

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

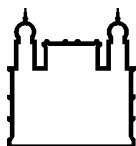
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização de ligantes de heparina em *Trypanosoma cruzi* e
determinação do domínio de heparan sulfato envolvido no processo
de invasão *T. cruzi*-cardiomiócito *in vitro*.**

por

FRANCISCO ODENCIO RODRIGUES DE OLIVEIRA JUNIOR

Rio de Janeiro
Abril de 2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

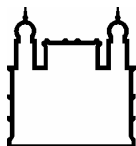
FRANCISCO ODENCIO RODRIGUES DE OLIVEIRA JUNIOR

Caracterização de ligantes de heparina em *Trypanosoma cruzi* e determinação do domínio de heparam sulfato envolvido no processo de invasão *T. cruzi*-cardiomiócito *in vitro*.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Biologia Celular.

Orientadoras: Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira
Dra. Maria de Nazareth SL de Meirelles

RIO DE JANEIRO
2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FRANCISCO ODENCIO RODRIGUES DE OLIVEIRA JUNIOR

Caracterização de ligantes de heparina em *Trypanosoma cruzi* e
determinação do domínio de heparam sulfato envolvido no
processo de invasão *T. cruzi*-cardiomiócito *in vitro*.

Orientadoras: Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira
Dra. Maria de Nazareth SL de Meirelles

Aprovada em: 09/04/2007

EXAMINADORES:

Dr. Jonas Enrique Aguilar Perales - IOC/FIOCRUZ - Presidente
Dra. Marimélia Porcionatto - Departamento de Bioquímica/UNIFESP
Dra. Narcisa Leal da Cunha-e-Silva - IBCC Filho/UFRJ
Dra. Maria Adelaide do Valle Matta - IOC/FIOCRUZ
Dra. Claudia D'avila - IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 09 de Abril de 2007.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Francisco e Irma, a minha noiva Rozana, ao meu filho João Victor e a minha Irmã Isabela, pelo carinho, confiança, ensinamentos morais, pelo apoio nas horas difíceis e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira e Dra. Maria de Nazareth Meirelles, minhas orientadoras, por terem me dado a oportunidade de demonstrar o meu trabalho, por me ensinar a trabalhar com dedicação e responsabilidade, pela paciência, pelos ensinamentos transmitidos que irei levar para o resto da minha vida profissional e pessoal. Minha admiração e respeito serão sempre pequenos diante de tudo que me foi oferecido.

Ao Dr. Carlos Roberto Alves por ser mais do que um colaborador tendo um papel preponderante para a confecção dessa dissertação de mestrado. Posso e devo considerar o Dr. Carlos como meu orientador.

A Dra. Suzana Cortê-Real por ter sempre me apoiado, pelo carinho com que sempre me trata, pelos ensinamentos, e pela paciência e por me dar apoio quando foi preciso.

A Dra. Maria de Nazareth Soeiro, Dra. Helene Santos Barbosa e Dra. Constança Britto pelos ensinamentos.

Aos amigos do DUBC pelos anos de trabalho, de amizade, de risos e companheirismo.

Aos amigos Fabiano, Luzia, Karina, Daniela, Fernanda, Bernardo e Bruno pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Kart Maurício, Erick, Alanderson, Kadu, por estarem sempre me ajudando toda vez que foi necessário e por serem amigos verdadeiros.

Ao Correa pela atenção e por me ajudar com as animações.

Ao Bruno, pelo apoio e paciência.

Aos amigos Ramon, Pedro, Kiko, Xênia, Sabrina, Fernanda, Fabrício, Luiz, pelo incentivo e por fazerem parte da minha família.

Aos amigos Claudson e Ângela, por terem me apoiado sempre aparecendo nas horas mais difíceis, pelas saídas, pelas bebedeiras, pelas brincadeiras e por serem as pessoas maravilhosas que sempre foram.

Aos Meus Avós Laura e Odencio (*in memoriam*), Antonia e Gildo, pelo amor e carinho.

Aos meus tios, Junior, Osmar, Marcelo pelo carinho e apoio.

As minhas tias Mazé, Lucia, Gilda, Silvia, Rosa, Gracinha, pelo carinho e apoio.

Aos meus primos, Alex, Carine, Priscila, Julia e Pedro por estarem sempre por perto quando precisei.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

A pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e ao seu corpo docente, por ter me oferecido os conhecimentos para minha formação.

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), CAPES e PAPES pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Dra. Mirian Claudia de Souza pereira e Dra. Maria de Nazareth SL de Meirelles, no Laboratório de Ultra-estrutura do Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, na Fundação Oswaldo Cruz, com o patrocínio financeiro das seguintes entidades:

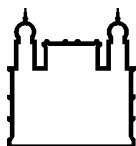
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
- Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde – PAPES IV.
- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ.

Data de ingresso no Programa de mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: Fevereiro de 2005.

ÍNDICE

Ficha catalográfica -----	II
Resumo -----	X
Abstract -----	XI
Lista de abreviaturas -----	XII
Introdução -----	01
1.1 Doença de Chagas -----	02
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	07
1.3 Ciclo evolutivo -----	10
1.4 Tecido cardíaco -----	13
1.5 Interação <i>T. cruzi</i> -célula hospedeira -----	15
1.6 Matriz extracelular -----	18
1.7 Glicosaminoglicanos -----	18
1.8 Proteoglicanos -----	23
1.9 Papel de proteoglicanos sulfatados na invasão de patógenos intracelulares -----	24
Objetivos -----	27
Material e Métodos -----	29
3.1 Cultura primária de células musculares cardíacas -----	30
3.2 Linhagens celulares -----	31
3.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	31
3.3.1 Formas tripomastigotas e amastigotas derivadas de cultivo celular -----	31
3.3.2 Formas epimastigotas -----	32
3.4 Ensaio de competição -----	32
3.5 Ensaio para remoção da sulfatação -----	34
3.6 Coloração pelo Giemsa -----	34
3.7 Análise estatística -----	35
3.8 Marcação radioativa -----	35
3.9 Obtenção de extrato celular -----	35
3.10 Fracionamento subcelular -----	36
3.11 Dosagem de proteínas -----	37
3.12 Cromatografia -----	37
3.12.1 Coluna de heparina-sefarse -----	37
3.12.2 Coluna de DEAE -----	38
3.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) -----	38
3.14 Western blotting -----	39
3.15 Determinação das massas moleculares das proteína -----	40
Resultados -----	41
4.1 Identificação de proteínas de <i>Trypanosoma cruzi</i> com afinidade a glicosaminoglicanos --	42
4.2 Isolamento e caracterização parcial das proteínas do <i>T. cruzi</i> que se ligam a heparina ----	42
4.3 Interação <i>Trypanosoma cruzi</i> -cardiomiócito: Reconhecimento celular -----	44
4.3.1 Avaliação da participação de glicosaminoglicanos sulfatados no processo de invasão -----	44

4.3.2 Mapeamento da região da molécula de heparam sulfato que participa do processo de invasão <i>T. cruzi</i> -Cardiomiócito -----	45
Discussão -----	59
5.1 Caracterização de ligante(s) de heparina do <i>T. cruzi</i> -----	60
5.2. Interação <i>T. cruzi</i> -cardiomiócito -----	64
Conclusões -----	70
Referências -----	73



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

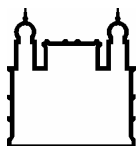
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

A capacidade do *Trypanosoma cruzi* de reconhecer moléculas na superfície de células fagocíticas e não-fagocíticas profissionais é essencial para sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado. O papel de proteoglicanos sulfatados no processo de reconhecimento celular tem sido relatado em muitos patógenos humanos, incluindo o *T. cruzi*. Dados do nosso grupo demonstraram a participação de proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) de cardiomiócitos na invasão por formas tripomastigotas. Entretanto, a estrutura da molécula de PGHS envolvida na interação receptor-ligante e o papel de outros glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados no processo de invasão ainda não foram elucidados.

Para avaliar a participação dos GAGs na invasão do *T. cruzi*, tripomastigotas, clone Dm28c, foram pré-tratados com 20µg/ml de heparina, queratam sulfato (KS) ou três fragmentos distintos de heparam sulfato (HS), os quais foram obtidos por tratamento enzimático (heparitinase I e II) e ácido nitroso. Nos ensaios de competição, os parasitas controles ou pré-tratados com GAGs solúveis foram incubados por 2hs a 37°C com culturas de cardiomiócitos e o percentual de infecção foi determinado após coloração pelo Giemsa. Nossos resultados revelaram uma inibição significativa no índice de infecção de 84,8% e 45% após tratamento dos parasitas com heparina e com o fragmento N-acetilado/N-sulfatado (NA/NS), respectivamente, sugerindo o importante papel do domínio ([IdoUA-GlcNAc]-[GlcUA-GlcNS]₃-[GlcUA-GlcNAc]₄[GlcNAc]), da cadeia de HS no reconhecimento *T. cruzi*-cardiomiócito. Em contraste, o tratamento dos parasitas com KS, fragmento N-acetilado ou N-sulfatado não apresentou efeito no processo de invasão. O papel da sulfatação no processo de reconhecimento e invasão foi avaliado pelo tratamento de culturas de cardiomiócitos por 16hs a 37°C com diferentes concentrações de clorato de sódio e posteriormente, infectados com tripomastigotas (2hs). O declínio da sulfatação resultou na redução (dose dependente) do índice de infecção, alcançando níveis de inibição de 26%, 48,5% e 73,6% após o tratamento de cardiomiócitos com 25 mM, 50 mM e 75 mM de clorato de sódio, respectivamente, sugerindo a participação da carga negativa como moduladora do reconhecimento específico com o domínio NA/NS da cadeia de HS.

Adicionalmente, ensaios bioquímicos foram realizados para caracterizar a proteína de ligação a heparina presente na superfície do *T. cruzi*. Duas bandas majoritárias de 65,8 kDa e 59 kDa foram identificadas no extrato protéico total das 3 formas evolutivas do *T. cruzi* por *Western blotting*, utilizando heparina, condroitim sulfato (CS) e HS conjugados a biotina. O ligante de heparina de *T. cruzi* foi isolado pela associação do método do Triton X-114 e cromatografia de afinidade a heparina-Sepharose. Após marcação metabólica (³⁵S-Metionina), as proteínas hidrofóbicas foram isoladas em coluna de afinidade e separadas por SDS-PAGE, revelando um perfil protéico, similar ao extrato total, com duas bandas majoritárias (65,8 kDa e 59 kDa) eluídas com 0,5 M e 1,0 M de NaCl em tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente. A análise isotópica também revelou uma expressão superior deste ligante (1,3-2 vezes) em tripomastigotas quando comparado com epimastigotas. As proteínas de ligação a heparina (65,8 kDa e 59 kDa) foram detectadas na fração de membrana de epimastigotas obtida pelo método de fracionamento subcelular associado a purificação em coluna de afinidade. A detecção das proteínas eluídas da coluna de afinidade a heparina por *Western blotting* com heparina-, HS- e CS-biotinilados revelou intensa marcação principalmente na proteína de 59 kDa. Além disso, a análise das proteínas por eletroforese não desnaturante revelou a presença de duas bandas nas formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Ensaios bioquímicos complementares serão realizados a fim de obter informações detalhadas sobre a proteína de ligação a heparina de *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

The ability of *Trypanosoma cruzi* to recognize molecules at the surface of both the phagocytic and non-phagocytic cells is essential to its survival in the vertebrate host. The role of the sulfated proteoglycans in the cell recognition process has been reported in several human pathogens, including *T. cruzi*. Data from our group have demonstrated the participation of heparan sulfated proteoglycan (HSPG) of cardiomyocytes in the invasion for forms trypomastigotes. However, the structure of the HSPG molecule involved in the receptor-ligand interaction and the role of other sulfated glycosaminoglycans (GAGs) in the invasion process have not been elucidated yet.

To evaluate the participation of GAGs in *T. cruzi* invasion, trypomastigotes, clone Dm28c, were pre-treated with 20µg/ml of heparin, keratan sulfate (KS) or three distinct fragments of heparan sulfate (HS) obtained by enzymatic (heparitinase I and II) and nitrous acid treatments. For competition assays, the untreated or soluble GAGs pre-treated parasites were incubated for 2h at 37°C with the cardiomyocyte cultures and the percentage of infection was determined after Giemsa staining. Our results revealed a significant inhibition of the infection index of 84.8% and 45% after treatment of the parasites with heparin and the N-acetylated/ N-sulfated fragment, respectively, suggesting the important role of the ([IdoUA-GlcNAc]-[GlcUA-GlcNS]₃-[GlcUA-GlcNAc]₄[GlcNAc]) domain of the HS chain in the *T. cruzi*-cardiomyocyte recognition. In contrast, the treatment of the parasites with KS, N-acetylated or N-sulfated fragments did not display any effect in the invasion process. The role of sulfation in the recognition and invasion process was evaluated by treating the cardiomyocytes cultures for 16h at 37°C with different concentrations of sodium chlorate, followed by trypomastigotes infection (2h). The decline of sulfation resulted in the reduction (dose dependent) of the infection index, achieving inhibition levels of 26%, 48.5% and 73.6% after treatment of cardiomyocyte cultures with 25mM, 50mM and 75mM of sodium chlorate, respectively, suggesting the participation of negative charge as modulator of the specific recognition with the NA/NS domain of HS chain.

Additionally, biochemical assays were performed to characterize the heparin binding protein present at the surface of *T. cruzi*. Two major protein bands of 65.8 kDa and 59 kDa were identified in the total protein extract of all evolutive forms of *T. cruzi* by *Western blotting*, using biotin conjugated-heparin, -chondroitin sulfate (CS) and -HS. The *T. cruzi* heparin ligand was isolated by association of Triton X-114 extraction method and heparin-Sepharose affinity chromatography. After metabolic labeling (³⁵S-Methionine), the hydrophobic proteins were isolated by affinity column and separated by SDS-PAGE, revealing a protein profile, similar to total protein extract, with two major bands (65.8 kDa and 59 kDa) eluted with 0.5M and 1M NaCl in trypomastigotes and epimastigotes, respectively. The isotopic analysis also revealed a higher expression of heparin ligand (1.3-2X) in trypomastigotes when compared to epimastigotes. The heparin binding proteins were detected at membrane fraction of epimastigotes obtained by cell fractionation methodology associated to the affinity column purification. The detection of proteins eluted from heparin affinity column with biotinylated heparin, CS and HS by *Western blotting* revealed intense labeling mainly at the 59 kDa protein. In addition, the analysis of the proteins by denaturant electrophoresis revealed the presence of two protein band in both trypomastigotes and epimastigotes forms of *T. cruzi*. Complementary biochemical assays will be carried out to get more detailed information about the *T. cruzi* heparin binding protein.

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR – polimerase chain reaction
BSA - albumina de soro bovino
CS – condroitim sulfato
CS – queratam sulfato
DMEM - meio Eagle modificado por Dulbecco
DO – densidade óptica
E64 - L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino) butano
ECL – luminol quimioluminescente
FGF – Fator de crescimento de fibroblastos
FN - fibronectina
g - gravidade
GAGs - glicosaminoglicanos
GlcNAc – N-acetil-glicosamina
GlcNAc – N-sulfo-glicosamina
GlcUA – ácido glicurônico
HA – ácido hialurônico
HS – heparam sulfato
PGHS – proteoglicano de heparam sulfato
IdoUA – ácido idurônico
IFN- γ - interferon gama
kDa – quilo Daltons
LN - laminina
NA – N-acetilado
NA/NS – N-acetilado/N-sulfatado
NS – N-sulfatado
PBS – tampão fosfato de sódio
PBS – tampão salina fosfato
PMSF - fluoreto de fenilmetil-l-sulfonil
RGD – seqüência de adesão celular da FN – arginina, glicina e ácido aspártico
SDS-PAGE – *sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
SFB – soro fetal bovino
Sulfo-NHS-LC-biotina - éster de sulfo-N-hidroxi-succinamidobiotina
Tris-HCl – tris (hidroximetil-amino) metano HCl
TS – Trans-sialidase

Tween 20 – laurato de sorbitan etoxilado 20

TX-100 – Triton X-100 (T-octilfenoxipoli-etoxietanol)

TX-114 – Triton X-114 (octilfenoxipoli-etoxietanol)

INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de chagas, cujo agente etiológico é o protozoário *T. cruzi*, foi primeiramente descrita por Carlos Chagas (1909). Esta doença é uma zoonose altamente difundida em 21 países do continente americano, sendo distribuída em regiões endêmicas do México a Argentina (Fig. 1). Cerca de 16 a 18 milhões de indivíduos estão infectados, sendo que 100 milhões de indivíduos encontram-se sob risco de contrair a doença (WHO 2002).



Figura 1. Distribuição da doença de chagas no mundo. Esquema retirado da página da Organização Mundial de Saúde (OMS) <http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm> (acessado em março de 2007).

Acredita-se que a relação entre os seres humanos e o *T. cruzi* nas Américas antecede a colonização, tendo sido confirmada a presença de DNA do protozoário por reações em cadeia de polimerase (PCR) em múmias andinas datadas de 4000 anos (Ferreira e cols., 2000; Guhl e cols., 1999; Rothhammer e cols., 1985), e mais recentemente, em múmias sub-andinas de até 9000 anos de idade, encontradas essencialmente em regiões costeiras do deserto do Atacama, entre o sul do Peru e norte do Chile (Aufderheide e cols., 2004).

A transmissão natural ocorre freqüentemente nas áreas endêmicas, principalmente pela introdução do homem, que reside geralmente sob condições precárias de habitação, no ecossistema do triatomíneo, inseto vetor vulgarmente conhecido como barbeiro. Além da transmissão vetorial, o *T. cruzi* pode ser transmitido por transfusão sangüínea, transplante de órgãos, transmissão congênita, acidentes de laboratório ou ingestão de animais e alimentos infectados (Dias, 1992; Wendel e Dias, 1992). Uma forma alternativa e menos comum de transmissão é observada durante a amamentação, devido à presença do *T. cruzi* no leite de mulheres que estão na fase aguda da doença, descrito primeiramente por Mazza e colaboradores (1936). A detecção de tripomastigotas também foi evidenciada no leite de camundongos infectados experimentalmente, sendo reportado que a pasteurização do leite contaminado inativa as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e evita a transmissão para a prole dos animais (Ferreira e cols., 2001).

A cardiomiopatia chagásica, uma importante manifestação clínica da doença, constitui um relevante problema de saúde pública e de grande impacto econômico, sendo este último gerado pelo elevado índice de incapacidade física dos indivíduos, ocasionando aposentadorias precoces. Assim, na década de 90, programas de controle da doença foram realizados em países pertencentes ao cone sul da América, objetivando eliminar a transmissão vetorial e transfusional da doença de Chagas pela fumigação com inseticidas em regiões endêmicas e pelo maior rigor no controle sorológico de bancos de sangue, respectivamente (Moncayo, 1999a; 1999b). Em 1997, países Andinos e da América Central se uniram a essa iniciativa, sendo evidenciada a erradicação da transmissão no Uruguai (1997) e mais tardiamente no Chile (1999) (Moncayo, 2003). Em junho de 2006, o Brasil recebeu uma certificação concedida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPS)/Organização Mundial de Saúde (OMS), relativa à eliminação da transmissão da doença de chagas pelo *Triatoma infestans*, e pela via transfusional (Dias, 2006). No entanto, as secretarias municipais e estaduais devem persistir na vigilância de modo a se capacitarem para surtos decorrentes de transmissão oral da doença, como relatado na Amazônia, Santa Catarina e Ceará e resistência de triatomíneos a inseticidas (Dias, 2006). Além disso, a grande dispersão de vetores infectados e a intensa imigração para a Amazônia possibilita a emersão da doença de Chagas na

região (Coura e cols., 2002; Dias e cols., 2002), justificando a recente implementação da vigilância epidemiológica e ambiental da doença (Agrelo, 2006).

Na Bolívia, o programa de controle da doença de Chagas iniciou-se apenas em 1998 (Moncayo, 1999a; 1999b) e a doença ainda representa um importante problema de saúde pública, onde a infecção pelo *T. cruzi* afeta 20% de toda a população, cerca de 180 mil habitantes, e a transmissão de mãe para filho ocorre em torno de 5% (Billot e cols., 2005). Salomone e colaboradores (2003) demonstraram através da PCR a presença do DNA de *T. cruzi* em indivíduos com sorologia negativa, sugerindo desta forma uma revisão nas recomendações de diagnósticos da doença de Chagas. Entretanto, o método de rotina utilizado nos laboratórios para diagnóstico é principalmente a sorologia que apresenta taxas de especificidade e sensibilidade superiores a 90% (Punukollu e cols., 2007). Devido ao elevado custo, o diagnóstico por PCR vem sendo utilizado apenas em casos de sorologia duvidosa como teste de confirmação.

A doença de Chagas evolui em 2 fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda se caracteriza por apresentar uma elevada parasitemia (Antas e cols., 1999; Grauert e cols., 1993; Hofflin e cols., 1987), sendo esta rapidamente controlada pelo sistema imunológico que não é capaz de eliminar completamente o parasito. Esta é uma fase de difícil detecção e na maioria dos casos não há manifestações clínicas evidentes. Porém, crianças e, menos freqüentemente, adultos infectados podem desenvolver sintomas expressivos nesta fase (Tanowitz e cols., 1992). As principais características da fase aguda incluem febre, mialgias, suor, hepatoesplenomegalia, falha no coração proveniente de miocardite, expansão do coração e menos freqüentemente meningoencefalites (Punukollu e cols. 2007).

A maioria dos indivíduos se recupera desta fase aguda, e ingressa em uma fase crônica assintomática, a forma indeterminada. Esta fase da infecção tem sido definida baseada no critério de positividade em testes sorológicos e parasitológicos, ausência de sintomas e sinais da doença de Chagas, ausência de alterações eletrocardiográficas e tamanho regular do coração, esôfago e colon (Teixeira e cols., 2006). Entretanto, após anos ou décadas, cerca de 30% dos indivíduos infectados passam a apresentar complicações cardíacas, digestivas (Elizari, 1999; Higuchi e cols., 2003) e/ou neurológicas na fase crônica da doença (Brenner, 1980; Dias e Coura, 1997; Köberle, 1968). Menos de 10% das pessoas infectadas com *T. cruzi*

desenvolvem a forma digestiva da doença que é caracterizada por importantes alterações morfológicas e funcionais do esôfago e colón, sendo principalmente resultante da destruição neuronal do trato gastrointestinal (Geraldino e cols., 2006; revisto por Soares e cols., 1999).

A cardiopatia chagásica é a mais devastadora manifestação da doença de Chagas, afetando 1/3 de todos os indivíduos infectados. Esta é progressiva e irreversível, podendo se apresentar como dilatação do coração, arritmias cardíacas graves geradas pelo aneurisma de ponta, eventos tromboembólicos que podem provocar infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva (Punukollu e cols., 2007; revisto por Tanowitz e cols., 1992). Observa-se a destruição da massa muscular que é substituída por intensa fibrose, provocando interrupção das fibras miocárdicas e remodelamento da matriz extracelular, levando a uma descompensação progressiva do miocárdio. O aumento da expressão de componentes de matriz extracelular foi evidenciado ainda na fase aguda em diferentes modelos experimentais (Andrade e cols., 1989; Calvet e cols., 2004; Sanchez e cols., 1993; Silva e cols., 1999). Existem diversas teorias que tentam explicar a forma cardíaca crônica da doença de Chagas. As duas principais teorias discutidas na literatura são as de autoimunidade e dano tissular (Cunha-Neto e cols., 2006; Tarleton, 2003).

A dificuldade de se encontrar parasitos viáveis na fase crônica da doença de Chagas e a demonstração de antígenos comuns entre o *T. cruzi* e fibras do coração humano, tem sustentado a teoria de autoimunidade (Revisto em Higushi 1999; Leon e Engman 2003). Além disso, antígenos do *T. cruzi* estariam provocando uma auto-reatividade de linfócitos CD4 contra o tecido cardíaco (Iwai e cols., 2005; Kierszenbaum, 1999), sugerindo que a miocardite perpetue independente da presença do parasito.

A hipótese do dano tissular postula que a extensão dos danos provocados ao tecido cardíaco na miocardiopatia chagásica crônica estaria vinculada à persistência do parasito (Fuenmayor e cols., 2005; Tarleton, 2001; 2003). Mesmo sendo a presença do *T. cruzi* raramente evidenciada no tecido cardíaco em preparações histológicas, a utilização da PCR tem permitido demonstrar a expressão de antígenos do parasito durante esta fase da doença (Carod-Artal, 2006). Além disso, evidências demonstram a reativação da infecção pelo *T. cruzi* pela imunossupressão

de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, sendo observados sinais clínicos mais intensos (revisto por Ferreira e Borges 2002; Fontes Rezende e cols., 2006). Estes dados apoiam a hipótese do dano tissular e corroboram a idéia de que a persistência do parasito em seu hospedeiro esteja diretamente ligada à patogênese da miocardite crônica na doença de Chagas. No entanto, a questão autoimunidade X persistência do parasito ainda permanece controversa. Atualmente, alguns pesquisadores acreditam que a presença do parasito desempenhe um papel primário na miocardopatia chagásica crônica e provavelmente atue como adjuvante para uma reação cruzada entre antígenos comuns do parasito e das fibras do miocárdio, resultando numa grave miocardite (Higushi e cols., 2003; Kierszenbaum, 2005).

