

Ministério da Saúde

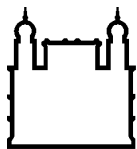
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Papel de proteoglicanos sulfatados no
reconhecimento e invasão de formas amastigotas de
Trypanosoma cruzi em cardiomiócitos**

RENATA BAMBINO MEDEIROS

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

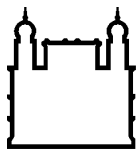
RENATA BAMBINO MEDEIROS

**Papel de proteoglicanos sulfatados no
reconhecimento e invasão de formas amastigotas de
Trypanosoma cruzi em cardiomiócitos**

Dissertação 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 S. L. de Meirelles

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RENATA BAMBINO MEDEIROS

**Papel de proteoglicanos sulfatados no
reconhecimento e invasão de formas amastigotas de
Trypanosoma cruzi em cardiomiócitos**

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

Aprovada em: 22/12/2008

EXAMINADORES:

Dra. Mariana Caldas Waghbi - Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Presidente)

Dra. Tecia Maria Ulisses de Carvalho - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal - Faculdade de Medicina Fundação ABC

Dra. Katia da Silva Calabrese - Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (suplente)

Dra. Maria Adelaide do Valle Matta - Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (suplente)

FICHA CATALOGRÁFICA

Bambino-Medeiros, Renata.

Papel de proteoglicanos sulfatados no reconhecimento e invasão de formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos / Renata Bambino-Medeiros. - Rio de Janeiro, 2008.

xi, 99 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008.

Orientadora: Mirian Claudia de Souza Pereira.

Co-orientadora: Maria de Nazareth S. L. de Meirelles.

Bibliografia: f. 57-71

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Cardiomiócito. 3. Amastigotas. 4. Glicosaminoglicanos. 5. Reconhecimento celular. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

À minha filha Julia,
minha grande inspiração
e razão de viver.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o grande responsável por tudo isso e ter me dado a grande oportunidade de realizar um sonho. Por me guiar nos momentos em que perdi o rumo e achei que não fosse dar certo. Por me fazer acreditar que sou capaz.

Aos meus pais, Sandra e Edmilson, pelo amor incondicional de sempre e por tudo que já fizeram (fazem e sei que ainda farão) por mim. Vocês serão sempre meus heróis!

Ao meu amor Marcelo, por tudo que ele representa pra mim. Pelo companheirismo desde o início disso tudo e por me aturar com tanto carinho nos momentos em que nem eu mesma aturaria.

À minha filha Julia, meu presente de Deus. Simplesmente por existir e dar um novo sentido à minha vida.

Ao meu irmão amado Rafael, meu grande amigo, por tudo.

À minha querida avó Léa, pela torcida e incentivo.

À minha amiga-comadre Flávia, por ser uma peça tão importante e fundamental na minha vida.

À minha amiga Heidi, por ser minha fiel confidente e pelo help enorme como babá nessa reta final tão conturbada. Valeu mesmo pela força, amiga!

À minha amiga Carol, pela amizade de tantos anos.

Às minhas queridas “florzinhas”, presentes que ganhei junto com a gravidez. Por serem tão importantes pra mim e fazerem toda a diferença na minha vida “de mãe”.

À Dra. Mirian Pereira, pela dedicação, ensinamentos, compreensão e, acima de tudo, paciência... sempre! Muito obrigada mesmo!

À Dra. Maria de Nazareth Meirelles, por ser um exemplo de dedicação pra mim.

À Daniele Vicente, pelo apoio técnico e por ser meu braço direito segurando a onda durante o período da minha licença. Valeu, amiga! Você faz falta.

À Taty, pela amizade, incentivo, força e, principalmente, pelo ouvido amigo de sempre.

À Cláudia, pela ajuda sempre que precisei e pela revisão de parte do artigo.

À toda equipe do LUC: Carol, Ângela, Alan, Daniel, Juliana, Liliane, Renata, Dayse, Francisco, Luciana, Valéria e Adelaide. Pela amizade, trabalho em equipe e cooperação.

À Kelly e Elen, pelo carinho, amizade e torcida.

A todos do antigo DUBC, pelos anos de trabalho e convivência.

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

À pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e seu corpo docente, pelo conhecimento adquirido.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), CNPq, FAPERJ, PAPES IV, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Diversos mecanismos de invasão têm sido descritos na infecção de diferentes tipos celulares pelo *Trypanosoma cruzi*, apontando a versatilidade deste parasita no reconhecimento de diferentes ligantes e/ou receptores na superfície da célula alvo. Além dos tripomastigotas, formas infectivas clássicas, as formas amastigotas desempenham importante papel na manutenção da infecção e progressão da doença de Chagas. Embora avanços no entendimento do mecanismo de invasão de tripomastigotas tenham sido alcançados, as moléculas que modulam o reconhecimento e disparam o processo de invasão de amastigotas ainda são pouco elucidadas. Neste estudo, avaliamos a participação de glicosaminoglicanos (GAGs) no processo de reconhecimento e invasão de amastigotas em cardiomiócitos *in vitro*. A padronização do processo de amastigogênese *in vitro* revelou que a diferenciação majoritária de tripomastigotas de *T. cruzi* em amastigotas ocorre após 48h de indução em meio ácido. Neste tempo de diferenciação (48h), os parasitas apresentaram (I) morfologia arredondada, (II) elevados índices de proliferação, (III) presença de antígeno estágio-específico (Ssp4) e (IV) características ultra-estruturais similares a amastigotas intracelulares. A cinética de infecção amastigota-cardiomiócito revelou elevados índices de infecção, atingindo 25% e 51% após 2h e 48h, respectivamente, na proporção de 65:1 parasita-célula alvo. Para avaliar o papel de GAGs sulfatados no reconhecimento parasita-cardiomiócitos, amastigotas foram pré-tratadas com 20µg/ml de GAGs solúveis, incluindo heparina, heparan sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), dermatan sulfato (DS) e queratam sulfato (KS), antes da interação com a célula alvo. Nossos resultados demonstraram que o tratamento de amastigotas com heparina e HS inibe a penetração em cardiomiócitos, alcançando 82% e 65% de inibição da invasão, respectivamente. Semelhante à tripomastigotas, o reconhecimento de amastigotas extracelulares é mediado pelo dissacarídeo ácido *D*-glucurônico (GlcA) ou ácido *L*-idurônico (IdoA) e *N*-acetilglicosamina (NacGli), enquanto GAGs também negativamente carregados, como CS, DS e KS, não dispararam a invasão de amastigotas. A infecção de células de ovário de hamster, selvagem (CHO-K1) e deficientes em GAGs (CHO-745), apontaram uma redução significativa de 74% e 67% da invasão após 2h e 4h de interação, respectivamente. Estes resultados corroboram dados de competição, sugerindo a participação de proteoglicanos de HS como moléculas mediadoras do processo de invasão de amastigotas.

ABSTRACT

Diverse mechanisms of invasion have been described in the infection of different cell types by *Trypanosoma cruzi*, pointing the versatility of this parasite in the recognition of different ligands and/or receptor at the surface of the target cells. Similar to trypomastigotes, classic infective form, amastigote forms play important role in the maintenance of the infection and the progression of Chagas disease. Although advances in the understanding of the mechanisms of trypomastigotes invasion have been attained, the molecules that modulate the recognition and trigger amastigotes invasion process are poorly elucidated. In this study, we evaluated the participation of glycosaminoglycans (GAGs) in the amastigote-cardiomyocyte recognition and invasion process *in vitro*. The standardization of the amastigogenesis process *in vitro* revealed that the majority of differentiation of *T. cruzi* trypomastigotes to amastigotes occurs after 48h of acid-induction. In this time of differentiation (48h), the parasites had presented (I) rounded morphology, (II) raised proliferation index, (III) presence of stage-specific antigen (Ssp4) and (IV) ultrastructural characteristics similar to intracellular amastigotes. The kinetic of amastigote-cardiomyocyte infection revealed high levels of infection, reaching 25% and 51% after 2h and 48h, respectively, in the ratio of 65:1 parasite-target cell. To evaluate the role of sulfated GAGs in the parasite-host cell recognition, amastigotes were pre-treated with 20µg/ml of soluble GAGs, including heparin, heparan sulfate (HS), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) and keratan sulfate (KS) prior to cardiomyocyte interaction. Our results demonstrated that treatment of acid-induced amastigotes with heparin and HS inhibits the penetration in cardiomyocyte, achieving 82% and 65% of inhibition of the invasion, respectively. Similar to trypomastigotes, the recognition of extracellular amastigotes is mediated by *D*-glucuronic acid (GlcA) or *L*-iduronic acid (IdoA) and *N*-acetylglucosamine (NacGli) disaccharide while GAGs also negatively charged, as CS, DS and KS, did not elicit amastigotes invasion. The infection of cells of hamster ovary, wild-type (CHO-K1) and deficient in GAGs (CHO-745), had pointed a significant reduction of 74% and 67% of the invasion in CHO-745 after 2h and 4h of interaction, respectively. These results corroborate competition assay data, suggesting the participation of heparan sulfate proteoglycans as mediating molecule of the amastigote invasion process.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – Albumina de soro bovino

BZ – Benznidazol

Células CHO – Linhagem celular derivada do ovário do hamster Chinês

CO₂ – Dióxido de carbono

CS – Condroitim sulfato

DABCO – 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano

DAPI – 4,6-Diamino-2-Fenilindol

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco

dpi – Dia pós-infecção

DS – Dermatam sulfato

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FAK – Cinase de adesão focal

g – Gravidade

GA - Glutaraldeído

GAGs – Glicosaminoglicanos

Gal - Galactose

GalNAc – N-acetil-galactosamina

GlcA – Ácido glicurônico

GlcNAc – N-acetil-glicosamina

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

HA – Ácido hialurônico

HS – Heparan sulfato

IdoA – Ácido idurônico

kDa – quilo Daltons

KS – Queratam sulfato

MEC – Matriz extracelular

NFX – Nifurtimox

OsO₄ – Tetróxido de ósmio

PBS – Tampão salina fosfato

PFA – Paraformaldeído

PGHS – Proteoglicano de heparam sulfato

PI3K - fosfatidil inositol 3-cinase

SFB – Soro fetal bovino

TS – Trans-sialidase

Xyl – Xilose

ÍNDICE

Introdução	1
1. Doença de Chagas	2
1.1. Epidemiologia e distribuição geográfica	2
1.2. Evolução e tratamento da doença de Chagas	3
2. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
2.1. Formas evolutivas	7
2.2. Ciclo biológico	10
3. Interação <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
4. Matriz Extracelular	14
4.1. Glicosaminoglicanos e proteoglicanos	16
Objetivos	21
Material e Métodos	23
1. Cultura de cardiomiócitos	24
2. Cultura de células Vero	25
3. Obtenção de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
a. Formas tripomastigotas	25
b. Formas amastigotas	26
4. Interação amastigotas-cardiomiócitos	26
5. Ensaio de competição	27
6. Ensaio com células CHO	27
7. Coloração pelo Giemsa	28
8. Imunofluorescência indireta	28
9. Microscopia eletrônica de transmissão	29
Resultados	30
1. Processo de amastigogênese <i>in vitro</i>	31
2. Interação amastigotas-cardiomiócitos	38
3. Reconhecimento celular	41
a. Ensaio de competição com GAGs	41
b. Ensaio com células CHO	44
Discussão	47
Conclusões	54
Referências	56
Anexo I	72
<u>Artigo</u> : Heparan sulfate proteoglycan tiggers invasion of cardiac myocytes by <i>Trypanosoma cruzi</i> amastigotes	73

INTRODUÇÃO

Devido, principalmente, aos programas de controle e crescente migração rural-urbana, dados de prevalência e incidência da doença de Chagas estão em constante mudança (Moncayo e Yanine, 2006). Na década de 80, a doença atingia cerca de 17 milhões de indivíduos e, a cada ano, eram registrados em torno de 700.000-800.000 novos casos (WHO, 1991). Em 1991, uma iniciativa lançada por diversos países do Cone Sul da América Latina teve como proposta eliminar a transmissão através de medidas preventivas como: (i) utilização de inseticidas em casas de áreas endêmicas, visando eliminação do inseto vetor com posterior controle entomológico para evitar re-infecções; (ii) controle sorológico rigoroso em bancos de sangue a partir da seleção de doadores e/ou esterilização do sangue utilizado para transfusão, (iii) programas de educação sanitária e (iv) melhoria das moradias (Moncayo e Yanine, 2006).

Estudos epidemiológicos demonstraram que os esforços no controle da infecção resultaram na interrupção da transmissão vetorial e transfusional no Uruguai (1997), Chile (1999) e Brasil (revisto por Moncayo e Yanine, 2006). Recentemente, o Brasil recebeu da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e Organização Mundial de Saúde (OMS) a certificação de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* (revisto por Dias, 2006). Na Argentina e Paraguai, as reduções da incidência da doença de Chagas foram bastante significativas (WHO, 2002). Dados atuais demonstram que há cerca de 13 milhões de pessoas infectadas, com aproximadamente 200.000 novos casos por ano (WHO, 2005). Ainda, em reconhecimento a gravidade de doenças negligenciadas na América Latina, a OPAS/OMS, juntamente com os governantes dos países sul americanos e seus programas de controle de doenças nacionais, estão combinando esforços para controle e, em alguns casos, eliminação de doenças tropicais negligenciadas (revisto por Hotez et al., 2008).

