrupo (Nível 2) de proteínas anteriormente classificadas como proteínas de ligação mostradas a figura 12. Nesse grupo é possível observar proteínas com provável ligação a calmodulina, ao citoesqueleto e a receptores. Dentre o grupo de proteínas de ligação ao citoesqueleto, foi identificada a Twinfilina-2, uma proteína de ligação à actina que inibe sua polimerização, provavelmente sequestrando G-actina. Também parece desempenhar um papel importante na endocitose e distribuição de organelas de endocitose mediada por clatrina (“UniProtKB”, [s.d.]).

Nível 1: Ligação (GO 0005488)

Nível 2: Ligação à proteína

Genes totais: 31. Total com função definida 19

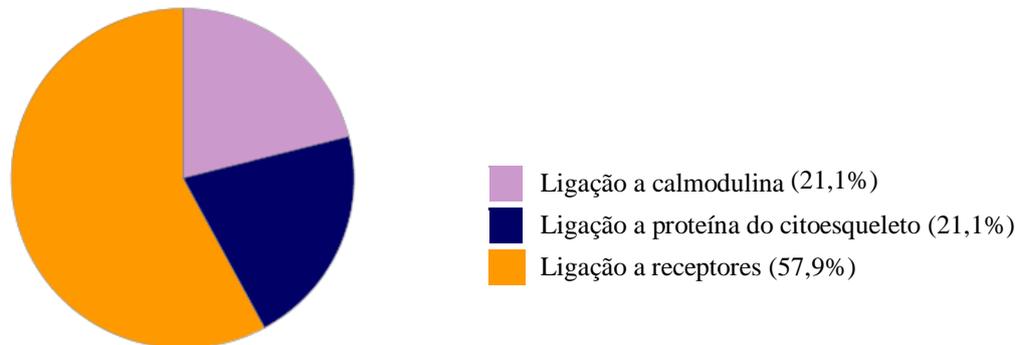


Figura 13 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionada a função de ligação a outras proteínas. O grupo de proteínas de ligação a receptores foi a mais expressiva. Enquanto que proteínas de ligação ao citoesqueleto e a calmodulina foram as menos expressivas.

2. Proteínas com atividade na estrutura molecular: As proteínas com função relacionada à estrutura molecular como mostra a figura 11 também foram reclassificadas (figura 15), e pode-se observar que o início da infecção causou alteração na regulação de proteínas constituintes do citoesqueleto e do ribossomo.

GO Função Molecular

Nível 1: Atividade na estrutura molecular

(GO 00051981)

Genes totais: 37. Total com função definida 34

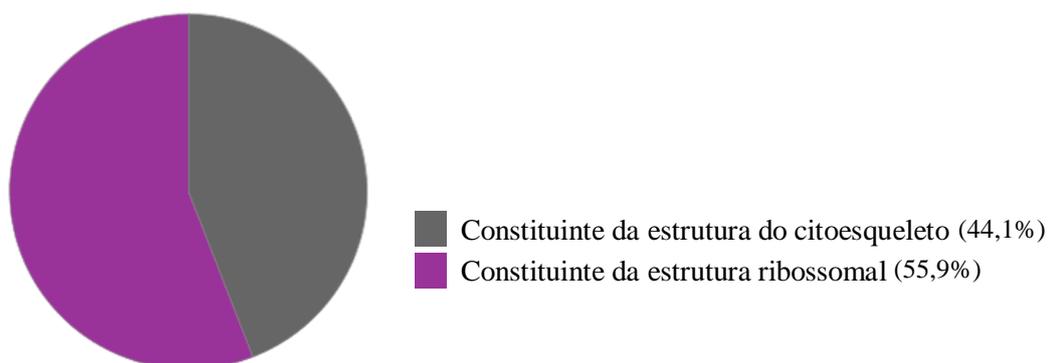


Figura 14 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a estrutura de moléculas celulares. O grupo de proteínas constituinte da estrutura ribossomal foi a mais expressiva. Enquanto que proteínas constituintes da estrutura do citoesqueleto foram menos expressiva

Proteínas agrupadas por Processos Biológicos:

No grupamento referente a processos biológicos (figura 15) nota-se também mudanças na regulação de proteínas envolvidas em processos apoptóticos, adesão, regulação, processos celulares, desenvolvimento de processos, processos envolvidos com sistema imune e processos metabólicos.

A partir desse grupo, foi feita nova classificação de proteínas envolvidas em processos do sistema imune (Nível 1) como é mostrada na figura 16. Dentre elas, foram separadas em subgrupos de proteínas envolvidas na apresentação e processamento de antígeno, resposta imune e ativação de macrófagos.

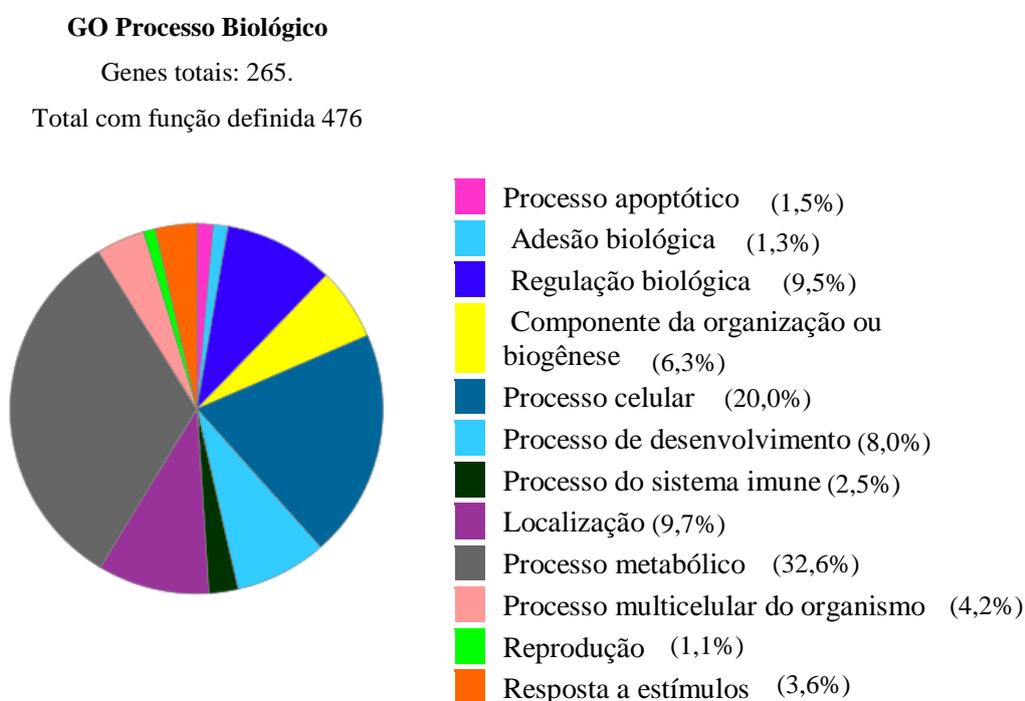


Figura 15 agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a processos biológicos o grupo de proteínas de ligação ao ácido nucleico e com ligação a outra proteína foram mais expressivas. Enquanto que proteínas de ligação ao cálcio dependente de fosfolípídeo, ligação ao lipídeo e ligação ao nucleotídeo foram as menos expressivas.

GO Processo Biológico

Nível 1: Processos do sistema imune (GO 0002376)

Genes totais:12. Total com função definida 4

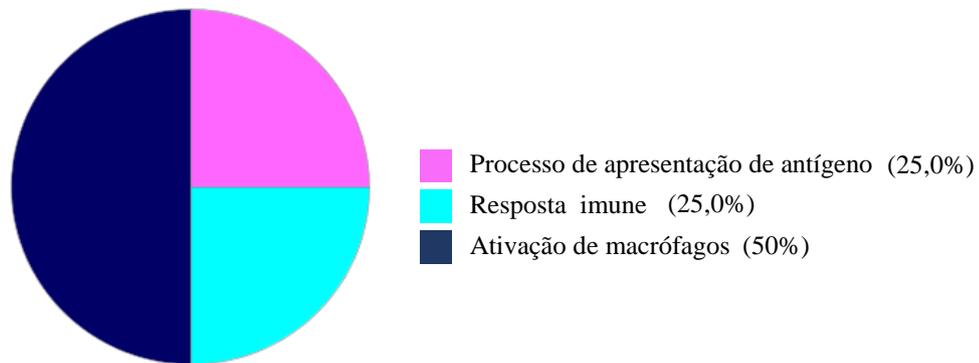


Figura 16 Agrupamento de proteínas diferencialmente expressas relacionadas a processos do sistema imune O grupo de proteínas envolvidas na apresentação de antígeno foi mais expressiva. Enquanto que proteínas envolvidas na resposta imune e ativação de macrófagos foram as menos expressivas.