O tratamento quimioterápico da doença de Chagas ainda é alvo de intensa investigação. Atualmente, o tratamento clínico está restrito ao uso de benznidazol (*N*-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida), uma vez que a produção de nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) foi descontinuada na década de 80 no Brasil e posteriormente, em outros países da América do Sul. O nifurtimox e o benznidazol são efetivos na fase aguda da doença, mas possuem efeitos limitados durante a fase crônica, sendo mais indicados para infecções recentes, forma congênita, reativação associada à imunossupressão, e em situações de transfusões e transplante de órgãos (Rassi, 1982). Contudo, a prescrição de drogas tripanocidas tem sido indicada na fase crônica da doença de Chagas, uma vez que estudos reportam uma redução na inflamação e reversão da fibrose cardíaca após o tratamento com benznidazol (Andrade e cols., 1991). Relatos recentes demonstraram que o tratamento na fase crônica da doença com benznidazol, em modelos murinos, leva a uma redução na carga parasitária, disfunção cardíaca e miocardite (Garcia e cols., 2005). Recomendações recentes da OMS indicam o tratamento com benznidazol para pacientes com menos de 10 anos de infecção (fase crônica precoce), mas há controvérsias sobre a eficácia do tratamento em pacientes com mais de 10 anos de doença (revisto por Coura e Castro, 2002). Os resultados obtidos com nifurtimox e benznidazol variam de acordo com a fase da doença de Chagas, o período e a dose do tratamento, a idade e origem geográfica dos pacientes, possivelmente devido às diferenças na suscetibilidade do hospedeiro e das diferentes cepas de *T. cruzi* (Andrade e cols.,

1992; Cançado, 1999; revisto em Coura e Castro, 2002). Nifurtimox e benznidazol apresentam sérios efeitos colaterais, que incluem anorexia, emagrecimento e manifestações digestivas, causadas pelo nifurtimox, e dermatites com erupção cutânea e polineuropatias, causadas pelo benznidazol (revisto por Cançado, 1997; Castro e cols., 2006; Coura, 1996).

Sendo assim, a busca de compostos ativos em ambas as fases da doença permanece uma investigação essencial para o controle desta patogenia. Os avanços nos estudos sobre a biologia do *T. cruzi* têm contribuído para identificação de novos alvos permitindo o desenvolvimento de quimioterápicos, incluindo aqueles que atuem na biossíntese de esterol, na inibição de cisteína protease e no metabolismo de pirofosfato do parasito (revisto em Urbina e Docampo, 2003) ou mesmo, disparando o processo de apoptose no parasito (De Souza e cols., 2006). Em 2006, durante o encontro sobre drogas efetivas em doenças negligenciáveis (DNDi), no Rio de Janeiro, foi sugerido a avaliação do efeito de drogas conjugadas a benznidazol.

Por outro lado, a aplicação de terapia celular tem sido uma alternativa promissora no tratamento da doença de Chagas. Recentemente, Vilas-Boas e colaboradores (2006) relataram uma melhora na qualidade de vida e capacidade funcional do miocárdio de pacientes transplantados com células progenitoras de medula óssea, sendo considerado um método fisiológico sem requerimento de medicações específicas e atualmente, abre novas perspectivas para uma nova linha terapêutica na doença de Chagas.

1.2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, protozoário hemoflagelado pertencente à ordem kinetoplastidae e família Trypanosomatidea é um parasito digenético, ou seja, necessita de dois hospedeiros distintos para o desenvolvimento de seu ciclo biológico: um hospedeiro vertebrado e outro hospedeiro invertebrado. Durante as diferentes etapas de seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas distintas: tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas (Fig. 2).

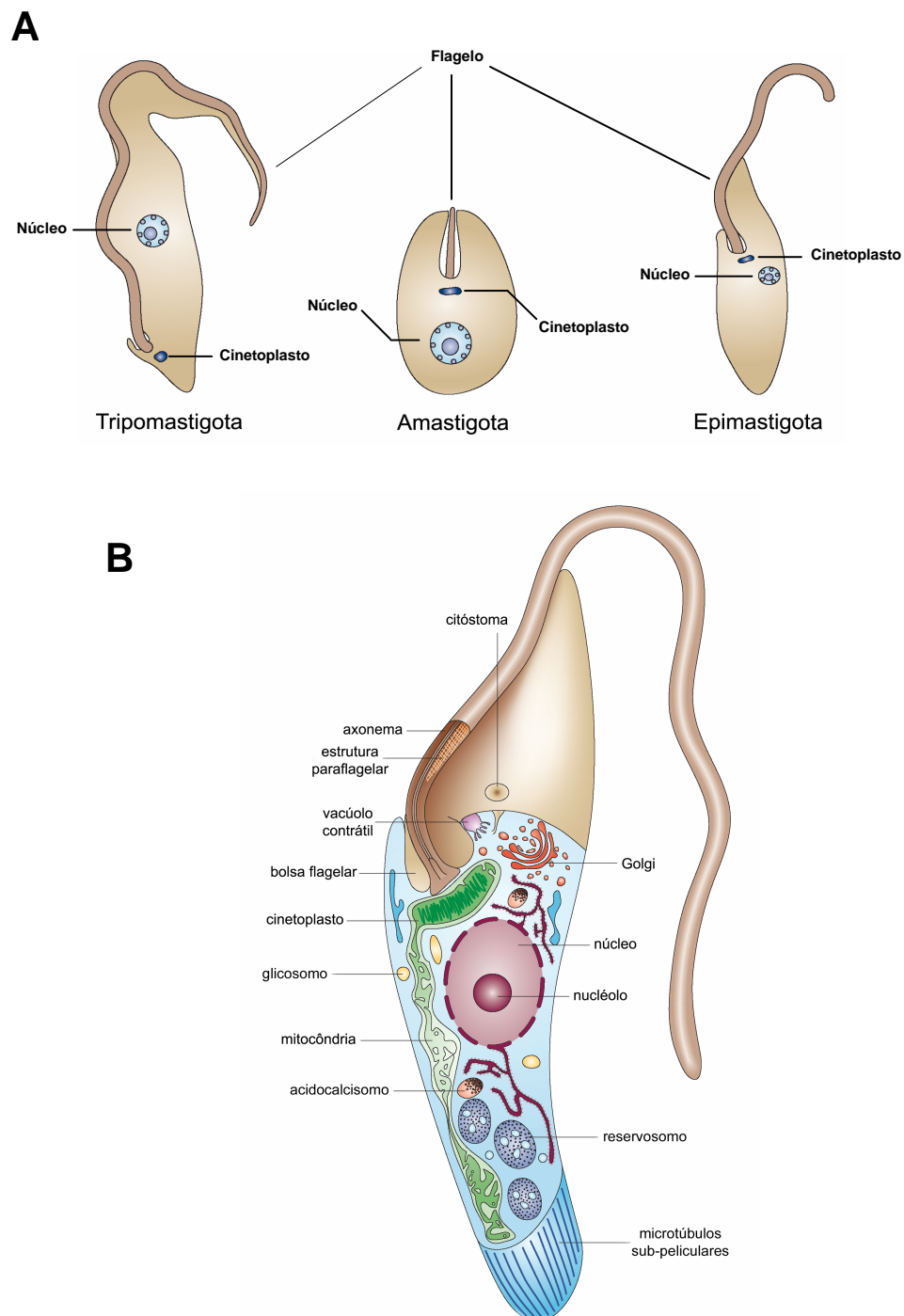


Figura 2. Desenhos esquemáticos de *T. cruzi*. **(A)** Características morfológicas das formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas. **(B)** Distribuição de organelas intracelulares em epimastigotas (adaptado de Docampo e cols., 2005 – Nature Reviews Microbiology).

Tripomastigotas são formas alongadas (Fig. 2A), medindo aproximadamente 25 μm e possuindo um flagelo que lhes confere grande mobilidade (De Souza, 2002). O cinetoplasto, organela rica em DNA extracromossômico, tem a forma arredondada apresentando uma constituição em lamelas espaçadas (Tomlinson e cols., 1995) e localizando-se na região posterior ao núcleo (De Souza, 2002). Os tripomastigotas são formas infectivas não multiplicativas e podem ser observados no sangue do hospedeiro vertebrado e no intestino posterior do Triatomíneo, sendo denominados tripomastigotas sangüíneos e metacíclicos, respectivamente (Brenner, 1973).

Epimastigotas são formas alongadas (Fig. 2A e B), com cerca de 20 a 40 μm , que possuem flagelo longo e são incapazes de infectar células de mamíferos (De Souza, 2002). O cinetoplasto é um disco ligeiramente côncavo, localizado na porção anterior do parasito (Almeida-de-Faria e cols., 1999). Estas formas proliferativas são encontradas principalmente no intestino do hospedeiro invertebrado. No entanto, durante a diferenciação da forma tripomastigota em amastigota no ciclo intracelular, observam-se formas intermediárias semelhantes a epimastigotas (“epimastigota like”), sendo evidenciada a presença de antígenos específicos de epimastigotas (3C5) na superfície destes parasitos (Almeida-de-Faria e cols., 1999).

Amastigotas são formas arredondadas (Fig. 2A), medindo aproximadamente 4 μm , que possuem flagelo curto, acarretando uma baixa mobilidade desta forma evolutiva (Rey, 1991). O cinetoplasto localizado na região anterior ao núcleo é alongado, em forma de barra e apresenta uma constituição em lamelas densas (Tomlinson e cols., 1995). As amastigotas são formas infectivas e capazes de se multiplicar no citoplasma de células do hospedeiro vertebrado (Carvalho e De Souza, 1986; De Souza 2002; Ley e cols., 1990).

O *T. cruzi*, como outros tripanosomatídeos, possui compartimentos intracelulares funcionalmente distintos, organelas típicas de células eucarióticas (Fig. 2B), assim como algumas que lhe são próprias (revisto em De Souza, 1984; 2002). Sua membrana plasmática é composta por proteínas, lipídeos e carboidratos, estes últimos distribuídos na superfície externa (De Souza e cols., 1978). Um grande número de proteínas está associado à membrana por âncoras de

glicosilfosfatidilinositol (Schenkman e cols., 1988). O colesterol presente nas membranas do parasito é captado do hospedeiro ou do meio através de receptores específicos (Soares e De Souza, 1991), sendo o ergosterol o esterol endógeno majoritário (Fagundes e cols., 1980; Williams e cols., 1966;). Além disso, microtúbulos subpeliculares distribuem-se por todo o corpo do parasito e formam um citoesqueleto imediatamente abaixo da membrana plasmática, exceto na bolsa flagelar e citóstoma permitindo a ingestão de macromoléculas por endocitose (De Souza, 2002).

1.3. Ciclo Evolutivo

A transmissão natural ocorre através das fezes do vetor infectado, Hemípteros Reduvidos da subfamília *Triatominae*, sendo os principais gêneros: *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*.

No intestino médio do inseto vetor infectado, as formas epimastigotas aderem ao epitélio intestinal por hemidesmossomos via uma glicoproteína de 72 kDa (Sher e Snary, 1982) e iniciam uma intensa replicação por fissão binária (De Souza 2002; Zeledon; 1997). Após sucessivas divisões, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes e urina durante o repasto sangüíneo do inseto vetor (Schaub e Losch, 1988).

O parasito não é capaz de penetrar na pele íntegra, assim, formas tripomastigotas metacíclicas penetram através do ferimento causado pela picada do inseto vetor e/ou por pequenas fissuras presentes na pele do hospedeiro vertebrado, permitindo a invasão de macrófagos e/ou fibroblastos do tecido conjuntivo próximos a “porta de entrada” do parasito. De 7 a 10 dias após o período de incubação o sítio de entrada do parasito no homem é marcado por uma lesão de pele denominada de chagoma de inoculação, freqüentemente na face do indivíduo. Os tripomastigotas metacíclicos também podem penetrar pela conjuntiva ocular, gerando dessa forma uma inflamação local denominada sinal de Romana (Fig. 3) (Romana e Meyer, 1942).



Figura 3. Sinal de Romaña característico: edema bpalpebral unilateral. Foto retirada do site <http://www.bioscience.org/2003/v8/e/948/figures.htm> (acessado em março de 2007)

No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de invadir e desenvolver seu ciclo intracelular em diferentes tipos celulares (Brenner, 1973). Após a invasão, os tripomastigotas são observados em vacúolos parasitóforos que se fundem com endosomas tardios e lisosomas (Meirelles e cols., 1986; Woolsey e Burleigh 2004). Em seguida, as formas tripomastigotas escapam do vacúolo parasitóforo, após acidificação e formação de poros por ativação de Tc TOX (Andrews e cols., 1990), se diferenciam em formas amastigotas no citoplasma e iniciam o processo de divisão celular (fissão binária). Após sucessivas divisões, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que serão liberadas no interstício após a ruptura da célula hospedeira. Os parasitos poderão infectar outros tipos celulares, alcançar a corrente sanguínea ou serem ingeridos pelo inseto vetor fechando assim o ciclo biológico da doença (Brenner, 1973; Chagas, 1909; 1911a,b; 1922) (Fig. 4).

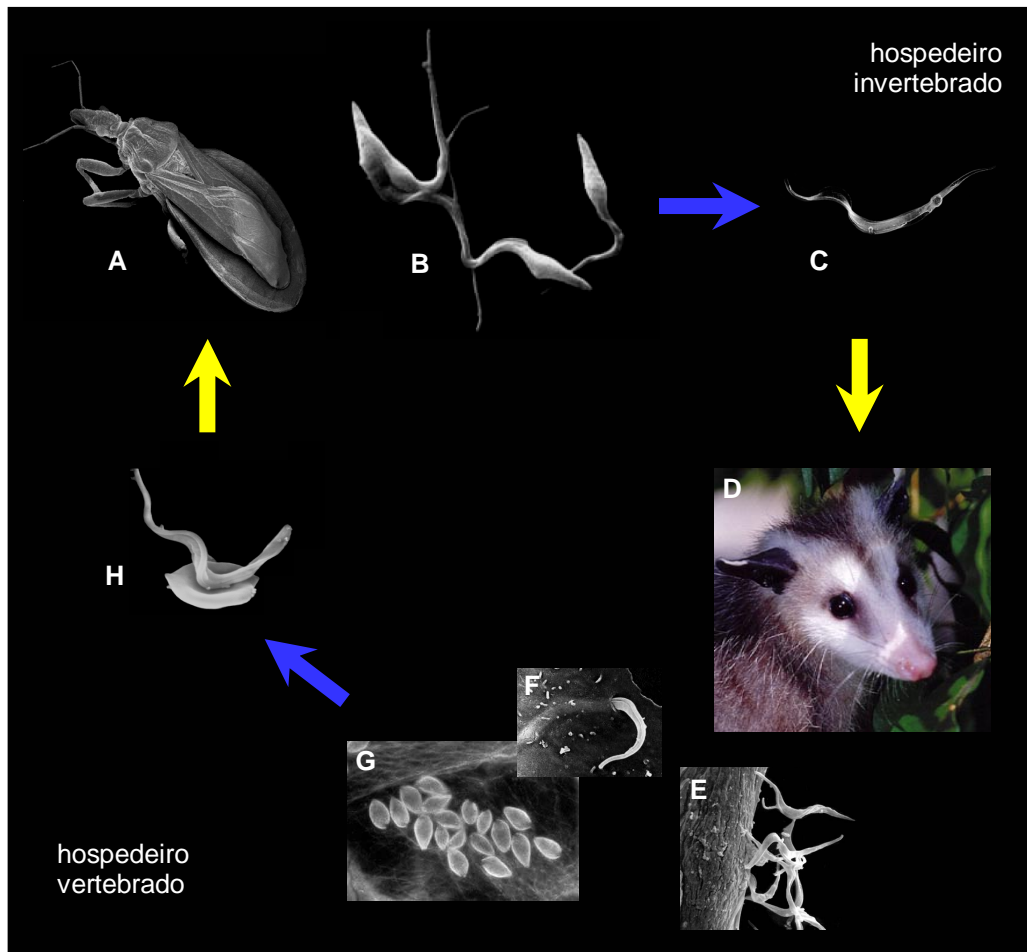


Figura 4. Ciclo evolutivo do *T. cruzi* - No hospedeiro invertebrado (A) formas epimastigotas (B) se multiplicam no lúmen do intestino. A diferenciação para tripomastigotas metacíclicas (C) ocorre na porção final do intestino com posterior liberação nas fezes do hospedeiro invertebrado. Estas formas infectam o hospedeiro vertebrado (D). Após adesão (E) e penetração (F) nas células hospedeiras, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas multiplicativos (G) e após diferenciação ocorre ruptura celular com liberação de tripomastigotas sanguíneos (H). Estas formas podem invadir músculos e outros tecidos. O ciclo se fecha quando o indivíduo infectado é picado pelo triatomíneo (Esquema gentilmente cedido por Rubem Barreto [A: Demetry C, capturado em 26/07/2005; B: Santa-Rita et al.,

2005; **C**: Vatarunakamura et al., 2005; **D**: USP, capturado em 26/07/2005; **E**: Barbosa HS, capturado em 26/07/2005; **F**: Andrews N, capturado em 26/07/2005; **G**: FIOCRUZ, capturado em 25/07/2005; **H**: Dantas et al., 2003]).

Tendo em vista o definido tropismo do *T. cruzi* por células musculares cardíacas (Brener, 1973; Cabrine-Santos e cols., 2001; Franco e cols., 2003; Vera-Cruz e cols., 2003), levando a graves alterações evidenciadas na doença de Chagas, utilizamos cultura primária de células musculares cardíacas como modelo experimental para análise de moléculas envolvidas no processo de reconhecimento parasito-célula hospedeira. Assim, uma breve descrição estrutural e funcional do tecido cardíaco será abordada para melhor entendimento do modelo aplicado.

1.4. Tecido cardíaco

O tecido muscular cardíaco tem origem no mesoderma. Inicialmente, moléculas sinalizadoras secretadas pelo endoderma (BMP, fator de crescimento de fibroblasto, Shh) atuam como mediadores da formação do mesoderma cardíaco, onde a expressão de Wnt, e outros fatores transcricionais cardiogênicos regulam diferentes aspectos da morfogênese e citodiferenciação cardíaca até completa formação do órgão (revisto por Brand, 2003).

O músculo cardíaco é constituído por células alongadas apresentando núcleo único central. A interface entre as células é mediada por junções terminais, denominadas discos intercalares, que permitem estabilidade mecânica e comunicação elétrica e química através de membranas de células adjacentes, sendo visualizado como uma densa linha transversa presente em fibras musculares por microscopia ótica (Bennett e cols., 2006; Yeager, 1998). Nos discos intercalares encontram-se três especializações juncionais (revisto por Gutstein e cols., 2002): (i) junções aderentes, que servem para ancorar os filamentos de actina dos sarcômeros terminais; (ii) desmossomos, que auxiliam na estabilização mecânica por integrar filamentos intermediários (Ehler e cols., 2001); e (iii) junções comunicantes (Junções “Gap”), responsáveis pelo transporte de íons entre as células, permitindo sincronia na contração muscular (Barr e cols., 1965; revisto por Bernstein e Mortey 2006; De Mello, 1982).

Para manter sua atividade funcional, contração muscular, o tecido cardíaco apresenta uma citoarquitetura complexa. A fibra muscular cardíaca é constituída de células com grande número de miofibrilas, cuja unidade contrátil – o sarcômero – apresenta cerca de 2,2 μm de comprimento (Fig. 5). O sarcômero consiste de uma unidade altamente organizada constituída de filamentos finos (actina e proteínas associadas) e filamentos grossos (formados por miosina II), que se encontram parcialmente sobrepostos e delimitados por duas linhas Z ou discos Z, que por sua vez apresentam α -actinina e Cap Z como proteínas majoritárias (Fig. 5). Os filamentos de actina e proteínas associadas constituem a banda I e a região de sobreposição de filamentos de actina e miosina II é denominada de banda A, enquanto a banda H é constituída apenas de filamentos de miosina II. Dividindo a banda H, existe uma região onde os filamentos de miosina se ligam entre si por projeções transversais, denominada linha M (Fig. 5). Proteínas gigantes como titina (3 a 4 MD) conferem a manutenção do comprimento e estabilidade dos sarcômeros, enquanto a nebulina (0,6 a 0,9 MD) regula o comprimento do filamento de actina no sarcômero (Wang, 1996).

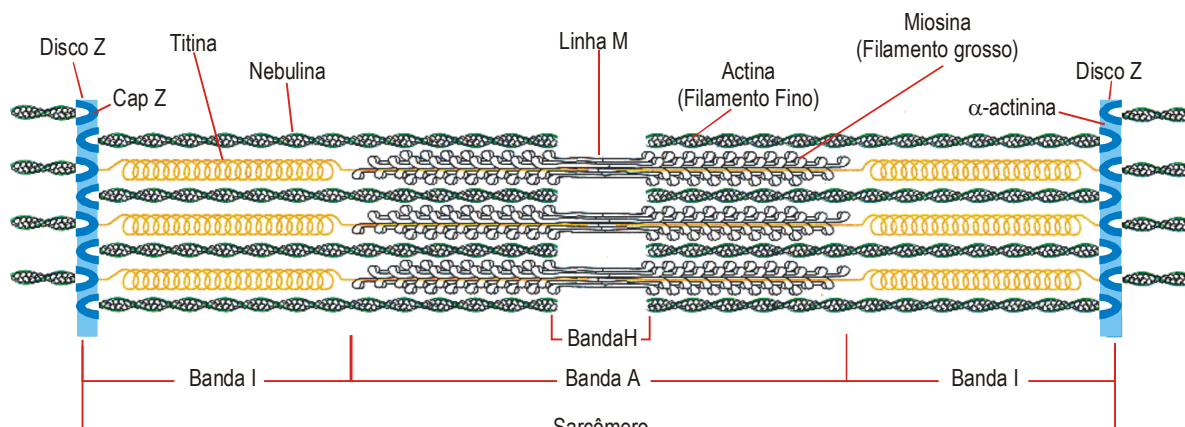


Figura 5. Esquema da distribuição de proteínas do citoesqueleto em sarcômeros, unidade contrátil do músculo estriado, determinando a localização de filamentos finos, grossos e proteínas associadas. Esquema retirado do livro de Alberts e cols., 2002. “Molecular Biology of the Cell, 4ª edição.

A contração muscular se inicia pela mudança do potencial de ação da membrana plasmática (sarcolema), sendo este diferencial de ação conduzido ao retículo sarcoplasmático por túbulos T, levando a liberação transiente de Ca^{2+} para o citoplasma (Honore e cols., 1987). O Ca^{2+} livre se liga à troponina C, um

componente do complexo troponina-tropomiosina, que muda sua conformação estrutural e permite a exposição do sítio de ligação do filamento de actina. Assim, a cabeça de miosina interage com o filamento de actina (Gordon e cols., 2000) e a liberação de fosfato pela hidrólise de ATP gera a força de contração (Holmes, 1996), possibilitando o movimento da cabeça de miosina pelo filamento de actina e conseqüentemente o encurtamento do sarcômero, produzindo a contração muscular.

1.5. Interação *T. cruzi*-célula hospedeira

O *T. cruzi*, assim como vírus e algumas bactérias, é um parasito intracelular obrigatório e apresenta capacidade de invadir e se replicar no interior de células de mamíferos (Gruenheid e Finlay 2003). Existe ainda uma outra classe de patógenos que são capazes de se replicar extracelularmente, entretanto, escolhem um estilo de vida intracelular, obtendo assim um nicho mais favorável a sua sobrevivência. Dessa forma, diversos patógenos têm desenvolvido diferentes estratégias que possibilitam sua invasão em células hospedeiras (Gruenheid e Finlay 2003).

O mecanismo de invasão de células fagocíticas profissionais e não profissionais pelo *T. cruzi* pode ser dividido em duas importantes etapas: adesão seguida de internalização do parasito (Andrews e Colli, 1982; Meirelles e cols., 1982). Durante o processo de infecção pelo *T. cruzi*, as formas tripomastigotas necessitam migrar através da matriz extracelular antes de poderem aderir e penetrar na célula hospedeira (Nde e cols, 2006). Esse evento facilita a interação de moléculas presentes na superfície das células hospedeiras com os ligantes presentes no parasito, favorecendo o processo de reconhecimento celular.

A adesão é uma etapa crucial no processo de invasão de células de mamíferos pelo *T. cruzi*, sendo mediada pelo reconhecimento de diferentes moléculas na superfície do parasito e da célula hospedeira. O processo de invasão do *T. cruzi* ainda é bastante discutido e parece ser dependente do tipo celular, da forma evolutiva do *T. cruzi*, e da via de sinalização (Barbosa, 1999; Burleigh e Woolsey, 2002). Carboidratos desempenham um importante papel no reconhecimento *T. cruzi*-célula hospedeira, sendo evidenciada a participação de moléculas de manose, galactose, *N*-acetil galactosamina e *N*-acetil glicosamina durante o processo de adesão do parasito em diferentes tipos celulares (Araújo-

Jorge, 1989; Barbosa e Meirelles, 1992; Bonay, 2001; Villalta e Kierszenbaum, 1985). Existem evidências demonstrando que moléculas de ácido siálico, um carboidrato terminal presente na superfície celular, estão envolvidas no processo de adesão e subsequente internalização do *T. cruzi* na célula hospedeira. O *T. cruzi* não é capaz de sintetizar ácido siálico, no entanto, ele apresenta uma glicoproteína de superfície com atividades neuraminidase e trans-sialidase a qual desempenha um importante papel na interação parasito-célula hospedeira (Schenkman e cols., 1994; Soeiro e cols., 1995), removendo moléculas de ácido siálico da superfície da célula alvo, preferencialmente ligados em uma posição α -2,3, e transferindo-os para glicoproteínas semelhantes a mucinas presentes em sua superfície (Acosta-Serrano e cols., 2001; Burleigh e Andrews, 1995; Schenkman e cols., 1993; revisto por Yoshida, 2006). Além disso, células deficientes em ácido siálico apresentam uma redução nos níveis de infecção, sugerindo o papel do ácido siálico na invasão do parasito (Ming e cols., 1993).