1.2. Evolução e tratamento da doença de Chagas

A doença é dividida em duas fases consecutivas: aguda e crônica. A primeira, caracterizada por elevada parasitemia, é controlada rapidamente pelo sistema imunológico e geralmente assintomática e, portanto, de difícil detecção. Cerca de 95% dos pacientes infectados não apresentam sinais clínicos significativos (revisto

por Antas et al., 1999; Grauert et al., 1993; Hofflin et al., 1987). Em alguns casos são observados sintomas clínicos nesta fase, podendo levar à morte principalmente crianças (1-5 anos) e indivíduos imuno-comprometidos, geralmente por meningoencefalite e, menos freqüentemente, por falência cardíaca causada por miocardite aguda difusa (revisto por Moncayo e Yanine, 2006). Nos casos de transmissão vetorial podem ser observados sinais de porta de entrada, também chamados de chagomas de inoculação, sendo o mais indicativo deles o Sinal de Romaña (Romaña, 1935).

Após a fase aguda, a doença evolui para fase crônica que pode ser sintomática (forma determinada) ou assintomática (forma indeterminada). A maioria dos indivíduos apresenta a forma indeterminada, que é caracterizada pelos seguintes critérios: (i) positivo para o teste de IgG específico; (ii) ausência de sintomas clínicos; (iii) ausência de alterações eletrocardiográficas e (iv) coração, esôfago e cólon apresentando aspecto normal na análise por raio-X (revisto por Teixeira et al., 2006). Após intervalo de tempo que pode variar de alguns anos até décadas, cerca de 30% dos indivíduos infectados ingressam na forma determinada, onde são observadas manifestações cardíacas, digestivas e, menos freqüentemente, neurológicas (Dias e Coura, 1997). O tempo médio entre a infecção aguda e o desenvolvimento de lesões graves na fase crônica da doença foi estimado em 28 ± 7 anos (revisto por Prata, 2001).

As manifestações digestivas, apresentadas por 5 a 10% dos indivíduos infectados, são acarretadas normalmente pela destruição neuronal do trato gastrointestinal e representadas principalmente por alterações morfológicas e funcionais do cólon e esôfago (da Silveira et al., 2007; Tanowitz et al., 1992). No megacólon, o reto e o cólon sigmóide são os segmentos mais comprometidos, onde são observados alargamento luminal e hipertrofia muscular (da Silveira et al., 2007).

Cerca de 30 a 40% dos indivíduos manifestam alterações cardíacas na fase crônica da doença (Marin-Neto et al., 2007). A cardiomiopatia chagásica crônica, forma mais grave da doença, é progressiva, irreversível e incapacitante, sendo evidenciado alterações eletrocardiográficas, hipertrofia do órgão, intensa miocardite e fibrose. Esta última é decorrente da destruição da massa muscular, que é substituída por intensa fibrose, levando a interrupção das fibras cardíacas. Em pacientes com alterações eletrocardiográficas graves, cerca de 58% apresentam

sinais de falência do órgão e, geralmente, morrem dentro de 7 – 24 meses (revisto por Teixeira et al., 2006).

Até o momento a etiologia da doença de Chagas não está bem determinada e múltiplos mecanismos têm sido propostos para explicar a patogênese da doença. A hipótese da doença de Chagas ser uma doença auto-imune foi difundida a partir da década de 70, pelo fato dos pacientes cardiopatas apresentarem inflamação e extensa fibrose mesmo na ausência aparente do parasita (Santos-Buch e Teixeira, 1974). Estudos detectaram produção de anticorpos contra antígenos próprios e presença de linfócitos T auto-reativos durante a infecção pelo *T. cruzi* (Cunha-Neto et al., 1995, 1996; revisto por Marin-Neto et al., 2007). Porém, duas críticas são geralmente usadas contra a hipótese auto-imune: (i) o fato de que drogas imunossupressoras levam a mortalidade e exacerbação da doença, ao invés de controlarem os sintomas e (ii) a eficácia da quimioterapia anti-*T. cruzi* na redução da sintomatologia clínica em humanos e modelos experimentais (revisto por Leon e Engman, 2003). Outra hipótese é que a resposta imune inflamatória seria disparada por antígenos do parasita (Higuchi et al., 1997, Zhang e Tarleton, 1999). Antígenos do parasita foram encontrados em biópsias de corações chagásicos crônicos humanos (Palomino, 2000). No entanto, como a intensidade da doença nem sempre é proporcional ao grau de parasitismo, diversos autores apontam a possibilidade do envolvimento de outros mecanismos patogênicos associados.

O tratamento clínico da doença de Chagas baseia-se em compostos nitro-heterocíclicos, como Benznidazol (BZ) e Nifurtimox (NFX) (revisto por Croft et al., 2005; revisto por Urbina e Do Campo, 2003). A ação dessas duas drogas varia de acordo com a fase da doença, o período de tratamento, a dose do medicamento, a idade e a origem geográfica dos pacientes. Em geral, são ativas nos casos agudos e recentes da infecção, principalmente em crianças. Estes quimioterápicos são indicados principalmente nos casos de infecções recentes, forma congênita, reativação associada à imunossupressão, em situações de transfusões e transplantes de órgãos de doadores infectados e em casos de acidentes de laboratório (Coura e de Castro, 2002; Rassi, 1982). Em relação à infecção crônica, tais compostos têm efeito limitado, porém estudos mais recentes têm demonstrado que o tratamento pode não só retardar como também evitar a evolução da doença (Pinto-Dias, 2006; Urbina e Do Campo, 2003). No entanto, estes quimioterápicos

apresentam efeitos colaterais sérios, como: anorexia, alterações psíquicas, manifestações digestivas, dermatites com erupção cutânea, edema generalizado, febre, dores articulares e musculares, depressão da medula óssea, trombocitopenia, entre outros (Castro et al., 2006; Coura, 1996). Ainda, a presença de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a BZ e NFX contribui para o índice reduzido de cura (Dos Santos et al., 2008; Filard e Brener, 1987). Desta forma, a busca de novos compostos ativos em ambas as fases da doença, aguda e crônica, e com efeitos colaterais reduzidos tem sido alvo de intensa investigação.

Derivados de triazóis, inibidores específicos da biossíntese de ergosterol como posaconazol e ravuconazol, apresentam potente ação tripanocida e eficácia na infecção experimental, sendo em breve aplicados em ensaios clínicos (Croft et al., 2005, Molina et al., 2000). Estudos revelaram que inibidores de cruzipaina, uma cisteína proteinase importante na relação parasita/célula hospedeira, são capazes de eliminar o parasita e promover a cura de camundongos infectados (Cazzulo, 2002). Diamidinas aromáticas induzem a morte do parasita, através da associação ao seu DNA, comprometendo a expressão de genes, duplicação e reparação do mesmo (Silva et al., 2007). Outros compostos, incluindo bisfosfanatos (Sanz-Rodríguez et al. 2007), 3-(bifil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH) e ER27856, dois inibidores específicos da esqualeno sintase (Braga et al., 2004) e derivados de acridina (Pardo Andreu et al., 2008) apresentam resultados bastante promissores e são fortes candidatos à aplicação terapêutica.

2. O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado digenético, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A característica principal desta ordem é a presença de uma estrutura intramitocondrial localizada logo abaixo do corpúsculo basal chamada de cinetoplasto, que consiste em uma grande quantidade de DNA organizada na forma de microcírculos. Seu ciclo biológico envolve dois hospedeiros: um vertebrado, mamíferos silvestres ou domiciliares, incluindo o homem, e um invertebrado. Este parasita é transmitido

através do inseto vetor, hemípteros da família Reduviidae e subfamília Triatominae, conhecido vulgarmente como barbeiro. Os principais gêneros são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Além da transmissão natural, através do inseto vetor, o *T. cruzi* também é transmitido por transfusão sangüínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, acidentes de laboratório ou ingestão de alimentos contaminados (Angelis et al., 2003; Dias et al., 2008; Kirchhoff et al., 2004; Yoshida 2008). A transmissão via oral tornou-se um importante mecanismo de infecção nos últimos anos, gerando microepidemias e acarretando sintomas clínicos agudos com alta mortalidade (Coura 2006). Casos recentes de infecção oral foram reportados em diferentes regiões, como: Rio de Janeiro em 2004, Bahia em 2004 e 2006, Santa Catarina em 2005, Amazônia em 2004 e 2007 e Pará em 2006, acarretados pelo consumo de alimentos contaminados, como água, açaí e caldo de cana. Colônias de triatomíneos positivos para infecção pelo *T. cruzi*, cujas espécies identificadas foram *Triatoma vitticeps* (Rio de Janeiro) *Triatoma sordida* (Bahia) e *Rhodnius robustus* e *Panstrongylus lignarius* (Pará), foram encontradas nas proximidades onde os casos de infecção oral foram relatados. Estes dados enfatizam a necessidade de se avaliar a importância de outros vetores na manutenção da endemicidade da doença (Dias et al., 2008; Lorosa et al., 2008; Yoshida 2008).

2.1. Formas evolutivas

Durante seu ciclo biológico, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas distintas: amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas. Em hospedeiros vertebrados ocorrem as duas primeiras formas, enquanto no invertebrado, as duas últimas. Estruturas intracelulares e organelas foram primeiramente visualizadas nas formas epimastigotas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 2), sendo observada a presença de complexo de Golgi, retículo endoplasmático, núcleo, glicosoma, acidocalcisoma, corpúsculo basal e microtúbulos subpeliculares, vesículas endocíticas e vacúolo contrátil, mitocôndria e cinetoplasto (revisto por De Souza 2008).

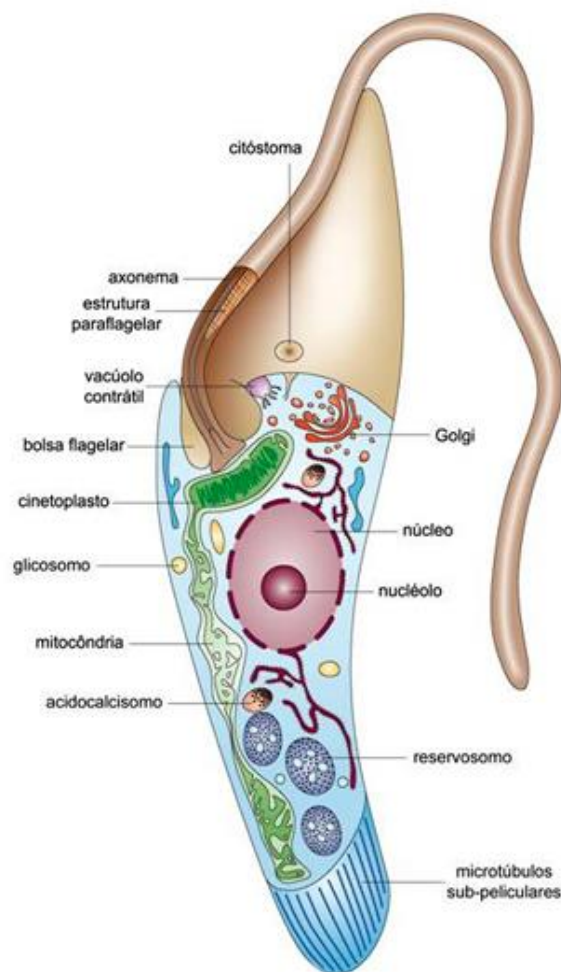


Figura 2. Esquema da forma epimastigota de *T. cruzi* contendo as principais estruturas e organelas. Imagem retirada do artigo de De Souza 2008 no Portal de doença de Chagas da FIOCRUZ - www.fiocruz.br/chagas/media/fig1a.jpg (acessado em outubro/2008).

Tripomastigotas (Figura 3a) são formas flageladas alongadas, com aproximadamente 25 μm de comprimento e 2 μm de diâmetro (De Souza, 2002). Seu cinetoplasto, organela com DNA mitocondrial abundante, é grande e redondo e constituído de lamelas espaçadas (Tomlinson et al, 1995). Encontra-se na região posterior ao núcleo, cuja localização é o segmento médio do citossomo. Seu flagelo, que equivale à cerca de um terço do seu comprimento total, percorre aderido toda a extensão do corpo celular. São as formas infectivas clássicas e não possuem capacidade proliferativa. Os tripomastigotas encontrados no sangue do hospedeiro

vertebrado e no intestino do inseto vetor são denominados tripomastigotas sanguíneos e metacíclicos, respectivamente (Brenner, 1973).

Amastigotas (Figura 3b) são formas arredondadas, com pouco citoplasma e núcleo redondo e excêntrico. Medem aproximadamente 4 μm de diâmetro e possuem um flagelo muito curto ou reduzido ao segmento intracelular, o que justifica sua baixa mobilidade (Rey, 1991). Seu cinetoplasto, situado na região anterior ao núcleo, é alongado e possui uma constituição em lamelas condensadas (Tomlinson et al., 1995). As amastigotas são formas proliferativas intracelulares, porém também são capazes de infectar células do hospedeiro vertebrado (De Souza, 2002; Ley et al., 1990).

Epimastigotas (Figura 3c) são formas flageladas alongadas, medindo cerca de 20 - 40 μm de comprimento (De Souza, 2002). Seu cinetoplasto, com formato de um disco ligeiramente côncavo, é localizado na região anterior ao núcleo e sua bolsa flagelar abre-se lateralmente, por onde o flagelo emerge. Este se mantém aderido ao corpo celular até a extremidade anterior, onde se torna livre. São formas proliferativas, encontradas no intestino do inseto vetor e incapazes de infectar células de vertebrados (De Souza, 2002).

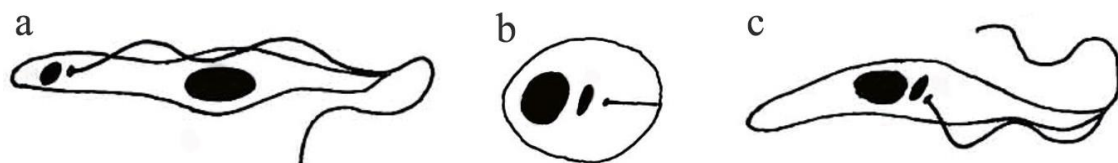


Figura 3 – Esquema das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*.
(a) Tripomastigota, (b) Amastigota e (c) Epimastigota.