Os resultados obtidos neste trabalho possibilitou uma visão geral dos processos alterados na célula. Para um maior detalhamento, foram adicionadas ao material suplementar duas tabelas com as proteínas que tiveram abundância diminuída e aumentada nas células HeLa após o contato com o parasito. Essas proteínas foram obtidas pelo UniProtKB.

Discussão

Nesse trabalho foi proposto um estudo de análise da abundância das proteínas da célula hospedeira após um contato inicial com formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Essa investigação foi realizada na tentativa de se entender melhor as possíveis modulações que o parasito realiza na célula hospedeira no início da infecção, fase essencial para a internalização, diferenciação e consequente instalação da doença de Chagas.

Com o agrupamento das proteínas que mostraram alteração em sua abundância nas duas condições, conforme os parâmetros de função molecular e processo biológico observa-se alteração em proteínas de ligação ao cálcio e proteínas envolvidas na ligação ao citoesqueleto. Tais alterações são descritas na literatura como essenciais para a invasão da célula hospedeira, desta forma, este resultado mostra que o tempo de contato e a carga parasitária escolhida foram suficientes para desencadear respostas iniciais do processo de invasão e infecção. Dentre as proteínas com abundância alterada, também foram relatadas proteínas envolvidas no processamento e apresentação de antígenos e, de alguma forma, também envolvidas com o sistema imunológico, mesmo se tratando de célula não fagocítica. Percebe-se que o parasito pode estar sendo reconhecido pela célula, uma vez que já se observa o início dos processos envolvidos no sistema imunológico, ou que o mesmo aciona ou bloqueia alguns desses processos para escape do sistema imune.

Para uma análise mais detalhada, foram retiradas algumas proteínas contidas nas tabelas do material suplementar. Foram observadas algumas com abundância diminuída e abundância aumentada após o contato.

A diminuição de proteínas Antígeno Leucocitário Humano (HLA) chamou a atenção, pois esta proteína faz parte do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC1), molécula responsável pela apresentação de antígenos citoplasmáticos na membrana celular, para reconhecimento por Linfócitos T citotóxicos (TCD8). A apresentação de antígeno se inicia com a degradação de proteínas marcadas (ubiquitinadas) pelo proteassoma, e de forma mais específica pelo imunoproteassoma (pequenas substituições de subunidades catalíticas que modificam sua atividade proteolítica para geração de peptídeos ideais para encaixe no MHC1). Esse processo é essencial para a eliminação de patógenos intracelulares, como é o caso de *T. cruzi* após invasão celular.

Um trabalho anterior demonstrou que o parasito é capaz de modular negativamente, por mecanismos pós-transcricionais, proteínas do MHC de classe I e do próprio proteassoma. Isso seria essencial para escape da detecção de sua presença no interior de células nucleares

pelo sistema imune, o que explicaria, em parte, a grande persistência intracelular desse parasito e duração prolongada da doença de Chagas. (Camargo, 2014)

Esse mesmo padrão foi observado neste estudo (Tabela 3, material suplementar), em que se encontrou uma abundância diminuída dos três alelos do HLA e alguns constituintes do proteassoma.

De forma resumida, o proteassoma pode ser dividido em duas porções: um centro catalítico (20S) e duas partículas reguladoras (19S) em forma de anel nas extremidades. Essa porção reguladora é responsável pela abertura e direcionamento das proteínas para o centro catalítico e o processo de degradação é realizado (Camargo, 2014). Entre as subunidades do proteassoma com diminuição na abundância, foi encontrada a Rpn2, uma subunidade da base da partícula reguladora 19S, que não parece ser pré-requisito da montagem da base (Kaneko et al., 2009). A Rpt5, uma subunidade da partícula reguladora 19S, com papel essencial para uma montagem correta do proteassoma 26S (Lee, De La Mota-Peynado, & Roelofs, 2011). Por fim, a subunidade beta tipo 2 ($\beta 2$), uma subunidade do núcleo 20S, cataliticamente ativa na degradação de proteínas (Camargo, 2014). Estes resultados revelam que 1 h de contato com o parasito foi o suficiente para gerar uma baixa modulação do MHC1 e de algumas subunidades do proteassoma, o que parece ser também independente da presença de formas amastigotas no interior da célula hospedeira.

Quanto às proteínas do proteassoma, foram encontradas algumas com regulação aumentada, são elas: subunidade do tipo alfa 2 ($\alpha 2$), subunidades do tipo beta 5 e 6 ($\beta 5$ e $\beta 6$). A subunidade do tipo $\alpha 2$ é componente dos anéis externos do centro catalítico 20S, que controla a abertura da câmara e se associa a partículas reguladoras, como é o caso da 19S (Camargo, 2014). As subunidades do tipo $\beta 5$ e $\beta 6$ fazem parte do núcleo catalítico, mas não possuem função catalítica. O aumento da abundância dessas proteínas pode ser vantajoso para o parasito ou pode ser apenas uma resposta da célula hospedeira desencadeada pelo processo de interação com o parasito, entretanto esta resposta não afeta o processo de infecção, visto que essas subunidades não possuem função catalítica. O aumento destas subunidades, teoricamente, não afetaria formação do proteassoma, isso porque uma subunidade essencial para essa montagem, e outra essencial para função catalítica, como já discutido, teve abundância diminuída

Outra proteína com aumento na regulação após contato com o parasito, foi a Rpn11, uma das subunidades constituintes da extremidade da partícula reguladora 19S do proteassoma. Esta proteína possui função de desubiquitinação, e sua atividade ocorre em uma

grande variedade de substratos, independente da estrutura primária (Worden, Padovani, & Martin, 2014). Um estudo mostrou que células HeLa com bloqueio gênico para a produção dessa desubiquitinase, resultou na redução da viabilidade celular e um aumento de proteínas poliubiquitinadas (Byrne et al., 2010).

Outra proteína com diminuição na abundância foi a Cullina associada a NEDD8. Essa proteína faz parte de uma superfamília de ubiquitina ligase (E3) e está envolvida no processo de identificação e ubiquitinação de proteínas (Liu, Furukawa, Matsumoto, & Xiong, 2002; Marín, 2009; Pan, Kentsis, Dias, Yamoah, & Wu, 2004).

Essas duas modulações, o aumento de uma desubiquitinase e a diminuição de uma proteína envolvida na ubiquitinação pode ser estratégico para a invasão do parasito, uma vez que afetaria, de forma eficiente, o reconhecimento de proteínas que deveriam estar ubiquitinadas e serem degradadas pelo proteassoma, resultando na diminuição na produção de possíveis antígenos que poderiam ser apresentadas na membrana pelo MHC1. Assim, diminuiria a eficiência no reconhecimento de linfócitos TCD8⁺. Todo esse processo poderia estar sendo utilizado pelo parasito para não ser reconhecido pelo sistema imune e, assim, evitando a sua eliminação.

Vale ressaltar que esse trabalho parece ser o primeiro a identificar essa modulação de cullina em células não fagocíticas pelo *T. cruzi*.

Uma proteína homóloga à DnaJ, membro da subfamília C10, também teve modulação diminuída. Essa proteína parece ter sua localização no retículo endoplasmático, e desempenha um papel essencial na retrotranslocação de proteínas no retículo endoplasmático para ubiquitinação e, conseqüente, direcionamento ao proteassoma e degradação (Dong, Bridges, Apsley, Xu, & Weaver, 2008). Outra proteína com abundância diminuída foi a Rad23, uma provável proteína responsável pela entrega de substratos ubiquitinadas do retículo endoplasmático para o proteassoma (Medicherla, Kostova, Schaefer, & Wolf, 2004).

A diminuição dessas duas proteínas pode afetar o transporte de proteínas ubiquitinadas do interior do retículo endoplasmático para o proteassoma no citoplasma celular. Isso também pode afetar o bom funcionamento do processo de degradação pelo proteassoma.

Ainda sobre esse processo, um estudo recente obteve resultados que corroboram com estes achados. Chou e colaboradores (2010) induziram uma imunização genética com expressão de plasmídeo que codifica uma proteína de superfície da forma amastigota (ASP-2) em um grupo de camundongos. Em outro grupo, eles realizaram o mesmo procedimento, mas foi adicionada uma ligação artificial de uma monoubiquitina ao antígeno. Os camundongos infectados que foram induzidos para produção dessa proteína com a monoubiquitina ativaram

células TCD8⁺ e se mostraram resistentes à infecção por *T. cruzi*. O mesmo padrão não foi observado em camundongos que foram imunizados apenas com o plasmídeo que codifica o antígeno. Os autores chegaram à conclusão de que mesmo que haja a produção do antígeno, se existe uma falha na ubiquitinação a resposta imune é prejudicada, uma vez que, apenas em camundongos que tiveram uma ubiquitinação artificial no antígeno a resposta imune foi eficaz: apresentação do antígeno pelo MHC1 e, conseqüente, degradação.