Formas tripomastigotas metacíclicas e provenientes de cultivo celular de *T. cruzi* apresentam um distinto arsenal de moléculas em suas superfícies que diferencialmente interagem com componentes da célula hospedeira no momento do reconhecimento e/ou invasão (revisto por Yoshida, 2006). Diferentemente das formas sanguíneas e de cultivo celular, os tripomastigotas metacíclicos apresentam uma molécula de superfície estágio específica, a gp82. Estudos revelaram que a gp82 é capaz de se ligar a mucinas gástricas, sugerindo a capacidade desta glicoproteína de tripomastigotas metacíclicos promover a invasão da mucosa gástrica (Neira e cols. 2003). A redução da infecção de camundongos desafiados por infecção oral após o tratamento do parasito com o anticorpo 3F6, anticorpo anti-gp82, corrobora a participação desta molécula no processo de invasão (Neira e cols., 2003). Além disso, estudos com isolados de tripomastigotas metacíclicos deficientes em gp82 (isolados 569 e 588) revelaram uma redução da infecção da mucosa gástrica em animais infectados via oral (Cortez e cols., 2003). Em contraste, os ensaios *in vitro* com os isolados 569 e 588 demonstraram uma capacidade de infecção semelhante ao parasito selvagem (controle), sendo este evento associado à similaridade funcional da glicoproteína gp30, presente na superfície dos tripomastigotas metacíclicos mutantes (569 e 588), com a gp82, mas com baixa eficiência em ligar mucinas gástricas (Cortez e cols., 2003). Moléculas semelhantes

a mucinas gp35/50 também estão envolvidas no processo de invasão de formas metacíclicas, sendo determinada pela inibição com anticorpo 10D8 ou a glicoproteína nativa purificada (revisto por Yoshida, 2006).

A Tc85 pertence a uma família constituída por uma população heterogênea de glicoproteínas de superfície ancoradas em glicosilfosfatidilinositóis (GPIs) (Andrews e cols, 1984; Katzin e Colli, 1983), estando esta molécula presente em formas tripomastigotas infectivas (revisto por Yoshida, 2006). O envolvimento da Tc85 no processo de adesão e penetração do parasito foi demonstrado utilizando-se anticorpos monoclonais anti-Tc85 que foram capazes de inibir significativamente a infecção de células hospedeiras pelo *T. cruzi* (Abuin e cols., 1989; Alves e cols., 1986). A Tc85-11, uma glicoproteína isolada da superfície do parasito, possui dois sítios de ligação com propriedades adesivas para laminina e citoqueratina 18 (Magdesian e cols., 2001). Além disso, Villalta e colaboradores (2001) reportaram o envolvimento de uma trans-sialidase, denominada gp83, no processo de invasão do *T. cruzi* em macrófagos, fibroblastos e mioblastos, participando do desencadeamento de transdução de sinais que favorecem a entrada do parasito. Relatos recentes, demonstraram que a molécula de ligação ao *T. cruzi* gp83 aumenta os níveis de transcrição e expressão da mais abundante isoforma de laminina em humanos (laminina γ -1), o que leva a um aumento na infecção de células de músculo liso de artéria coronariana humana (HCASM) (Nde e cols., 2006).

Além de laminina, a participação de outros componentes de matriz extracelular foi identificada no processo de invasão. Evidências têm demonstrado que fibronectina, uma glicoproteína de matriz extracelular, promove adesão e entrada de tripomastigotas em macrófagos e fibroblastos (Ouaissi e cols., 1985; Wirth and Kierszenbaum, 1984) e amastigotas por macrófagos murinos ou humanos (Noisin e Villalta 1989). Calvet e colaboradores (2004) demonstraram a participação da sequência Arg-Gli-Asp (seqüência RGD) da molécula de fibronectina na invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos.

Além das proteínas de matriz extracelular mencionadas, os glicosaminoglicanos (GAGs) também podem desempenhar um importante papel na patogênese de processos infecciosos. A diversidade estrutural da cadeia dos GAGs oferece muitas possibilidades de reconhecimento biológico e estas características os

tornam um potencial alvo de adesão de microorganismos (Barragan e cols., 1999; Calvet e cols., 2004; Carruthers e cols., 2000; Park e cols., 2001).

Em virtude do enfoque temático desta dissertação de mestrado estar direcionado à participação de proteoglicanos sulfatados e seus ligantes no processo de interação *T. cruzi*-cardiomiócito, abordaremos aspectos estruturais e biológicos destas moléculas para melhor entendimento de seu papel no reconhecimento parasito-célula hospedeira.

1.6. Matriz extracelular

A matriz extracelular foi inicialmente identificada como uma estrutura relativamente inerte, com a função de estabilizar a estrutura física dos tecidos. No entanto, atualmente está claro que a matriz desempenha um papel muito mais ativo e complexo na regulação de diferentes processos celulares do comportamento das células com as quais está associada (Farhadian e cols., 1996). A matriz extracelular é composta por diferentes proteínas versáteis e polissacarídeos que são secretados localmente e montados em uma organizada rede integrada à superfície celular. As interações célula-matriz extracelular parecem ser dinâmicas e recíprocas, iniciando um fluxo de informação bidirecional que regula processos fundamentais incluindo crescimento, diferenciação, migração e reconhecimento celular (Farhadian e cols., 1996). A matriz extracelular determina as características físicas dos tecidos e muitas das propriedades biológicas das células nela inseridas. Os componentes majoritários da matriz são proteínas fibrosas que conferem resistência à tensão e resiliência (os diversos tipos de colágenos e a elastina), glicoproteínas adesivas (como fibronectina, laminina e tenascina) e proteoglicanos que formam um gel hidratado capaz de resistir a forças de compressão (Esko, 1999). Com exceção da elastina e do ácido hialurônico, todas as outras classes de moléculas consistem de proteínas relacionadas que são derivadas de genes individuais (Schönherr e Hausser, 2000).

1.7. Glicosaminoglicanos

Inicialmente acreditava-se que os Glicosaminoglicanos (GAGs) apresentavam importante papel no preenchimento do espaço intersticial, facilitando a orientação e

organização da matriz extracelular. No entanto, avanços no conhecimento destas moléculas têm demonstrado que a participação dos GAGs, e seus proteoglicanos, é importante em uma variedade de eventos relacionados ao reconhecimento celular e vias de sinalização, adesão, migração e proliferação celular (revisto por Lopes e cols., 2006; Porcionatto e cols., 1999; revisto por Taylor e Gallo 2006). Os GAGs, cadeias lineares de polissacarídeos compostas de unidades repetidas de dissacarídeos, são divididos em: (i) ácido hialurônico (HA); (ii) queratam sulfato (KS); (iii) condroitim sulfato (CS); (iv) dermatam sulfato (DS); (v) heparam sulfato (HS); (vi) heparina, sendo identificados por meio de suas estruturas, natureza de suas moléculas de açúcar, tipo de ligação entre as moléculas, número e localização de grupamentos sulfato (Jackson e cols., 1991; Turnbull e cols., 1995,) (Fig. 6).

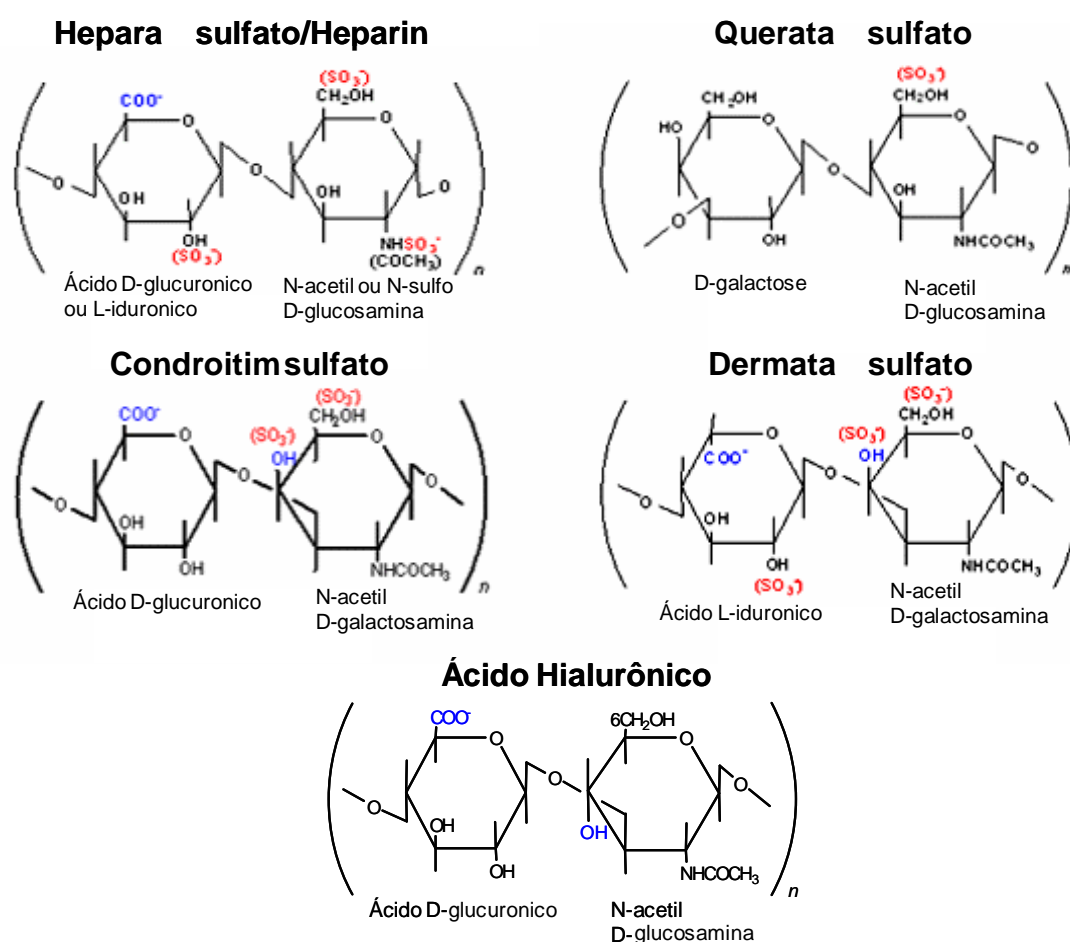


Figura 6. Esquema representando a fórmula estrutural dos Glicosaminoglicanos.

Estes dissacarídeos são formados por um ácido hexurônico podendo ser D-glicurônico (D-GlcA) ou L-idurônico (L-IdoA) e por uma molécula de açúcar aminado (hexosamina) podendo ser *N*-acetil-D-glucosamina (D-GlcNAc) ou *N*-acetil-D-galactosamina (D-GalNAc), que são freqüentemente sulfatadas. Esta estrutura é similar nas diferentes famílias, exceto no queratam sulfato que apresenta uma galactose no lugar do ácido urônico (Gallagher e cols, 1986; Nasciuttii e cols., 2006). A maioria dos GAGs estão ligados a molécula serina da proteína central, proteoglicano, por um tetrassacarídeo (Xilose-galactose-galactose-ácido glucurônico), sendo a xilose inicialmente adicionada pela atividade da xilosiltransferases I no retículo endoplasmático (RE) (Cuellar e cols., 2007), a adição de duas moléculas de galactose ocorre pela atividade de galactosiltransferases I e II no domínio cis/medial do complexo de Golgi e finalmente, a adição de ácido glicurônico pela atividade de glicuronosiltransferase I na região trans do Golgi (Silbert e Sugumaran, 2002). No entanto, a determinação do GAG só ocorre após a adição de α -GlcNAc pela α -*N*-acetilglucosaminiltransferase I ou β -GalNAc por β -*N*-acetilgalactosaminiltransferase I, identificando as cadeias das famílias de heparam sulfato e condroitim sulfato, respectivamente. O número de repetições de dissacarídeos por cadeia de GAGs pode variar enormemente, desde cerca de 15 dissacarídeos em queratam sulfato, até 50-200 em heparam sulfato/condroitim sulfato, e mais de 4000 unidades no ácido hialurônico. As cadeias de GAGs são fortemente hidrofílicas, tendendo a adotar conformações que ocupam um grande espaço em relação à massa, e a formar géis mesmo em baixas concentrações.

O ácido hialurônico (HA), também chamado de hialuronan, foi descoberto por Meyer e Palmer em 1934 em humor vítreo de olhos de boi. Este é um polissacarídeo com uma elevada massa molecular, que dependendo do tecido pode variar de 2000 a 25000 dissacarídeos, gerando uma variação no peso molecular de 10^6 a 10^7 Da e no comprimento de 2 a 25 μ m (Toole, 2001). O HA é formado por dissacarídeos constituídos de ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina associados por uma ligação glicosídica β 1-4 sendo a cadeia formada pela ligação β 1-3 entre dissacarídeos (Kakehi e cols, 2003; Toole, 2001). O HA, diferentemente dos outros GAGs, não é modificado por sulfatação ou epimerização (Taylor e Gallo, 2006). HA é sintetizado na face interna da membrana plasmática pela associação de hialuronan sintase com UDP-ácido glucurônico (UDP-GlcUA) e UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-

GlcNac), sendo a cadeia de HA transportada, através desta enzima, para a matriz extracelular (Tlapak-Simmons e cols., 2005), podendo ligar-se a proteínas de ligação a hialuronan, tais como agrecan e versican (Takehi e cols, 2003).

Queratam sulfato (KS) foi identificado por Suzuki em 1939 em extratos de córneas, mas também é observado em cartilagens e no cérebro. Atualmente, este GAG é dividido em três diferentes classes de acordo com o tipo de ligação realizada com a proteína central. Dessa forma, a classe KSI inclui todos os KS ligados a uma asparagina; KSII se refere a todos os KS ligados a proteína por uma serina/treonina e o KSIII determina a ligação do KS a proteína por uma serina/treonina via uma manose (Funderburgh, 2000). O KS é composto por cadeias curtas de dissacarídeos, sendo alongadas pela ação de glicosiltransferases que alternadamente adicionam moléculas de *N*-acetil glucosamina e galactose (Funderburgh, 2000). Durante a síntese do KS, ambas as moléculas de açúcar (*N*-acetil glucosamina e galactose) podem ser *O*-sulfatadas no C6 por enzimas específicas. Duas sulfotransferases foram identificadas, sendo uma enzima com capacidade de adicionar sulfato as moléculas GalNAc de CS e também a Gal em KS (Habuchi e cols., 1996), enquanto a outra transfere sulfato para Gal de KS, mas não age sobre CS (Fukuta, 1997).

O CS e o dermatam sulfato são ambos derivados do mesmo polímero, sendo constituídos por *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) e ácido glicurônico (GlcA). O DS difere do CS por suas moléculas de GlcA sofrerem uma epimerização no carbono C5 para formar um ácido idurônico (IdoA) (Nasciutti e cols, 2006; Taylor e Gallo, 2006). A proporção de dissacarídeos contendo IdoA em DS é variável, podendo alcançar quase 100% da cadeia de polissacarídeo (Kusche-Gullberg e Kjellén, 2003). No DS, o sítio mais comum de sulfatação é no C4 da molécula GalNAc pela atividade de condroitim 4-*O*-sulfotranferase 1, 2 e 3, as quais preferem moléculas ricas em GlcA, e dermatam 4-*O*-sulfotransferase, que é específica para regiões de IdoA presentes, mas grupos sulfatos podem também ser encontrados no C6 da molécula GalNAc pela ação da condroitim 6-*O*-sulfotransferase (Turnbull e cols, 1995). Além disso, a sulfatação no C2 do IdoA pode ser observada, sendo promovida pela enzima CS/DS 2-*O*-sulfotransferase (Taylor e Gallo, 2006).

Heparan sulfato (HS) e heparina são GAGs estruturalmente semelhantes e assim, classificados dentro de uma mesma família. O HS foi primeiramente descrito por Jorpes e Gardell em 1948, sendo considerado um GAG sem propriedade anti-coagulante. No entanto, estudos demonstraram que HS isolado da superfície de células endoteliais apresentam atividade anti-coagulante (Mertens e cols, 1992). Heparina é sintetizada exclusivamente em mastócitos e estocada em grânulos presentes em seu citoplasma. Por outro lado, HS é abundantemente encontrado na superfície celular e matriz extracelular em uma grande variedade de células de mamíferos (Lindahl e cols, 1998, Sasisekharan e Venkataraman, 2000; Salmivirta e cols, 1996). Além disso, estudos demonstraram a presença e manutenção estrutural de heparan sulfato durante o processo evolutivo, desde invertebrados a humanos, exceto em poríferas (Esko e Lindahl 2001; Ferreira e cols., 1993; Medeiros e cols., 2000; Nader e cols., 1999). HS/heparina são caracterizados por apresentar uma cadeia linear composta de 10-200 unidades de dissacarídeos constituídos por moléculas alternadas de *N*-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurônico (Dietrich e cols., 1983, 1998; Sasisekharan e Venkataraman, 2000). A biossíntese do HS e heparina inicia-se com a adição de quatro monossacarídeos a uma molécula de serina na proteína central. Posteriormente, a cadeia é estendida com adição de uma GlcNAc e GlcA por duas glicosiltransferases – exostosina 1 e 2 (EXT1 e EXT2) (revisto por Taylor e Galo, 2006). Estas cadeias são modificadas através de etapas consecutivas de *N*-deacetilação e *N*-sulfatação de moléculas *N*-acetilglicosamina pela atividade das enzimas *N*-deacetilase e *N*-sulfotransferases (NDST), respectivamente, substituindo assim, um grupamento *N*-acetil por um grupamento sulfato. O próximo passo da modificação é a epimerização, onde o carbono C5 do GlcA resulta na formação de um IdoA, realizada pela enzima C5-epimerase (Sasisekharan e Venkataraman, 2000; Taylor e Galo, 2006). Subseqüentemente, ocorre a *O*-sulfatação do C2 da molécula IdoA e a *O*-sulfatação do C6 e C3 da molécula GlcNAc. Diferentemente do HS, uma alta proporção de moléculas GlcNAc na heparina são *N*-sulfatados, além disso, os polissacarídeos são altamente *O*-sulfatados e apresentam uma alta taxa de IdoA em relação a GlcA. Resumidamente, a heparina é distinguida do HS por apresentar um maior grau de modificações (epimerização e sulfatação) (Lindahl e Kjellén, 1991; Nakato e Kimata, 2002; Taylor e Galo, 2006).

1.8. Proteoglicanos

Os proteoglicanos são proteínas glicosiladas complexas que contém uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados covalentemente ligadas a uma proteína central. As cadeias de polissacarídeos são inseridas na proteína central em uma região apresentando os aminoácidos serina ou treonina. Como descrito anteriormente, as moléculas de açúcares, que compõem os GAGs, não são inseridos diretamente na proteína central sendo necessária a participação de quatro monossacarídeos. Primeiramente, uma Xilosiltransferase insere uma xilose, seguido de duas galactoses e ácido glucurônico inseridos pela atividade de galactosiltransferases I e II e glucuroniltransferase, respectivamente (Silbert e Sugumaran, 2002; Taylor e Gallo, 2006) (Fig. 7). Após a formação do tetrassacarídeo, as moléculas de carboidrato serão inseridas por enzimas específicas determinando assim, o tipo de proteoglicano sintetizado.

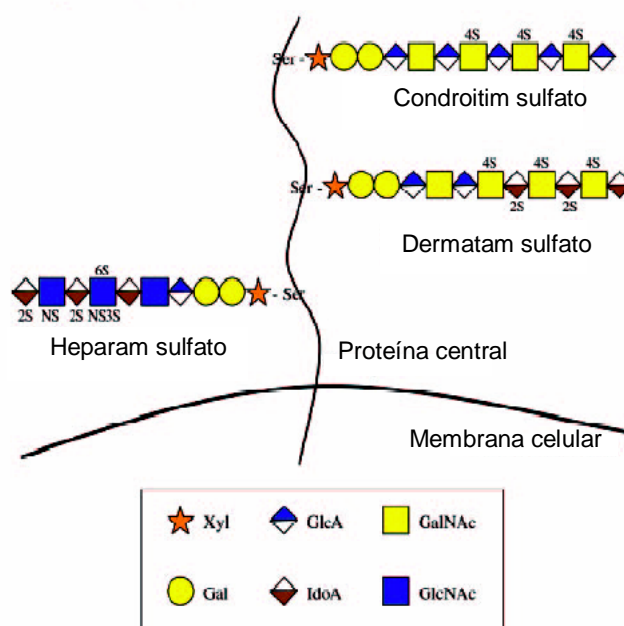


Figura 7. Esquema mostrando a ligação das cadeias de GAGs na proteína central para formação do proteoglicano. (Adaptado de Taylor e Gallo, 2006 do *FASEB Journal*).

cada GAG pode ser modificado por um padrão complexo de sulfatação, aumentando ainda mais esta heterogeneidade dos proteoglicanos. Assim, podemos definir os proteoglicanos como um grupo diversificado de glicoproteínas altamente glicosiladas cujas funções são mediadas tanto pelo núcleo protéico quanto pelas cadeias de GAGs (Hardingham e Fosang, 1992).

Os GAGs de heparam sulfato (HS) presentes na superfície celular estão envolvidos em diversos processos biológicos como adesão celular, proliferação, diferenciação, coagulação e metabolismo de lipídios (Bellin e cols., 2003). Sua atividade biológica pode ser demonstrada pela grande afinidade do HS para uma variedade de ligantes extracelulares (Carey, 1997, Lopes e cols., 2006). Os proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) são diversificados e podem pertencer à família dos sindecans (proteoglicanos transmembrana); dos glicicans (proteoglicanos ancorados à membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI)); ou dos perlecans, (proteoglicanos secretados na membrana basal) (Perrimont e Bernfield, 2000). A principal família de proteoglicanos presentes na superfície celular é a dos sindecans que carregam um número variável de cadeias de CS e HS em seu domínio extracelular, enquanto seu domínio intracelular interage com o citoesqueleto de actina (revisto por Lopes e cols., 2006). Os proteoglicanos são encontrados em diversos tipos celulares, em que atuam, junto com as integrinas, como receptores para colágeno, fibronectina e outras proteínas de matriz e também participam na transdução de sinal durante o processo de invasão de diferentes agentes patogênicos (revisto por Lopes e cols., 2006).

1.9. Papel de proteoglicanos sulfatados na invasão de patógenos intracelulares

Proteoglicanos sulfatados são moléculas amplamente exploradas por diversos microorganismos patogênicos durante o processo de adesão e invasão de células do hospedeiro, uma vez que estes se encontram expostos em grandes quantidades na superfície das células alvo. O vírus da imunodeficiência humana (HIV), por exemplo, apresenta uma proteína do envelope viral gp120 capaz de interagir com heparam sulfato, sugerindo fortemente que esta molécula possa desempenhar um importante papel no mecanismo pós-adesão (Vivès e cols., 2005). Heparan sulfato

também está envolvido no processo de adesão e infecção pelo vírus da febre amarela e o vírus do Dengue tipo 2 (Germi e cols. 2002). Além disso, proteoglicanos de heparam sulfato também estão envolvidos nas etapas de reconhecimento durante o processo de invasão de bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Orientia tsutsugamushi*, como demonstrado por experimentos utilizando GAG liases e linhagens celulares mutantes deficientes em proteoglicanos (Alvarez-Dominguez e cols., 1997; Ihn e cols., 2000; Plotkowski e cols., 2001).

Não só vírus e bactérias, mas diversos protozoários também reconhecem proteoglicanos de superfície durante a interação com a célula hospedeira. A adesão de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* a macrófagos apresentou uma redução de 60% após pré-tratamento dos parasitos com heparina, sugerindo a presença de uma proteína com afinidade para heparina na superfície de amastigotas que poderia interagir com proteoglicanos de células de mamíferos (Love e cols., 1993). Uma redução nos índices de invasão foi evidenciada durante a interação de *Toxoplasma gondii* e células de ovário de hamster deficientes na síntese de heparam sulfato e heparina (Ortega-Barria e Boothroyd, 1999). Além disso, Carruthers e cols (2000), sugeriram que diferentes proteoglicanos sulfatados, incluindo heparina, heparam sulfato e condroitim sulfato, são capazes de reduzir a mobilidade do parasito ao substrato e também reduz a adesão do *T. gondii* a uma variedade de linhagens celulares do hospedeiro, tais como células monocíticas, endoteliais, epiteliais, macrófagos e fibroblastos.

Heparam sulfato e condroitim sulfato são predominantemente expressos na superfície de cardiomiócito, entretanto apenas proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) estão envolvidos no processo de invasão de cardiomiócitos por formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Calvet e cols., 2003), possivelmente via a glicoproteína penetrina. Penetrina, é uma glicoproteína de 60 kDa descrita na superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, capaz de promover a adesão e penetração do parasito em células de mamífero através da sua associação com heparina, heparam sulfato e colágeno do tipo I e IV (Ortega-Barria e Pereira 1991). Estudos demonstraram que a penetrina pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de agentes que bloqueiam os eventos de adesão do parasito com a célula hospedeira (Ulrich e cols. 2002).

Assim, sendo o reconhecimento celular uma etapa crucial durante a invasão de patógenos, neste estudo nos propusemos a caracterizar a proteína de superfície do *T. cruzi* com afinidade por heparina e determinar a natureza do domínio de ligação do HS reconhecido pelo ligante do parasito, contribuindo para o entendimento do mecanismo de invasão do parasito a fim de gerar informações que possam ser aplicadas em estudos farmacológicos.