2.2. Ciclo biológico

A infecção natural ocorre através da liberação de formas tripomastigotas metacíclicas juntamente com as fezes e urina do inseto vetor infectado, durante o repasto sanguíneo (Figura 4A). Os tripomastigotas não são capazes de penetrar na pele íntegra do hospedeiro vertebrado. Desta forma, penetram através de fissuras na pele e/ou mucosa ocular (Figura 4B) e invadem macrófagos e/ou células do tecido conjuntivo adjacente. Após adesão e invasão nas células hospedeiras, os parasitas diferenciam-se intracelularmente em formas amastigotas (Figura 4C) que, após sofrerem sucessivas multiplicações, se rediferenciam em tripomastigotas. A lise da célula infectada libera os tripomastigotas juntamente com formas amastigotas, que podem invadir células adjacentes e/ou atingir a corrente sanguínea e infectar tecidos distantes (Figura 4D). Embora os tripomastigotas sejam as formas infectivas clássicas, estudos revelaram que amastigotas liberadas no espaço intersticial são capazes de infectar células vizinhas e/ou recrutar células mononucleares, gerando intensos focos de infiltrados inflamatórios (Ley et al., 1988; Schafstein et al., 1999). Após o repasto sanguíneo (Figura 4E), as formas tripomastigotas sanguíneas (Figura 4F) ingeridas se diferenciam em formas epimastigotas no intestino médio do hospedeiro invertebrado, durante o repasto sanguíneo (Figura 4G), se multiplicam e se rediferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas (Figura 4H), que serão novamente liberadas nas fezes e urina, dando continuidade ao ciclo biológico.

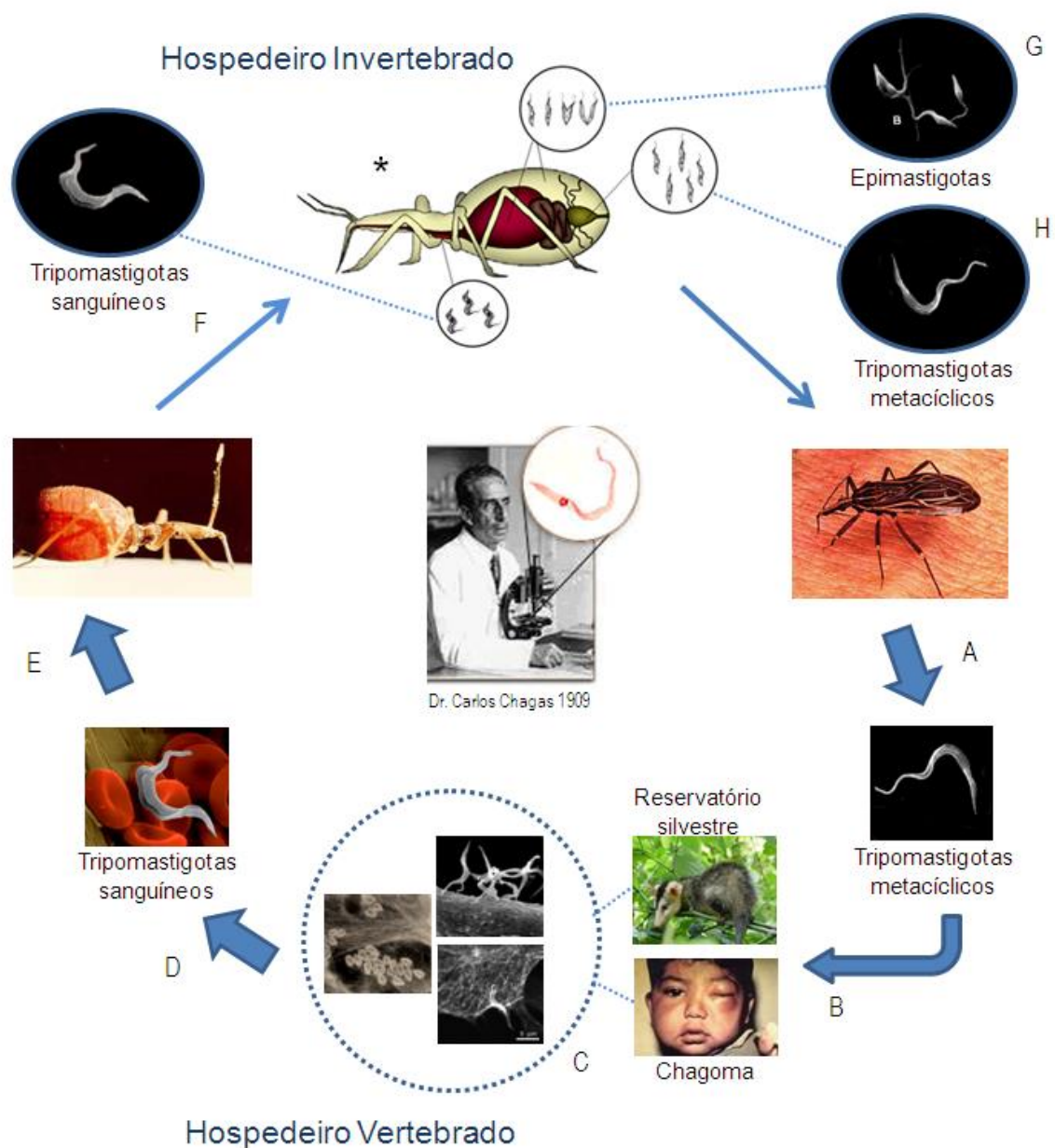


Figura 4.- Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Fontes: (A) http://www.fundep.ufmg.br/homepage/fotos_cases/barbeiro_interna.jpg (acessado em nov/2008). (B) http://www.cib.uaem.mx/agebiol/pr03_archivos/image016.jpg (acessado em nov/2008).

(C) Dra. Mirian Pereira / Dra. Helene Barbosa / Dra. Técia de Carvalho.

(D) http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/fevereiro/img/chagas_2.jpg (acessado em out/2008). (E) www.fiocruz.br/ccs/media/chagas.jpg (acessado em nov/2008). (F-H)

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=1> (acessado em nov/2008).

(*) Dra. Patrícia Azambuja.

3. Interação *Trypanosoma cruzi* – célula hospedeira

O *T. cruzi* é um parasita intracelular obrigatório e sua capacidade de invadir células de mamíferos determina sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado. Seu mecanismo de invasão é dividido em duas etapas fundamentais: adesão e interiorização do parasita (Meirelles et al., 1982). Assim, o estabelecimento da infecção é dependente do reconhecimento entre moléculas da superfície do parasita e da célula hospedeira e da ativação de vias de sinalização que disparem o processo de internalização do parasita. Embora o tecido cardíaco seja preferencialmente afetado, o *T. cruzi* é capaz de aderir e invadir diferentes tipos celulares, sugerindo que este parasita reconhece uma multiplicidade de receptores/ligantes na superfície da célula hospedeira.

Estudos *in vitro* de interação *T. cruzi* - célula hospedeira têm contribuído para o esclarecimento de eventos biológicos e moleculares do processo de invasão e desenvolvimento intracelular do parasita. O tropismo do *T. cruzi* por células musculares (Brenner, 1973; Cabrine-Santos et al., 2001), principalmente células musculares cardíacas, é evidenciado pelos altos índices de lesões no miocárdio, principalmente na fase crônica da doença (Eliazari, 1999; Higuchi et al., 2003). Desta forma, o modelo de cultura primária de células musculares cardíacas utilizado neste estudo torna-se uma importante ferramenta para o estudo dos aspectos biológicos da interação *T. cruzi* - cardiomiócito. Embora diferentes moléculas tenham sido descritas como protagonistas do processo de invasão, as moléculas que deflagram a adesão e penetração do *T. cruzi* não estão bem definidas.

A superfície negativa da célula hospedeira modula a adesão e invasão do *T. cruzi* (Ming et al., 1993; Schenckman et al., 1991, 1992; Soeiro et al., 1995; Villalta et al., 2001) através da participação de membros da superfamília gp85/trans-sialidase presente na superfície do parasita (revisto por Alves e Colli, 2007). As trans-sialidasas (TS) desempenham duplo papel no processo de invasão: (i) removem ácido siálico da superfície da célula alvo transferindo-os para moléculas aceptoras na superfície do parasita, conhecidas como Ssp3 (Schenkman e Eichinger 1993) e (ii) atuam como molécula multiadesiva com propriedade de ligação a laminina e citoqueratina 18 em células epiteliais, mediado pelo domínio FLY de TS (Magdesian et al., 2001; 2007). Evidências demonstraram a capacidade de ligação de gp85 com

moléculas na superfície de cardiomiócitos (Alcântara-Neves et al., 2004). Ainda, glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* como gp30/50 e gp82 disparam vias de sinalização com liberação de Ca^{2+} em ambos, o parasita e a célula hospedeira (revisto por Yoshida 2006), acarretando recrutamento ou despolimerização de filamentos de actina, respectivamente, para penetração do parasita (Ferreira et al., 2006).

Além disso, carboidratos presentes na superfície da célula hospedeira, incluindo galactose, N-acetil glicosamina e N-acetil galactosamina, desempenham importante papel no reconhecimento e invasão do parasita em diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos e cardiomiócitos (Araújo-Jorge e De Souza., 1988; Barbosa e Meirelles, 1992). Receptores na superfície celular, como integrinas (Fernández et al., 1993) e receptor de manose (Soeiro et al., 1999), e componentes de matriz extracelular, incluindo proteoglicanos de heparan sulfato e fibronectina (Calvet et al., 2003, 2004), também participam do processo de reconhecimento parasita – célula hospedeira. Evidências demonstraram que fibronectina promove adesão e entrada de tripomastigotas mediado por seu domínio RGD (Calvet et al., 2003; Ouaiissi et al., 1985). Ainda, estudos recentes demonstraram a participação de domínios especializados de membrana enriquecidos em colesterol e caveolina no processo de invasão do *T. cruzi* (Barrias et al., 2008; Fernandes et al., 2008). Assim, a penetração do *T. cruzi* na célula alvo é um processo envolvendo várias moléculas da superfície do parasita e da célula hospedeira.

Embora avanços no entendimento do mecanismo de invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* tenham sido alcançados nas últimas décadas, as moléculas envolvidas nos processos de reconhecimento e invasão de formas amastigotas ainda não são bem conhecidas. Diversos estudos têm sugerido que as duas formas evolutivas utilizam diferentes estratégias para a invasão da célula hospedeira, apontando que não somente moléculas que modulam o reconhecimento assim como as vias de sinalização ativadas durante o processo de invasão de tripomastigotas e amastigotas sejam distintas. Em contraste com tripomastigotas, evidências demonstraram que alterações na concentração de Ca^{2+} não afetam a invasão de amastigotas em células Vero (Stecconi-Silva et al., 2003). O tratamento de células Vero e HeLa com citocalasina D, droga que desorganiza filamentos de actina, inibe somente a invasão de formas amastigotas e não tripomastigotas, sugerindo um papel mais passivo de amastigotas durante o processo de

interiorização (Procópio et al., 1998). Estudos com células HeLa demonstraram que as duas formas evolutivas interagem com diferentes regiões das células hospedeira, sendo evidenciado que tripomastigotas utilizam preferencialmente a região basolateral como sítio de penetração na célula, enquanto amastigotas invadem a célula preferencialmente pela região apical, onde são encontradas microvilosidades. (Mortara et al., 1991). Em contraste, ambas as formas infectivas, tripomastigotas e amastigotas, são capazes de penetrar na célula alvo por domínios especializados de membrana enriquecidos em colesterol (Fernandez et al., 2008). Estudos demonstraram a participação efetiva de amastigotas na progressão e manutenção da infecção sendo esta forma evolutiva apontada como desencadeadores da miocardite focal (de Carvalho e de Souza, 1986; Ley et al., 1988; Schafstein et al., 1999). Desta forma, o esclarecimento das moléculas envolvidas no processo de invasão de formas amastigotas é importante para o entendimento da patogenia da doença de Chagas e fornecerá novas informações nos campos de pesquisa básica, permitindo a detecção de moléculas alvo para fins profiláticos.

4. Matriz extracelular (MEC)

Inicialmente a matriz extracelular foi descrita como uma matéria inerte, cuja função era apenas estrutural. Atualmente está claro que a matriz exerce um papel muito mais dinâmico e complexo, participando na regulação de atividades funcionais das células nas quais está inserida (revisto por Farhadian et al., 1996), como diferenciação, proliferação, migração e reconhecimento celular. Através de interações célula-matriz, ela é capaz de controlar a função celular. Também atua como moduladora de sinais extracelulares e promove um sítio de estocagem para fatores de crescimento e citocinas (revisto por Sivakumar et al., 2006).

A MEC é constituída por uma rede composta por diferentes tipos de proteínas, lipídios e polissacarídeos (Fig. 5). Seus constituintes majoritários são: (a) proteínas fibrosas, como colágenos e elastina, que lhe conferem resistência e elasticidade; (b) glicoproteínas, como fibronectina e laminina, principais responsáveis pela conexão célula-matriz extracelular e (c) proteoglicanos, que formam um gel hidratado capaz de resistir a forças de compressão (revisto por Tanzer, 2006).