Neste trabalho, os autores também fizeram uma imunização com a infusão da monoubiquina em camundongos. Naqueles que apresentaram deficiência de subunidades do proteassoma e do imunoproteassoma, houve um bloqueio na imunização. Outra observação importante foi que camundongos imunizados com anti-CD4 continuaram apresentando resistência à Doença de Chagas. Isso mostra que mesmo sem auxílio do linfócito TCD4 em camundongos, foi o suficiente para erradicação da doença.

Até aqui, esses resultados em conjunto reforçam o papel do proteassoma, e mais especificamente, da ubiquitinação para uma resposta imune satisfatória e eficiente combate à Doença de Chagas.

Conclusão

Utilizando nossa metodologia, foi mostrado que o contato de formas tripomastigotas de *T. cruzi* modulou a abundância de proteínas em células HeLa. Observou-se uma diminuição na abundância de proteínas essenciais no processo de ubiquitinação, degradação e apresentação de antígeno na superfície celular. Em contra partida, houve um aumento na abundância de proteínas que retiram ubiquitinas de proteínas marcadas para degradação.

Essa modulação pode dificultar a apresentação de proteínas do parasito pela célula hospedeira, o que afeta a eficiência na resposta imune. Esse fenômeno pode constituir uma explicação viável sobre a capacidade dos parasitos em permanecer durante muitos anos em um hospedeiro vertebrado, uma vez que não é erradicado pelo sistema imunológico.

Corroborando estes resultados, um estudo mostrou que somente camundongos que passaram a expressar antígenos de formas amastigotas com uma monoubiquitina artificial, foram capazes de resistir à infecção. Desta forma, entende-se que o *T. cruzi* altera a eficiência na marcação de proteínas que deveriam ser degradadas, pode-se pensar que a ubiquitinação é um processo crucial para gerar uma resposta imunológica adequada.

Por fim, vale ressaltar que outras proteínas apresentadas no material suplementar, moduladas pelo parasito e não envolvidas nesse processamento de antígeno também podem ser alvos importantes de estudo para entendimento do processo de interação. Assim, a lista de proteínas diferencialmente expressas constitui uma ferramenta importante.

Esse trabalho parece ser o primeiro a demonstrar que durante o processo inicial de interação de formas tripomastigotas com a célula hospedeira não fagocítica provoca modulações importantes em todo o sistema de ubiquitinação, degradação, apresentação de antígeno. Desta forma, novas pesquisas para elucidar detalhadamente os mecanismos moleculares envolvidos na interação parasito-célula hospedeira, tornam-se alvos atraentes que podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias para o controle e prevenção da doença de Chagas.

Bibliografia

- .Andrade, H. M., Murta, S. M. F., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P., & Romanha, A. J. (2008). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Resistance to Benznidazole. *Journal of Proteome Research*, 7(6), 2357–2367. <http://doi.org/10.1021/pr700659m>
- Byrne, A., McLaren, R. P., Mason, P., Chai, L., Dufault, M. R., Huang, Y., ... Carter, K. (2010). Knockdown of human deubiquitinase PSMD14 induces cell cycle arrest and senescence. *Experimental Cell Research*, 316(2), 258–271. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.08.018>
- Camargo, R. (2014). Interação *Trypanosoma cruzi*-hospedeiro: influência da infecção na via de apresentação de antígenos MHC de classe I. Recuperado de <http://repositorio.unb.br/handle/10482/16747>
- Camargo, R., Faria, L. O., Kloss, A., Favali, C. B. F., Kuckelkorn, U., Kloetzel, P.-M., ... Lima, B. D. (2014). *Trypanosoma cruzi* Infection Down-Modulates the Immunoproteasome Biosynthesis and the MHC Class I Cell Surface Expression in HeLa Cells. *PLoS ONE*, 9(4), e95977. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0095977>
- Dong, M., Bridges, J. P., Apsley, K., Xu, Y., & Weaver, T. E. (2008). ERdj4 and ERdj5 Are Required for Endoplasmic Reticulum-associated Protein Degradation of Misfolded Surfactant Protein C. *Molecular Biology of the Cell*, 19(6), 2620–2630. <http://doi.org/10.1091/mbc.E07-07-0674>
- Dr Denis Daumerie, & Dr Lorenzo Savioli (Orgs.). (2010). *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva: WHO.
- Epting, C. L., Coates, B. M., & Engman, D. M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 126(3), 283–291. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.023>

- Erdmann, H., Steeg, C., Koch-Nolte, F., Fleischer, B., & Jacobs, T. (2009). Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). *Cellular Microbiology*, *11*(11), 1600–1611. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01350.x>
- Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., ... Murata, S. (2009). Assembly Pathway of the Mammalian Proteasome Base Subcomplex Is Mediated by Multiple Specific Chaperones. *Cell*, *137*(5), 914–925. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.008>
- Lee, S. Y.-C., De La Mota-Peynado, A., & Roelofs, J. (2011). Loss of Rpt5 Protein Interactions with the Core Particle and Nas2 Protein Causes the Formation of Faulty Proteasomes That Are Inhibited by Ecm29 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(42), 36641–36651. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.280875>
- Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T., & Xiong, Y. (2002). NEDD8 Modification of CUL1 Dissociates p120CAND1, an Inhibitor of CUL1-SKP1 Binding and SCF Ligases. *Molecular Cell*, *10*(6), 1511–1518. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00783-9](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00783-9)
- Maeda, F. Y., Cortez, C., & Yoshida, N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*, *3*. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00361>
- Marín, I. (2009). Diversification of the cullin family. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1), 267. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-9-267>
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., & Wolf, D. H. (2004). A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Reports*, *5*(7), 692–697. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400164>
- Morais, C. G. V., Castro Lima, A. K., Terra, R., dos Santos, R. F., Da-Silva, S. A. G., & Dutra, P. M. L. (2015). The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania*

- spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *BioMed Research International*, 2015, 1–19.
<http://doi.org/10.1155/2015/324915>
- Motta, Flávia Nader. (2012, janeiro). The *Trypanosoma cruzi* Virulence Factor Oligopeptidase B (OPBTc) Assembles into an Active and Stable Dimer, 7.
- Pan, Z.-Q., Kentsis, A., Dias, D. C., Yamoah, K., & Wu, K. (2004). Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*, 23(11), 1985–1997.
<http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207414>
- Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402.
- Rajo, G., Castillo, C., Duaso, J., Liempi, A., Droguett, D., Galanti, N., ... Kemmerling, U. (2014). Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. *Acta Tropica*, 132, 112–118. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.002>
- Snary, D. (1985). The Cell Surface of *Trypanosoma cruzi*. In L. Hudson (Org.), *The Biology of Trypanosomes* (Vol. 117, p. 75–92). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado de http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-70538-0_4
- Tardieux, I., Nathanson, M. H., & Andrews, N. W. (1994a). Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *The Journal of experimental medicine*, 179(3), 1017–1022.
- Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U., & Nussenzweig, V. (1995). The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*, 110(05), 547. <http://doi.org/10.1017/S0031182000065264>
- UniProtKB. ([s.d.]). Recuperado 11 de janeiro de 2015, de <http://www.uniprot.org/>

- Villalta, F., & Kierszenbaum, F. (1983). Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 736(1), 39–44. [http://doi.org/10.1016/0005-2736\(83\)90167-0](http://doi.org/10.1016/0005-2736(83)90167-0)
- Worden, E. J., Padovani, C., & Martin, A. (2014). Structure of the Rpn11–Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(3), 220–227. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2771>