OBJETIVOS

Objetivos:

1. Investigar o perfil de proteínas presentes nas três formas evolutivas do *T. cruzi*, com propriedades de se ligação a glicosaminoglicanos sulfatados das células do hospedeiro;
2. Isolar polipeptídios de formas epimastigotas e tripomasigotas do *T. cruzi* com propriedade de ligação à heparina;
3. Determinar algumas características bioquímicas e físico-químicas dos polipeptídios com afinidade à heparina;
4. Complementar estudos anteriores sobre a participação de proteoglicanos sulfatados no processo de reconhecimento e invasão do *T. cruzi* em cardiomiócitos, investigando o papel de heparina e queratam sulfato neste processo;
5. Determinar a natureza do domínio de heparam sulfato envolvido no processo de invasão de cardiomiócitos pelo *T. cruzi*.

***MATERIAL E
MÉTODOS***

3.1. Cultura primária de células musculares cardíacas

Células musculares cardíacas foram isoladas de embriões com 18 dias obtidos de camundongos Suíços (Meirelles e cols., 1986). Fêmeas grávidas de camundongos Suíços foram eutanasiadas com dióxido de carbono (CO₂) em câmara mortuária. Após assepsia com álcool 70%, os animais foram transferidos para câmara de dissecação e fixados na placa de contenção (placas de cortiça) com a região ventral para cima. Em seguida, a pele foi removida, expondo a cavidade peritoneal, e o útero, com cerca de 7 a 12 embriões, foi transferido para placa de Petri (100x15mm) contendo solução de Ringer (NaCl 154 mM, KCl 56 mM, Na₂HPO₄ 17 mM, pH 7,0). Em cabines de biossegurança NB2, os embriões foram retirados do útero, decapitados e seus corações removidos após incisão do esterno. Os corações foram transferidos para placa de Petri (35X10 mm) contendo solução de Ringer e mantidos no gelo para minimizar o processo de autólise. Após a lavagem dos corações em solução de Ringer, etapa essencial para remoção do excesso de hemácias, o átrio foi descartado e o ventrículo fragmentado com auxílio de bisturi. O tecido fragmentado foi transferido para Erlenmeyer contendo barra magnética e lavado em solução de Ringer por 5 minutos (min) a 37°C sob agitação. Em seguida, o material foi lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM, Na₂HPO₄ 6,4 mM, pH 7,4) e submetido à dissociação enzimática seqüencial, utilizando tripsina 0,025% e colagenase 0,01% em PBS. Os sobrenadantes das dissociações foram recolhidos e a atividade enzimática inativada pela adição de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 25% de soro fetal bovino (SFB). Após completa dissociação do tecido cardíaco, o número de células isoladas/mL foi determinado pela quantificação em câmara de Neubauer utilizando Microscópio óptico Zeiss equipado com contraste de fase e objetiva de 40X. Posteriormente, as células foram plaqueadas, na densidade de 10⁵ células/poço, em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro previamente revestidas com gelatina 0,01%. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com SFB 5%, extrato embrionário 4%, CaCl₂ 2,5 mM, L-glutamina 1 mM e antibióticos (penicilina e estreptomicina). O meio nutritivo foi trocado a cada 2 dias. A infecção das culturas de cardiomiócitos foi

realizada após 24hs de cultivo. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (Protocolo CEUA 230-04)

3.2. Linhagens celulares

As culturas de células Vero, uma linhagem celular proveniente de rim de macaco verde africano (Hay e cols., 1992), foram mantidas em nosso laboratório para obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (clone Dm28c).

Ao alcançar confluência, células Vero cultivadas em frascos de cultura (150 cm²) foram lavadas em PBS e incubadas em solução de PBS contendo tripsina 0,01% e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,01%, pH 7,2. Após 2 a 3 min de atividade enzimática a 37°C, as células dissociadas foram recolhidas em meio RPMI 1640 suplementado com SFB 5% e L-glutamina 1 mM. Após determinação do número de células/mL, o plaqueamento foi efetuado na densidade de 3 x 10⁶ células por frasco de cultura (150cm²). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e o meio nutritivo trocado a cada 2 dias.

Ao atingir cerca de 70% de confluência, as culturas foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, na relação de 5:1 parasita/célula.

3.3. Trypanosoma cruzi

3.3.1. Formas tripomastigotas e amastigotas derivadas de cultivo celular

Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, foram obtidas de culturas de células Vero infectadas. Culturas de célula Vero semi-confluentes foram infectadas com 15 x10⁶ tripomastigotas. Em virtude da alta infectividade do *T. cruzi*, clone Dm28c, os ensaios de infecção foram realizados em presença de baixa relação parasita-célula hospedeira, permitindo a liberação de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 4 dias de infecção. Assim, as formas tripomastigotas livres no sobrenadante das culturas infectadas foram removidas e centrifugadas a 2000 g por 15 min. O sedimento contendo os parasitas foi ressuspenso em DMEM e o número de parasitas/mL determinado pela quantificação em câmara de Neubauer. Para a obtenção de proteínas totais (método de extração pelo Triton X-100) e hidrofóbicas

(método de extração pelo Triton X-114) foram processados 10^8 e 2×10^{10} tripomastigotas, respectivamente, por ensaio bioquímico.

Após 7 a 10 dias de infecção, formas amastigotas, liberadas pela ruptura de células Vero altamente infectadas, foram recolhidas do sobrenadante da cultura e separadas de “debris” celulares por centrifugação diferencial (100 g por 10 min). O sobrenadante contendo os parasitas foi recolhido e centrifugado a 1500 g por 15 min. O sedimento contendo os parasitas foi lavado em PBS, o número de parasitas/mL determinado pela quantificação em câmara de Neubauer e após centrifugação a 1500 g por 15 min os parasitas (10^9) foram processados para extração de proteínas totais.

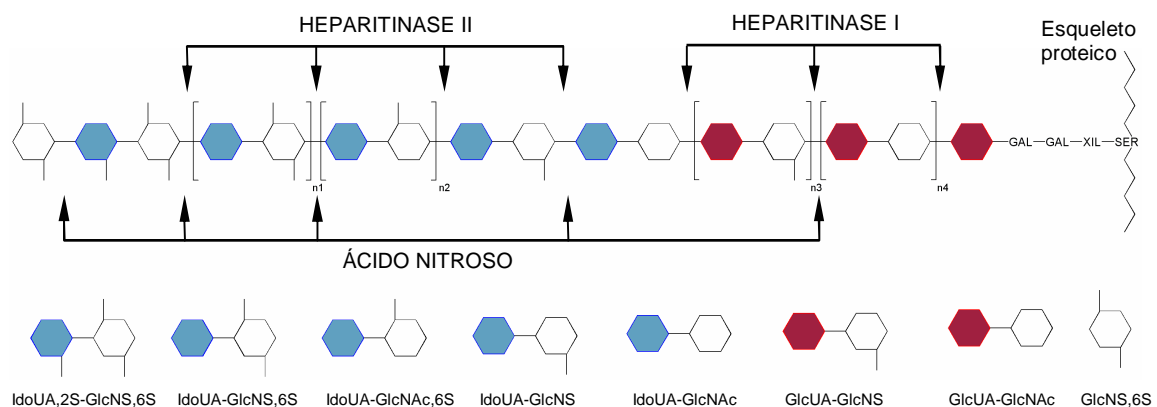
3.3.2. Formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, clone Dm28c, foram cultivadas segundo Camargo (1964). Os parasitas foram mantidos a 28°C em frascos de cultura (25 cm²) contendo 40 mL de meio LIT (Extrato de levedura 1,5%, Fosfato dibásico de sódio 1,15%, Glucose 0,22%, Hemina 0,002%, Infusão de fígado 0,5%, KCl 0,04%, NaCl 0,44%, triptose 0,5%, pH 7,2) suplementado com SFB 10%. O repique dos parasitas foi efetuado periodicamente de 4 em 4 dias na densidade de 10^6 parasitas/mL, sendo também controlado o aspecto morfológico e possíveis contaminações por fungos ou bactérias por microscopia óptica de contraste de fase. Para extração de proteínas hidrofóbicas, o cultivo de formas epimastigotas foi amplificado para um volume final de 2,5L, obtendo-se um total de 10^{11} parasitas. Proteínas totais foram obtidas de uma massa de 10^9 parasitas.

3.4. Ensaio de competição

Para investigar a participação de glicosaminoglicanos (GAGs) no processo de invasão do *T. cruzi* em cardiomiócitos, formas tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, derivadas de células Vero foram lavadas em DMEM e pré-tratadas por 1h a 0°C com 20 µg/mL de GAGs solúveis em meio DMEM suplementado com 0,5% de soro albumina bovina (BSA). O ensaio de competição foi realizado com Queratam sulfato (D-galactose e N-acetil D-glucosamina), heparina (ácido D-glucurônico ou L-

idurônico e *N*-sulfo D-glucosamina) ou fragmentos sulfatados e acetilados de heparam sulfato obtidos pela ação de heparitinase I (domínio *N*-sulfatado) e II (domínio *N*-sulfatado/*N*-acetilado) e pelo tratamento com ácido nitroso (domínio *N*-acetilado) (Esquema 1). Heparam sulfato, queratam sulfato e heparina foram obtidos de pâncreas bovino, córnea bovina e mucosa intestinal bovina, respectivamente. Todos os GAGs foram gentilmente cedidos pela Dra Leny Toma do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).



Esquema 1. Fragmentos de Heparam sulfato gerados a partir do tratamento da molécula com Ácido nitroso, Heparitinase I e II.

As culturas de cardiomiócitos crescidas em lamínula de vidro (\varnothing 13mm) foram infectadas com tripomastigotas pré-tratados com GAGs na proporção de 20:1 parasita/célula hospedeira e a interação interrompida após 2 hs a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após interação em presença de meio contendo GAG, as culturas foram lavadas em PBS, fixadas por 5 min à temperatura ambiente em solução de Bouin (75 ml de solução aquosa de ácido pícrico 1,2%, 25 ml de formalina (40% formaldeído) e 5 ml ácido acético glacial) e coradas pelo Giemsa para determinação do índice de infecção. Como controle, as formas tripomastigotas foram incubadas por 1h a 0°C em DMEM suplementado com BSA 0,5% na ausência de GAGs e a interação realizada como descrito anteriormente. Todos os ensaios experimentais (número de ensaios ≥ 3) foram realizados em duplicata. O percentual de infecção foi determinado pela quantificação randômica de 200 células por lamínula ao microscópio óptico utilizando objetiva de 63X.

3.5. Ensaio para remoção da sulfatação

Para investigar o papel da carga negativa de GAGs durante o processo de invasão do *T. cruzi*, culturas de cardiomiócitos foram tratadas com 25 mM, 50 mM e 75 mM de clorato de sódio em meio DMEM suplementado com BSA 0,5% por 16hs a 37°C. Após o tratamento, as culturas de cardiomiócitos foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* na proporção de 20:1 parasitas/célula hospedeira, sendo o clorato de sódio mantido durante todo o processo. Após 2hs de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, as culturas foram lavadas em PBS, fixadas por 5 min à temperatura ambiente em solução de Bouin e coradas pelo Giemsa para determinação do índice de infecção. Todos os ensaios experimentais (≥ 3 ensaios) foram realizados em duplicata. O percentual de infecção foi determinado pela quantificação randômica de 200 células por lamínula ao microscópio óptico utilizando objetiva de 63X.

3.6. Coloração pelo Giemsa

Culturas de cardiomiócitos infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, tratados ou não com GAGs solúveis ou clorato de sódio foram lavadas em PBS e fixadas com solução de Bouin

Após fixação, as células foram lavadas em álcool 70% até a completa remoção do fixador. Em seguida, lavadas em água (H₂O) destilada e coradas por 40-60 minutos à temperatura ambiente com solução aquosa de Giemsa diluído 1/10. Após remoção do corante com H₂O destilada, as células foram desidratadas e clarificadas em solução contendo acetona-xilol em série decrescente de acetona (100% - 30%) e crescente de xilol (30% - 100%). Posteriormente, as lamínulas foram montadas em Permount sobre lâminas de microscopia e observadas ao microscópio óptico Zeiss Axioplan.

3.7. Análise estatística

O Teste-T foi utilizado para determinar se as diferenças entre os valores dos percentuais de infecção dos ensaios de competição foram significantes ($p \leq 0,05$). Os dados foram obtidos de 3 ensaios experimentais realizados em duplicatas.

3.8. Marcação radioativa

Formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, foram incubadas por 30 minutos a 28°C em meio RPMI 1640 (Sigma) livre de metionina. Posteriormente, 100 μ Ci de Metionina-³⁵S (Met-³⁵S) foi adicionado ao meio RPMI e os parasitas submetidos a marcação metabólica por 2hs a 28°C. Após incubação com Met-³⁵S, o meio foi suplementado com 10% de SFB e os parasitas incubados por 30 min em estufa a 28°C. Em seguida, os parasitas foram lavados em PBS 0,1M contendo SFB 1%, seguido de 2 lavagens consecutivas em PBS. As proteínas foram, então, extraídas em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 contendo 2% de Triton X-114 e inibidores de proteases como descrito no item 3.9. Em seguida, as proteínas hidrofóbicas foram aplicadas em coluna de afinidade à heparina como descrito no item 3.11 e as frações obtidas das diferentes concentrações de NaCl foram monitoradas em contador de emissão β (Liquid Scintillation Analyser, 1600TR – Packard) e separadas em gel de poliacríamida (SDS-PAGE) como descrito no item 12.

3.9. Obtenção de extrato celular

O método de extração pelo Triton X-114 foi utilizado como estratégia para separação de proteínas hidrofóbicas. Um total de 10^{11} e 2×10^{10} formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, respectivamente, foram lavados em PBS e extraídos com Triton X-114 a 2% em solução tampão de 150 mM NaCl, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, acrescido de inibidores de protease, [Orto-fenantrolina 10mM, pepstatina 1 μ M, L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino) butano (E64) 10 μ M, fluoreto de fenilmetil-l-sulfonil (PMSF) 1mM]. Em seguida, o extrato protéico foi centrifugado a 10.000g por 50 min a 4°C, para retirada da fração insolúvel. A fração

solúvel foi recolhida e incubada por 15 min a 37°C e, posteriormente, centrifugada a 4.500g por 30 min à temperatura ambiente para formação da fase (Bordier 1981; Alves e cols., 1993). Após a formação das fases, a porção hidrofílica (fase superior) foi desprezada e a fração hidrofóbica (fase inferior) lavada três vezes com PBS, pH 7,2. Posteriormente, Triton X-100 (Sigma) 1 % (V:V / 10 minutos, 4°C) foi adicionado a fração hidrofóbica e o material acondicionado a -20°C. As amostras processadas desta forma foram utilizadas nos ensaio de cromatografia.

Aternativamente, as proteínas totais de epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas foram extraídas com Tris-HCl 10mM, pH 6,8 contendo 1% de Triton X-100, e inibidores de protease como descrito acima. Estas preparações foram utilizadas nos ensaios de *Western blotting* revelados com heparam sulfato, condroitim sulfato e heparina.

3.10 . Fracionamento subcelular

Para obtenção das proteínas de membrana plasmática, aproximadamente 10¹⁰ epimastigotas obtidos de cultivo axênico foram sedimentados a 1500 g por 10 minutos a 4 °C. Os parasitas foram lavados (3X) em PBS, pH 7,2 e sedimentados a 1500 g por 10 minutos a 4 °C. O peso do sedimento foi determinado pelo cálculo do peso total subtraído do peso do tubo, alcançando assim, o valor da massa úmida. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de tampão Tris-HCl 10mM pH 7,5 com 50 mM de sacarose por grama de massa úmida, sendo deixado em repouso por 20 minutos no gelo. Decorrido o tempo de repouso, foi acrescentado 1 ml de Lubrol (Sigma) 10% (detergente não iônico) por grama de massa úmida. Posteriormente as células foram rompidas com auxílio do homogenizador Dounce (Konter Glass) por 15 minutos no gelo, as etapas do rompimento foram observadas ao microscópio de luz. A condição isotônica foi ajustada acrescentando 0,4M de sacarose em Tris-HCl 10mM pH 7,5 por grama de massa úmida. Para eliminação das células intactas e fragmentos, a solução contendo parasitas lisados foi centrifugada a 750 g por 90 segundos e o sobrenadante foi centrifugado a 5000 g por 10 minutos. Este sobrenadante foi então centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e o sedimento contendo a fração de membrana foi ressuspenso em 1ml de PBS pH 7,2. Da solução

final foi retirada uma alíquota (100µl) para determinar a quantidade de proteína pelo método de Lowry.

3.11. Dosagem de proteínas

As proteínas extraídas foram dosadas pelo método de Folin - Lowry (Lowry e cols., 1951) e BSA, 10 a 40 µg/mL, foi utilizado como curva padrão. Triplicata de alíquotas de cada amostra (5, 10 e 15µl) foram diluídas em q.s.p. 400µl de H₂O. Posteriormente, em cada tubo foram acrescentados 2mL da mistura reativa (hidróxido de sódio 0,1M, carbonato de sódio 0,18M, tartarato de sódio 0,02% e sulfato de cobre 0,01%). Após 10 min de incubação com a mistura reativa, 200µl de Follin Ciocateus (Merck) diluído 1:3 foi adicionado em cada amostra, e seguido de incubação por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as absorbâncias foram analisadas a 617nm em espectrofotômetro Beckman DU640 e a concentração protéica das amostras foi determinada com base na densidade óptica (DO) das amostras e da curva padrão obtida de BSA (estoque a 1mg/mL) nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL.

3.12. Cromatografia

3.12.1. Coluna de heparina-Sepharose

Para purificação do ligante da superfície do *T. cruzi* que reconhece heparam sulfato, frações hidrofóbicas de formas tripomastigotas e epimastigotas foram obtidas pela extração com Triton X-114, como descrito anteriormente. Primeiramente 6 mL da resina heparina-Sepharose (Amersham Biosciences) foi empacotada em uma coluna (6,0 cm x 1,2cm) e equilibrada com 100mL de PBS pH 7,2. Posteriormente, a resina foi transferida da coluna para um tubo cônico de 50 mL juntamente com a proteínas hidrofóbicas e incubada por 2hs no gelo sob agitação branda. Após incubação, a resina foi empacotada na coluna e as proteínas não ligadas foram removidas pela lavagem da coluna com PBS contendo glicerol 0,5% na proporção de 10X o volume da coluna. Em seguida, as proteínas adsorvidas à coluna de heparina foram eluídas em PBS, pH 7,2, contendo glicerol 0,5% em

diferentes concentrações de NaCl (0,25 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM; 3,0 mM), dosadas pelo método de Folin-Lowry e eletroforeticamente separadas em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As proteínas com afinidade para heparina foram concentradas em filtros Centriprep 10 (Millipore) e dialisadas contra tampão de equilíbrio (PBS, pH 7,2, contendo glicerol 0,5 %) para realização dos diferentes ensaios bioquímicos.

3.12.2. Coluna de DEAE

A coluna de DEAE-Sepacell (Sigma) foi devidamente empacotada e equilibrada com 10 mM de Tris-HCl pH 7,2 contendo glicerol 0,5% (tampão C). Após a adsorção das proteínas hidrofóbicas com afinidade à heparina, a coluna foi lavada com o tampão C e posteriormente, as proteínas foram eluídas em tampão fosfato, pH 7,2, contendo glicerol 0,5% e concentrações crescentes de NaCl (0,075 mM; 0,15 mM; 0,25 mM; 0,3 mM; 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM; 3,0 mM). Todas as etapas de cromatografia foram conduzidas a 4°C e a eluição das amostras monitoradas ao espectrofotômetro (280 nm).

3.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para isolar e caracterizar o ligante de heparina e heparam sulfato das formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28C), as proteínas extraídas por Triton X-114 e eluídas da coluna de afinidade foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrita por Laemmli 1970. O sistema de Mini-gel (BioRad) foi montado e adicionado o gel de poliacrilamida 12% (gel de corrida ou “running gel”) Em seguida, a solução do gel de corrida foi rapidamente aplicada entre as placas de vidro do sistema e cuidadosamente coberta com água destilada para tornar a superfície do gel linear e evitar a difusão de oxigênio no gel que dificulta a polimerização. Após completa polimerização do gel de corrida, a cobertura de água foi removida de sua superfície e a solução do gel de empacotamento (“stacking gel”) foi aplicada ao sistema, sendo cuidadosamente inserido o pente de teflon para evitar bolhas de ar. Após

polimerização, o pente de teflon foi removido e os poços lavados em água destilada para a remoção de poliacrilamida não polimerizada.

Após dosagem dos extratos celulares, 10 a 20 µg de proteína foram diluídos em tampão de amostra (Tris-HCl 80mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 12%; β mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,05%), sendo posteriormente fervidos por 3 minutos. É necessária a desnaturação completa das proteínas pela ação do calor e do β mercaptoetanol para que sua conformação não altere a corrida e a separação ocorra em função de suas massas moleculares. As proteínas foram então aplicadas no gel de empacotamento, juntamente com marcadores de massa molecular (SDS-6H; Sigma), constituído de miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa), permitindo a determinação das massas moleculares das proteínas com afinidade à heparina. Após a aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma voltagem constante de 100 V até que a linha de frente atingisse o final do gel de corrida. Em seguida, o gel de empacotamento foi descartado e as proteínas foram visualizadas pela coloração com azul de Coomassie R-250 [0,2 % (p/v) em metanol: ácido acético: água (4 : 1 : 5)]. A descoloração foi realizada utilizando-se a mesma concentração dos reagentes sem o corante. Alternativamente, o método de impregnação com prata foi usado para a revelação das proteínas (Gonçalves e cols., 1990). Alguns géis foram submetidos ao processamento para detecção de moléculas por *Western blotting*.

3.14. Western blotting

Para detecção de proteínas do *T. cruzi* com afinidade para glicosaminoglicanos sulfatados, as proteínas totais e hidrofóbicas de formas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas, previamente separadas por eletroforese, foram transferidas por 50 minutos para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM e metanol 10%, pH 8,3) utilizando um sistema semi-seco (Bio-Rad) com voltagem de 15V. Após a transferência, a membrana foi incubada por 16hs em PBS, pH 7,2, contendo 0,1% de Tween 20 e BSA 1% para bloqueio de reações inespecíficas. A membrana foi, então, incubada com 2µg/mL de diferentes GAGs (heparam sulfato, condroitin sulfato ou heparina)

conjugados à biotina. Após 4 lavagens em tampão de bloqueio a membrana foi incubada por 1h com extra-avidina conjugada com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:1000. Em seguida, a membrana foi lavada 6x por 5 minutos no tampão de lavagem (PBS + 0,1% de Tween 20), e revelado com Diaminobenzidina (DAB) 0,01% ou por quimiluminescência, usando o kit comercial (ECL - *Chemiluminescence Luminol Reagent* - Santa Cruz).

3.15 . Determinação das massas moleculares das proteínas

As massas moleculares das amostras resolvidas por SDS-PAGE foram calculadas por regressão linear da mobilidade relativa das proteínas padrão. Os géis corados secos e as membranas de *Western blotting* foram previamente digitalizadas e as imagens processadas pelo programa “imageMaster 1D scanner and software” e/ou programa “Gel-Pro analyzer 3.1”.

RESULTADOS

4.1. Identificação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* com afinidade a glicosaminoglicanos.

Inicialmente foi avaliada a presença de proteínas de *T. cruzi* com propriedade de ligação á GAGs sulfatados. Este estudo foi realizado com extrato total das três formas evolutivas do parasito (tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas); e as proteínas ligantes reveladas com GAGs conjugados a biotina em ensaios de *Western blotting*. Nossos resultados evidenciaram um perfil complexo de bandas com massas moleculares relativas variando entre 10 kDa a 160 kDa, revelados com heparina-biotina. Por outro lado, as revelações realizadas com HS- e CS-biotina indicaram a presença de um perfil mais simples de reconhecimento. Neste caso, nas preparações das três formas evolutivas de *T. cruzi* foi detectada a presença majoritária das bandas de 65,8 kDa e 59 kDa (Fig. 1).

4.2. Isolamento e caracterização parcial das proteínas do *T. cruzi* que se ligam à heparina.

Com a finalidade de isolar e caracterizar os ligantes de heparina presentes no *T. cruzi*, utilizamos como estratégia inicial a marcação metabólica com Metionina-³⁵S (Met-³⁵S) das formas tripomastigotas e epimastigotas associada ao método de extração com Triton X-114, seguida de cromatografia em coluna de heparina-Sepharose. Assim, as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, foram mantidas por 1h em meio deficiente em metionina seguido de incubação por 2h a 28°C em meio contendo 100 µCi de Met-³⁵S. Posteriormente, as proteínas foram extraídas pelo método de extração com Triton X-114 e a fração de proteínas hidrofóbicas aplicada em coluna de afinidade a heparina (heparina-Sepharose). Nossos resultados demonstram que as proteínas de tripomastigotas e epimastigotas com afinidade a heparina são preferencialmente eluídas em 0,5M e 1M de NaCl, respectivamente (Fig. 2). Os dados quantitativos dos ensaios de marcação metabólica sugerem que as formas tripomastigotas apresentam cerca de 1,3-2X mais ligantes de heparina do que as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Para determinar o perfil eletroforético das proteínas hidrofóbicas metabolicamente marcadas e com afinidade à heparina, as frações de proteínas

hidrofóbicas de tripomastigotas e epimastigotas obtidas da coluna heparina-Sepharose foram submetidas à separação eletroforética em gel desnaturante (SDS-PAGE). Duas bandas distintas de massa molecular de 65,8 kDa e 59,0 kDa foram identificadas nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* (Fig. 2A). Interessantemente, um perfil de eletroforese similar foi visualizado em frações protéicas de epimastigotas marcadas com Met-³⁵S e submetidas ao mesmo sistema de cromatografia (Fig. 2B).