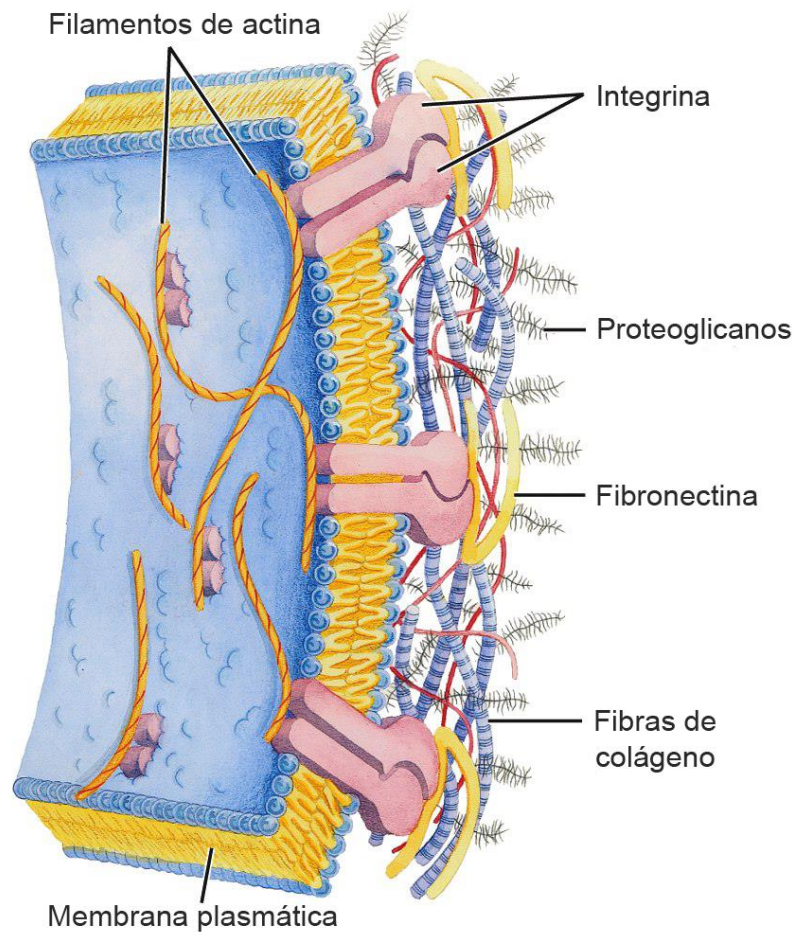


Figura 5 - Representação esquemática da matriz extracelular demonstrando seus principais componentes.

Modificado de: <http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-2/figure-07-30.jpg>
(acessado em novembro/2008)

4.1. Glicosaminoglicanos e proteoglicanos sulfatados

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos não-ramificados, formados por unidades repetidas de dissacarídeos, divididos em grupos de acordo com sua composição e grau de sulfatação. São altamente hidrofílicos, em função da carga negativa atribuída pelos grupamentos sulfato. Tais moléculas participam de diversos processos biológicos, como interação da matriz extracelular e controle de processos inflamatórios, influenciando na produção de citocinas/quimiocinas, enzimas e fatores de crescimento, no recrutamento de leucócitos, entre outros eventos (Taylor e Gallo, 2006).

Há quatro famílias principais de GAGs: (i) Heparan sulfato (HS)/ Heparina, (ii) Condroitim sulfato (CS)/ Dermatam sulfato (DS), (iii) Queratam sulfato (KS) e (iv) Ácido Hialurônico (HA). Estes dissacarídeos são formados por um açúcar aminado geralmente sulfatado (*N*-acetil-D-glucosamina ou *N*-acetil-D-galactosamina) e um ácido urônico (glicurônico ou idurônico), exceto o KS, que contém uma galactose no lugar do ácido urônico (Taylor e Gallo, 2006).

O ácido hialurônico é o mais simples dos GAGs, formado por até 25 mil unidades dissacarídeas não-sulfatadas, um ácido glicurônico e uma *N*-acetil-glicosamina. Diferentemente dos outros GAGs, não é covalentemente ligado a nenhuma proteína central, por isso não faz parte dos proteoglicanos. É encontrado em quantidades variáveis em todos os tecidos e fluidos adultos animais e é especialmente abundante no embrião no início do desenvolvimento.

O condroitim sulfato (CS) é formado por um ácido glicurônico e uma *N*-acetil-galactosamina, podendo ser sulfatado. O dermatam sulfato é semelhante ao condroitim, porém possui um ácido idurônico no lugar do ácido glicurônico (Figura 6).

O heparan sulfato e a heparina são estruturalmente semelhantes, porém apresentam diferenças quanto o grau de sulfatação. Ambos são constituídos por resíduos alternados de *N*-acetil-glicosamina e por ácido glicurônico (Figura 6). Esta estrutura sofre subseqüentes modificações, que resultam na *N*-sulfatação de resíduos de glicosamina. No caso do heparan sulfato, essas reações são restritas a domínios característicos, deixando partes da cadeia inalteradas. Uma consequência dessa não conclusão das etapas de modificação é a geração de uma diversidade estrutural das cadeias de heparan sulfato, levando a um potencial para uma grande

variedade de interações específicas (Hardingham e Fosang, 1992; revisto em Schönher e Hausser, 2000). Durante a síntese de heparina essas modificações se completam, gerando o maior nível de sulfatação entre os GAGs, e incluindo a epimerização do ácido glicurônico em ácido idurônico. As cadeias de queratam sulfato são compostas de resíduos de N-acetil glicosamina e galactose ligados por β 1,3, que podem ser O-sulfatados no C6 de ambos os açúcares (revisto em Schönher e Hausser, 2000; Turnbull et al., 1995).

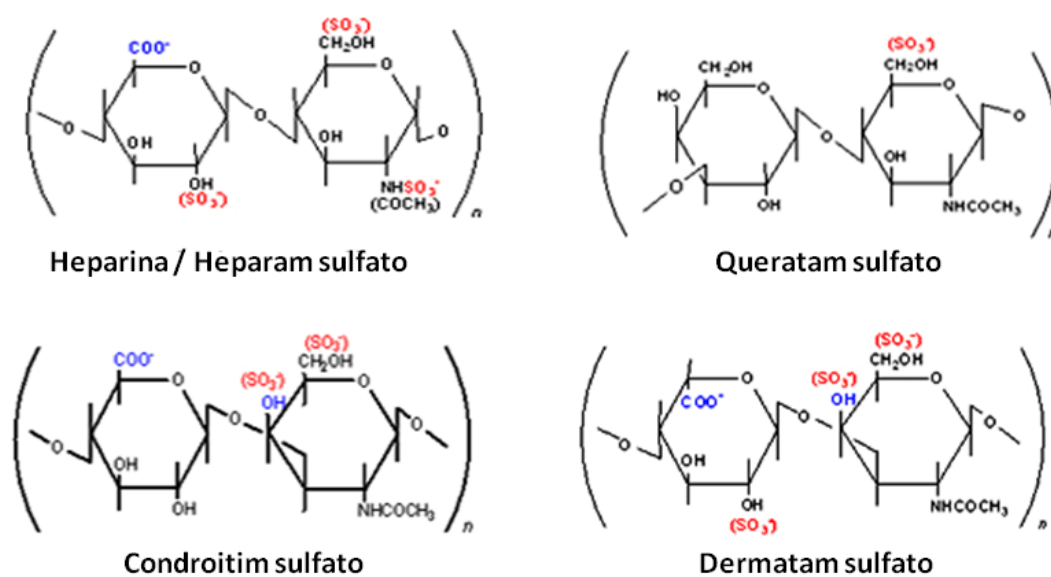


Figura 6- Estrutura dos glicosaminoglicanos sulfatados.

Os proteoglicanos são proteínas glicosiladas formadas por uma proteína central ligada covalentemente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados (Figura 7). Glicosil transferases adicionam as cadeias de polissacarídeos à proteína central a partir de um tetrassacarídeo (xilose – galactose – galactose – ácido glicurônico) associado a resíduos serina (Carey, 1997). O primeiro resíduo xilose é adicionado a partir da atividade de uma xilosil-transferase, no retículo endoplasmático. Dois resíduos galactose são adicionados à xilose no Golgi (cis), por galactosil-transferase I e galactosil-transferase II. O quarto resíduo, um ácido glicurônico, é adicionado por uma glicuronil-transferase no Golgi (trans). Esta cadeia

de tetrassacarídeo inicial é idêntica para todos as famílias de GAGs. A próxima enzima a adicionar um resíduo à cadeia determinará o GAG formado (Taylor e Gallo, 2006).

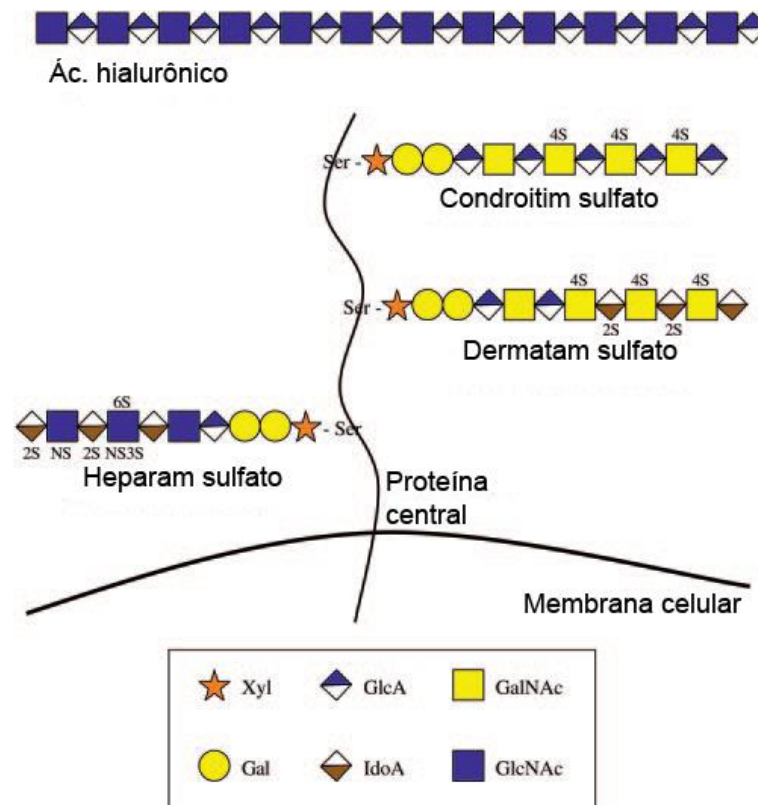


Figura 7 – Estrutura dos proteoglicanos.

Imagem adaptada de Taylor e Gallo 2006 – FASEB J. 20(1):9-22.

O número e tipo de cadeias de GAGs, assim como a grande variação do tamanho das proteínas centrais, geram uma imensa heterogeneidade entre os proteoglicanos. Além disso, mecanismos de sulfatação e fosforilação aumentam ainda mais essa variedade (Taylor e Gallo, 2006). Como um grupo bastante diversificado, suas funções são mediadas tanto pela proteína central quanto pelas cadeias laterais de GAGs (Hardingham e Fosang, 1992). A principal família de proteoglicanos presentes na superfície celular é a dos sindecans (proteoglicanos transmembrana). Há também a família dos glicicanos, proteoglicanos ancorados a membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI) e dos perlecans, proteoglicanos

secretados na membrana basal (Perrimont e Bernfield, 2000). Os sindecans carregam, em seu domínio extracelular, um grande número de cadeias de heparam sulfato e condroitim sulfato. Seu domínio intracelular interage com o citoesqueleto e moléculas sinalizadoras, incluindo cinase de adesão focal (FAK), que atuam em vias de sinalização associada a eventos de adesão e migração regulados por Rho GTPase (Saoncella et al., 2004) e na ativação de enzimas proteolíticas. Além disso, proteoglicanos de heparam sulfato estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos através de sua cadeia de heparam sulfato e/ou proteína central, que regula a atividade de diversos ligantes, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, proteínas de matriz e moléculas de adesão celular (Chen et al., 2007; Guerrini et al., 2002).

Ainda, estudos têm demonstrado que proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) participam do processo de invasão de diferentes microorganismos patogênicos, como: bactérias (Henry-Stanley et al., 2002; Hess et al., 2006; Ihn et al., 2000, Plotkowski et al., 2001); protozoários (Calvet et al., 2003; Frevert et al., 1993; Jacquet et al., 2001) e vírus (Reddi e Lipton, 2002; Rue e Ryan, 2002; Walker et al., 2002). Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* aderem em PGHS presentes na superfície da célula hospedeira a partir de SAG3, antígeno de superfície ancorado a sua membrana via glicosilfosfatidilinositol (Jacquet et al., 2001). Ainda, a adesão de *Plasmodium falciparum* em hepatócitos e células estreladas é via circunsporozoíta (CS), proteína de superfície de esporozoítas - proteoglicanos (Frevert et al., 1993). No entanto, CS se liga a proteoglicanos de heparam sulfato e condroitim sulfato na superfície de células estreladas, porém somente em proteoglicanos de heparam sulfato na superfície de hepatócitos (Pradel et al., 2002).

A identificação de uma proteína de 60 kDa na superfície do *T. cruzi*, penetrina, capaz de promover a adesão de tripomastigotas a moléculas de heparam sulfato, heparina e colágeno, sugere a participação destas moléculas na invasão do parasita (Ortega-Barria e Pereira, 1991). Além disso, estudos demonstraram o papel de proteoglicanos de heparam sulfato como mediadores do processo de invasão de tripomastigotas em cardiomiócitos (Calvet et al., 2003). Evidências demonstraram a participação efetiva do domínio N-acetilado/N-sulfatado da cadeia de heparam sulfato (HS) neste processo, sendo sua interação com o ligante da superfície do parasita modulada pela domínio N-sulfatado (Oliveira-Jr et al., 2008). Recentemente, proteínas com massas moleculares de 59 kDa e 65,8 kDa com propriedades de

ligação a heparina, heparam sulfato e condroitim sulfato foram descritas em tripomastigotas e amastigotas (Oliveira-Jr et al., 2008). No entanto, ainda não há dados da participação de GAGs na invasão de formas amastigotas. Assim, neste projeto nos propusemos a avaliar a participação de proteoglicanos sulfatados no reconhecimento de cardiomiócitos por formas amastigotas de *T. cruzi*.