Materiais Suplementares

Tabela 2 Proteínas com abundância diminuídas após o contato

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
P17980	PRS6A_HUMAN N	26S protease regulatory subunit 6A (26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT5) (Proteasome 26S subunit ATPase 3) (Proteasome subunit P50) (Tat-binding protein 1) (TBP-1)	PSMC3 TBP1
Q99460	PSMD1_HUMAN N	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (26S proteasome regulatory subunit RPN2) (26S proteasome regulatory subunit S1) (26S proteasome subunit p112)	PSMD1
Q9ULD0	OGDHL_HUMAN N	2-oxoglutarate dehydrogenase-like, mitochondrial (EC 1.2.4.-) (2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1-like) (OGDC-E1-like) (Alpha-ketoglutarate dehydrogenase-like)	OGDHL KIAA1290
P09110	THIK_HUMAN	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase) (Beta-ketothiolase) (Peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase)	ACAA1 ACAA PTHIO
P46781	RS9_HUMAN	40S ribosomal protein S9	RPS9
P08195	4F2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc) (4F2 heavy chain antigen) (Lymphocyte activation antigen 4F2 large subunit) (Solute carrier family 3 member 2) (CD antigen CD98)	SLC3A2 MDU1
P61254	RL26_HUMAN	60S ribosomal protein L26	RPL26
Q9UNX3	RL26L_HUMAN	60S ribosomal protein L26-like 1	RPL26L1 RPL26P1
Q02878	RL6_HUMAN	60S ribosomal protein L6 (Neoplasm-related protein C140) (Tax-responsive enhancer element-binding protein 107) (TaxREB107)	RPL6 TXREB1
P61158	ARP3_HUMAN	Actin-related protein 3 (Actin-like protein 3)	ACTR3 ARP3
O43707	ACTN4_HUMAN N	Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4)	ACTN4
Q92499	DDX1_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase DDX1 (EC 3.6.4.13) (DEAD box protein 1) (DEAD box protein retinoblastoma) (DBP-RB)	DDX1
P13929	ENO3_HUMAN	Beta-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Enolase 3) (Muscle-specific enolase) (MSE) (Skeletal muscle enolase)	ENO3
P35222	CTNB1_HUMAN N	Catenin beta-1 (Beta-catenin)	CTNNB1 CTNNB

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
			OK/SW-cl.35 PRO2286
Q9UKF6	CPSF3_HUMAN	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3 (EC 3.1.27.-) (Cleavage and polyadenylation specificity factor 73 kDa subunit) (CPSF 73 kDa subunit) (mRNA 3'-end-processing endonuclease CPSF-73)	CPSF3 CPSF73
Q86VP6	CAND1_HUMAN	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (Cullin-associated and neddylation-dissociated protein 1) (TBP-interacting protein of 120 kDa A) (TBP-interacting protein 120A) (p120 CAND1)	CAND1 KIAA0829 TIP120 TIP120A
Q8IXB1	DJC10_HUMAN	DnaJ homolog subfamily C member 10 (EC 1.8.4.-) (Endoplasmic reticulum DNA J domain-containing protein 5) (ER-resident protein ERdj5) (ERdj5) (Macrothioredoxin) (MTHr)	DNAJC10 ERDJ5 UNQ495/PRO1012
O95834	EMAL2_HUMAN	Echinoderm microtubule-associated protein-like 2 (EMAP-2) (HuEMAP-2)	EML2 EMAP2 EMAPL2
Q9BSJ8	ESYT1_HUMAN	Extended synaptotagmin-1 (E-Syt1) (Membrane-bound C2 domain-containing protein)	ESYT1 FAM62A KIAA0747 MBC2
O75369	FLNB_HUMAN	Filamin-B (FLN-B) (ABP-278) (ABP-280 homolog) (Actin-binding-like protein) (Beta-filamin) (Filamin homolog 1) (Fh1) (Filamin-3) (Thyroid autoantigen) (Truncated actin-binding protein) (Truncated ABP)	FLNB FLN1L FLN3 TABP TAP
P09104	ENOG_HUMAN	Gamma-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Enolase 2) (Neural enolase) (Neuron-specific enolase) (NSE)	ENO2
O60763	USO1_HUMAN	General vesicular transport factor p115 (Protein USO1 homolog) (Transcytosis-associated protein) (TAP) (Vesicle-docking protein)	USO1 VDP
Q9H8Y8	GORS2_HUMAN	Golgi reassembly-stacking protein 2 (GRS2) (Golgi phosphoprotein 6) (GOLPH6) (Golgi reassembly-stacking protein of 55 kDa) (GRASP55) (p59)	GORASP2 GOLPH6

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
<i>Q9UIJ7</i>	KAD3_HUMAN	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial (EC 2.7.4.10) (Adenylate kinase 3) (AK 3) (Adenylate kinase 3 alpha-like 1)	AK3 AK3L1 AK6 AKL3L
<i>P08754</i>	GNAI3_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha (G(i) alpha-3)	GNAI3
<i>P17066</i>	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6 (Heat shock 70 kDa protein B')	HSPA6 HSP70B'
<i>P31942</i>	HNRH3_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (hnRNP H3) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 2H9) (hnRNP 2H9)	HNRNP3 HNRPH3
<i>Q9BUJ2</i>	HNRL1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 (Adenovirus early region 1B-associated protein 5) (E1B-55 kDa-associated protein 5) (E1B-AP5)	HNRNPUL1 E1BAP5 HNRPUL1
<i>Q1KMD3</i>	HNRL2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 (Scaffold-attachment factor A2) (SAF-A2)	HNRNPUL2 HNRPUL2
<i>P30443</i>	1A01_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain (MHC class I antigen A*1)	HLA-A HLAA
<i>P13746</i>	1A11_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-11 alpha chain (MHC class I antigen A*11)	HLA-A HLAA
<i>P01892</i>	1A02_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain (MHC class I antigen A*2)	HLA-A HLAA
<i>P30447</i>	1A23_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-23 alpha chain (HLA class I histocompatibility antigen, A-9 alpha chain) (MHC class I antigen A*23)	HLA-A HLAA
<i>P05534</i>	1A24_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain (Aw-24) (HLA class I histocompatibility antigen, A-9 alpha chain) (MHC class I antigen A*24)	HLA-A HLAA
<i>P18462</i>	1A25_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-25 alpha chain (HLA class I histocompatibility antigen, A-10 alpha chain) (MHC class I antigen A*25)	HLA-A HLAA
<i>P30450</i>	1A26_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-26 alpha chain (MHC class I antigen A*26)	HLA-A HLAA
<i>P30512</i>	1A29_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-29 alpha chain (Aw-19) (MHC class I antigen A*29)	HLA-A HLAA
<i>P04439</i>	1A03_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain (MHC class I antigen A*3)	HLA-A HLAA
<i>P16188</i>	1A30_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-30 alpha chain (MHC class I antigen A*30)	HLA-A HLAA
<i>P16189</i>	1A31_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-31 alpha chain (MHC class I antigen A*31)	HLA-A HLAA
<i>P10314</i>	1A32_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-32 alpha chain (MHC class I antigen A*32)	HLA-A HLAA

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
P16190	1A33_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-33 alpha chain (Aw-19) (Aw-33) (MHC class I antigen A*33)	HLA-A HLAA
P30453	1A34_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-34 alpha chain (Aw-34) (HLA class I histocompatibility antigen, A-10 alpha chain) (MHC class I antigen A*34)	HLA-A HLAA
P30455	1A36_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-36 alpha chain (Aw-36) (MHC class I antigen A*36)	HLA-A HLAA
P30456	1A43_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-43 alpha chain (Aw-43) (MHC class I antigen A*43)	HLA-A HLAA
P30457	1A66_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-66 alpha chain (Aw-66) (HLA class I histocompatibility antigen, A-10 alpha chain) (MHC class I antigen A*66)	HLA-A HLAA
P01891	1A68_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain (Aw-68) (HLA class I histocompatibility antigen, A-28 alpha chain) (MHC class I antigen A*68)	HLA-A HLAA
P10316	1A69_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-69 alpha chain (Aw-69) (HLA class I histocompatibility antigen, A-28 alpha chain) (MHC class I antigen A*69)	HLA-A HLAA
P30459	1A74_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, A-74 alpha chain (Aw-19) (Aw-74) (MHC class I antigen A*74)	HLA-A HLAA
P30464	1B15_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-15 alpha chain (MHC class I antigen B*15)	HLA-B HLAB
P30685	1B35_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-35 alpha chain (MHC class I antigen B*35)	HLA-B HLAB
P30484	1B46_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-46 alpha chain (Bw-46) (MHC class I antigen B*46)	HLA-B HLAB
P18464	1B51_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-51 alpha chain (MHC class I antigen B*51)	HLA-B HLAB
P30490	1B52_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-52 alpha chain (Bw-52) (HLA class I histocompatibility antigen, B-5 alpha chain) (MHC class I antigen B*52)	HLA-B HLAB
P30491	1B53_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-53 alpha chain (Bw-53) (MHC class I antigen B*53)	HLA-B HLAB
P30492	1B54_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-54 alpha chain (Bw-22) (Bw-54) (MHC class I antigen B*54)	HLA-B HLAB
P30493	1B55_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-55 alpha chain (Bw-55) (HLA class I histocompatibility antigen, B-12 alpha chain) (MHC class I antigen B*55)	HLA-B HLAB CDABP0067
P30495	1B56_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-56 alpha chain (Bw-22) (Bw-56) (MHC class I antigen B*56)	HLA-B HLAB
P18465	1B57_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-57 alpha chain (Bw-57) (MHC class I antigen B*57)	HLA-B HLAB
P10319	1B58_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-58 alpha chain (Bw-58) (MHC class I antigen B*58)	HLA-B HLAB
Q2994 0	1B59_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-59 alpha chain (MHC class I antigen B*59)	HLA-B HLAB
P30498	1B78_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, B-78 alpha chain (MHC class I antigen B*78)	HLA-B HLAB