Resultados similares foram obtidos com proteínas hidrofóbicas de tripomastigotas e epimastigotas (Fig. 3) isoladas em coluna de heparina-Sepharose e caracterizadas por SDS-PAGE. As colorações pelo azul de Coomassie (Fig. 3C e 3F) e pelo método de impregnação com nitrato de prata (Fig. 3D e 3G) evidenciaram um perfil distinto estando presentes as duas bandas com massas moleculares relativas de 65,8 kDa e 59 kDa em ambas as formas evolutivas; quando comparado ao complexo perfil das frações hidrofóbicas de ambos os parasitas (de 20 kDa a 120 kDa) (Fig. 3B e 3E). Além das análises em SDS-PAGE, as proteínas ligantes de heparina obtidas de tripomastigotas e epimastigotas foram analisadas em condições não desnaturante (gel nativo). Nossos resultados revelaram a presença de duas bandas majoritárias (setas) na fração de tripomastigotas (Fig. 4A) e epimastigotas (Fig. 4B) com migração eletroforética próxima ao anodo.

Um ensaio adicional de cromatografia em coluna de heparina-Sepharose foi realizado com proteínas da fração enriquecida de membrana de epimastigotas, onde as proteínas foram eluídas em concentrações crescente de NaCl (0,5 a 3,0M) e analisadas por SDS-PAGE. Os resultados também revelaram a presença de duas bandas majoritárias com massas moleculares de 65,8 kDa e 59 kDa, como observado na marcação metabólica de epimastigotas, eluídas principalmente com 1M de NaCl (Fig. 5A). Além disso, ensaios de *Dot blotting* utilizando heparina conjugada à biotina revelaram a presença deste ligante com afinidade à heparina na fração de membrana de epimastigotas (FM) e no extrato total de tripomastigotas e epimastigotas, mas não evidenciado na fração de proteínas não ligadas a coluna (Fig. 5B).

No curso deste trabalho, nos propusemos investigar se as proteínas hidrofóbicas isoladas por cromatografia de afinidade de ambas as formas

evolutivas ligavam-se especificamente à heparina e não apenas à resina (Sephrose) como observado por outros investigadores (comunicação oral do Dr. Giovani Salvatori de Simone). Assim, as proteínas hidrofóbicas eluídas da cromatografia de afinidade foram resolvidas em SDS-PAGE e reveladas por *Western blotting* com heparina, heparam sulfato (HS) e condroitim sulfato (CS) conjugados à biotina. Nossos resultados revelaram a presença das duas bandas majoritárias de 65,8 kDa e 59 kDa em ambas as formas evolutivas de *T. cruzi*, tripomastigotas e epimastigotas, nas preparações reveladas com heparina (Fig. 6A), HS (Fig. 6B) e CS (Fig. 6C), sendo a banda de 59 kDa mais intensamente revelada pelos glicosaminoglicanos-biotinilados.

Para analisar possíveis diferenças na carga destas duas proteínas hidrofóbicas presentes em ambas as formas de *T. cruzi*, tripomastigotas e epimastigotas, as frações enriquecidas por coluna de afinidade (heparina-sepharose) foram avaliadas quanto ao seu comportamento em coluna de troca iônica. Os dados obtidos da análise destas frações em coluna de DEAE celulose indicaram que as duas proteínas majoritárias podem ter cargas similares em ambas as formas de *T. cruzi* (Fig. 7 e 8), portanto não foi possível sua separação com esta metodologia. A análise por SDS-PAGE das frações obtidas da coluna indicam que as mesmas são eluídas em uma extensa faixa do perfil de eluição (Fig. 7 e 8), sendo que amostras mais homogêneas são obtidas em menor concentração (0,075M) de NaCl (Fig. 7 e 8).

4.3. Interação *Trypanosoma cruzi*-cardiomiócito: Reconhecimento celular.

4.3.1. Avaliação da participação de glicosaminoglicanos sulfatados no processo de invasão.

O modelo de cultura primária de células musculares cardíacas foi utilizado para determinar o papel de alguns glicosaminoglicanos sulfatados e de diferentes moléculas de heparam sulfato no processo de invasão do *T. cruzi* em cardiomiócitos, os quais representam um dos principais alvos da infecção *in vivo*. Além disso, a escolha do estoque de *T. cruzi*, clone Dm28c, foi baseada na capacidade deste parasita atingir altos índices de infecção (30-40%) em tempos

curtos de interação parasita-célula hospedeira (2h), sendo este fator essencial para a realização dos ensaios de competição com glicosaminoglicanos solúveis, uma vez que formas tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes de eliminar moléculas ligadas à sua superfície (Gonçalves e cols., 1991). Assim, o emprego deste modelo como ferramenta de estudo permitiu avaliar a participação de proteoglicanos sulfatados na interação *T. cruzi*-cardiomiócito.

Para investigar esta questão, formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular, clone Dm28c, foram pré-tratadas por 1h no gelo com diferentes GAGs solúveis purificados (20µg/ml), incluindo heparina, queratam sulfato e fragmentos sulfatados e acetilados de heparam sulfato, antes da interação com as células musculares cardíacas, sendo estes mantidos durante a interação. O tratamento com heparina, GAG constituído de ácido glicurônico e/ou idurônico e N-sulfo D-glicosamina com carga altamente negativa resultou em uma redução significativa do processo de invasão do parasita. A avaliação dos níveis de infecção revelou um decréscimo de 38% (controle) (Fig. 9A e 10) para 5,9% após o pré-tratamento de tripomastigotas com heparina ($p \leq 1,65 \times 10^{-6}$), representando uma inibição de 84,8% da invasão (Fig. 9B e 10). Em contraste, o pré-tratamento de tripomastigotas com queratam sulfato, GAG constituído de D-galactose e N-acetil D-glicosamina e também negativamente carregado não revelou alteração nos níveis de infecção, permanecendo similar ao controle (Fig. 9C e 10).

4.3.2. Mapeamento da região da molécula de heparam sulfato que participa do processo de invasão *T. cruzi*-Cardiomiócito.

Dados anteriores de nosso grupo demonstraram a participação de HS como molécula mediadora do processo de invasão do *T. cruzi* em cardiomiócito (Calvet e cols., 2003). Assim, neste estudo nos propusemos determinar o domínio da molécula de HS que participa efetivamente do reconhecimento parasita-célula hospedeira. Nossos ensaios de competição, onde formas tripomastigotas, clone Dm28c, foram pré-tratadas com 20µg/mL dos três diferentes fragmentos de HS, (domínios N-acetilado, N-sulfatado/N-acetilado e N-sulfatado), revelaram um declínio na infecção de cardiomiócitos após o tratamento dos parasitas com o fragmento N-sulfatado/N-acetilado. Os dados quantitativos demonstraram uma

redução significativa no índice de infecção, passando de 38% no controle (Fig. 9A e 10), tripomastigotas não tratados, para 21% ($p \leq 0,0031$) após incubação dos parasitas com o fragmento N-sulfatado/N-acetilado (Fig. 9F e 10), representando 45% de inibição da invasão. Por outro lado, o tratamento dos parasitas com os fragmentos integralmente N-acetilado (Fig. 9D e 10) ou N-sulfatado (Fig. 9E e 10) não revelou nenhum efeito inibitório na interação *T. cruzi*-cardiomiócito, apresentando índice de infecção similar ao controle.

Embora o tratamento dos parasitas com condroitim sulfato (Calvet e cols., 2003), fragmento N-sulfatado de HS e queratam sulfato não tenham revelado uma participação direta do sulfato no processo de invasão, o elevado efeito inibitório de heparina levou ao questionamento sobre o papel da sulfatação como modulador do reconhecimento entre o domínio de ligação de HS e a proteína com afinidade à heparina presente na superfície do parasita. Assim, para responder esta questão, as culturas de cardiomiócitos foram incubadas com diferentes concentrações de clorato de sódio por 16h e, em seguida, infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Após 2h de infecção as culturas sem tratamento (controles) apresentaram cerca de 38% de infecção (Fig. 11A e 12), enquanto as culturas tratadas com clorato de sódio nas concentrações de 25, 50 e 75 μ M atingiram 28%, 19,6% ($p \leq 0,007$) e 10% ($p \leq 0,014$) de infecção (Fig. 11 e 12,), respectivamente, representando uma inibição de 26%, 48,5% e 73,6% no índice de infecção.

kDa

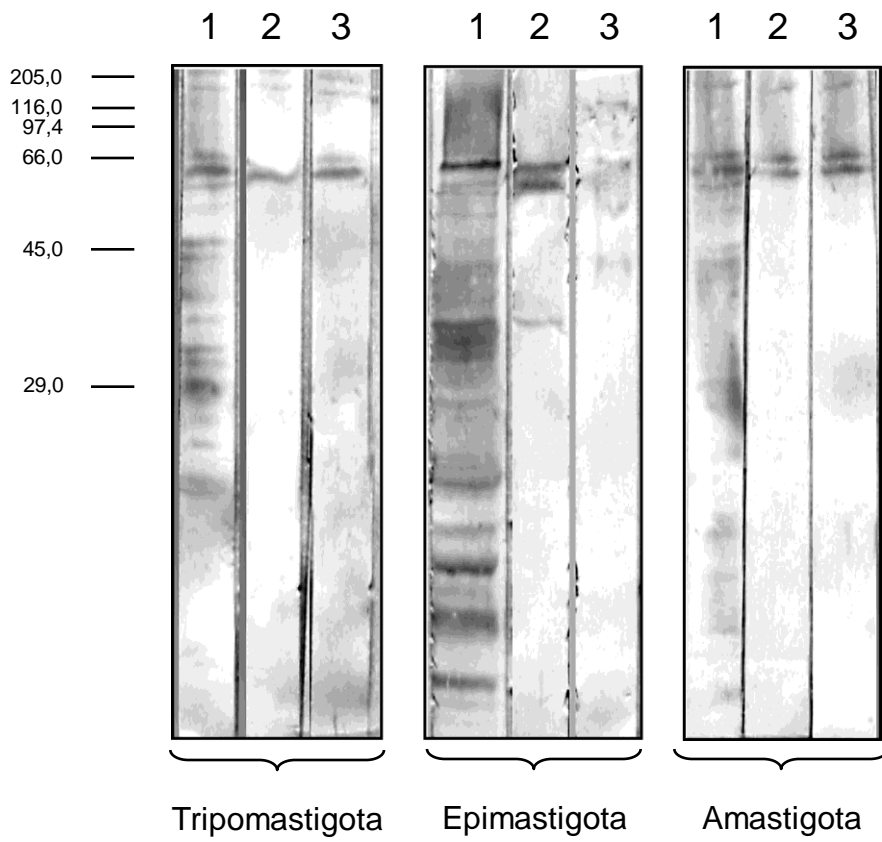


Figura 1 – Detecção de proteínas com propriedades de ligação a glicosaminoglicanos sulfatados nas 3 formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* por *Western blotting*. As proteínas totais de tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas separadas por SDS-PAGE foram incubadas com heparina (1), condroitin sulfato (2) e heparan sulfato (3) conjugados a biotina e reveladas com diaminobenzidina. Note a presença de duas bandas majoritárias com massa molecular de 65,8 kDa e 59 kDa nas diferentes formas evolutivas. Os valores das massas moleculares das proteínas padrão estão indicados na figura.

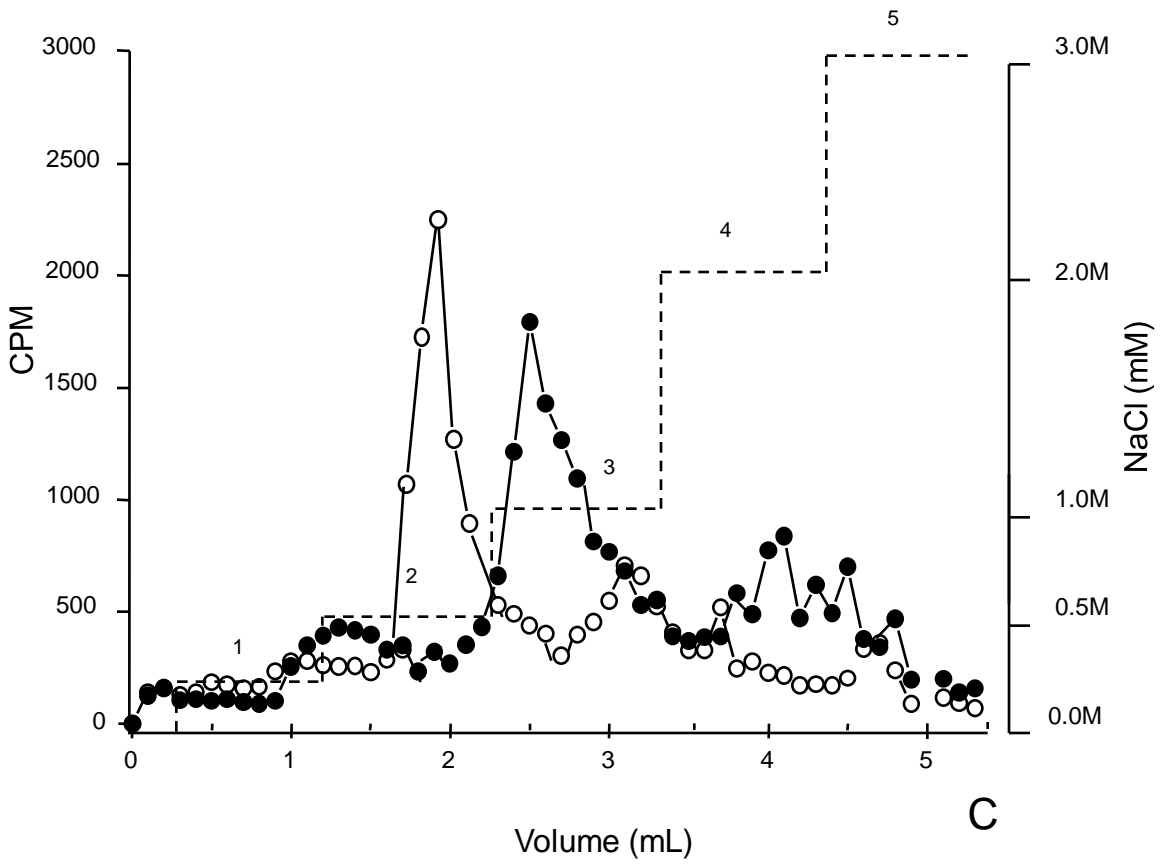
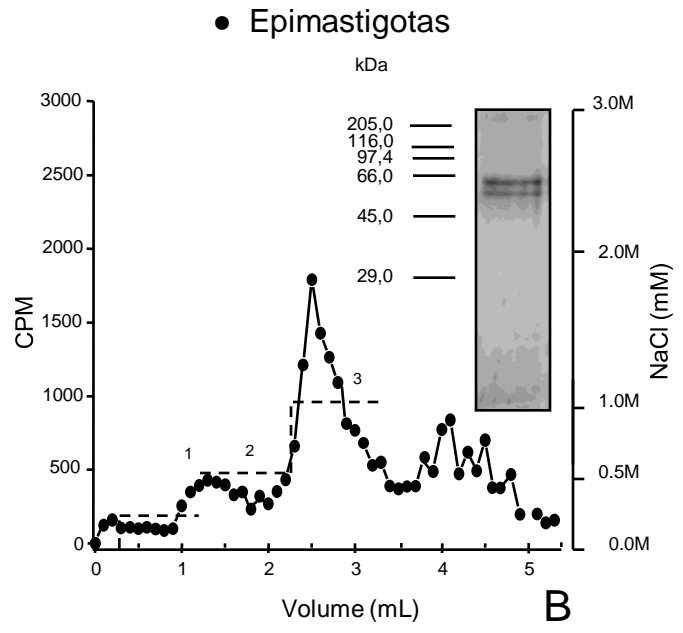
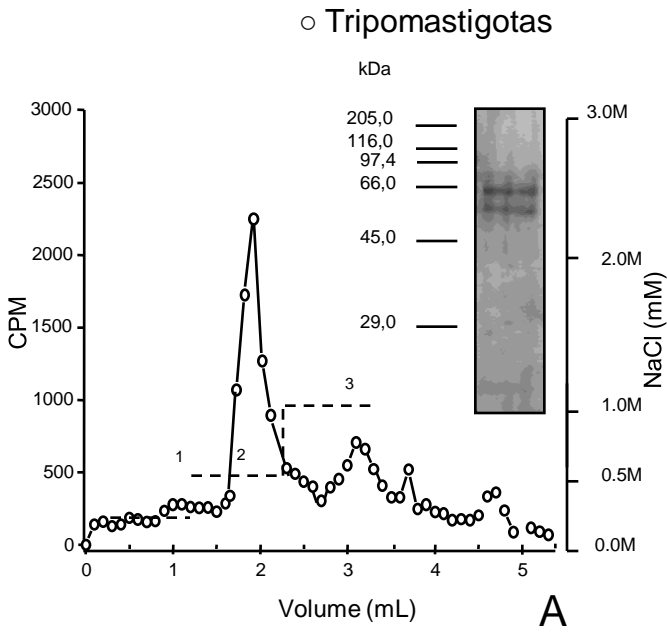


Figura 2. Cromatografia de afinidade das proteínas hidrofóbicas de *Trypanosoma cruzi* marcadas com metionina-³⁵S. As proteínas hidrofóbicas (92 300 cpm) de tripomastigotas () e epimastigotas () foram fracionadas em coluna de heparina-Sefarose. Após equilíbrio da coluna em PBS pH 7,2 contendo 0,5% de glicerol, as proteínas ligadas foram eluídas no mesmo tampão contendo diferentes concentrações de NaCl (de 0,5 a 3,0M), onde tripomastigotas e epimastigotas apresentaram picos de radioatividade de 23000 cpm e 19000 cpm, respectivamente (C). Os detalhes da figura indicam os perfis de proteínas isoladas desta coluna de tripomastigotas (A) e epimastigotas (B).

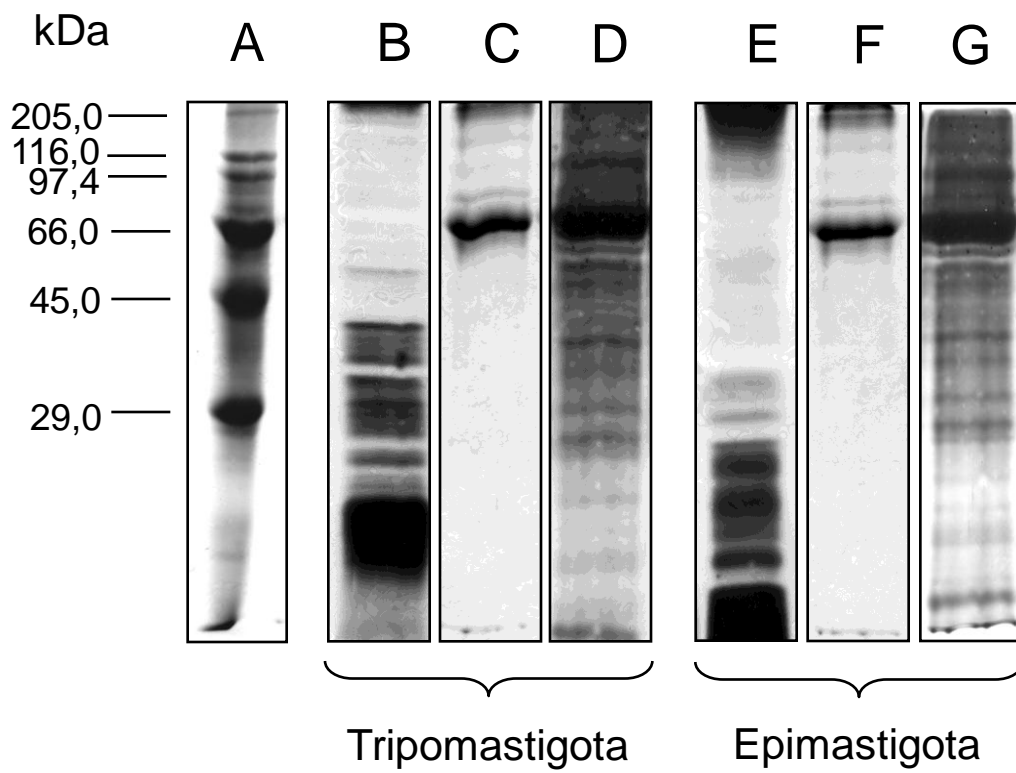


Figura 3. Ensaio de eletroforese das proteínas hidrofóbicas das formas tripomastigotas e epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Padrão de massa molecular (A). As frações, hidrofóbica total (B e E) e eluídas da coluna de heparina-Sepharose (C, D, F e G) foram analisadas por SDS-PAGE com redução. As preparações foram coradas pelo azul de Coomassie (C e F) e por impregnação com nitrato de prata (D e G). Tripomastigota (B, C e D); epimastigota (E, F e G). Os valores das massas moleculares das proteínas estão indicadas na figura.

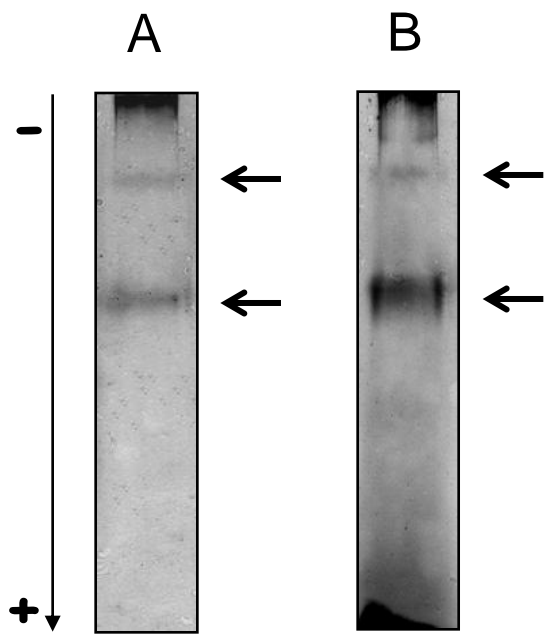
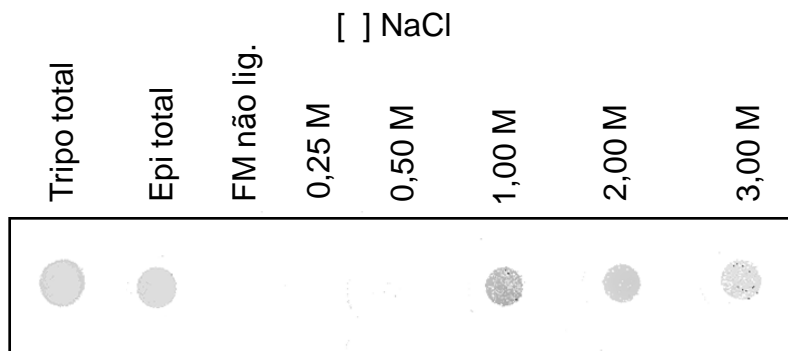
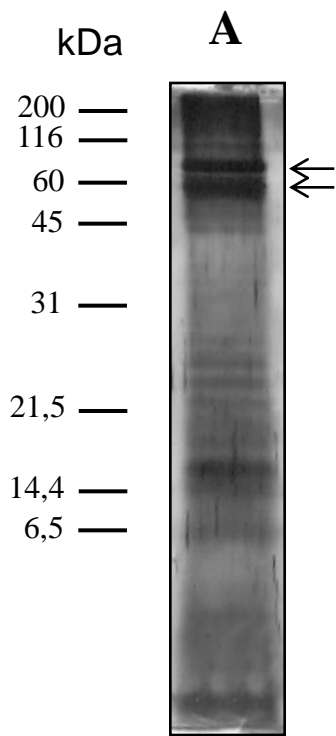


Figura 4. Ensaio de PAGE das proteínas hidrofóbicas das formas tripomastigotas e epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. As frações hidrofóbicas eluídas da coluna de heparina-Sepharose de tripomastigotas (A) e epimastigotas (B) foram analisadas por PAGE. As preparações foram coradas por impregnação com nitrato de prata. As setas indicam as proteínas majoritárias. O sentido da eletroforese (- → +) estão indicadas na figura.



B

Figura 5. Detecção de proteínas de membrana com afinidade à heparina de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Após o fracionamento sub-celular do parasito, a fração de membrana (FM) foi submetida à cromatografia em coluna de heparina-Sepharose, eluída em 1 mM de NaCl e analisada por SDS PAGE (A). A eluição da FM da coluna de heparina-sefarose, em diferentes concentrações de NaCl (B), foi revelada em ensaios de *Dot blotting* utilizando heparina conjugada à biotina e diaminobezidina. Os valores das massas moleculares (kDa) das proteínas padrão em SDS-PAGE estão indicadas na figura. As bandas de proteínas com massas moleculares de 68,5 kDa e 59 kDa (setas) foram identificadas na fração de membrana de epimastigotas (A). Intensa marcação com heparina-biotina foi observada na concentração de 1 M de NaCl, enquanto ligantes de heparina não foram revelados na fração de proteínas não ligadas (B).