OBJETIVOS

- I. Padronizar a técnica de amastigogênese *in vitro* do *Trypanosoma cruzi*, clone Dm28c;

- II. Avaliar o índice de infecção de formas amastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos *in vitro*;

- III. Analisar o papel de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados, como heparina, heparam sulfato, condroitim sulfato, queratam sulfato e dermatam sulfato no reconhecimento e invasão de formas amastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura de cardiomiócitos

Células musculares cardíacas foram obtidas de embriões de camundongos Suíços com 18 dias (Meireles et al., 1986). As fêmeas grávidas foram eutanasiadas em câmara mortuária contendo dióxido de carbono (CO₂) e, na câmara de dissecação, fixadas na placa de contenção (placas de cortiça) com a região ventral voltada para cima. Após assepsia com álcool 70%, a pele foi removida expondo a cavidade peritoneal. O útero contendo os embriões foi retirado e transferido para placa de Petri contendo solução de Ringer (NaCl 154 mM, KCl 3,35 mM, CaCl₂ 1,7 mM, pH 7,0). Dentro da cabina de segurança biológica, os embriões foram decapitados e seus corações removidos após a incisão do esterno. Em seguida, os átrios foram retirados e descartados e os ventrículos fragmentados com auxílio de bisturi. Para a remoção de hemácias, os fragmentos foram lavados por 5 min em solução de Ringer sobre placa agitadora aquecida (37°C). Posteriormente, o tecido fragmentado foi lavado em solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2, (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM, Na₂HPO₄ 6,4 mM, pH 7,2) e submetido à dissociação enzimática seqüencial, utilizando PBS, pH 7,2, contendo tripsina 0,025% e colagenase 0,01%. A série de tripsinizações foi efetuada até completa dissociação do tecido. As células isoladas foram quantificadas em câmara de Neubauer ao microscópio de luz Zeiss com contraste de fase e plaqueadas na densidade de 8×10^4 células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas previamente revestidas com gelatina 0,01%. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 8% soro fetal bovino (SFB), 2% extrato embrionário, 25 mM CaCl₂, 1 mM L-glutamina e antibióticos (penicilina e estreptomicina). O meio nutritivo foi trocado a cada 2 dias. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da FIOCRUZ (registro número P0230-04, aprovado em 01 de agosto de 2005).

2. Cultura de células Vero

As culturas de células Vero, uma linhagem celular proveniente de rim de macaco verde africano, foram mantidas em nosso laboratório para obtenção de massa parasitária de *T. cruzi* (clone Dm28c). A amplificação das células foi realizada semanalmente através de dissociação com solução PBS contendo tripsina 0,01% e Verseno (EDTA) 0,01%, pH 7,2 por 2 a 5 minutos a 37°C. As células isoladas foram recolhidas e plaqueadas na densidade de 3×10^6 células por frasco de cultura de 75 cm². As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio RPMI suplementado com 5% SFB e 1mM L-glutamina. O meio nutritivo foi trocado a cada 2 dias.

Ao atingir semi-confluência (70%), as culturas foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, e processadas para purificação das formas tripomastigotas como descrito a seguir.

3. Obtenção de *Trypanosoma cruzi*

a. Formas tripomastigotas

Culturas de células Vero semi-confluentes foram infectadas com *T. cruzi*, clone Dm28c, na proporção de 5:1 parasita/célula hospedeira. Em função da alta virulência do *T. cruzi*, clone Dm28c, os ensaios de infecção foram realizados com baixa relação parasita/célula hospedeira. A obtenção de formas tripomastigotas foi realizada na primeira liberação das culturas infectadas, a fim de garantir o isolamento de formas tripomastigotas purificadas, ou seja, sem contaminação de formas amastigotas liberadas pela ruptura das células Vero em infecções tardias.

No 4º dia após a infecção (dpi), formas tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante das culturas infectadas e purificadas através de centrifugação a 2.136 g por 15 min. O sedimento contendo os parasitas foi ressuspenso em 1 a 2 ml de DMEM e o número de parasitas/ml determinado pela quantificação em câmara de Neubauer.

b. Formas amastigotas axênicas (amastigogênese)

Formas amastigotas de *T. cruzi* foram obtidas pelo método modificado de acidificação do meio (Tomlinson et al., 1995), cuja proposta é mimetizar o microambiente intracelular da infecção *in vivo*.

Tripomastigotas provenientes de células Vero foram incubados por 4 h a 37° C em meio RPMI suplementado com 1 % soro fetal bovino (SFB) pH 5,0, na concentração de 5×10^6 parasitas/ml. Em seguida, os parasitas foram sedimentados por centrifugação a 2.136g por 15 min e ressuspensos em 10 ml de meio RPMI suplementado com 1% SFB (Cultilab) pH 7,2. O meio enriquecido com formas tripomastigotas submetidos por 4 h a pH 5,0 foi transferido para frascos de cultura de 25 cm² e mantido a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂.

O processo de diferenciação foi monitorado por microscópio invertido Olympus equipado com contraste de fase, com o objetivo de avaliar as mudanças morfológicas ocorridas até 72 h após indução da diferenciação. Durante este período, a proliferação das formas amastigotas foi avaliada através da quantificação diária do número de parasitas/ml em câmara de Neubauer, em 3 experimentos. Para avaliação da morfologia e posição do cinetoplasto dos parasitas durante o processo de diferenciação, amostras foram coletadas em diferentes tempos e processadas para análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão, como descrito no item 9. Ainda, a análise da expressão do antígeno de superfície específico de formas amastigotas (Ssp-4) foi realizado através de marcação com o anticorpo anti-Ssp4, conforme descrito no item 8.

4. Interação amastigotas-cardiomiócitos

Culturas de cardiomiócitos crescidas por 48 h em lamínulas de vidro (13 mm) foram infectadas com formas amastigotas provenientes da amastigogênese *in vitro* (48h pós-indução). Para avaliar a capacidade de infecção de formas amastigotas axênicas e determinar o índice de infecção, realizamos um estudo cinético da interação amastigota-cardiomiócito *in vitro*. Utilizando diferentes proporções parasita/célula (30:1, 50:1 e 65:1), interrompemos a interação após 2, 4, 24 e 48 h. As células foram lavadas em PBS e fixadas por 5 min em solução de Bouin (75 ml

de solução de ácido pícrico 1.2%, 25 ml de formol e 5ml de ácido acético). Após fixação, as culturas foram processadas para coloração pelo Giemsa, como descrito no item 7. A determinação do índice de infecção foi realizada pela quantificação randômica de 200-400 células por lamínula ao microscópio de luz (Axioplan, Zeiss). O ensaio de invasão foi realizado 3 vezes em duplicata. Culturas de amastigostas axênicas com índices de diferenciação menores que 95% não foram utilizadas nos ensaios de interação parasita-célula hospedeira.

5. Ensaio de competição

Ensaio de competição foram realizados com o objetivo de avaliar a participação de glicosaminoglicanos (GAGs) no processo de invasão de formas amastigotas do *T.cruzi* em cardiomiócitos. Os parasitas derivados de meio axênico foram pré-tratados por 1 h no gelo com 20 µg/ml de heparina (Hep), heparam sulfato (HS), condroitin sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e queratam sulfato (KS) em meio DMEM suplementado com 1% de BSA pH 7,0. Em seguida, os parasitas tratados foram colocados para interagir, na proporção de 65:1, com a cultura de células musculares cardíacas. Após 2 e 4 h de interação a 37 °C, as células foram lavadas em PBS, fixadas por 5 min a temperatura ambiente em solução de Bouin e coradas pelo Giemsa (item 7). Como controle da reação, formas amastigotas foram incubadas por 1 h no gelo na ausência de glicosaminoglicanos e submetidas ao mesmo procedimento dos parasitas tratados. A determinação do índice de infecção foi realizada pela quantificação randômica de 200-400 células por lamínula ao microscópio de luz (Axioplan, Zeiss). O ensaio foi realizado 3 vezes em duplicata.

6. Ensaio com células CHO (Chinese Hamster Ovary cells)

Culturas de células CHO (CHO-K1 - linhagem selvagem e CHO-745 - linhagem mutante, deficiente em glicosaminoglicanos) foram utilizadas para confirmação dos dados de participação de GAGs no processo de adesão e interiorização de formas amastigotas. A dissociação das células foi feita com solução PBS contendo tripsina 0,25% e colagenase 0,05%, pH 7,2 por 2 a 5 min a 37°C. As células isoladas foram recolhidas e plaqueadas na densidade de 5×10^4 /poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm). Após 24 horas de cultivo em meio Ham's F12, as células foram infectadas com amastigotas provenientes de amastigogênese *in vitro* (48h pós-indução), na proporção de 65:1 parasita/célula hospedeira. Após 2h e 4h, a interação foi interrompida e as células lavadas em PBS, fixadas por 5 min em solução de Bouin e processadas para coloração pelo Giemsa, como descrito no item 7. O ensaio foi realizado 3 vezes em duplicata.

7. Coloração pelo Giemsa

As culturas infectadas com formas amastigotas de *T. cruzi*, tratadas ou não com glicosaminoglicanos sulfatados solúveis, foram lavadas em PBS e fixadas por 5 min a temperatura ambiente em solução de Bouin (75 ml de solução de ácido pícrico 1.2%, 25 ml de formol e 5 ml de ácido acético). Após a fixação, as culturas foram lavadas em álcool 70%, para remoção do fixador, lavadas em água destilada e coradas em solução aquosa de Giemsa (diluído 1:5) por 60 min a temperatura ambiente. Após remoção do corante com água destilada, as lamínulas contendo as células foram desidratadas e clarificadas em soluções de acetona e xilol, em série decrescente de acetona (100% - 30%) e crescente de xilol (30% - 100%). Em seguida, as lamínulas foram montadas em Permout sobre lâminas de microscopia e observadas ao microscópio de luz para determinação do percentual de infecção.

8. Imunofluorescência indireta

Amastigotas provenientes da amastigogênese *in vitro* (48h pós-indução) foram aderidas em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina (1:100). Após 30 – 40 min a 37°C, as lamínulas contendo os parasitas (2 x 10⁶ parasitas) foram lavadas com PBS e fixadas por 20 min a 4°C em PFA 4% em PBS. Após a fixação, o material foi lavado 3x por 10 min com PBS. Em seguida, foram incubados por 3x por 15 min com PBS contendo 4% de BSA, para bloqueio de sítios aldeídicos inespecíficos. As amastigotas foram então incubadas overnight (12-18h) a 4°C com os anticorpos monoclonais anti-Ssp3 e anti-Ssp4, gentilmente cedidos pelo Dr. Marco Krieger (Instituto de Biologia Molecular do Paraná), na diluição de 1:100 em PBS contendo 2% de BSA, pH 7,2. Após lavagens em PBS, os parasitas foram incubados por 1 h a 37° C em câmara úmida com o anticorpo secundário apropriado, anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (1:200). Posteriormente, as células foram lavadas por 3x por 10 min em PBS e incubadas por 5 min a temperatura ambiente com 10µg/ml de 4,3-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI) para detecção do DNA. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e montadas em PBS contendo 2,5% de 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DABCO) e 50% de glicerol, pH 7,2. Como controle negativo, as amastigotas foram incubadas com soro homólogo ou na ausência do anticorpo primário. As amostras foram observadas ao microscópio Zeiss Axioplan equipado com epifluorescência e as imagens foram obtidas com objetiva de 63 X.

9. Microscopia eletrônica de transmissão

Formas amastigotas de *T. cruzi* proveniente de amastigogênese *in vitro* foram coletados após 24h e 48h de indução. Os parasitas foram lavados em solução PBS e fixados por 1 h a 4 °C com 2,5% de glutaraldeído (GA) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M contendo 2,5 mM de CaCl₂ e 3,5% de sacarose pH 7,2. Após fixação, os parasitas foram lavados no veículo do fixador por 3x por 10 min cada. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas por 1 h a 4 °C com tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 e desidratadas em série crescente de acetona (30-100%). A infiltração em resina Poly Bed 812 (Epon) foi realizada

“overnight” a 4 °C na mistura Epon – acetona (1:1) e, posteriormente, em Epon puro por 4 h a temperatura ambiente. O material foi emblocado em Epon e mantido a 60 °C por 72 h em estufa de polimerização. Em seguida, foram obtidos cortes ultrafinos em Ultramicrótomo Leica (UCT), os quais foram recolhidos em grades de cobre. O material foi contrastado com acetato de uranila 2% por 10 min a temperatura ambiente e citrato de chumbo (0,8M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0,199M $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$ e 4 ml de NaOH 1N) por 2 min. As amostras foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 10C.

10. Análise estatística

O teste-*t* de student foi utilizado para determinar a significância entre as diferenças dos resultados obtidos nos ensaios de invasão, considerando como significativo o valor de $p \leq 0,0005$.

RESULTADOS

1. Processo de amastigogênese *in vitro*

Para avaliar a participação de glicosaminoglicanos sulfatados no processo de invasão de amastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos, utilizamos amastigotas extracelulares obtidas pelo método de acidificação descrito por Tomlinson e colaboradores (1995). O método de amastigogênese *in vitro* baseia-se em evidências de sinalização para diferenciação de tripomastigotas em amastigotas através da acidificação do microambiente, mimetizando a acidificação do vacúolo parasitóforo pela fusão de lisosomos ou endosomas tardios que ocorre durante o ciclo intracelular. Assim, tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, provenientes do sobrenadante de culturas de células Vero infectadas, foram incubados por 4h em meio RPMI pH 5,0 e, posteriormente, transferidos para meio RPMI pH 7,2, com a finalidade de reproduzir o pH citoplasmático. Inicialmente, avaliamos mudanças na morfologia do parasita durante o processo de diferenciação no período de 24h - 72h pós-indução. A microscopia de contraste de fase revelou alterações morfológicas nos parasitas após 24h de indução (Fig. 1A). Os parasitas induzidos em pH ácido apresentaram forma arredondada e baixa mobilidade, características de formas amastigotas (Fig. 1A). Esta morfologia permaneceu inalterada após 48h de indução (Fig. 1B). Raros tripomastigotas foram observados na cultura neste tempo de pós-indução, sendo frequentemente alcançado 95-98% de diferenciação dos parasitas. Em estágios mais avançados, após 72h de indução *in vitro*, foi observada redução no tamanho destas formas arredondadas apresentando superfície celular irregular (dado não mostrado).