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
P30508	1C12_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain (MHC class I antigen Cw*12)	HLA-C HLAC
P30510	1C14_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-14 alpha chain (MHC class I antigen Cw*14)	HLA-C HLAC
Q29960	1C16_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-16 alpha chain (MHC class I antigen Cw*16)	HLA-C HLAC
Q95604	1C17_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-17 alpha chain (MHC class I antigen Cw*17)	HLA-C D6S204 HLA- JY3 HLAC
P30504	1C04_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-4 alpha chain (MHC class I antigen Cw*4)	HLA-C HLAC
P35914	HMGCL_HUMAN	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial (HL) (HMG-CoA lyase) (EC 4.1.3.4) (3-hydroxy-3-methylglutarate-CoA lyase)	HMGCL
P06756	ITAV_HUMAN	Integrin alpha-V (Vitronectin receptor subunit alpha) (CD antigen CD51) [Cleaved into: Integrin alpha-V heavy chain; Integrin alpha-V light chain]	ITGAV MSK8 VNRA
Q8N1G4	LRC47_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRRC47 KIAA1185
Q9P2J5	SYLC_HUMAN	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic (EC 6.1.1.4) (Leucyl-tRNA synthetase) (LeuRS)	LARS KIAA1352
P36776	LONM_HUMAN	Lon protease homolog, mitochondrial (EC 3.4.21.-) (LONHs) (Lon protease-like protein) (LONP) (Mitochondrial ATP-dependent protease Lon) (Serine protease 15)	LONP1 PRSS15
Q9UPN3	MACF1_HUMAN	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5 (620 kDa actin-binding protein) (ABP620) (Actin cross-linking family protein 7) (Macrophin-1) (Trabeculin-alpha)	MACF1 ABP620 ACF7 KIAA0465 KIAA1251
Q6UB35	C1TM_HUMAN	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial (EC 6.3.4.3) (Formyltetrahydrofolate synthetase)	MTHFD1L FTHFSDC1
P08183	MDR1_HUMAN	Multidrug resistance protein 1 (EC 3.6.3.44) (ATP-binding cassette sub-family B member 1) (P-glycoprotein 1) (CD antigen CD243)	ABCB1 MDR1 PGY1
Q9BYT	NEUL_HUMAN	Neurolysin, mitochondrial (EC 3.4.24.16) (Angiotensin-binding protein) (Microsomal endopeptidase)	NLN AGTBP

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
8		(MEP) (Mitochondrial oligopeptidase M) (Neurotensin endopeptidase)	KIAA1226
Q6XQN6	PNCB_HUMAN	Nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRTase) (EC 6.3.4.21) (FHA-HIT-interacting protein) (Nicotinate phosphoribosyltransferase domain-containing protein 1)	NAPRT FHIP NAPRT1
O00567	NOP56_HUMAN	Nucleolar protein 56 (Nucleolar protein 5A)	NOP56 NOL5A
P51659	DHB4_HUMAN	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (MFE-2) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4) (17-beta-HSD 4) (D-bifunctional protein) (DBP) (Multifunctional protein 2) (MPF-2) (Short chain dehydrogenase/reductase family 8C member 1) [Cleaved into: (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (EC 1.1.1.n12); Enoyl-CoA hydratase 2 (EC 4.2.1.107) (EC 4.2.1.119) (3-alpha,7-alpha,12-alpha-trihydroxy-5-beta-cholest-24-enoyl-CoA hydratase)]	HSD17B4 EDH17B4 SDR8C1
P36871	PGM1_HUMAN	Phosphoglucomutase-1 (PGM 1) (EC 5.4.2.2) (Glucose phosphomutase 1)	PGM1
P68402	PA1B2_HUMAN	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta (EC 3.1.1.47) (PAF acetylhydrolase 30 kDa subunit) (PAF-AH 30 kDa subunit) (PAF-AH subunit beta) (PAFAH subunit beta)	PAFAH1B2 PAFAHB
Q9UHX1	PUF60_HUMAN	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (60 kDa poly(U)-binding-splicing factor) (FUSE-binding protein-interacting repressor) (FBP-interacting repressor) (Ro-binding protein 1) (RoBP1) (Siah-binding protein 1) (Siah-BP1)	PUF60 FIR ROBPI SIAHBP1
Q8NBJ5	GT251_HUMAN	Procollagen galactosyltransferase 1 (EC 2.4.1.50) (Collagen beta(1-O)galactosyltransferase 1) (Glycosyltransferase 25 family member 1) (Hydroxylysine galactosyltransferase 1)	COLGALT1 GLT25D1 PSEC0241
P49721	PSB2_HUMAN	Proteasome subunit beta type-2 (EC 3.4.25.1) (Macropain subunit C7-l) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C7-l) (Proteasome component C7-l)	PSMB2
Q9Y570	PPME1_HUMAN	Protein phosphatase methylesterase 1 (PME-1) (EC 3.1.1.89)	PPME1 PME1 PP2593 PRO0750
P06703	S10A6_HUMAN	Protein S100-A6 (Calcyclin) (Growth factor-inducible protein 2A9) (MLN 4) (Prolactin receptor-associated protein) (PRA) (S100 calcium-binding protein A6)	S100A6 CACY
P21980	TGM2_HUMAN	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 (EC 2.3.2.13) (Tissue transglutaminase) (Transglutaminase C) (TG(C)) (TGC) (TGase C) (Transglutaminase H) (TGase H) (Transglutaminase-2)	TGM2

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
		(TGase-2)	
Q96C36	P5CR2_HUMAN	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2 (P5C reductase 2) (P5CR 2) (EC 1.5.1.2)	PYCR2
Q9NQG5	RPR1B_HUMAN	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B (Cell cycle-related and expression-elevated protein in tumor)	RPRD1B C20orf77 CREPT
P60891	PRPS1_HUMAN	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 (EC 2.7.6.1) (PPRibP) (Phosphoribosyl pyrophosphate synthase I) (PRS-I)	PRPS1
P11908	PRPS2_HUMAN	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2 (EC 2.7.6.1) (PPRibP) (Phosphoribosyl pyrophosphate synthase II) (PRS-II)	PRPS2
P21108	PRPS3_HUMAN	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3 (EC 2.7.6.1) (Phosphoribosyl pyrophosphate synthase 1-like 1) (PRPS1-like 1) (Phosphoribosyl pyrophosphate synthase III) (PRS-III)	PRPS1L1 PRPS3 PRPSL
Q14137	BOP1_HUMAN	Ribosome biogenesis protein BOP1 (Block of proliferation 1 protein)	BOP1 KIAA0124
Q16181	SEPT7_HUMAN	Septin-7 (CDC10 protein homolog)	SEPT7 CDC10
P83111	LACTB_HUMAN	Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitochondrial (EC 3.4.-.-)	LACTB MRPL56 UNQ843/PRO1781
P30154	2AAB_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (PP2A subunit A isoform PR65-beta) (PP2A subunit A isoform R1-beta)	PPP2R1B
P67775	PP2AA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform (PP2A-alpha) (EC 3.1.3.16) (Replication protein C) (RP-C)	PPP2CA
Q29RF7	PDS5A_HUMAN	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A (Cell proliferation-inducing gene 54 protein) (Sister chromatid cohesion protein 112) (SCC-112)	PDS5A KIAA0648 PDS5 PIG54
Q9UNH7	SNX6_HUMAN	Sorting nexin-6 (TRAF4-associated factor 2) [Cleaved into: Sorting nexin-6, N-terminally processed]	SNX6