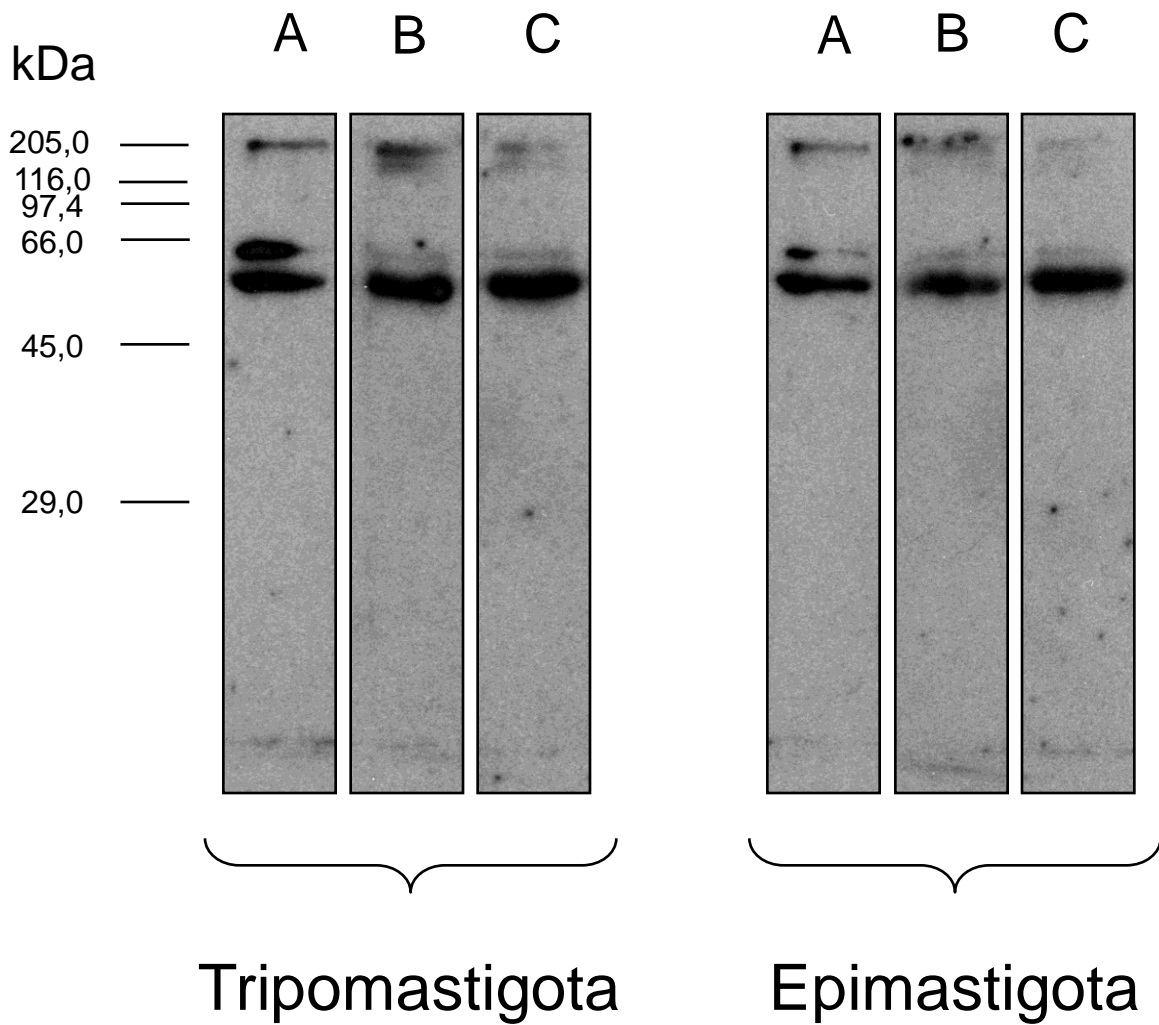


Figura 6 – Detecção por *Western-blotting* de proteínas de tripomastigotas e epimastigotas isoladas em coluna de afinidade. Após as cromatografias as frações foram resolvidas em SDS-PAGE e eletrotransferida para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram reveladas com 2 µg/mL de heparina (A), heparam sulfato (B) e condroitim sulfato (C) por quimioluminiscência. Note a intensa marcação da banda de proteína correspondente a 59 kDa. Os valores das massas moleculares das proteínas padrão estão indicadas na figura.

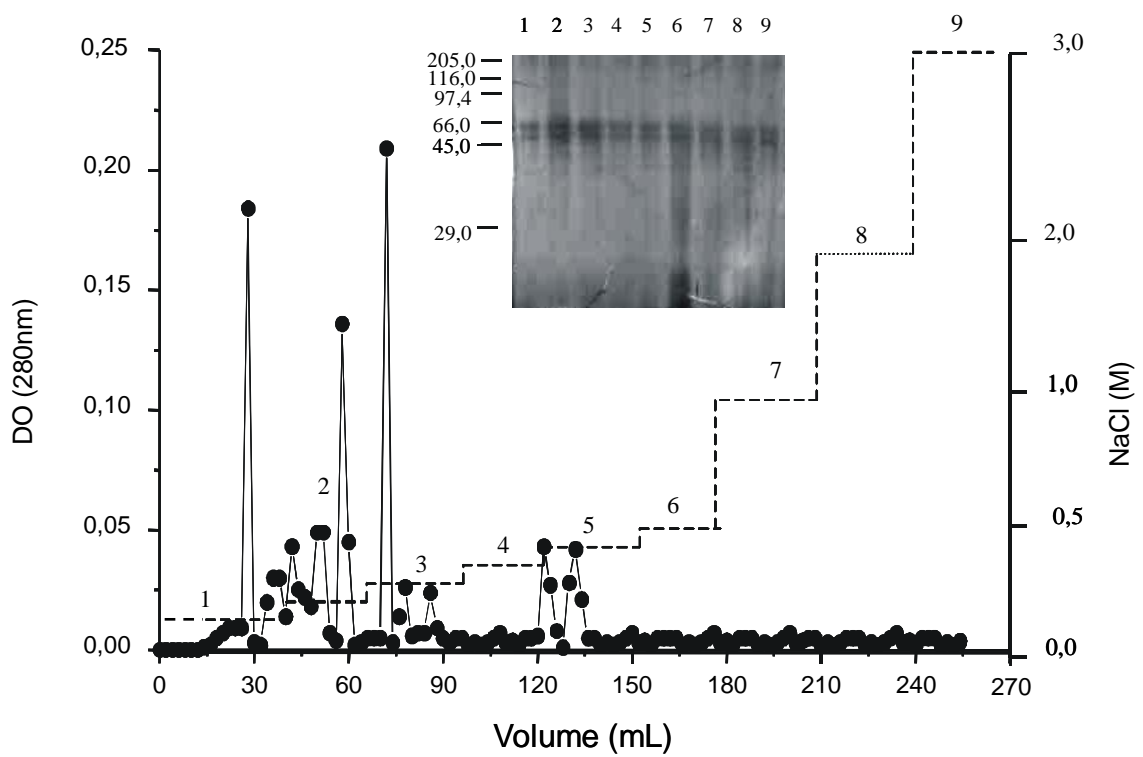


Figura 7: Cromatografia em troca iônica das proteínas hidrofóbicas de tripamastigotas que ligam à heparina. As amostras de proteínas foram aplicadas na coluna de DEAE (6,0cm x 1,2cm), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,2 contendo 0,5% de glicerol. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão em diferentes concentrações de NaCl e detectadas a 280nm (). Os números de (1-9) indicam as frações coletadas. O detalhe da figura indica a análise das frações por SDS-PAGE reveladas por nitrato de prata. Os valores das massas moleculares (kDa) das proteínas padrão estão indicadas na figura.

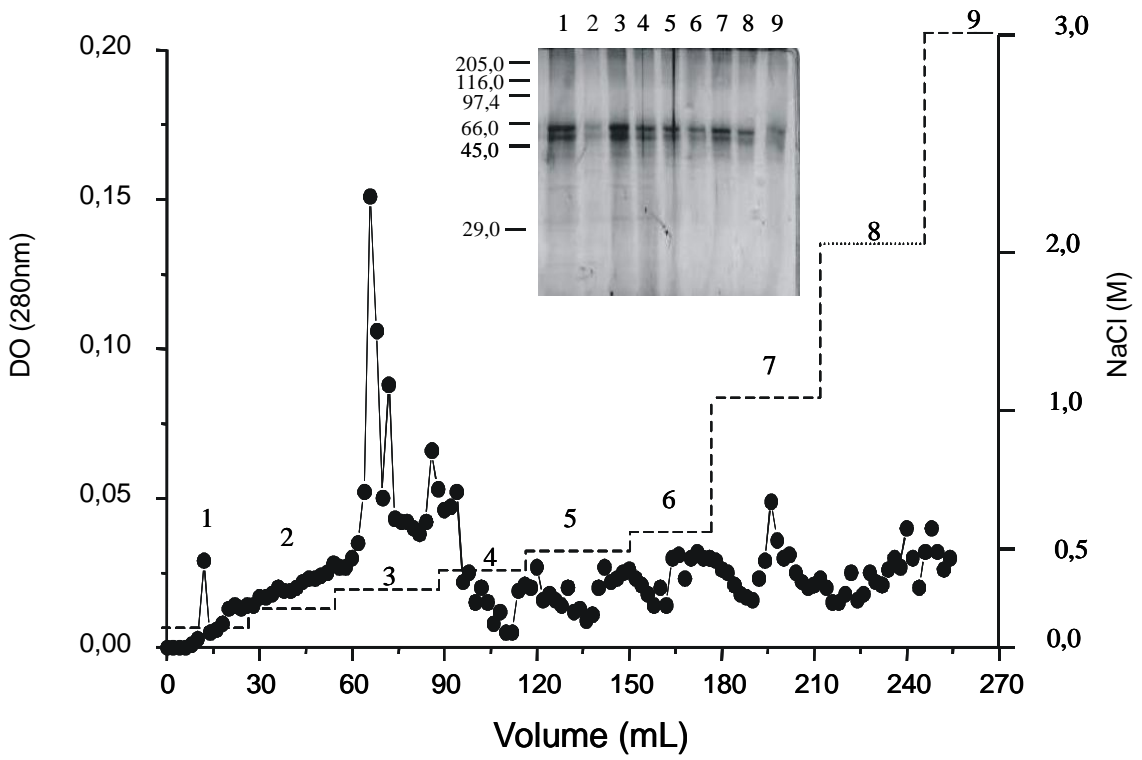


Figura 8. Cromatografia em troca iônica das proteínas hidrofóbicas de epimastigotas que ligam a heparina. As amostras de proteínas foram aplicadas na coluna de DEAE (6,0cm x 1,2cm), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,2 contendo 0,5% de glicerol. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão em diferentes concentrações de NaCl e detectadas a 280nm (). Os números de (1-9) indicam as frações coletadas. O detalhe da figura indica a análise das frações por SDS-PAGE reveladas por nitrato de prata. Os valores das massas moleculares (kDa) das proteínas padrão estão indicadas na figura.

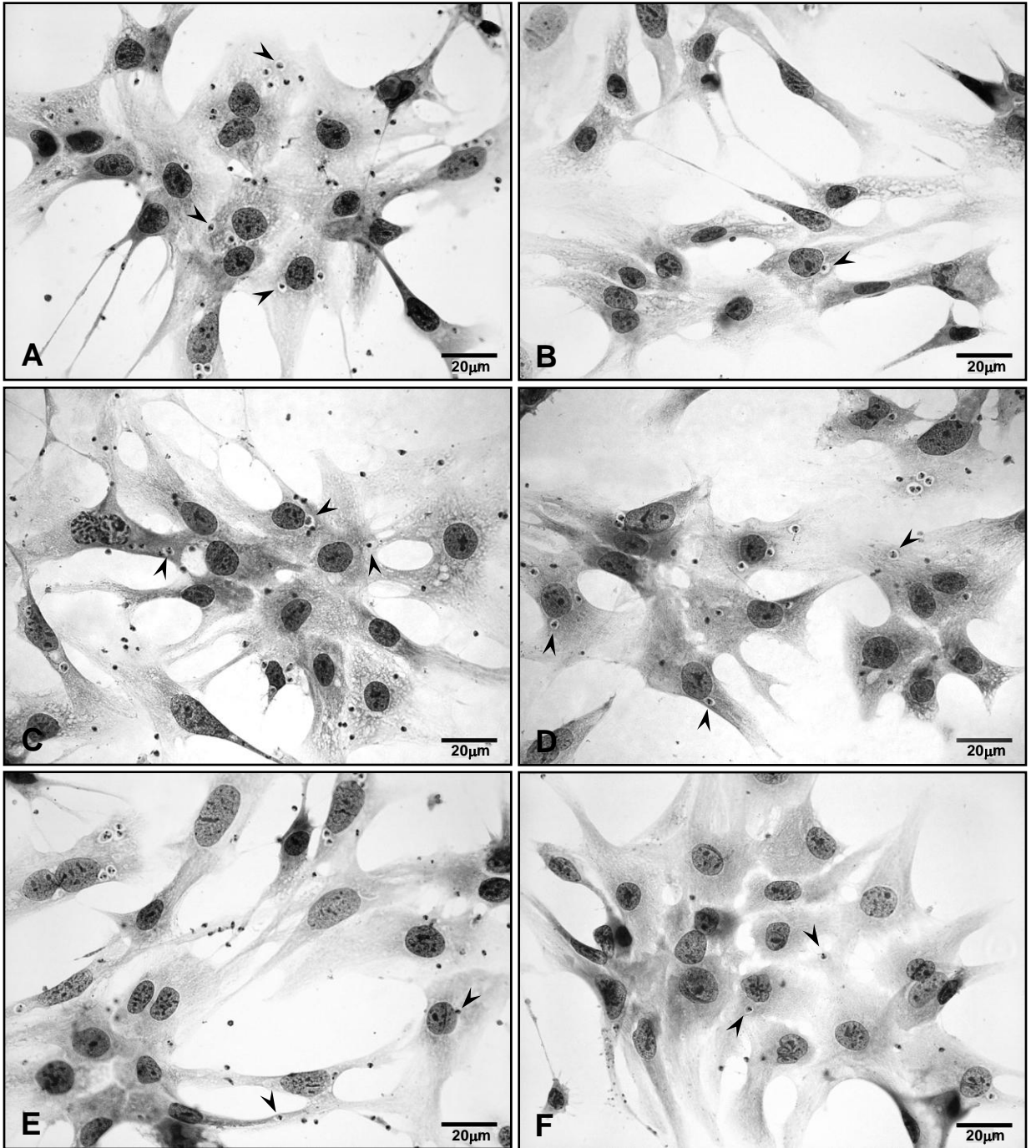


Figura 9 – Aspecto geral da cultura de cardiomiócito infectada com tripomastigotas de *T. cruzi* pré-tratados ou não com heparina, queratam sulfato e três diferentes fragmentos da cadeia de heparam sulfato. (A) Cardiomiócitos infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, por 2h (controle). (B) Células infectadas após o tratamento dos parasitas com 20 μ g/mL de heparina, (C) queratam sulfato, (D) fragmento N-acetilado (NA), (E) fragmento N-sulfatado (NS) e (F) N-acetilado/N-sulfatado (NA/NS). Uma drástica redução da infecção foi observada após o tratamento com heparina (B), enquanto queratam sulfato (C) não alterou o padrão de infecção das culturas. Dentre os fragmentos analisados, apenas o pré-tratamento de tripomastigotas com NA/NS reduziu a infecção de cardiomiócitos. As setas indicam os parasitos intracelulares. Barra = 20 μ m.

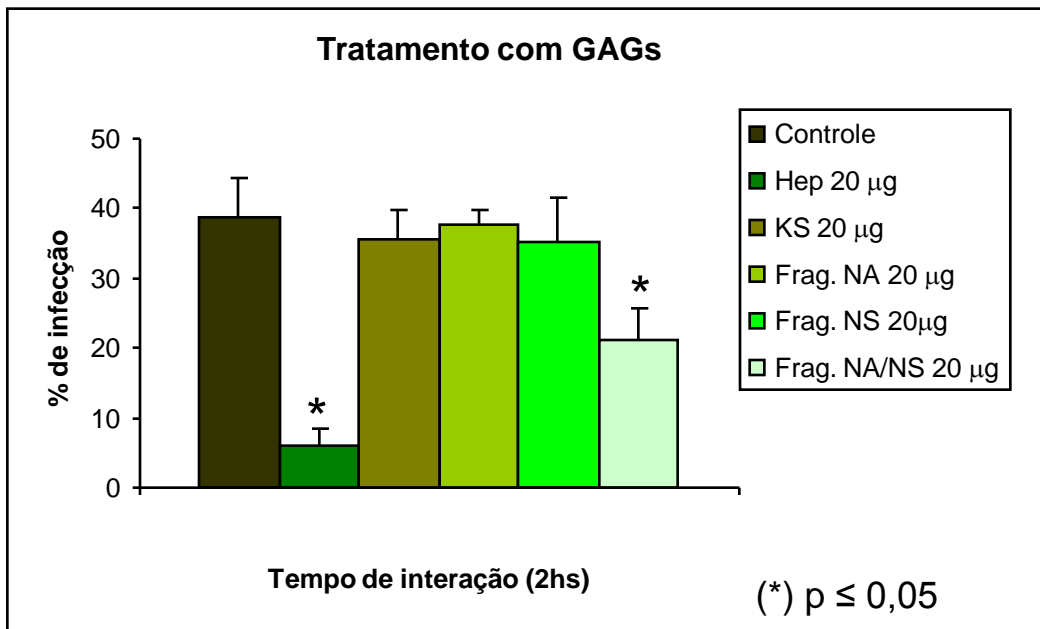


Figura 10 – Avaliação da participação de heparina, queratam sulfato e fragmentos N-acetilado (1), N-sulfatado (2) e N-acetilado/N-sulfatado (3) da cadeia de heparan sulfato (HS) no processo de invasão de *T. cruzi* em cardiomiócitos. O índice de infecção foi determinado em culturas de cardiomiócitos após 2 h de interação com parasitas tratados ou não com 20 µg/ml de GAGs. Alterações no índice de infecção são evidenciadas após tratamento dos parasitas com heparina e o fragmento NA/NS da cadeia de HS, alcançando índices de 5,9% e 21%, respectivamente, enquanto que no controle o índice de infecção foi de 38%. Queratam sulfato e os domínios NA e NS de HS não apresentaram efeito inibitório da invasão. (*) Student *t*-test $p \leq 0,05$.

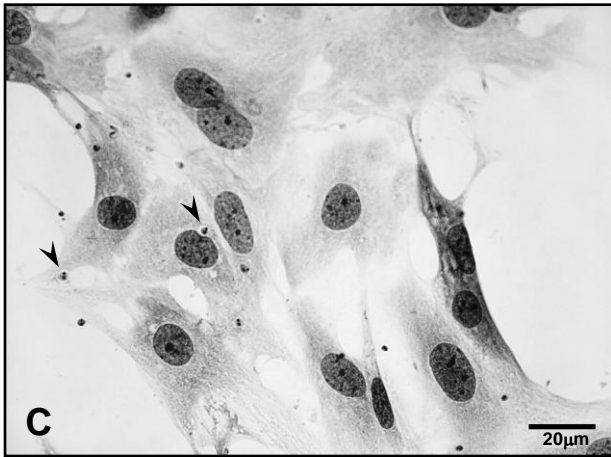
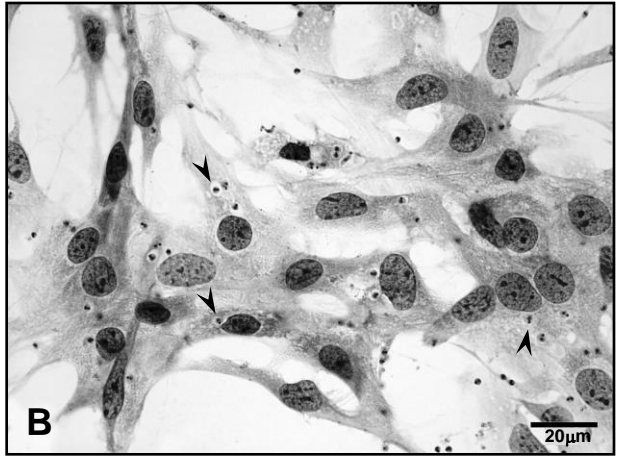
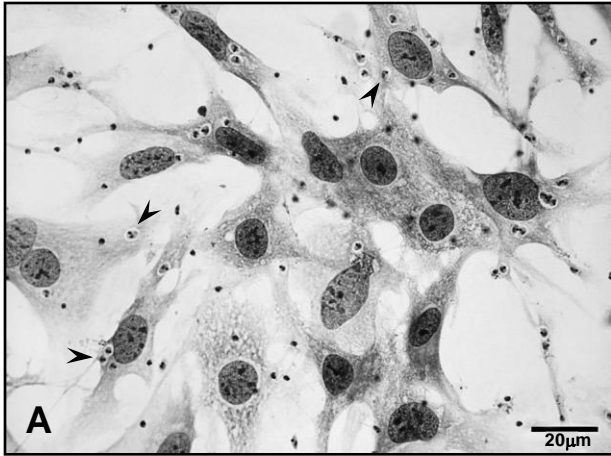


Figura 11 – Aspecto da interação *T. cruzi*-cardiomiócito após tratamento de cardiomiócitos com concentrações crescentes de clorato de sódio por 16 hs. (A) Cardiomiócitos infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c por 2h (controle). (B) Cardiomiócitos infectados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* após tratamento das células hospedeiras com 25mM, (C) 50 mM e (D) 75 mM de clorato de sódio. Note o distinto perfil de infecção nas diferentes concentrações de clorato de sódio. As setas indicam os parasitos intracelulares. Barra = 20 μ m.

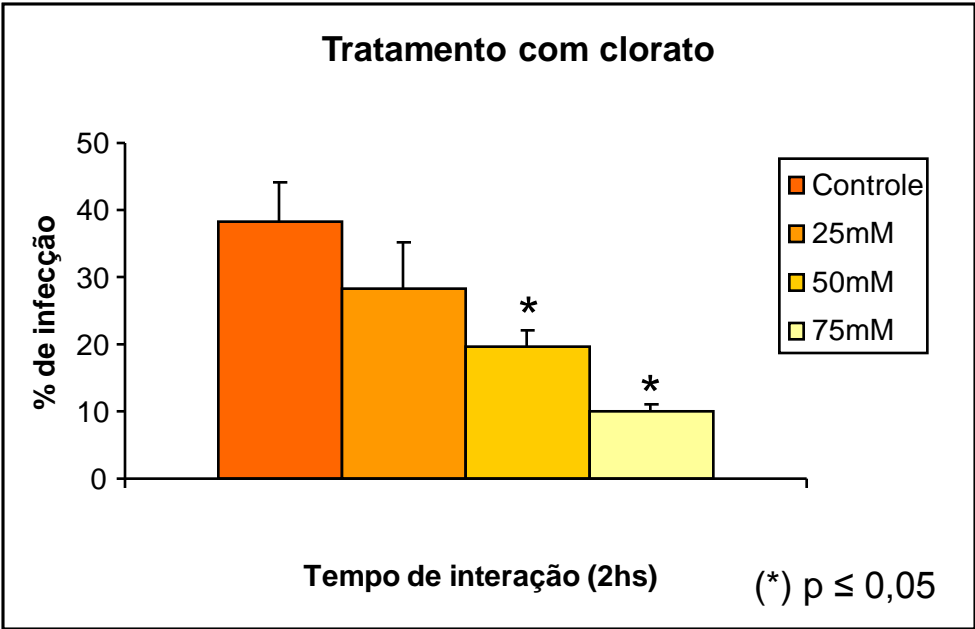


Figura 12 – Avaliação do índice de infecção das culturas de cardiomiócitos após tratamento com clorato de sódio. A redução da sulfatação na superfície de cardiomiócitos reduziu a invasão do *T. cruzi*, alcançando índices de infecção de 38% no controle para 28%, 19% e 10% após tratamento das culturas com 25 mM, 50 mM e 75 mM de clorato de sódio, respectivamente. (*) Student t-test $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

O reconhecimento de moléculas de superfície entre patógenos intracelulares e a célula alvo é essencial para disparar o processo de invasão e conseqüentemente, o estabelecimento da infecção. Os Proteoglicanos sulfatados, abundantemente expressos em células de mamíferos, têm sido descrito como uma classe de receptores envolvidos no processo de adesão e invasão de uma variedade de parasitas intracelulares (Carruthers e cols., 2000; Yan e cols., 2006; Tiwari e cols., 2006; Pradel e cols., 2002), incluindo o *Trypanosoma cruzi* (Calvet e cols., 2003; Ortega-Barria e Pereira, 1991). Evidências demonstraram a importante participação de proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) como moléculas mediadoras da invasão do *T. cruzi* (Calvet e cols., 2003; Ortega-Barria e Pereira, 1991) e seu potencial como alvo terapêutico (Ulrich e cols., 2002). Assim, neste estudo nos propusemos a (i) determinar algumas características bioquímicas da proteína de ligação à heparina presente na superfície do *T. cruzi*, (ii) avaliar o papel de outros proteoglicanos sulfatados no processo de invasão e (iii) determinar a natureza do domínio de ligação do PGHS com o ligante na superfície do parasita.

5.1. Caracterização de ligante(s) de heparina do *T. cruzi*.

Inicialmente, propusemos investigar o perfil de proteínas que ligam a glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados em extratos das três formas evolutivas do *T. cruzi* por *Western blotting*. Neste tipo de ensaio foi possível confirmar a presença de tais proteínas e informar sobre suas massas moleculares, que apresentou um perfil de 65,8 kDa e 59 kDa após revelação com HS-biotina e CS-biotina, enquanto um perfil mais complexo de bandas foi evidenciado com heparina-biotina (160 kDa a 10 kDa). Alguns fatores podem ter contribuído para estes perfis de ligação dos GAGs a mais de uma banda de proteína do parasito. Sabe-se que a heparina tem propriedades físico-químicas de ligação com ectoquinases e substratos que são normalmente fosforilados pelas proteínas quinases *in vivo* (Mukhopadhyay e cols., 1989). Além disso, a elevada carga negativa desta molécula conferida pelo alto grau de ácido idurônico (IdoA) (Lindahl E Kjellén, 1991), pode ter favorecido este perfil mais complexo de bandas.