A análise ultra-estrutural do processo de amastigogênese *in vitro* demonstrou diferenças no estágio de diferenciação dos parasitas após 24h de indução. Embora os parasitas apresentassem morfologia arredondada, alguns ainda possuíam o cinetoplasto característico de formas tripomastigotas (cinetoplasto redondo com kDNA enovelado) ou em fase intermediária de diferenciação, onde o cinetoplasto apresentava-se migrando para a região anterior do parasita (Fig. 2A). Além das formas em transição, também foram observadas, após 24h de indução, formas amastigotas clássicas, com cinetoplasto em barra e kDNA condensado localizado na região anterior do parasita e evidências de multiplicação do corpúsculo basal (Fig. 2B). Entretanto, estas formas clássicas com cinetoplasto característico e indícios de

duplicação do kDNA e do corpúsculo basal foram majoritariamente observadas após 48h de indução (Fig. 2C).

Além do acompanhamento do aspecto morfológico dos parasitas induzidos em pH ácido, avaliamos sua capacidade de replicação *in vitro*, uma vez que a divisão binária é uma característica da forma amastigota intracelular e as imagens de microscopia eletrônica de transmissão apontavam sinais de proliferação celular. A curva de crescimento foi determinada pela quantificação do número total de parasitas após 24h, 48h e 72h de indução partindo de um inóculo inicial de 1×10^6 parasitas/ml (Fig. 3). Nossos resultados demonstraram que os parasitas foram capazes de se multiplicar em meio axênico, evidenciando um aumento de 38% e 65% na quantidade de parasitas/ml após 24h e 48h de indução *in vitro*, respectivamente. A proliferação nas primeiras 48h de indução é similar ao que ocorre no ciclo celular, onde, neste mesmo tempo, é observado um elevado índice de multiplicação das formas amastigotas intracelulares. No entanto, observamos uma redução de 13% no número de parasitas após 72h de indução, quando comparado ao tempo de 48h. Estes dados sugerem que as mudanças morfológicas observadas neste tempo de indução estejam relacionadas à morte do parasita, provavelmente devido à carência nutricional no meio.

Tendo em vista que tripomastigotas e amastigotas expressam em sua superfície antígenos estágio-específicos, Ssp3 e Ssp4, respectivamente, analisamos, através de imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-Ssp3 e anti-Ssp4, a presença destas moléculas na superfície dos parasitas diferenciados. As imagens de fluorescência revelaram intensa marcação para Ssp4 na superfície da maioria dos parasitas diferenciados após 48h de amastigogênese (Fig. 4A e A'), sendo raros parasitas positivos para Ssp3 (Fig. 4C e C'). Estes dados, juntamente com os dados da análise ultra-estrutural e capacidade proliferativa apontaram para diferenciação majoritária dos parasitas em amastigotas no tempo de 48h de indução. Desta forma, utilizamos em nossos ensaios de interação com cardiomiócitos formas amastigotas extracelulares obtidas após 48h de amastigogênese *in vitro*.

Figura 1- Aspecto morfológico de formas amastigotas obtidas após 24h (A) e 48h (B) de indução *in vitro*, observado por microscopia de contraste de fase. Note que a maioria dos parasitas apresenta morfologia arredondada, similar a amastigotas intracelulares. Barra = 50 μ m

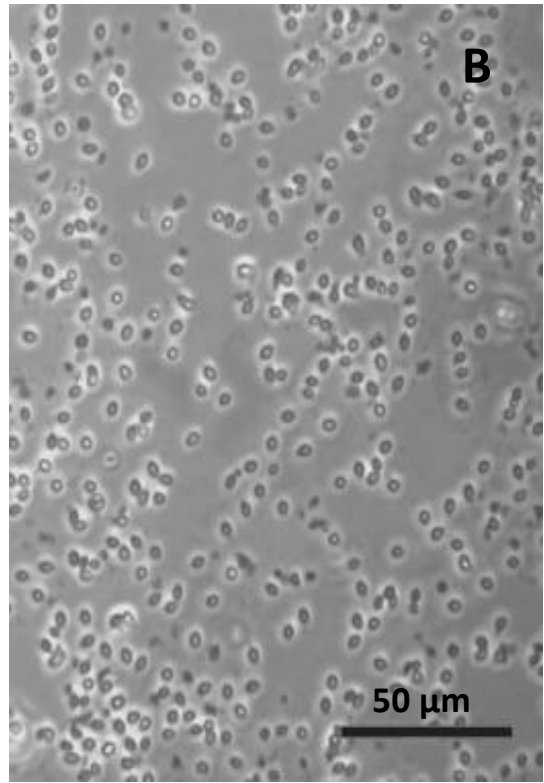
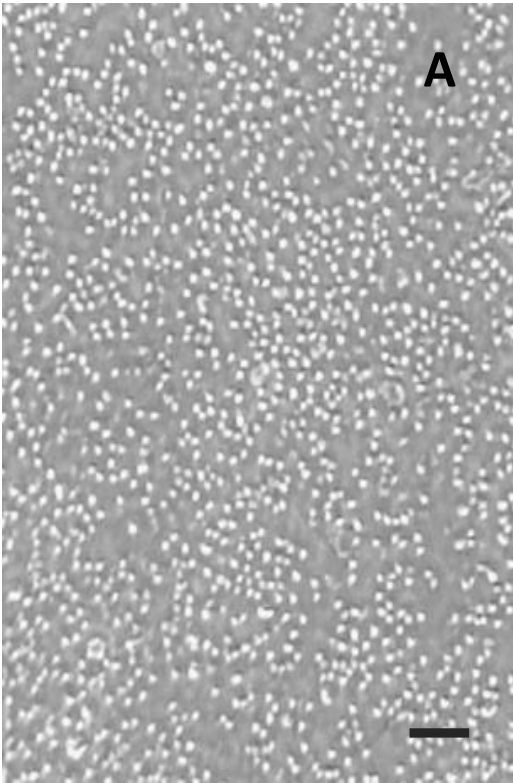


Figura 2 – Aspecto ultra-estrutural de parasitas obtidos durante o processo de amastigogênese *in vitro*. Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão revelaram a presença de formas intermediárias de *T. cruzi* (A), com cinetoplasto arredondado, e formas amastigotas (B), com cinetoplasto característico em forma de barra, após 24 h de indução. Amastigotas clássicas foram majoritariamente observadas após 48h de indução (C). As setas demonstram sinas de divisão celular com início de duplicação do cinetoplasto e corpúsculo basal. Barra = 0,5 μm

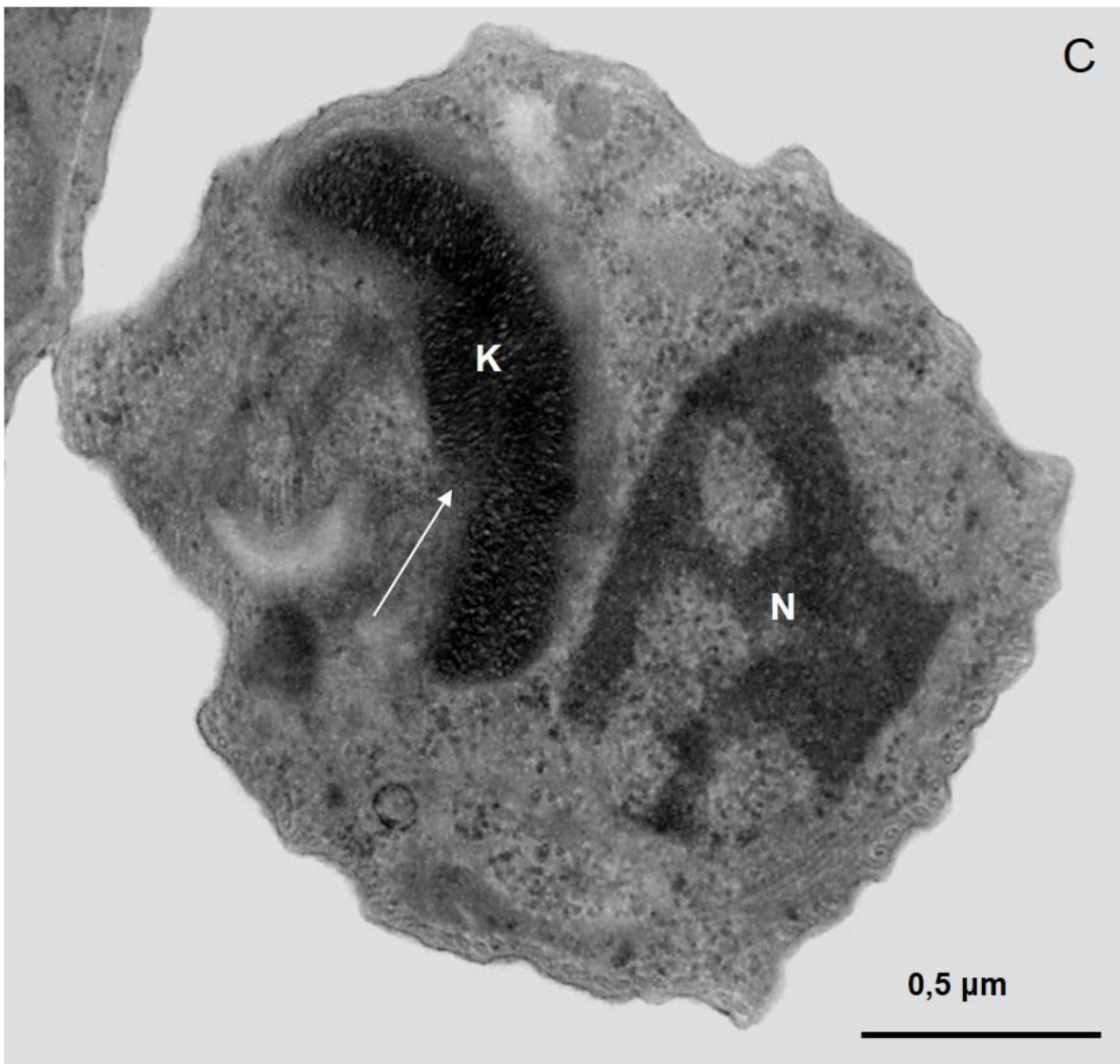
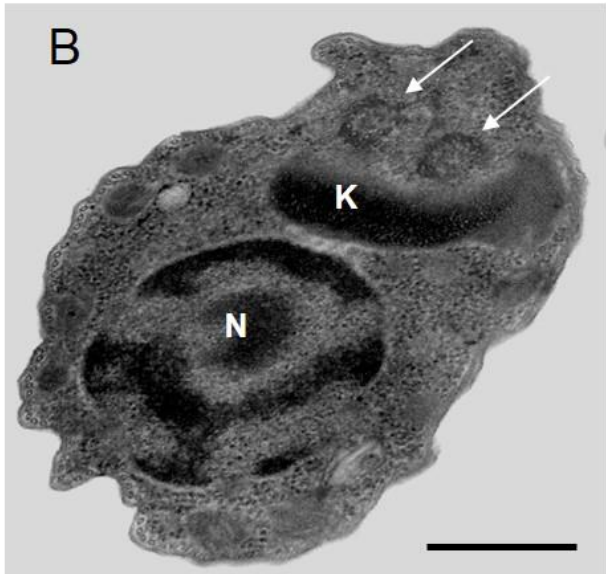
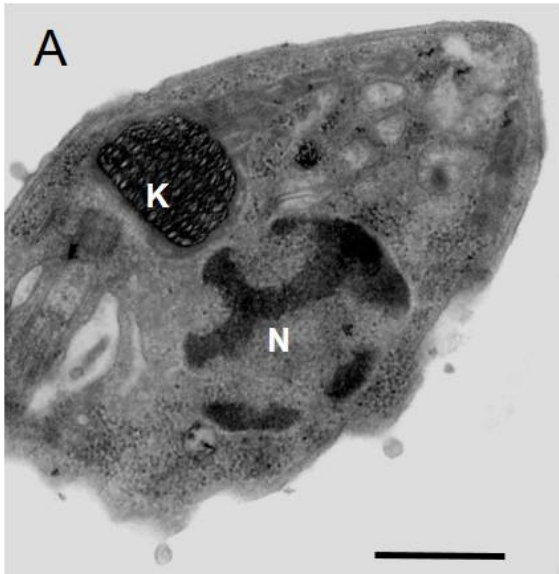


Figura 3 – Curva de proliferação de formas amastigotas em meio axênico. Os índices de proliferação de 38% e 65% após 24h e 48h de indução, respectivamente, demonstram que parasitas morfológicamente diferenciados são capazes de se multiplicar em meio axênico. Um declínio no número de parasitas foi detectado após 72h de indução, atingindo uma redução de 13% em relação ao tempo de 48h.