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
P19623	SPEE_HUMAN	Spermidine synthase (SPDSY) (EC 2.5.1.16) (Putrescine aminopropyltransferase)	SRM SPS1 SRML1
Q13838	DX39B_HUMAN	Spliceosome RNA helicase DDX39B (EC 3.6.4.13) (56 kDa U2AF65-associated protein) (ATP-dependent RNA helicase p47) (DEAD box protein UAP56) (HLA-B-associated transcript 1 protein)	DDX39B BAT1 UAP56
Q15393	SF3B3_HUMAN	Splicing factor 3B subunit 3 (Pre-mRNA-splicing factor SF3b 130 kDa subunit) (SF3b130) (STAF130) (Spliceosome-associated protein 130) (SAP 130)	SF3B3 KIAA0017 SAP130
P38646	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) (Mortalin) (MOT) (Peptide-binding protein 74) (PBP74)	HSPA9 GRP75 HSPA9B mt- HSP70
P04179	SODM_HUMAN	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial (EC 1.15.1.1)	SOD2
Q8NBS9	TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5 (Endoplasmic reticulum resident protein 46) (ER protein 46) (ERp46) (Thioredoxin-like protein p46)	TXND5 TLP46 UNQ364/PRO700
Q86W42	THOC6_HUMAN	THO complex subunit 6 homolog (Functional spliceosome-associated protein 35) (fSAP35) (WD repeat-containing protein 58)	THOC6 WDR58 PSEC0006
P62995	TRA2B_HUMAN	Transformer-2 protein homolog beta (TRA-2 beta) (TRA2-beta) (hTRA2-beta) (Splicing factor, arginine/serine-rich 10) (Transformer-2 protein homolog B)	TRA2B SFRS10
P23381	SYWC_HUMAN	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic (EC 6.1.1.2) (Interferon-induced protein 53) (IFP53) (Tryptophanyl-tRNA synthetase) (TrpRS) (hWRS) [Cleaved into: T1-TrpRS; T2-TrpRS]	WARS IFI53 WRS
Q6IBS0	TWF2_HUMAN	Twinfilin-2 (A6-related protein) (hA6RP) (Protein tyrosine kinase 9-like) (Twinfilin-1-like protein)	TWF2 PTK9L MSTP011
P54727	RD23B_HUMAN	UV excision repair protein RAD23 homolog B (HR23B) (hHR23B) (XP-C repair-complementing complex 58 kDa protein) (p58)	RAD23B

Tabela 3 Proteínas com abundância aumentadas após o contato

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
P6225 8	1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	YWHAE
P2734 8	1433T_HUMAN	14-3-3 protein theta (14-3-3 protein T-cell) (14-3-3 protein tau) (Protein HS1)	YWHAQ
P6310 4	1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1)	YWHAZ
O0048 7	PSDE_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14 (EC 3.4.19.-) (26S proteasome regulatory subunit RPN11) (26S proteasome-associated PAD1 homolog 1)	PSMD14 POH1
Q9971 4	HCD2_HUMAN	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (EC 1.1.1.35) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 10) (17-beta-HSD 10) (EC 1.1.1.51) (3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase) (EC 1.1.1.178) (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II) (Endoplasmic reticulum-associated amyloid beta-peptide-binding protein) (Mitochondrial ribonuclease P protein 2) (Mitochondrial RNase P protein 2) (Short chain dehydrogenase/reductase family 5C member 1) (Short-chain type dehydrogenase/reductase XH98G2) (Type II HADH)	HSD17B10 ERAB HADH2 MRPP2 SCHAD SDR5C1 XH98G2
P6228 0	RS11_HUMAN	40S ribosomal protein S11	RPS11
P2539 8	RS12_HUMAN	40S ribosomal protein S12	RPS12
P6285 1	RS25_HUMAN	40S ribosomal protein S25	RPS25
P6285 4	RS26_HUMAN	40S ribosomal protein S26	RPS26
P2763 5	RL10_HUMAN	60S ribosomal protein L10 (Laminin receptor homolog) (Protein QM) (Tumor suppressor QM)	RPL10 DXS648E QM
Q96L2 1	RL10L_HUMAN	60S ribosomal protein L10-like	RPL10L
Q0702	RL18_HUMAN	60S ribosomal protein L18	RPL18

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
0			
P3526 8	RL22_HUMAN	60S ribosomal protein L22 (EBER-associated protein) (EAP) (Epstein-Barr virus small RNA-associated protein) (Heparin-binding protein HBp15)	RPL22
P6135 3	RL27_HUMAN	60S ribosomal protein L27	RPL27
P6289 9	RL31_HUMAN	60S ribosomal protein L31	RPL31
Q9290 1	RL3L_HUMAN	60S ribosomal protein L3-like	RPL3L
P3296 9	RL9_HUMAN	60S ribosomal protein L9	RPL9 OK/SW-cl.103; RPL9P7; RPL9P8; RPL9P9
P6803 2	ACTC_HUMAN	Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin)	ACTC1 ACTC
P6813 3	ACTS_HUMAN	Actin, alpha skeletal muscle (Alpha-actin-1)	ACTA1 ACTA
P6273 6	ACTA_HUMAN	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2) (Cell growth-inhibiting gene 46 protein)	ACTA2 ACTSA ACTVS GIG46
P6326 7	ACTH_HUMAN	Actin, gamma-enteric smooth muscle (Alpha-actin-3) (Gamma-2-actin) (Smooth muscle gamma-actin)	ACTG2 ACTA3 ACTL3 ACTSG
O1551 1	ARPC5_HUMAN	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 (Arp2/3 complex 16 kDa subunit) (p16-ARC)	ARPC5 ARC16
C9JRZ 8	AK1BF_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member B15 (EC 1.1.1.-) (Estradiol 17-beta-dehydrogenase AKR1B15) (EC 1.1.1.62)	AKR1B15
P5289 5	AK1C2_HUMAN	Aldo-keto reductase family 1 member C2 (EC 1.-.-) (3-alpha-HSD3) (Chlordecone reductase homolog HAKRD) (Dihydrodiol dehydrogenase 2) (DD-2) (DD2) (Dihydrodiol dehydrogenase/bile acid-binding	AKR1C2 DDH2

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
		protein) (DD/BABP) (Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase) (EC 1.3.1.20) (Type III 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase) (EC 1.1.1.357)	
P12814	ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1 (Alpha-actinin cytoskeletal isoform) (F-actin cross-linking protein) (Non-muscle alpha-actinin-1)	ACTN1
P06733	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (C-myc promoter-binding protein) (Enolase 1) (MBP-1) (MPB-1) (Non-neural enolase) (NNE) (Phosphopyruvate hydratase) (Plasminogen-binding protein)	ENO1 ENO1L1 MBPB1 MPB1
P14868	SYDC_HUMAN	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic (EC 6.1.1.12) (Aspartyl-tRNA synthetase) (AspRS) (Cell proliferation-inducing gene 40 protein)	DARS PIG40
P24539	AT5F1_HUMAN	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial (ATP synthase proton-transporting mitochondrial F(0) complex subunit B1) (ATP synthase subunit b) (ATPase subunit b)	ATP5F1
P08237	PFKAM_HUMAN	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type (ATP-PFK) (PFK-M) (EC 2.7.1.11) (6-phosphofructokinase type A) (Phosphofructo-1-kinase isozyme A) (PFK-A) (Phosphohexokinase)	PFKM PFKX
P31939	PUR9_HUMAN	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Cleaved into: Bifunctional purine biosynthesis protein PURH, N-terminally processed] [Includes: Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3) (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase) (AICAR transformylase); IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) (ATIC) (IMP synthase) (Inosinicase)]	ATIC PURH OK/SW-cl.86
P27797	CALR_HUMAN	Calreticulin (CRP55) (Calregulin) (Endoplasmic reticulum resident protein 60) (ERp60) (HACBP) (grp60)	CALR CRTC
P21291	CSRP1_HUMAN	Cysteine and glycine-rich protein 1 (Cysteine-rich protein 1) (CRP) (CRP1) (Epididymis luminal protein 141) (HEL-141)	CSRP1 CSRP CYRP
P49589	SYCC_HUMAN	Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic (EC 6.1.1.16) (Cysteinyl-tRNA synthetase) (CysRS)	CARS
P99999	CYC_HUMAN	Cytochrome c	CYCS CYC
P20674	COX5A_HUMAN	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide Va)	COX5A
Q07065	CKAP4_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 4 (63-kDa cytoskeleton-linking membrane protein) (Climp-63) (p63)	CKAP4