Embora existam fortes indícios sobre as propriedades de ligação da heparina com proteínas de *T. cruzi* (Ortega-Barria e Pereira, 1991), é possível que as

condições de análise assumidas em nossos ensaios seriam favoráveis à detecção deste extenso padrão de polipeptídios ligantes à heparina. Tais condições não previam a concentração exclusiva de proteínas de membrana externa e ainda seriam adequadas à desnaturação de estruturas protéicas podendo gerar, inclusive, várias sub-unidades. Constatamos também, que a propriedade de ligação dos GAGs avaliados é preservada mesmo após o drástico tratamento das preparações de proteínas para os ensaios de eletroforese desnaturante com SDS, como previamente descrito (Love e cols., 1993). Este fato é um indicativo de que os motivos estruturais destes polipeptídios envolvidos com a ligação ao GAGs sejam mantidos após a eletroforese.

Tendo em vista que proteínas intracelulares com afinidade à heparina poderiam ser reveladas pelos GAGs biotinilados no extrato protéico total e conseqüentemente, se tornar um artefato em nossas preparações, optamos por utilizar como estratégia experimental o método de extração com Triton X-114 (Bordier, 1981) associado à cromatografia de afinidade (Lobb e cols., 1986) a fim de isolar e caracterizar as proteínas hidrofóbicas de ligação à heparina das formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Com esta estratégia, a reprodução do perfil de múltiplas bandas de proteínas obtido nos ensaios de *Western blotting* só foi possível quando as preparações eluídas da coluna de afinidade eram reveladas com nitrato de prata ao passo que a revelação feita com GAGs biotinilados indicava a predominância das proteínas de 65,8 kDa e 59 kDa. Assim, é possível que o perfil de múltiplas bandas detectado nas preparações eluídas da coluna de afinidade seja resultante de interações inespecíficas entre a matriz sólida da coluna e proteínas hidrofóbicas dos extratos de parasitos.

De qualquer forma, é possível sugerir que o perfil de duas bandas (65,8 kDa e 59 kDa) obtido dos extratos hidrofóbicos de tripomastigotas e epimastigotas esteja correto. A explicação para este achado pode ser especulada sobre as condições de interação entre a heparina e as proteínas ligantes presentes em ambos extratos hidrofóbicos nos ensaios de cromatografia. Provavelmente, a exposição dos motivos estruturais classicamente envolvidos na interação da heparina com os seus ligantes estaria minimizada nas proteínas hidrofóbicas do parasito, na fase móvel do sistema de cromatografia; o que não é possível controlar nos ensaios de eletroforese

desnaturante. De fato, sabe-se que um dos fatores decisivos das propriedades de ligação da heparina com o seu ligante é a presença de moléculas de aminoácidos com carga positiva nesta proteína (Caldwell e cols., 1996) as quais, provavelmente, estão expostas na superfície da estrutura nativa destas, cujo enovelamento se mantém estável nas condições de solubilidade propostas nos protocolos desenhados neste trabalho.

Nossos resultados com marcação metabólica (^{35}S -metionina) e isolamento não isotópico da proteína de ligação à heparina revelaram um perfil eletroforético similar ao observado no extrato total, apresentando duas bandas de proteínas hidrofóbicas majoritárias com massa molecular de 65,8 kDa e 59 kDa. Apesar do perfil eletroforético semelhante entre as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, a concentração de sal eluente e a expressão destas proteínas é bastante distinta entre as duas formas evolutivas. As análises isotópicas apontam para níveis elevados do ligante de heparina (1,3 a 2X) em formas tripomastigotas, sugerindo que a expressão superior nesta forma infectiva possa estar relacionada à necessidade deste parasito reconhecer moléculas na superfície da célula alvo, favorecendo o processo de invasão nas células do hospedeiro vertebrado. Embora nossos dados sejam divergentes ao primeiro relato de identificação do ligante de heparina do *T. cruzi* (Ortega-Barria e Pereira, 1991), estes são similares ao perfil de proteínas de ligação à heparina recentemente relatado em outro Tripanosomatidea, *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, onde duas bandas protéicas majoritárias de 65 kDa e 54,8 kDa foram identificadas na fração hidrofóbica de formas promastigotas (Azevedo-Pereira e cols., 2007).

Além disso, outro fato curioso evidenciado na revelação de extrato protéico total e proteínas isoladas em coluna de heparina com GAGs biotinilados diz respeito à capacidade desta proteína de se ligar a diferentes GAGs, incluindo condroitim sulfato, heparim sulfato e heparina. Este dado sugere que o ligante de heparina apresenta múltiplos domínios de ligação para GAGs sulfatados, similarmente ao observado em *Microsporidia* (Hayman e cols., 2005) e *Toxoplasma gondii* (Carruthers e cols., 2000), mas apenas a ligação ao dissacarídeo contendo ácido D-glucurônico / L-idurônico e N-acetil- ou N-sulfo- D-glucosamina é capaz de disparar a invasão do *T. cruzi* (Calvet e cols., 2003). Diferentemente do *T. cruzi*, uma variedade de GAGs pode inibir a adesão de esporos de *Encephalitozoon intestinalis* (Hayman

e cols., 2005) e *Toxoplasma gondii* (Carruthers e cols., 2000) na célula hospedeira, sugerindo que estes parasitos são capazes de reconhecer múltiplos GAGs na superfície da célula hospedeira. O reconhecimento de diferentes GAGs, incluindo dermatam sulfato, condroitim sulfato e heparam sulfato, por esporos de *Microsporídia* dispara a via de sinalização por cálcio (Ca^{2+}) e promove a invasão do parasito (Hayman e cols., 2005). Em *Toxoplasma gondii*, este reconhecimento é mediado por uma proteína com atividade semelhante a lectina que reconhece polissacarídeos sulfatados (Ortega-Barria e Boothroyd, 1999).

É importante ressaltar as diferenças evidenciadas entre as duas bandas majoritárias, 65,8 kDa e 59 kDa, no reconhecimento dos GAGs biotinilados. Nossos dados indicam que a banda de 59 kDa encontra-se mais intensamente marcada com os diferentes GAGs, sugerindo que esta possa apresentar em sua estrutura mais domínios de reconhecimento para os GAGs sulfatados analisados.

A detecção de proteínas com afinidade à heparina em frações hidrofóbicas de formas epimastigotas despertou-nos interesse especial, uma vez que proteínas com afinidade à heparina não tinham sido descritas nesta forma evolutiva por outros investigadores (Ortega-Barria e Pereira, 1991). Em virtude da metodologia aplicada neste estudo não permitir a separação de proteínas hidrofóbicas da membrana celular e de compartimentos intracelulares, nos propusemos avaliar se este perfil protéico com afinidade à heparina seria também evidenciado em frações de membrana de epimastigotas. Assim, utilizamos como estratégia o método de fracionamento celular associado à cromatografia de afinidade à heparina. Nossos dados revelaram a presença das proteínas com afinidade à heparina nestas frações de membrana, o que foi confirmado pela revelação com heparina-biotina por *Dot blotting*. Estes dados sugerem que estas proteínas possam estar presentes na superfície desta forma evolutiva. Outro dado que sugere as proteínas de 65,8 kDa e 59 kDa como sendo de membrana externa é a sua dispersão nos ensaios analíticos em coluna catiônica. Este fato é um indicativo das possíveis modificações pós-traducionais como fosforilação (Maurides e cols., 1989), acetilação, sulfatação, (Anderson e Anderson, 1984; Williamson e cols., 1973) e principalmente a glicosilação, o que é típico de muitas proteínas presentes na membrana externa (Gahmberg e Tolvanen, 1996). De qualquer forma, a confirmação desta hipótese necessita de estudos.

Embora epimastigotas não sejam formas infectivas para o hospedeiro vertebrado, é possível que as proteínas de ligação à heparina tenham importante papel no desenvolvimento do ciclo no hospedeiro invertebrado. A detecção de GAGs sulfatados de heparam sulfato na superfície de células do intestino de *Rhodnius prolixus* (Souza e cols.,2004) sugere o papel destas proteínas de ligação à heparina no reconhecimento de moléculas, favorecendo a adesão de formas epimastigotas no intestino do inseto vetor. Sendo assim, a caracterização destas proteínas de ligação à heparina poderia contribuir para o entendimento de etapas essenciais para a subsistência do parasito em ambos os hospedeiros vertebrado e invertebrado.

Ainda visando obter mais informações sobre as características da(s) proteína(s) de ligação à heparina, as amostras obtidas da cromatografia de afinidade, das formas tripomastigotas e epimastigotas, foram submetidas à eletroforese em gel não-desnaturante. Os resultados revelaram a presença de duas bandas de proteínas com tendência de migração próxima ao anodo, em ambas as formas do parasita. Embora os resultados sejam sugestivos da presença de duas proteínas com afinidade a heparina em ambas as formas evolutivas, os dados obtidos até o momento não permitem tal afirmação. Por outro lado, o perfil de uma única banda de 60 kDa resolvida por SDS-PAGE foi previamente descrito por Ortega-Barria e Pereira (1991). Enquanto que em *Anadara granosa*, a proteína de ligação à heparina isolada da superfície celular apresenta uma massa molecular nativa de 300 kDa e apenas uma banda de 60 kDa (Dam e cols, 1994), indicando tratar-se de uma proteína pentamérica. Ainda, uma proteína de ligação à heparina com 60 kDa, *OmcB*, localizada na superfície celular de *Chlamidia trachomatis*, parece reconhecer heparam sulfato e ligar-se a MOMP para iniciar o processo de invasão (Stephens e cols. 2001). Por outro lado, em *Leishmania (Vianna) brasiliensis*, duas bandas foram identificadas em promastigotas por SDS-PAGE, mas apenas uma proteína foi evidenciada no gel nativo (Azevedo-Pereira e cols., 2007), sugerindo a presença de um heterodímero com capacidade de se ligar à heparina.

5.2. Interação *T. cruzi*-cardiomiócito.

Glicosaminoglicanos (GAGs) são abundantemente encontrados na superfície da maioria das células de mamíferos e, em virtude de sua distribuição e

acessibilidade na superfície celular, são alvos ideais para adesão de patógenos. Dados do nosso grupo demonstraram o papel de proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS), mas não condroitim sulfato, no reconhecimento e invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos (Calvet e cols., 2003). Embora o tropismo por células musculares, principalmente células musculares cardíacas, tenha sido reportado na infecção pelo *T. cruzi* (Brener, 1983; Cabrine-Santos e cols., 2001; Vera-Cruz e cols., 2003), a diversidade de tipos celulares que este parasita é capaz de invadir *in vitro* pode ser atribuída a sua habilidade em se ligar a diferentes GAGs na superfície da célula hospedeira, tal como ocorre com *Toxoplasma gondii* (Carruthers e cols., 2000), *Encephalitozoon intestinalis* (Hayman e cols., 2005) e *Staphylococcus aureus* (Liang e cols., 1992), e/ou reconhecer uma multiplicidade de receptores na superfície da célula alvo. Desta forma, a capacidade do *T. cruzi* reconhecer múltiplos GAGs e a natureza do domínio de ligação do PGHS envolvido no processo de reconhecimento celular foi investigada utilizando heparina, queratam sulfato e diferentes fragmentos de heparam sulfato (domínio, N-sulfatado, N-acetilado/sulfatado e N-acetilado) obtidos por atividade enzimática (heparitinase I e II) e pela ação de ácido nitroso, respectivamente.

Nossos dados demonstraram que o tratamento de formas tripomastigotas com heparina reduziu significativamente (84,8%) o índice de infecção de cardiomiócitos, sugerindo que a ligação do parasita pode ocorrer pela interação direta com proteoglicanos de heparam sulfato na superfície de cardiomiócitos (Calvet e cols., 2003) ou mesmo através de GAGs solúveis, atuando como uma ponte para outro receptor na superfície da célula. Fibronectina, por exemplo, por apresentar um domínio de ligação para heparina e se associar a integrinas na superfície celular, seria forte candidato a participar deste processo. Desta forma, fibronectina poderia desempenhar um papel duplo no processo de invasão do *T. cruzi*, uma vez que a seqüência RGD (Arg-Gly- Asp) desta glicoproteína também participa do processo de reconhecimento e invasão do *T. cruzi* (Calvet e cols., 2003; Ouaissi e cols., 1986,1988). Interessantemente, os níveis de inibição nos ensaios com heparina, um GAG estruturalmente semelhante ao heparam sulfato e altamente sulfatado, foram consideravelmente superiores aos índices reportados com heparam sulfato (53 a 61%) (Calvet e cols., 2003), sugerindo que a sulfatação deste dissacarídeo, que confere carga negativa, facilita a associação entre receptor-ligante.

A carga de superfície tem sido apontada como moduladora da adesão *T. cruzi*-célula hospedeira. Estudos demonstraram que moléculas de ácido siálico, carboidrato negativamente carregado, desempenham importante papel no processo de adesão parasita-célula hospedeira (Schenkman e cols., 1993; Soeiro e cols., 1995), sendo reveladas as atividades de neuraminidase e trans-sialidase na superfície do parasita, que atuam removendo ácido siálico da superfície da célula hospedeira e transferindo-o para glicoproteínas, mucinas, em sua superfície, respectivamente (Schenkman e cols., 1991; Pereira, 1983). Além de tornar a superfície do parasito mais negativamente carregada, permitindo uma aproximação eletrostática com a célula alvo, expõe sítios de galactose na superfície da célula hospedeira, promovendo o reconhecimento e invasão do parasito.

No entanto, o reconhecimento de GAGs pelo parasito não parece ser apenas uma ligação eletrostática. O queratam sulfato, por exemplo, apresenta em sua constituição N-acetil D-glucosamina (GlcNAc); sendo negativamente carregado, este GAG, tal como condroitim sulfato (Calvet e cols., 2003), não foi capaz de induzir nenhum efeito no processo de invasão do *T. cruzi*, alcançando índices de infecção similares a célula controle. Embora os ensaios bioquímicos tenham revelado que o ligante com afinidade para heparina presente na superfície do parasita liga-se a condroitim sulfato, nossos dados anteriores demonstraram que este GAG não está envolvido na invasão do *T. cruzi* em cardiomiócitos, sugerindo que o ligante de superfície do *T. cruzi* pode reconhecer diferentes GAGs, mas somente a ligação específica com o dissacarídeo constituído de ácido D-glicurônico (GlcA) ou ácido L-idurônico (IdoA) e N-acetil glicosamina ou N-sulfo-glicosamina pode disparar cascatas de sinalização envolvidas no mecanismo de invasão.

A participação de proteoglicanos de heparam sulfato no reconhecimento de células hospedeiras não é um mecanismo exclusivo do *T. cruzi*; estas moléculas participam do processo de invasão de diversos microorganismos patogênicos, incluindo bactérias (Plotkowski e cols., 2001, Alvarez-Domínguez e cols., 1997; Hannah e cols., 1994), protozoários (Calvet e cols., 2003; Jacquet e cols., 2001; Frevert e cols., 1993, Love e cols., 1993) e vírus (Rue e Ryan 2002; Reddi e Lipton 2002; Walker e cols., 2002; Spillmann, 2001; Shieh e cols., 1992). Assim, a identificação da natureza do sítio de ligação da molécula de heparam sulfato com o

ligante do parasito contribuirá para um melhor entendimento do seu mecanismo de invasão.

A diversidade estrutural de PGHS permite o reconhecimento e ligação seletiva de proteínas à cadeia de heparam sulfato, modulando sua atividade biológica e degradação. O reconhecimento de ligantes pode ocorrer pela interação específica com as unidades de dissacarídeo N-acetilada (domínio NA), N-sulfatada (domínio NS) ou N-acetilada e N-sulfatada alternada (domínio NA/NS) (revisto por Esko e Lindahl, 2001; Lindahl e cols., 1998). Diversos fatores de crescimento são capazes de se ligar a GAGs (Clasper e cols. 1999; Garcia-Olivas e cols., 2003; Stacey e cols., 2003), mas a natureza do domínio de ligação da cadeia de HS difere amplamente de acordo com o ligante. Fatores de crescimento de fibroblastos ligam-se a seqüência N-sulfatada (ácido L-Idurônico 2-O-Sulfatado), enquanto o reconhecimento de fatores de crescimento de plaquetas depende do domínio N-sulfatado contendo ambos os grupos 2-O e 6-O sulfatados (Feyzi e cols., 1997). Entretanto, a interação proteína/GAG pode ser mais complexa, como no caso da ligação de γ -interferon, onde dois domínios sulfatados separados pelo domínio N-acetilado são seqüências alvo na cadeia de HS (Lortat-Jacob e cols., 1995).

A interação de patógenos-PGHS também parece ser mediada por um domínio específico da cadeia de HS. Assim, para avaliar a participação dos domínios NA, NS e NA/NS da cadeia de HS no processo de invasão do *T. cruzi*, ensaios de interação foram realizados com três diferentes fragmentos de heparam sulfato, obtidos após o tratamento de heparam sulfato com ácido nitroso, heparitinase I e heparitinase II gerando os fragmentos N-acetilado, N-sulfatado e N-acetilado/N-sulfatado, respectivamente. O pré-tratamento das formas tripomastigotas de *T. cruzi* com o fragmento N-acetilado/N-sulfatado ([IdoUA-GlcNAc]-[GlcUA-GlcNS]₃-[GlcUA-GlcNAc]₄[GlcUA]), reduziu significativamente em 45% a invasão do parasita em cardiomiócitos, sugerindo a participação desta região da molécula de heparam sulfato no processo de invasão. Por outro lado, os fragmentos N-acetilado ([GlcUA-GlcNAc]₄[GlcUA]) e N-sulfatado ([GlcNS,6s]-[IdoUA,2s-GlcNS,6s]-[IdoUA-GlcNS,6s]-[IdoUA-GlcNAc,6s]₂-[IdoUA-GlcNS]-[IdoUA-GlcNAc]) não alteraram o índice de infecção, sugerindo que tanto a região N-acetilada quanto a região N-sulfatada isoladamente não participam ativamente do processo de reconhecimento parasita-PGHS. É importante ressaltar que ao compararmos as seqüências dos fragmentos

entre si observamos que o dissacarídeo ([GlcUA-GlcNS]₃) está presente apenas no domínio NA/NS, sugerindo um papel determinante deste dissacarídeo no processo de invasão do *T. cruzi* em cardiomiócitos. Além disso, queratam sulfato e condroitim sulfato (Calvet e cols., 2003), que não possuem em sua estrutura este dissacarídeo, não foram capazes de inibir a infecção. Desta forma, o dissacarídeo ([GlcUA-GlcNS]₃) parece ter um papel primordial no processo de sinalização, disparando a penetração do parasito. Tal como ocorre com fatores de crescimento, o reconhecimento do domínio da cadeia de HS entre patógenos parece ser bastante específico e dependente da proteína ligante. Em *Herpes simplex* vírus, por exemplo, ocorre o reconhecimento do domínio NS da cadeia de HS, sendo o dissacarídeo (IdoA2S-GlcN3S) envolvido no reconhecimento da glicoproteína gD na superfície do vírus, permitindo a fusão entre o envoltório viral e a membrana plasmática da célula alvo (Spear 2004; Tiwari e cols., 2006).

Uma questão em aberto refere-se à participação da carga negativa, mediada pela sulfatação, no processo de reconhecimento receptor-ligante, uma vez que o domínio NS não demonstrou papel importante na invasão e os elevados níveis de inibição com o tratamento dos parasitos com heparina eram sugestivos da participação da carga negativa como moduladores do reconhecimento. Assim, para esclarecer o papel da sulfatação durante o processo de invasão de cardiomiócitos pelo *T. cruzi*, realizamos ensaios onde células musculares cardíacas foram pré-tratadas com concentrações crescentes de clorato de sódio. Este composto é conhecido por inibir a sulfatação durante a síntese de proteoglicanos sulfatados. Nossos dados demonstraram uma redução dose dependente no percentual de invasão pelo *T. cruzi* alcançando 26%, 48,5% e 73,6% após tratamento com 25 mM, 50 mM e 75 mM, respectivamente. Estes dados sugerem que, embora a região sulfatada da molécula de HS não esteja envolvida no reconhecimento ligante-receptor, esta parece ser importante na modulação da ligação entre estas moléculas, favorecendo a aproximação entre parasito-célula hospedeira. Recentemente, Fadel e Eley (2004) relataram o importante papel da sulfatação de heparan sulfato no processo de invasão de *Chlamydia trachomatis*. No entanto, o efeito inibitório da invasão após o tratamento com clorato de sódio parece ser dependente da cepa de *Chlamydia trachomatis* utilizada, sendo evidenciado que a infectividade da *C. trachomatis* E64 é levemente alterada após tratamentos com altas concentrações de

clorato (≥ 100 mM), enquanto a invasão de *C. trachomatis* LGV1 é inibida com baixas concentrações de clorato (≥ 30 mM).

Em resumo, nossos resultados revelaram que ambas as formas tripomastigotas e epimastigotas apresentam proteína(s) de massa molecular de 65,8 kDa e 59 kDa com capacidade de ligar a múltiplos GAGs, mas apenas a ligação ao domínio NA/NS ([IdoUA-GlcNAc]-[GlcUA-GlcNS]₃-[GlcUA-GlcNAc]₄[GlcUA]), promove a penetração do parasito. Além disso, demonstramos que a carga negativa modula a ligação específica ao domínio N-acetilado/N-sulfatado da cadeia de heparam sulfato, disparando vias de sinalização envolvidas no processo de invasão do parasita. Acreditamos que os dados obtidos neste trabalho poderão contribuir com estudos futuros que visam bloquear o reconhecimento da célula hospedeira pelo receptor de heparina, podendo gerar estratégias farmacológicas mais eficazes no controle da infecção aguda da doença de Chagas.

CONCLUSÕES

-
- As três formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* apresentam proteína(s) com propriedades de ligação a glicosaminoglicanos sulfatados (heparina, heparan sulfato e condroitim sulfato), sugerindo o importante papel deste ligante no reconhecimento de proteoglicanos sulfatados nas células do hospedeiro;
 - Duas bandas majoritárias de proteínas hidrofóbicas com afinidade a heparina e massa molecular de 65,8 kDa e 59 kDa estão presentes nas formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*;
 - O perfil protéico de 59 kDa apresenta elevada capacidade de ligação a glicosaminoglicanos sulfatados em ambas as formas de *T. cruzi*, sendo um potencial candidato com possível envolvimento no reconhecimento *T. cruzi*-cardiomiócito;
 - A caracterização bioquímica parcial de proteína(s) de ligação a heparina sugere que os polipeptídios de 65,8 kDa e 59 kDa têm um comportamento heterogêneo quanto às suas cargas.
 - Heparina, um glicosaminoglicano estruturalmente semelhante ao heparan sulfato, mas não queratam sulfato, inibe a invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos. Estes dados corroboram a participação seletiva de ácido D-glicurônico/L-idurônico e N-acetil ou N-sulfo glicosamina como mediadores do processo de invasão do *Trypanosoma cruzi*;
 - O domínio N-acetilado/N-sulfatado (NA/NS) da cadeia de heparan sulfato inibi em 45% os níveis de infecção, sugerindo a participação de [IdoUA-GlcNAc]-[GlcUA-GlcNS]₃-[GlcUA-GlcNAc]₄[GlcUA] como molécula alvo de reconhecimento capaz de disparar o processo de invasão do *T. cruzi* em cardiomiócitos;
 - Os domínios N-acetilado (NA) e N-sulfatado (NS) não participam do reconhecimento receptor-ligante, mas o domínio NS parece modular a

interação do ligante com o domínio NA/NS da cadeia de heparam sulfato;

- A inibição da invasão após tratamento com clorato de sódio corrobora o papel inicial do domínio NS como modulador por aproximação eletrostática durante interação receptor-ligante, favorecendo o reconhecimento do domínio NA/NS da cadeia de heparam sulfato.

REFERÊNCIAS

1. Abuin G, Colli W, de Souza W, Alves MJ 1989. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol Biochem Parasitol* 35(3):229-37.
2. Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S 2001. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol* 114(2):143-50.
3. Almeida-de-Faria M, Frymuller E, Colli W, Alves MJ 1999 *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol* 92(4):263-74.
4. Alvarez-Domínguez C, Vazquez-Boland JÁ, Carrasco-Marín E, López-Mato P and Leyva-Cobián F, 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the *Listerial surface* protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun* 65: 78-88.
5. Alves MJ, Abuin G, Kuwajima VY, Colli W 1986. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 21(1):75-82.
6. Anderson L, Anderson N 1984. Some perspectives on two-dimensional protein mapping. *Clin Chem* 30: 1898-1905.
7. Andrade SG, Grimaud JA, Stocker-Guerret S, 1989. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (Fibronectin and Laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 40(3): 252-260.
8. Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA 1991. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86(2):187-200.

9. Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferriolli Filho F, Luquetti AO 1992. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 86:624-6.
10. Andrews NW, Colli W 1982. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J Protozool* 29: 264-269.
11. Andrews NW, Katzin AM and Colli W 1984. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. *Eur J Biochem* 140: 599-604.
12. Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61(7):1277-87.
13. Antas PR, Medrano-Mercado N, Torrico F, Ugarte-Fernandez R, Gomez F, Correa Oliveira R, Chaves AC, Romanha AJ, Araujo-Jorge TC 1999. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 61:308-314.
14. Araújo-Jorge TC 1989. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Mem Inst Oswaldo cruz.* 84: 441-462.
15. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streit J, Buikstra J, Guhl F, et al. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 101:2034-2039.
16. Azevedo-Pereira RL, Pereira MC, Oliveria-Junior FO, Brazil RP, Cortes LM, Madeira MF, Santos AL, Toma L, Alves CR 2007. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Vet Parasitol.* doi:10.1016.
17. Barbosa HS, Meirelles MNL 1992. Ultrastructural detection *in vitro* of WGA-, RCA I-, and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 78: 404-409.