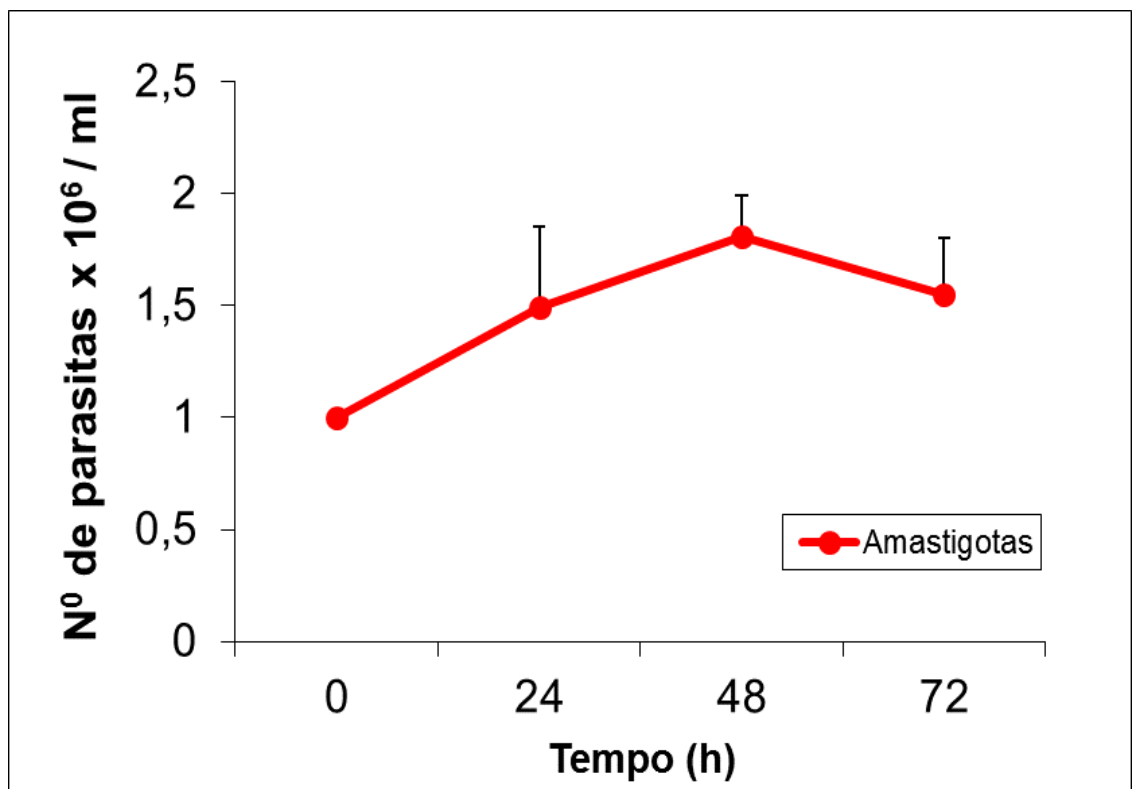
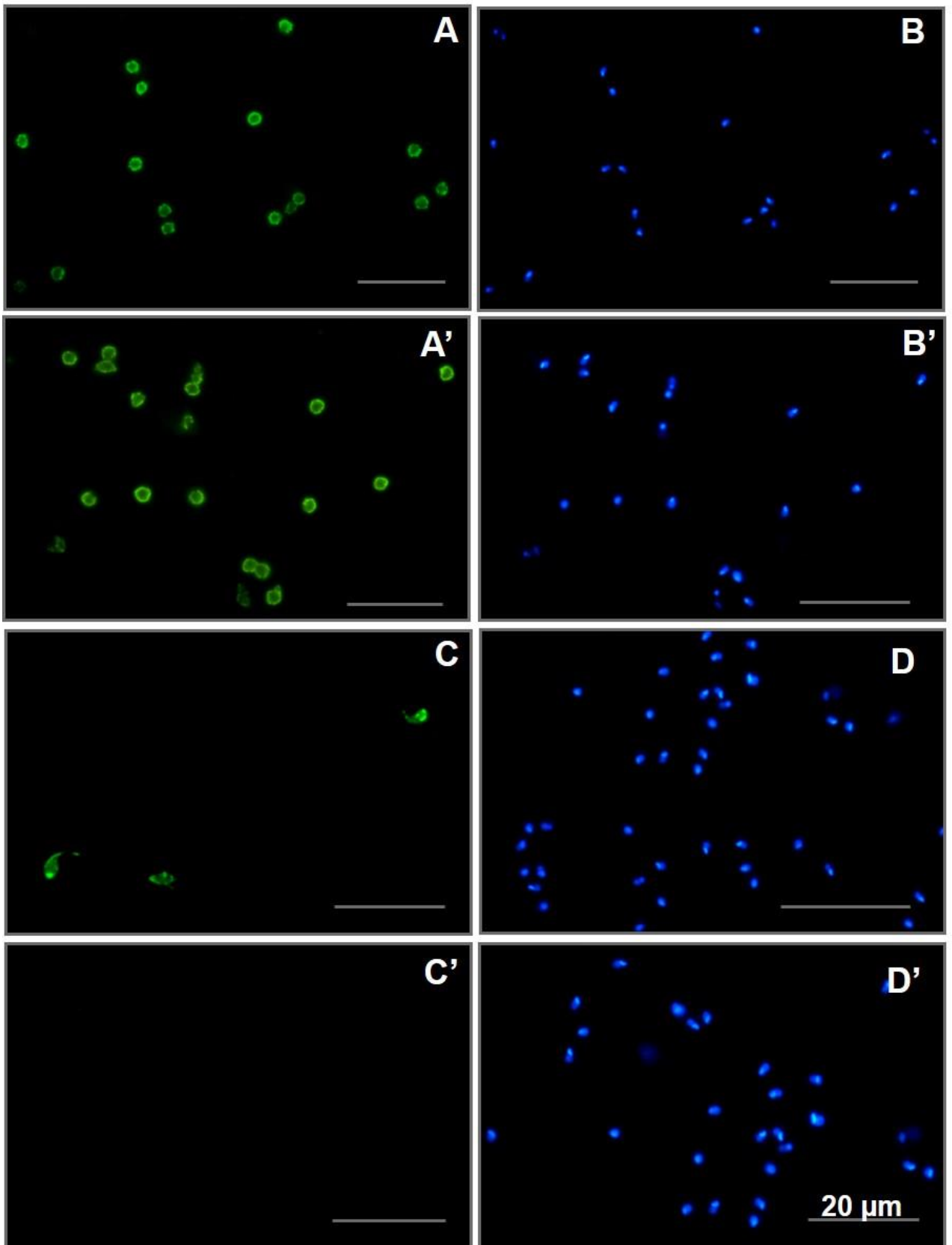


Figura 4 – Detecção de Ssp4 e Ssp3 nos parasitas obtidos da amastigogênese *in vitro* (48h pós-indução) por imunofluorescência indireta. Foi observada intensa marcação de Ssp4, antígeno estágio específico de amastigotas (A/A'). Poucos parasitas foram positivos para Ssp3, antígeno específico de tripomastigotas (C/C'). O núcleo e cinetoplasto do parasita foram revelados com DAPI, corante de DNA (B/B' e D/D'). Barra = 20 μ m



2. Interação amastigota-cardiomiócito

Para investigar a capacidade de invasão de formas amastigotas extracelulares (48 h pós-indução) em cardiomiócitos e determinar os índices de infecção durante cinética de interação parasita-célula hospedeira, culturas primárias de células musculares cardíacas foram infectadas com diferentes proporções parasita/célula hospedeira (30:1, 50:1 e 65:1). A elevada relação parasita-célula alvo justifica-se pela baixa mobilidade da amastigota, sendo a interação parasita-célula hospedeira principalmente mediada pela sedimentação espontânea dos parasitas. A cinética de interação revelou índices elevados de infecção nos diferentes intervalos de tempo (Fig. 5 e 6). Após 2h de interação, observamos um percentual de infecção de 10% e 25% nas proporções de 30:1 e 65:1 parasita/célula hospedeira, respectivamente. Tempos mais tardios registraram índices ainda maiores de infecção, alcançando cerca de 50% após 48h. No entanto, a fim de evitar a eliminação (“shedding”) de moléculas ligadas à superfície do parasita no ensaio de reconhecimento celular, optamos por realizar os ensaios de competição com glicosaminoglicanos (GAGs) solúveis em tempos curtos de interação (2h) e utilizar a maior relação parasita/célula hospedeira (65:1), cujo índice de infecção atingiu aproximadamente 25% (Fig. 5).

Figura 5 – Cinética de infecção amastigota-cardiomiócitos *in vitro*. Cardiomiócitos foram infectados com amastigotas obtidas de meio axênico em diferentes proporções parasita/célula hospedeira (30:1, 50:1 e 65:1). Os índices de infecção atingiram percentuais de 11, 17 e 25% respectivamente após 2h de interação. Tempos tardios de interação (48h) resultaram em altos níveis de infecção, alcançando um máximo de 51% de cardiomiócitos infectados.

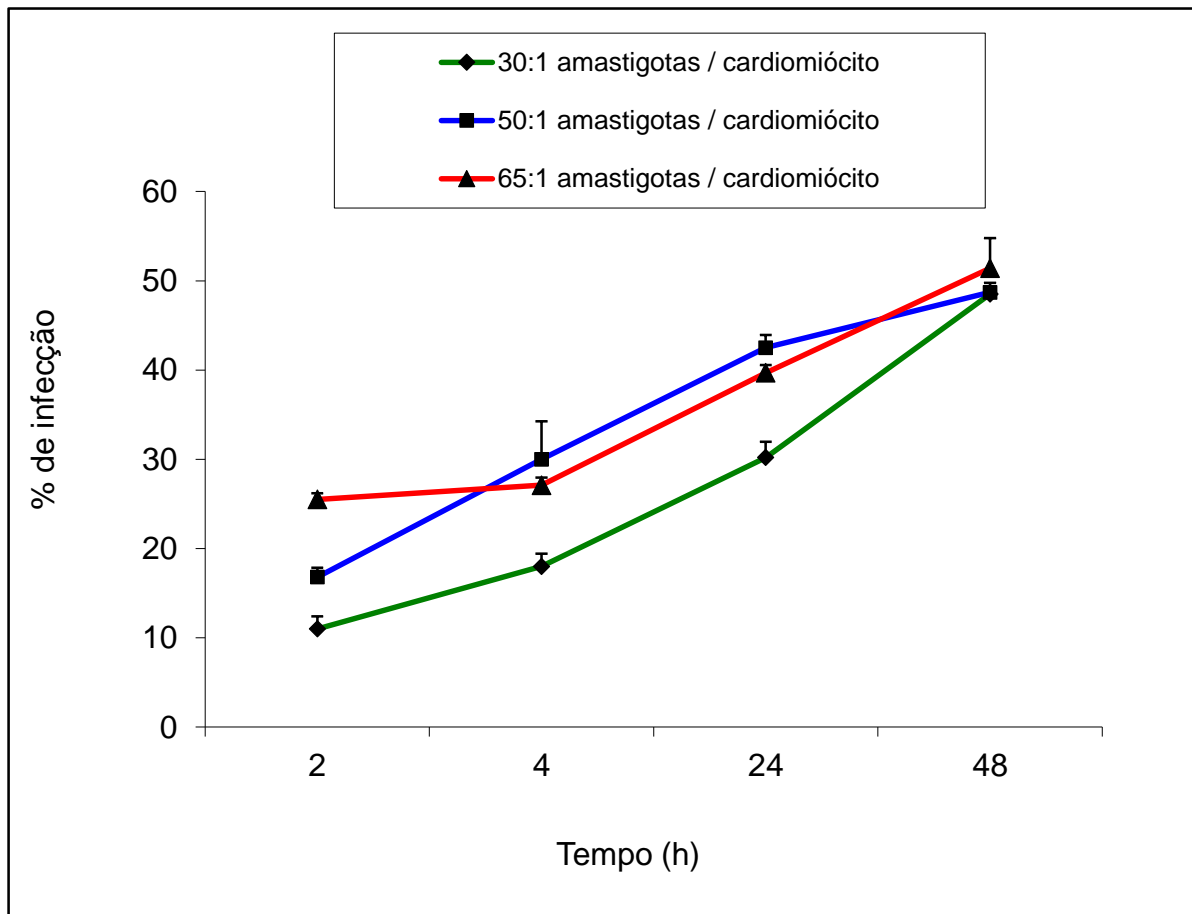
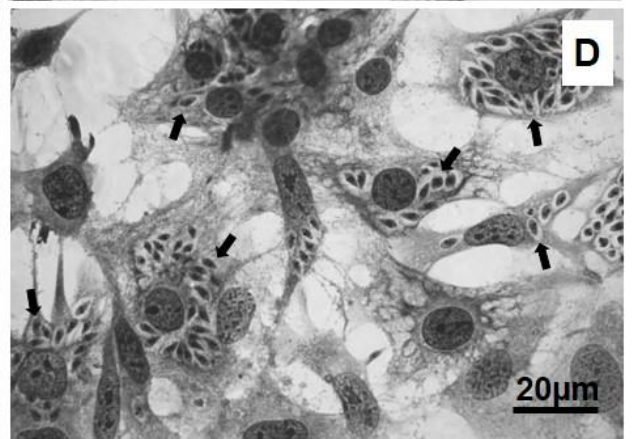
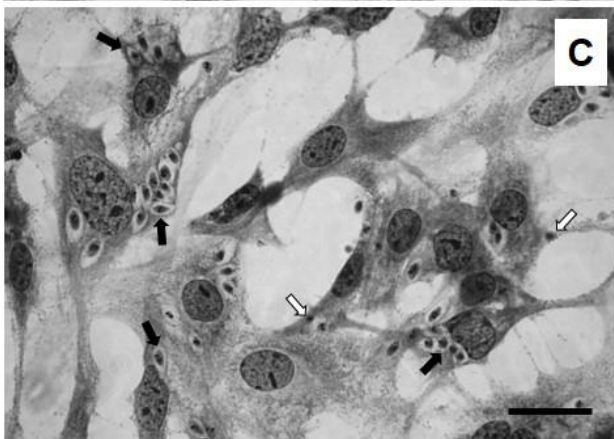
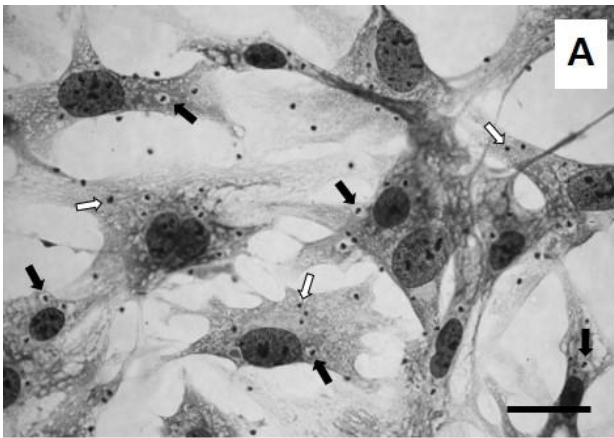


Figura 6 – Imagens de cardiomiócitos infectados com amastigotas axênicas após 2h (A), 4h (B), 24h (C) e 48h (D) de interação. Parasitas aderidos (setas brancas) são observados na superfície das células após 2h (A) e 4h (B) de infecção. A interiorização das amastigotas (setas pretas) é visualizada a partir de 2h (A), com evidente multiplicação intracelular após 24h e 48h (C-D). Barra = 20 μ m.