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
Q1419 5	DPYL3_HUMAN	Dihydropyrimidinase-related protein 3 (DRP-3) (Collapsin response mediator protein 4) (CRMP-4) (Unc-33-like phosphoprotein 1) (ULIP-1)	DPYSL3 CRMP4 DRP3 ULIP ULIP1
Q96C1 9	EFHD2_HUMAN	EF-hand domain-containing protein D2 (Swiprosin-1)	EFHD2 SWS1
P2969 2	EF1D_HUMAN	Elongation factor 1-delta (EF-1-delta) (Antigen NY-CO-4)	EEF1D EF1D
P4941 1	EFTU_HUMAN	Elongation factor Tu, mitochondrial (EF-Tu) (P43)	TUFM
P1462 5	ENPL_HUMAN	Endoplasmic (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP-94) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Tumor rejection antigen 1) (gp96 homolog)	HSP90B1 GRP94 TRA1
P6084 2	IF4A1_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-I (eIF-4A-I) (eIF4A-I) (EC 3.6.4.13) (ATP-dependent RNA helicase eIF4A-1)	EIF4A1 DDX2A EIF4A
P0519 8	IF2A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) (eIF-2-alpha) (eIF-2A) (eIF-2alpha)	EIF2S1 EIF2A
P4109 1	IF2G_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma X) (eIF-2-gamma X) (eIF-2gX)	EIF2S3 EIF2G
P2358 8	IF4B_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B)	EIF4B
Q0146 9	FABP5_HUMAN	Fatty acid-binding protein, epidermal (Epidermal-type fatty acid-binding protein) (E-FABP) (Fatty acid-binding protein 5) (Psoriasis-associated fatty acid-binding protein homolog) (PA-FABP)	FABP5
P0407 5	ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Lung cancer antigen NY-LU-1) (Muscle-type aldolase)	ALDOA ALDA
P0938 2	LEG1_HUMAN	Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Galaptin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)	LGALS1
P1793 1	LEG3_HUMAN	Galectin-3 (Gal-3) (35 kDa lectin) (Carbohydrate-binding protein 35) (CBP 35) (Galactose-specific lectin 3) (Galactoside-binding protein) (GALBP) (IgE-binding protein) (L-31) (Laminin-binding protein) (Lectin L-29) (Mac-2 antigen)	LGALS3 MAC2

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
P0674 4	G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) (EC 5.3.1.9) (Autocrine motility factor) (AMF) (Neuroleukin) (NLK) (Phosphoglucose isomerase) (PGI) (Phosphohexose isomerase) (PHI) (Sperm antigen 36) (SA-36)	GPI
P0036 7	DHE3_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GDH 1) (EC 1.4.1.3)	GLUD1 GLUD
P4944 8	DHE4_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial (GDH 2) (EC 1.4.1.3)	GLUD2 GLUDP1
Q9HA V0	GBB4_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 (Transducin beta chain 4)	GNB4
Q32P5 1	RA1L2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2 (hnRNP A1-like 2) (hnRNP core protein A1-like 2)	HNRNPA1L2 HNRNPA1L
P0965 1	ROA1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) (Helix-destabilizing protein) (Single-strand RNA-binding protein) (hnRNP core protein A1) [Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, N-terminally processed]	HNRNPA1 HNRPA1
O6050 6	HNRPQ_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) (Glycine- and tyrosine-rich RNA-binding protein) (GRY-RBP) (NS1-associated protein 1) (Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein)	SYNCRIP HNRPQ NSAP1
P0791 0	HNRPC_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (hnRNP C1/C2)	HNRNPC HNRPC
P0049 2	HPRT_HUMAN	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) (HGPRTase) (EC 2.4.2.8)	HPRT1 HPRT
Q1497 4	IMB1_HUMAN	Importin subunit beta-1 (Importin-90) (Karyopherin subunit beta-1) (Nuclear factor p97) (Pore targeting complex 97 kDa subunit) (PTAC97)	KPNB1 NTF97
O0041 0	IPO5_HUMAN	Importin-5 (Imp5) (Importin subunit beta-3) (Karyopherin beta-3) (Ran-binding protein 5) (RanBP5)	IPO5 KPNB3 RANBP5
P4216 6	LAP2A_HUMAN	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha (Thymopoietin isoform alpha) (TP alpha) (Thymopoietin-related peptide isoform alpha) (TPRP isoform alpha) [Cleaved into: Thymopoietin (TP) (Splenin); Thymopentin (TP5)]	TMPO LAP2
P4216 7	LAP2B_HUMAN	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma (Thymopoietin, isoforms beta/gamma) (TP beta/gamma) (Thymopoietin-related peptide isoforms beta/gamma) (TPRP isoforms beta/gamma)	TMPO LAP2

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
		[Cleaved into: Thymopoietin (TP) (Splenin); Thymopentin (TP5)]	
Q14847	LASP1_HUMAN	LIM and SH3 domain protein 1 (LASP-1) (Metastatic lymph node gene 50 protein) (MLN 50)	LASP1 MLN50
Q9BV20	MTNA_HUMAN	Methylthioribose-1-phosphate isomerase (M1Pi) (MTR-1-P isomerase) (EC 5.3.1.23) (Mediator of RhoA-dependent invasion) (S-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase) (Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha/beta/delta-like protein)	MRI1 MRDI UNQ6390/PRO21135
Q16891	MIC60_HUMAN	MICOS complex subunit MIC60 (Cell proliferation-inducing gene 4/52 protein) (Mitochondrial inner membrane protein) (Mitofilin) (p87/89)	IMMT HMP MIC60 MINOS2 PIG4 PIG52
P27816	MAP4_HUMAN	Microtubule-associated protein 4 (MAP-4)	MAP4
Q13765	NACA_HUMAN	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (NAC-alpha) (Alpha-NAC) (allergen Hom s 2)	NACA HSD48
E9PAV3	NACAM_HUMAN	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form (Alpha-NAC, muscle-specific form) (skNAC)	NACA
P15531	NDKA_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase A (NDK A) (NDP kinase A) (EC 2.7.4.6) (Granzyme A-activated DNase) (GAAD) (Metastasis inhibition factor nm23) (NM23-H1) (Tumor metastatic process-associated protein)	NME1 NDPKA NM23
P22392	NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B (NDK B) (NDP kinase B) (EC 2.7.4.6) (C-myc purine-binding transcription factor PUF) (Histidine protein kinase NDKB) (EC 2.7.13.3) (nm23-H2)	NME2 NM23B
P62937	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed]	PPIA CYPA
Q9Y536	PAL4A_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4A (PPIase A-like 4A) (EC 5.2.1.8) (Chromosome one-amplified sequence 2) (COAS-2) (Cyclophilin homolog overexpressed in liver cancer)	PPIAL4A COAS2 PPIAL4B
Q96AY3	FKB10_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10 (PPIase FKBP10) (EC 5.2.1.8) (65 kDa FK506-binding protein) (65 kDa FKBP) (FKBP-65) (FK506-binding protein 10) (FKBP-10) (Immunophilin FKBP65) (Rotamase)	FKBP10 FKBP65 PSEC0056
P6294	FKB1A_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A (PPIase FKBP1A) (EC 5.2.1.8) (12 kDa FK506-binding	FKBP1A

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
2	N	protein) (12 kDa FKBP) (FKBP-12) (Calstabin-1) (FK506-binding protein 1A) (FKBP-1A) (Immunophilin FKBP12) (Rotamase)	FKBP1 FKBP12
P4121 9	PERI_HUMAN	Peripherin (Neurofilament 4)	PRPH NEF4 PRPH1
Q1682 2	PCKGM_HUMAN N	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial (PEPCK-M) (EC 4.1.1.32)	PCK2 PEPCK2
P1194 0	PABP1_HUMAN N	Polyadenylate-binding protein 1 (PABP-1) (Poly(A)-binding protein 1)	PABPC1 PAB1 PABP1 PABPC2
Q1331 0	PABP4_HUMAN N	Polyadenylate-binding protein 4 (PABP-4) (Poly(A)-binding protein 4) (Activated-platelet protein 1) (APP-1) (Inducible poly(A)-binding protein) (iPABP)	PABPC4 APP1 PABP4
Q6N2I 2	PTRF_HUMAN	Polymerase I and transcript release factor (Cavin-1)	PTRF FKSG13
P0CG4 7	UBB_HUMAN	Polyubiquitin-B [Cleaved into: Ubiquitin]	UBB
P0CG4 8	UBC_HUMAN	Polyubiquitin-C [Cleaved into: Ubiquitin]	UBC
O1521 2	PFD6_HUMAN	Prefoldin subunit 6 (Protein Ke2)	PFDN6 HKE2 PFD6
P0773 7	PROF1_HUMAN N	Profilin-1 (Epididymis tissue protein Li 184a) (Profilin I)	PFN1
P1200 4	PCNA_HUMAN	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin)	PCNA
Q9UQ 80	PA2G4_HUMAN N	Proliferation-associated protein 2G4 (Cell cycle protein p38-2G4 homolog) (hG4-1) (ErbB3-binding protein 1)	PA2G4 EBP1
P2578 7	PSA2_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-2 (EC 3.4.25.1) (Macropain subunit C3) (Multicatalytic endopeptidase complex subunit C3) (Proteasome component C3)	PSMA2 HC3 PSC3
P2807 4	PSB5_HUMAN	Proteasome subunit beta type-5 (EC 3.4.25.1) (Macropain epsilon chain) (Multicatalytic endopeptidase complex epsilon chain) (Proteasome chain 6) (Proteasome epsilon chain) (Proteasome subunit MB1)	PSMB5 LMPX MB1 X