18. Barbosa 1999. Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1:153-154. Review.
19. Barragan A, Spillmann D, Carlson J, Wahlgren M 1999. Role of glycans in *Plasmodium falciparum* infection. *Biochem Soc Trans.* 27(4):487-93.
20. Bennett PM, Maggs AM, Baines AJ, Pinder JC 2006. The transitional junction: a new functional subcellular domain at the intercalated disc. *Mol Biol Cell.* 17(4):2091-100.
21. Bernstein S, Morley G 2006. Gap Junctions and Propagation of the Cardiac Action Potential. *Adv Cardiol.* 2006;42:71-85. Review.
22. Billot C, Torrico F, Carlier Y 2005. Cost effectiveness study of a control program of congenital Chagas disease in Bolivia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38 Suppl 2:108-13.
23. Bonay 2001. Binding specificity of mannose-specific carbohydrate-binding protein from the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology.* 11:719-729.
24. Bordier C 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256: 1604-1607.
25. Brand T 2003. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol.* 258(1):1-19.
26. Brener Z 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 27: 347-382.
27. Brener Z 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol.* 18:247-292.
28. Brener Z, Ramirez LE, Krettli AU, Cancado JR 1983. EVI antibodies in patients with Chagas' disease: relationship with anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulins and effects of specific treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 78(4):437-42.

-
29. Burleigh BA, Andrews, N.W., 1995. A 120 - kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca^{2+} - signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 5172 - 5180.
 30. Burleigh BA, Woolsey AM 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 4:701-711.
 31. Cabrine-Santos M, Lages Silva E, Chapadeiro E, Ramirez LE 2001. *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol.* 99:160-167.
 32. Caldwell EE, Nadkarni VD, Fromm JR, Linhardt RJ, Weiler JM 1996. Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 203-216.
 33. Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MNL, Pereira MCS 2004. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: Role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression *in vitro* and *in vivo*. *Experimental parasitology.* 107(1-2):20-30.
 34. Calvet CM, Toma L, Souza FR, Meirelles MNL, Pereira, MCP 2003. Heparan Sulfate Proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J Eukariot Microbiol.* 50: 97-103.
 35. Camargo EP 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12:93-100.
 36. Cançado JR 1997. Terapêutica específica. In: *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*, p.362-424. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro.
 37. Cançado JR 1999. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:331-5.

38. Carey DJ 1997. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J.* 327 (Pt 1):1-16.
39. Carod-Artal FJ 2006. Enfermedad de Chagas e ictus. *Neurologia* 21(3):135-149.
40. Carruthers VB, Hakansson S, Giddings OK, Sibley LD 2000. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infection and Immunity.* 68(7): 4005-4011.
41. Carvalho TU, de Souza W 1986. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 28:205-212.
42. Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* (8):471-9.
43. Chagas C 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n., gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
44. Chagas C 1911a. Moléstia de "Carlos Chagas" ou thyroidite parasitária. *Rev Inst Med São Paulo* 14: 337-356.
45. Chagas C 1911b. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 219-275.
46. Chagas C 1922. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American tripanosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 15: 1-11.
47. Clasper S, Vekemans S, Fiore M, Plebanski M, Wordsworth P, David G, Jackson DG 1999. Inducible expression of the cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 (fibroglycan) on human activated macrophages can regulate fibroblast growth factor action. *J Biol Chem.* 274(34):24113-23.

-
48. Cortez M, Neira I, Ferreira D, Luquetti AO, Rassi A, Atayde VD, Yoshida N 2003. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. *Infect Immun.* 71(11):6184-91.
 49. Coura JR 1996. Current prospects of specific treatment of Chagas's disease. *Boll Chil Parasitol* 51: 69-75.
 50. Coura JR e Castro SL 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1): 3-24.
 51. Cuellar K, Chuong H, Hubbell SM, Hinsdale ME 2007. Biosynthesis of Chondroitin and Heparan Sulfate in Chinese Hamster Ovary Cells Depends on Xylosyltransferase II. *J Biol Chem.* 282(8):5195-200.
 52. Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J, Engman DM 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 39(1):41-54.
 53. Dam TK, Bandyopadhyay P, Sarkar M, Ghosal J, Bhattacharya A, Choudhury A 1994. Purification and partial characterization of a heparin-binding lectin from the marine clam *Anadara granosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 36-45.
 54. De Mello WC 1982. Intercellular communication in cardiac muscle. *Circ Res.* 51:1-9.
 55. De Souza EM, Menna-Barreto R, Araujo-Jorge TC, Kumar A, Hu Q, Boykin DW, Soeiro MN_2006. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 133(Pt 1):75-9.
 56. De Souza W 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality.
 57. De Souza W, Martinez-Palomo A, Gonzalez-Robbles A 1978. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*. cytochemistry and freeze-fracture. *J Cell Sci* 33:285-299.

-
58. De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 1984;86:197-283.
59. Dias JC, Prata A, Schofield CJ 2002. Chagas' disease in the Amazon: an overview of the current situation and perspectives for prevention. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35(6):669-78.
60. Dias JCP 1992. Epidemiology of Chagas' disease Em: Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.
61. Dias JCP 2006. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad. Saúde publica, Rio de Janeiro.* 22(10):2020-2021.
62. Dias JCP, Coura J 1997. Clínica e terapêutica da Doença de Chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral. *Ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro* 486p.
63. Dietrich CP, Nader HB, Straus AH 1983. Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. *Biochem Biophys Res Commun.* 111(3):865-71.
64. Dietrich CP, Tersariol IL, Toma L, Moraes CT, Porcionatto MA, Oliveira FW, Nader HB 1998. Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparan sulfates of different origins. *Cell Mol Biol* 44(3):417-29.
65. Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 3:251-261
66. Ehler E, Horowitz R, Zuppinger C, Price LR, Perriard E, Leu M, Caroni P, Sussman M, Eppenberger HM, Perriard JC 2001. Alterations at the intercalated disks associated with the absence of muscle LIM protein. *The Journal of cell Biology.* 153: 763-772.
67. Elizari MV 1999. La Miocardiopatia Chagásica. Perspectiva Histórica. *Medicina (Buenos Aires)* 59: 25-40.

-
68. Esko JD 1999. Proteoglycans and Glycosaminoglycans. In Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G e Marth J (eds), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
69. Esko JD, Lindahl U 2001. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* 108(2):169-73.
70. Fadel S, Eley A 2004. Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulphation in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Med Microbiol* 53(Pt2):93-5.
71. Fagundes LJM, Angluster J, Gilbert B, Roitman I 1980. Synthesis of sterol in *Herpetomonas samuelpeessoai*: Influence of growth conditions. *J Protozool* 27:238-241.
72. Farhadian F, Contard F, Sabri A, Samuel JL, Rappaport L 1996. Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res* 32: 433-442.
73. Ferreira CS, Martinho PC, Amato Neto V, Cruz RRB 2001. Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 43 (3):161-162.
74. Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop* 75:79-84.
75. Ferreira MS, Borges AS 2002. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(4):443-57.
76. Ferreira TM, Medeiros MG, Dietrich CP, Nader HB 1993. Structure of heparan sulfate from the fresh water mollusc Anomantidae sp: sequencing of its disaccharide units. *Int J Biochem.* 25(9):1219-25.
77. Feyzi E, Lustig F, Fager G, Spillmann D, Lindahl U, Salmivirta M 1997. Characterization of heparin and heparan sulfate domains binding to the long splice variant of platelet-derived growth factor A chain. *J Biol Chem.* 272(9):5518-24.

-
78. Fontes Rezende RE, Lescano MA, Zambelli Ramalho LN, de Castro Figueiredo JF, Oliveira Dantas R, Garzella Meneghelli U, Pimenta Modena JL 2006. Reactivation of Chagas' disease in a patient with non-Hodgkin's lymphoma: gastric, oesophageal and laryngeal involvement. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100(1):74-8.
79. Franco DJ, Vago AR, Chiari E, Meira FC, Galvao LM, Machado CR 2003. *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp Parasitol*. 104(1-2):54-61.
80. Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Tackacs B and Nussenzweig V, 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with surface membrane of hepatocytes. *J. Exp. Med.* 177: 1287-1298.
81. Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, Palomino S 2005. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol.* 60(1):33-7.
82. Fukuta M, Inazawa J, Torii T, Tsuzuki K, Shimada E, Habuchi O 1997. Molecular cloning and characterization of human keratan sulfate Gal-6-sulfotransferase. *J Biol Chem.* 272(51):32321-8.
83. Funderburgh JL 2000. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 10(10):951-8.
84. Gahmberg CG, Tolvanen M 1996. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* 21: 308-311.
85. Gallagher JT, Lyon M, Steward WP 1986. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem J.* 236(2):313-25.
86. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB 2005. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(4):1521-8.

-
87. Garcia-Olivas R, Hoebeke J, Castel S, Reina M, Fager G, Lustig F, Vilaro S 2003. Differential binding of platelet-derived growth factor isoforms to glycosaminoglycans. *Histochem Cell Biol.* 120(5):371-82.
88. Geraldino RS, Ferreira AJ, Lima MA, Cabrine-Santos M, Lages-Silva E, Ramirez LE 2006. Interstitial cells of Cajal in patients with chagasic megacolon originating from a region of old endemicity. *Pathophysiology.* 13(2):71-4.
89. Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, Zarski JP, Drouet E 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology.* 292(1):162-8.
90. Gordon AM, Homsher E, Regnier M 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 80:853-924.
91. Grauert MR, Houdayer M, Hontebeyrie-Joskowicz M 1993. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clin Exp Immunol.* 93:85-92.
92. Gruenheid S, Finlay BB 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature.* 422(6933):741-5.
93. Guhl F, Vellejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, et al 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from Northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 108:401-407.
- Gutstein DE, Liu FY, Meyers MB, Choo A, Fishman GI 2003. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J Cell Sci.* 116(Pt 5):875-85.
94. Habuchi O, Hirahara Y, Uchimura K, Fukuta M 1996. Enzymatic sulfation of galactose residue of keratan sulfate by chondroitin 6-sulfotransferase. *Glycobiology.* 6(1):51-7.

-
95. Hannah JH, Menozzi FD, Renauld G, Loch C and Brennan MJ, 1994. Sulfated glycoconjugated receptors for the *Bordetella pertusis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain of FHA. *Infect Immun* 62: 5010-5019.
 96. Hardingham TE and Fosang AJ 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6: 861-870.
 97. Harnett KM, Biancani P 2003. Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. *The American Journal of Medicine.* 115:18 (3A) 24s-30s.
 98. Hayman JR, Southern TR, Nash TE 2005. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect Immun.* 73(2):841-8.
 99. Higuchi Mde L Human 1999. Chronic Chagasic Cardiopathy: Participation of Parasite Antigens, Subsets of Lymphocytes, Cytokines and Microvascular Abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:263-267.
 100. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M 2003. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 60(1):96-107.
 101. Hofflin JM, Sadler RH, Araujo FG, Page WE, Remington JS 1987. Laboratory-acquired Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81:437-440.
 102. Holmes KC 1996 Muscle proteins – their actions and interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 6:781-789.
 103. Honore E, Adamantidis MM, Dupuis BA, Challice CE, Guibault P 1987b. Calcium channels and excitation-contraction coupling in cardiac cells. I. Two components of contraction in guinea-pig papillary muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 65: 1821-1831.

-
104. Ihn KS, Han SH, Kim HR, Huh MS, Seong SY, Kang JS, Han TH, Kim IS, Choi MS 2000. Cellular invasion of *Orientia tsutsugamushi* requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Microb Pathog* 28(4):227-233.
105. Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kalil J, Cunha-Neto E 2005. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J Autoimmun.* 24(2):111-7.
106. Jackson RL, Busch SJ e Cardin AD, 1991. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interaction, and role in physiological processes. *Physiol Ver* 2: 481-523.
107. Jacquet A, Coulon L, De Neve J, Daminet V, Haumont M, Garcia L, Bollen A, Jurado M, Biemans R 2001. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. *Mol Biochem Parasitol* 116(1):35-44.
108. Jorpes JE, Gardell S 1948. On heparin monosulfuric acid. *J. Biol. Chem.* 176:267.
109. Kakehi K, Kinoshita M, Yasueda S 2003. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 797(1-2):347-55.
110. Katzin AM, Colli W 1983. Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*. An N-acetyl-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochim Biophys Acta* 727: 403-411.
111. Kierszenbaum F 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev.* 12(2):210-23.
112. Kierszenbaum F 2005. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol.* 21(11):513-6.
113. Köberle F 1968. Chagas disease and Chagas syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 6: 63-116.

-
114. Kusche-Gullberg M, Kjellen L 2003. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* 13(5):605-11.
115. Leon JS, Engman DM 2003. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci.* 8:e315-22.
116. Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med* 171: 401- 413.
117. Liang OD, Ascencio F, Fransson LA, Wadstrom T 1992. Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 60(3):899-906.
118. Lindahl U, Kjellen L 1991. Heparin or heparan sulfate--what is the difference? *Thromb Haemost.* 66(1):44-8.
119. Lindahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellen L 1998. Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol. Chem.* 273(39):24979-82.
120. Lobb RR, Harper JW, Fett JW 1986. Purification of heparin-binding growth factors. *Anal Biochem* 154: 1-4.
121. Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB 2006. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res.* 39(2):157-67.
122. Lortat-Jacob H, Turnbull JE, Grimaud JA 1995. Molecular organization of the interferon gamma-binding domain in heparan sulphate. *Biochem J.* 310 (Pt 2):497-505.
123. Love DC, Esko JD, Mosser DM 1993. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J Cell Biol* 123: 759-766.
124. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.

-
125. Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano L, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ 2001. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J Biol Chem.* 276(22):19382-19389.
126. Maurides PA, Akkaraju GR, Jagus R 1989. Evaluation of protein phosphorylation state by a combination of vertical slab gel isoelectric focusing and immunoblotting. *Anal Biochem* 183: 144-151.
127. Mazza S, Montaña A, Benitez C, Janzi EC 1936. Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *MEPRA (Mis. Est. Pat. reg. Argentina, Public.)* 28: 41-46, 1936.
128. Medeiros GF, Mendes A, Castro RA, Bau EC, Nader HB, Dietrich CP 2000. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochim Biophys Acta.* 1475(3):287-94.
129. Meirelles MNL, Araújo-Jorge TC, De Souza W 1982. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: Dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Z. Parasitenkd.* 68:7-14.
130. Meirelles MNL, Araújo-Jorge TC, Miranda CF, De Souza W, Barbosa HS 1986. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon miogenesis in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 41: 198-206.
131. Mertens G, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Vermylen J, David G 1992. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. 267(28):20435-43.
132. Meyer K, Palmer JW 1934. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem.* 107:629-634.

-
133. Ming M, Chuenk M, Ortega-Barria E, Pereira MEA 1993. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol* 59: 243-252.
134. Moncayo A 1999a. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94:401-404.
135. Moncayo A 1999b. [Progress towards the interruption of transmission of Chagas disease in the southern countries]. *Medicina (B Aires)*. 59: 120-124.
136. Moncayo A 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(5): 577-591.
137. Mukhopadhyay NK, Shome K, Saha AK, Hassell JR, Glew RH 1989. Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation. *Biochem J* 264: 517-525.
138. Nader HB, Chavante SF, dos-Santos EA, Oliveira TW, de-Paiva JF, Jeronimo SM, Medeiros GF, de-Abreu LR, Leite EL, de-Sousa-Filho JF, Castro RA, Toma L, Tersariol IL, Porcionatto MA, Dietrich CP 1999. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? *Braz J Med Biol Res*. 32(5):529-38.
139. Nakato H, Kimata K 2002. Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. *Biochim Biophys Acta*. 1573(3):312-8.
140. Nasciutti LE, Ferrari R, Berardo PT, Souza ML, Takiya CM, Borojevic R, Abrao MS, Silva LC 2006. Distribution of chondroitin sulfate in human endometrium. *Micron*. 37(6):544-50.
141. Nde PN, Simmons KJ, Kleshchenko YY, Pratap S, Lima MF, Villalta F 2006. Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. 74(3):1643-8.

-
142. Neira I, Silva FA, Cortez M, Yoshida N 2003. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*. 71(1):557-61.
143. Noisin E, Villalta F 1989. Fibronectin increases *Trypanosoma cruzi* amastigote binding to and uptake by murine macrophages and human monocytes. *Infect Immun* 57 (4): 1030-1034.
144. Ortega-Barria E and Pereira EA 1991. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*. 67: 411-421.
145. Ortega-Barria E, Boothroyd JC 1999. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem* 274(3):1267-1276
146. Ouaisi MA, Cornette J, Capron A 1985. *Trypanosoma cruzi*: Modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. *Eur J Immunol* 15: 1096-1101.
147. Ouaisi MA, Cornette J, Afchain D, Capron A, Gras-Masse H, Tartar A 1986a. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from fibronectin cell attachment domain. *Science* 234: 603-607.
148. Ouaisi, MA, Cornette J, Capron A 1986b. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* tripomastigote cell surface protein with properties expected as a fibronectin receptor. *Mol Biochem Paras* 19: 201-211.
149. Ouaisi MA, Kusnierz JP, Gras-Masse H, Drobecq H, Velge P, Cornette J, Capron A, Tartar A 1988. Fluorescence activated cell sorting analysis of fibronectin peptides binding to *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Protozool* 35(1): 111-114.
150. Park PW, Pier GB, Hinkes MT, Bernfield M 2001. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature*. 411 (6833): 98-102.
151. Pereira ME 1983. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*. 219(4591):1444-6.

152. Perrimon N, Bernfield M 2000. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404(6779):725-8.
153. Plotkowski MC, Costa AO, Morandi V, Barbosa HS, Nader HB, de Bentzmann S, Puchelle E 2001. Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. *J Med Microbiol* 50(2):183-190.
154. Porcionatto MA, Nader HB, Dietrich CP 1999. Heparan sulfate and cell division. *Braz J Med Biol Res.* 32(5):539-44.
155. Pradel G, Garapaty S, Frevert U 2002. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol.* 45(3):637-51.
156. Punekollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC 2007. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 115(3):279-83.
157. Rassi A 1982. Tratamento etiológico da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 38: 277-281.
158. Reddi HV, and Lipton HL 2002. Heparan sulfate mediates infection of high-neurovirulence Theiler's viruses. *J. Virology* 76: 8400-8407.
159. Rey L 1991. Parasito e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan.
160. Romãña C, Meyer H 1942. Estudo do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecido de embrião de galinha. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 37: 19-27.
161. Ross MH, Romrell LJ 1993. Histologia. 2ª ed. Editora Panamericana.
162. Rothhammer F, Allison MJ, Nuñez L, Staden V, Arriza B 1985. Chagas disease in pre-Columbian South America. *Am J Phys Anthropol* 68:495-498.
163. Rue CA and Ryan P 2002. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein C attachment to heparin sulfate proteoglycans. *J. Gen Virol.* 83: 301-309.

-
164. Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U 1996. Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J.* 10(11):1270-9.
165. Salomone OA, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M, Fernandez RA, Enders J, Palma A, Barral JM, Madoery RJ 2003. Trypanosoma cruzi in persons without serologic evidence of disease, Argentina. : *Emerg Infect Dis.* 9:1558-1562.
166. Sanchez JA, Milei J, Yu ZX, Storino R, Wenthold R Jr, Ferrans VJ 1993. Immunohistochemical localization of laminin in the hearts of patients with chronic chagasic cardiomyopathy: relationship to thickening of basement membranes. *Am Heart J.* 126:1392-1401.
167. Sasisekharan R, Venkataraman G 2000. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol.* 4(6):626-31.
168. Schaub GA, Losch P 1988. Trypanosoma cruzi: Origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector triatoma infestans. *Exp Parasitol* 65:174-186.
169. Schenkman RP, Vandekerckhove F, Schenkman S 1993. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 61:898-902.
170. Schenkman S, Eichinger D, Pereira MEA, Nussenzweig V 1994. Structural and functional properties of *Trypanosoma cruzi* transialidase. *Ann Rev Microbiol* 48:499-523.
171. Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V 1991. A novel cell surface transialidase of *Trypanosoma cruzi* generate a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* 65: 1117-1125.
172. Schenkman S, Yoshida N, Cardoso-de-Almeida ML 1988. Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 29:141-151.
173. Schönherr E e Hausser HJ 2000. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol.* 7 (2-4): 89-101.

-
174. Sher A, Snary D 1982. Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. *Nature* 300(5893):639-640.
175. Shieh M-T, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD and Spear PG, 1992. Cell surface receptors for *Herpes simplex* virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* 116: 1273-1281.
176. Silbert JE, Sugumaran G 2002. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* 54(4):177-86.
177. Silva AA, Roffe E, Lannes-Vieira J 1999. Expression of extracellular matrix components and their receptors in the central nervous system during experimental *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res.* 32: 593-600.
178. Soares MBP, Ribeiro dos Santos R 1999. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 257-262.
179. Soares MJ, De Souza W 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 77:461-468
180. Soeiro Mde N, Costa e Silva Filho F, Leal de Meirelles Mde N 1995. Alterations in the surface charge of heart muscle cells during interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Biophys* 26(1):21-44.
181. Souza ML, Sarquis O, Gomes TF, Moreira MF, Lima MM, Silva LC 2004. Sulfated glycosaminoglycans in two hematophagous arthropod vectors of Chagas disease, *Triatoma brasiliensis* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 139(4):631-5.
182. Spear PG 2004. *Herpes simplex* virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol.* 6(5):401-10.

-
183. Spillmann D 2001. Heparan sulfate: anchor for viral intruders?. *Biochimie* 83(8):811-7.
184. Stacey M, Chang GW, Davies JQ, Kwakkenbos MJ, Sanderson RD, Hamann J, Gordon S, Lin HH 2003. The epidermal growth factor-like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Blood*. 102(8):2916-24.
185. Stephens NL 2001. Airway smooth muscle. *Lung*. 179: 333-373.
186. Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Douglas S, Morris SA, Weiss LM, Wittner M 1992. Chaga´s disease. *Clinical Microbiology reviews* 5: 400-419.
187. Tarleton RL 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 31(5-6):550-4.
188. Tarleton RL 2003. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*. 19(10):447-51.
189. Taylor KR, Gallo RL 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J*. 20(1):9-22.
190. Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR 2006. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101(5):463-91.
191. Tiwari V, Clement C, Xu D, Valyi-Nagy T, Yue BY, Liu J, Shukla D 2006. Role for 3-O-sulfated heparan sulfate as the receptor for *herpes simplex* virus type 1 entry into primary human corneal fibroblasts. *J Virol*. 80(18):8970-80.
192. Tlapak-Simmons VL, Baron CA, Gotschall R, Haque D, Canfield WM, Weigel PH 2005. Hyaluronan biosynthesis by class I streptococcal hyaluronan synthases occurs at the reducing end. *J Biol Chem*. 280(13):13012-8.

-
193. Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V 1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*. 110 (Pt 5):547-54.
194. Toole BP 2001. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 12(2):79-87.
195. Turnbull JE, Lyon M e Gallagher JT 1995. Structural analysis of glycosaminoglycans. In Haralson MA e Hassel JR (eds), *Extracellular matrix: a practical approach*, p. 199-219. Oxford University Press, New York.
196. Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJ, Colli W 2002. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem*. 277(23):20756-62.
197. Urbina JA, Docampo R 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 19:495-501. Dias JCP 1992. Epidemiology of Chagas' disease Em: Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.
198. Vera-Cruz JM, Magallon-Gastelum E, Grijalva G, Rincon AR, Ramos-Garcia C, Armendariz-Borunda J 2003. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*. 89: 480-486.
199. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ, Andrade MV, Carvalho HG, Dourado-Oliveira A, Ribeiro-dos-Santos R 2006. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol*. 87(2):159-66.
200. Villalta F, Kieszenbaum F 1985. Role of surface N-acetylglucosamine residues on host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Acta* 845: 216-222.
201. Villalta F, Smith CM, Ruiz-Ruano A, Lima MF 2001. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. *FEBS Lett*. 505(3):383-8.

-
202. Vives RR, Imberty A, Sattentau QJ, Lortat-Jacob H 2005. Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. *J Biol Chem.* 280(22):21353-7.
203. Walker SJ, Pizzato M, Takeuchi Y and Devereux S 2002. Heparin binds to murine leukemia virus and inhibits. *Env-independent attachment and infection. J. Virology* 76: 6909-6918.
204. Wang K 1996. Titin/connectin and nebulin: giant protein rulers of muscle structure and function. *Adv Biophys.* 33:123-134.
205. Wendel AS, Dias JCP 1992. Transfusion transmitted Chagas' disease. Em: Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. Wendel AS, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. eds., pp 103-133, ISBT Brazil' 92 – SBHH.
206. Williams BL, Goodwin TW, Ryley JF 1966. The sterol content of some protozoa. *J. Protozool* 13:227-230.
207. Williamson AR, Salaman MR, Kreth HW 1973. Microheterogeneity and allomorphy of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 209: 210-224.
208. Wirth JJ, Kierszenbaum F 1984. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 133(1):460-4.
209. Woolsey AM, Burleigh BA 2004. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol.* 6(9):829-38.
210. Yan Y, Silvennoinen-Kassinen S, Leinonen M, Saikku P 2006. Inhibitory effect of heparan sulfate-like glycosaminoglycans on the infectivity of *Chlamydia pneumoniae* in HL cells varies between strains. *Microbes Infect.* 8(3):866-72.
211. Yeager M 1998. Structure of cardiac Gap junction intercellular channels. *Journal of structural Biology* 121: 231-245.

212. Yoshida N 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78(1): 87-111.
213. Zeledon R 1997. Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. In Atlas of Chaga's disease vectors in the America. *Ed. Fiocruz* 1:271-287.