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
		(Proteasome subunit X)	
P2807 2	PSB6_HUMAN	Proteasome subunit beta type-6 (EC 3.4.25.1) (Macropain delta chain) (Multicatalytic endopeptidase complex delta chain) (Proteasome delta chain) (Proteasome subunit Y)	PSMB6 LMPY Y
O1474 4	ANM5_HUMAN	Protein arginine N-methyltransferase 5 (EC 2.1.1.-) (72 kDa ICh-binding protein) (Histone-arginine N-methyltransferase PRMT5) (EC 2.1.1.125) (Jak-binding protein 1) (Shk1 kinase-binding protein 1 homolog) (SKB1 homolog) (SKB1Hs) [Cleaved into: Protein arginine N-methyltransferase 5, N-terminally processed]	PRMT5 HRMT1L5 IBP72 JBP1 SKB1
P0723 7	PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55)	P4HB ERBA2L PDI PDIA1 PO4DB
P1366 7	PDIA4_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A4 (EC 5.3.4.1) (Endoplasmic reticulum resident protein 70) (ER protein 70) (ERp70) (Endoplasmic reticulum resident protein 72) (ER protein 72) (ERp-72) (ERp72)	PDIA4 ERP70 ERP72
P0049 1	PNPH_HUMAN	Purine nucleoside phosphorylase (PNP) (EC 2.4.2.1) (Inosine phosphorylase) (Inosine-guanosine phosphorylase)	PNP NP
A6NEC 2	PSAL_HUMAN	Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein (EC 3.4.11.-)	NPEPPSL1
Q5JNZ 5	RS26L_HUMAN	Putative 40S ribosomal protein S26-like 1	RPS26P11 RPS26L1
Q2VIR 3	IF2GL_HUMAN	Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein (Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma A) (eIF-2-gamma A) (eIF-2gA)	EIF2S3L
Q58FF 7	H90B3_HUMAN	Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 (Heat shock protein 90-beta c) (Heat shock protein 90Bc)	HSP90AB3P HSP90BC
O6036 1	NDK8_HUMAN	Putative nucleoside diphosphate kinase (NDK) (NDP kinase) (EC 2.7.4.6)	NME2P1
Q0825 7	QOR_HUMAN	Quinone oxidoreductase (EC 1.6.5.5) (NADPH:quinone reductase) (Zeta-crystallin)	CRYZ
P6300 0	RAC1_HUMAN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Cell migration-inducing gene 5 protein) (Ras-like protein TC25) (p21-Rac1)	RAC1 TC25 MIG5
P1515	RAC2_HUMAN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (GX) (Small G protein) (p21-Rac2)	RAC2

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
3			
P6076 3	RAC3_HUMAN	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (p21-Rac3)	RAC3
P6249 1	RB11A_HUMAN	Ras-related protein Rab-11A (Rab-11) (YL8)	RAB11A RAB11
Q1590 7	RB11B_HUMAN	Ras-related protein Rab-11B (GTP-binding protein YPT3)	RAB11B YPT3
Q86TG 7	PEG10_HUMAN	Retrotransposon-derived protein PEG10 (Embryonal carcinoma differentiation-regulated protein) (Mammalian retrotransposon-derived protein 2) (Myelin expression factor 3-like protein 1) (MEF3-like protein 1) (Paternally expressed gene 10 protein) (Retrotransposon gag domain-containing protein 3) (Retrotransposon-derived gag-like polyprotein) (Ty3/Gypsy-like protein)	PEG10 EDR KIAA1051 MAR2 MART2 MEF3L1 RGAG3
Q0817 0	SRSF4_HUMAN	Serine/arginine-rich splicing factor 4 (Pre-mRNA-splicing factor SRP75) (SRP001LB) (Splicing factor, arginine/serine-rich 4)	SRSF4 SFRS4 SRP75
Q1324 3	SRSF5_HUMAN	Serine/arginine-rich splicing factor 5 (Delayed-early protein HRS) (Pre-mRNA-splicing factor SRP40) (Splicing factor, arginine/serine-rich 5)	SRSF5 HRS SFRS5 SRP40
Q1324 7	SRSF6_HUMAN	Serine/arginine-rich splicing factor 6 (Pre-mRNA-splicing factor SRP55) (Splicing factor, arginine/serine-rich 6)	SRSF6 SFRS6 SRP55
P4932 1	NASP_HUMAN	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP
P5099 3	AT1A2_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 (Na ⁺)/K ⁺ ATPase alpha-2 subunit) (EC 3.6.3.9) (Sodium pump subunit alpha-2)	ATP1A2 KIAA0778
P1363 7	AT1A3_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 (Na ⁺)/K ⁺ ATPase alpha-3 subunit) (EC 3.6.3.9) (Na ⁺)/K ⁺ ATPase alpha(III) subunit) (Sodium pump subunit alpha-3)	ATP1A3
P2324 6	SFPQ_HUMAN	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (100 kDa DNA-pairing protein) (hPOMp100) (DNA-binding p52/p100 complex, 100 kDa subunit) (Polypyrimidine tract-binding protein-associated-splicing factor) (PSF) (PTB-associated-splicing factor)	SFPQ PSF
Q9983	TCPH_HUMAN	T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta) (CCT-eta) (HIV-1 Nef-interacting protein) [Cleaved into: T-	CCT7 CCTH

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
2		complex protein 1 subunit eta, N-terminally processed]	NIP7-1
P4022 7	TCPZ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta) (Acute morphine dependence-related protein 2) (CCT-zeta-1) (HTR3) (Tcp20)	CCT6A CCT6 CCTZ
Q9252 6	TCPW_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta-2 (TCP-1-zeta-2) (CCT-zeta-2) (CCT-zeta-like) (TCP-1-zeta-like) (Testis-specific Tcp20) (Testis-specific protein TSA303)	CCT6B
Q9Y2 W1	TR150_HUMAN	Thyroid hormone receptor-associated protein 3 (Thyroid hormone receptor-associated protein complex 150 kDa component) (Trap150)	THRAP3 TRAP150
P3783 7	TALDO_HUMAN	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	TALDO1 TAL TALDO TALDOR
Q1326 3	TIF1B_HUMAN	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (E3 SUMO-protein ligase TRIM28) (EC 6.3.2.-) (KRAB-associated protein 1) (KAP-1) (KRAB-interacting protein 1) (KRIP-1) (Nuclear corepressor KAP-1) (RING finger protein 96) (Tripartite motif-containing protein 28)	TRIM28 KAP1 RNF96 TIF1B
P3780 2	TAGL2_HUMAN	Transgelin-2 (Epididymis tissue protein Li 7e) (SM22-alpha homolog)	TAGLN2 KIAA0120 CDABP0035
O1478 7	TNPO2_HUMAN	Transportin-2 (Karyopherin beta-2b)	TNPO2
Q9Y31 0	RTCB_HUMAN	tRNA-splicing ligase RtcB homolog (EC 6.5.1.3)	RTCB C22orf28 HSPC117
Q3ZC M7	TBB8_HUMAN	Tubulin beta-8 chain	TUBB8
O4339 9	TPD54_HUMAN	Tumor protein D54 (hD54) (Tumor protein D52-like 2)	TPD52L2
P6231 0	LSM3_HUMAN	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3	LSM3 MDS017
P6297 9	RS27A_HUMAN	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a (Ubiquitin carboxyl extension protein 80) [Cleaved into: Ubiquitin; 40S ribosomal protein S27a]	RPS27A UBA80

<i>Entry</i>	Entry name	Protein names	Gene names
			UBCEP1
P6298 7	RL40_HUMAN	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (CEP52) (Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1) [Cleaved into: Ubiquitin; 60S ribosomal protein L40]	UBA52 UBCEP2
O1529 4	OGT1_HUMAN	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit (EC 2.4.1.255) (O-GlcNAc transferase subunit p110) (O-linked N-acetylglucosamine transferase 110 kDa subunit) (OGT)	OGT