3. Reconhecimento celular

a. Ensaio de competição com GAGs

Tendo em vista a importante participação de proteoglicanos de heparan sulfato, abundantemente expresso na superfície de células de mamíferos, no processo de reconhecimento e invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos (Calvet et al., 2003), nos propusemos a investigar o papel de GAGs sulfatados na interação amastigotas-cardiomiócito. Formas amastigotas axênicas foram pré-tratadas ou não por 1h no gelo com 20µg/ml de GAGs sulfatados solúveis, incluindo heparina, heparan sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e queratam sulfato (KS) e, em seguida, submetidos a incubação por 2h a 37°C com cardiomiócitos (proporção 65:1 parasita-célula hospedeira). A determinação do percentual de infecção demonstrou alterações na invasão após o tratamento de amastigotas com os dissacarídeos constituídos de ácido glucurônico (GlcA)/idurônico (IdoA) e *N*-acetilglicosamina (GlcNAc). Uma significativa redução nos percentuais de infecção foi evidenciada após tratamento com HS e heparina, decaindo de 25% no controle para 8,7% ($p \leq 0,0004$) e 4,5% ($p \leq 0,0001$), respectivamente, representando uma inibição de 65% e 82% do processo de invasão (Fig. 7). Embora CS, DS e KS sejam GAGs carregados negativamente, o pré-tratamento de amastigotas com estes GAGs sulfatados não acarretou redução significativa do percentual de invasão em cardiomiócitos (Fig. 7).

A participação de heparina e HS no processo de invasão de amastigotas do *T. cruzi* foi claramente visualizada por microscopia de luz. Imagens da cultura de cardiomiócitos infectada com amastigotas demonstraram intensa associação dos parasitas não-tratados (parasitas aderidos e interiorizados) com a célula alvo após 2h de interação na proporção 65:1 parasita-célula hospedeira (Fig. 8A). Em contraste, uma redução expressiva dos parasitas associados foi visualizada após o tratamento com heparina (Fig. 8B) e HS (Fig. 8C). No entanto, o perfil de parasitas associados após tratamento das amastigotas com CS, DS e KS permaneceu similar ao controle (Fig. 8 D-F).

Figura 7 – Análise da participação de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) no processo de reconhecimento e invasão de formas amastigotas de *T. cruzi* em cardiomiócitos após 2h e interação. O pré-tratamento dos parasitas com 20 µg/ml de heparina e heparam sulfato resultou em redução significativa no percentual de invasão, alcançando 82% e 65%, respectivamente, condroitim sulfato, dermatam sulfato e queratam sulfato não alteram os percentuais de infecção.

(*) Estatisticamente significativo, teste t de Student, $p \leq 0,05$.

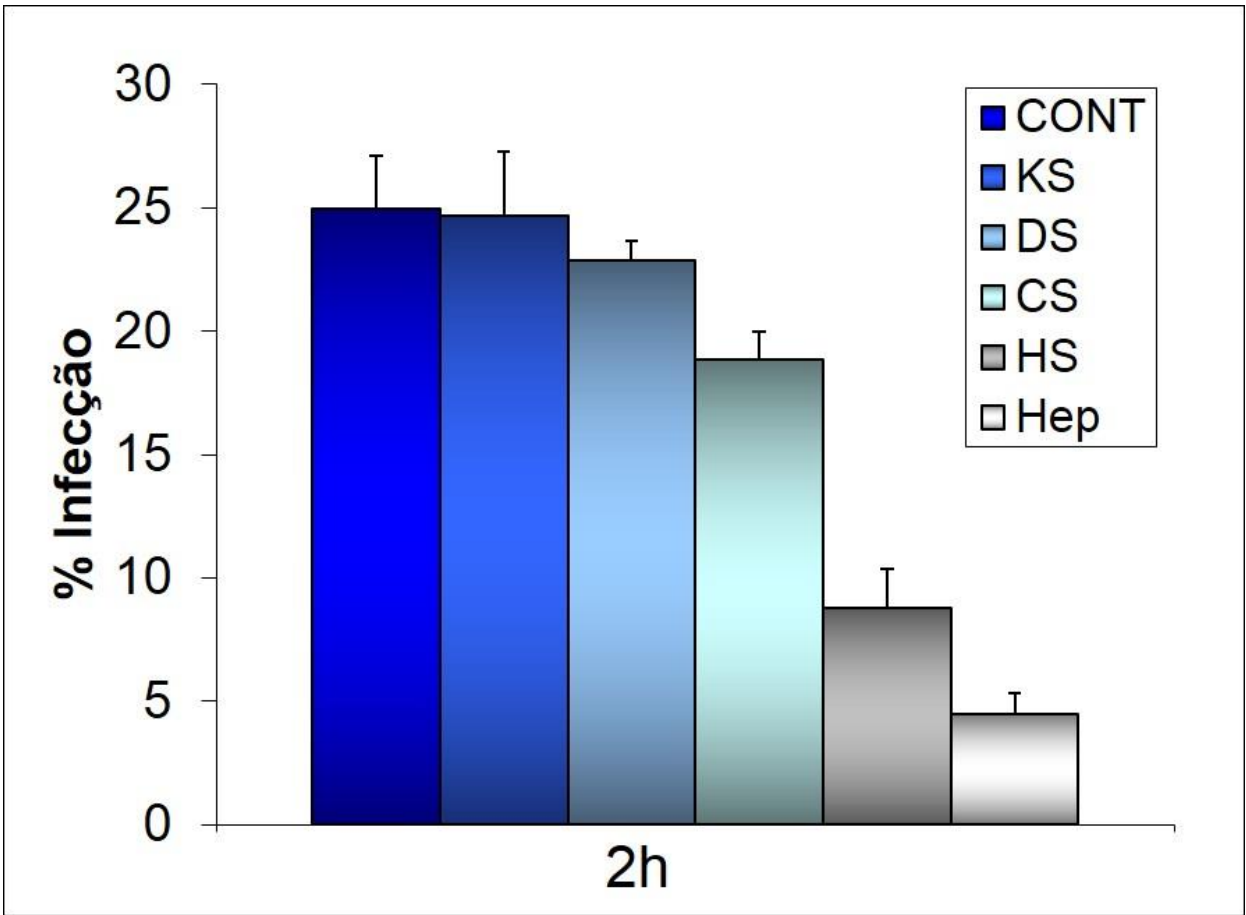
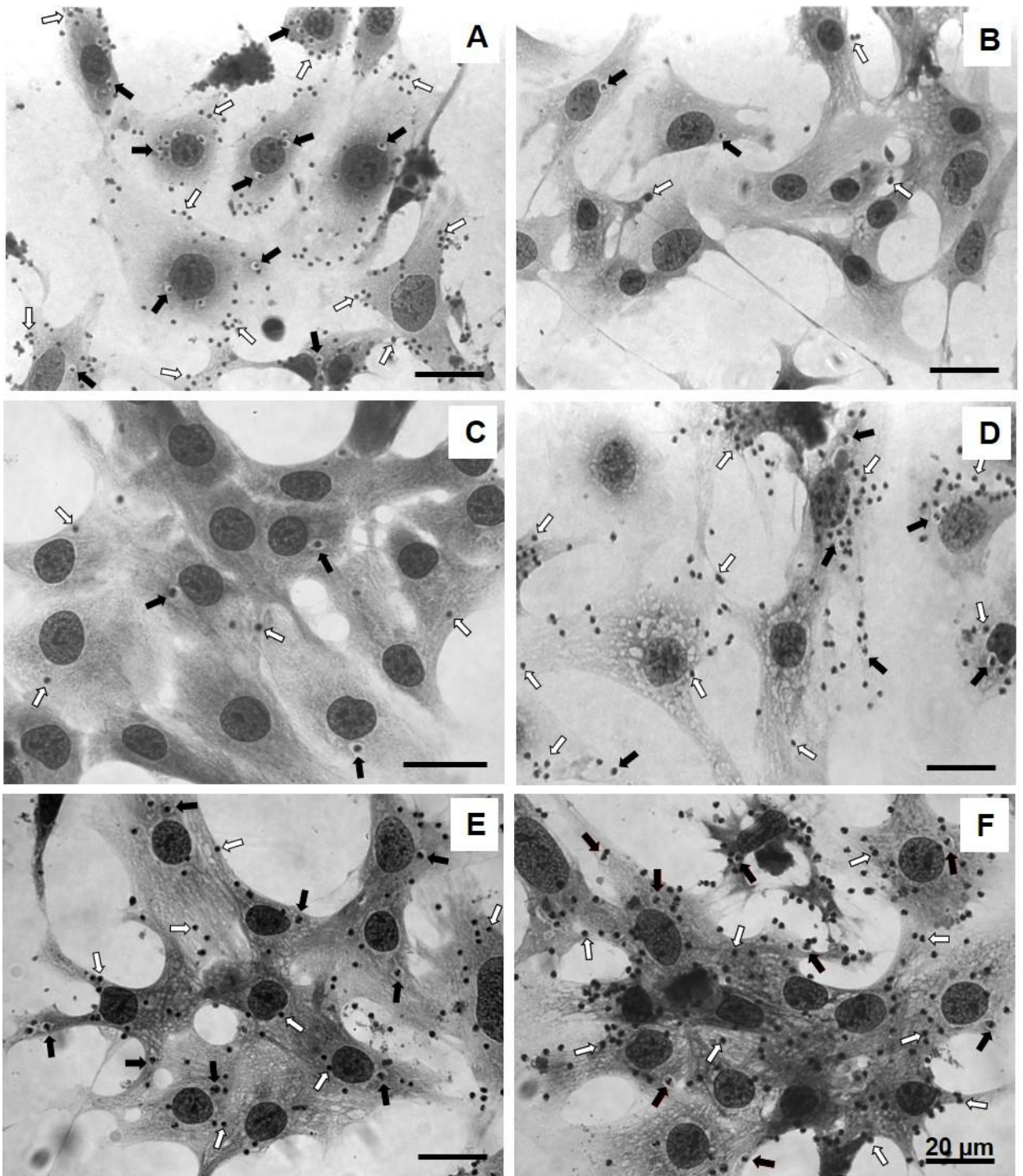


Figura 8 - Aspecto da interação amastigota-cardiomiócito após tratamento dos parasitas com glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs). (A) Cardiomiócitos infectados com amastigotas de *T. cruzi* não tratadas, após 2 h de interação. Células infectadas com amastigotas pré-tratadas com 20 µg/ml de heparina (B) e, heparam sulfato (C) apresentam menor índice de adesão (setas brancas) e interiorização (setas pretas). O pré-tratamento dos parasitas com condroitim sulfato (D), dermatam sulfato (E) e queratam sulfato (F) resultou em infecção similar às culturas controle (A). Barra = 20 µm.



a. Ensaios com células CHO (Chinese Hamster Ovary)

Células CHO selvagem (CHO-K1) e mutantes (CHO-745), estas últimas deficientes na biossíntese de glicosaminoglicanos devido à ausência da enzima xilosiltransferase, foram utilizadas para avaliar o papel de GAGs no reconhecimento e invasão de amastigotas. As células CHO-K1 e CHO-745 foram infectadas com amastigotas derivadas da amastigogênese *in vitro* na proporção de 65:1 parasitas/célula hospedeira e a cinética de interação interrompida após 2h e 4h de infecção. Nos estágios iniciais de interação, as células CHO-K1 (selvagem) apresentaram elevado índice de infecção, alcançando 20% e 28% após 2h e 4h de interação com amastigotas extracelulares, respectivamente (Fig. 9). Em contraste, uma inibição da invasão foi evidenciada em células CHO-745. A ausência de GAGs nas células mutantes (CHO-745) acarretou um declínio de 3-4X do percentual de infecção quando comparado com as células CHO selvagens (CHO-K1). Após 2h e 4h de interação, uma redução significativa do percentual de infecção foi observada em células CHO-745, atingindo 5% ($p \leq 0,0009$) e 9% ($p \leq 0,01$) de infecção, respectivamente, que representa uma inibição da invasão de 74% e 67% (Fig. 9). Imagens obtidas das culturas de CHO infectadas demonstraram expressiva redução da associação de amastigotas com células CHO-745 após 2h (Fig 10B) e 4h (Fig 10D), quando comparadas ao perfil de associação de parasitas nas culturas CHO-K1 (Fig 10A e 10C).

Figura 9 - Percentuais de adesão e infecção de amastigotas de *T. cruzi* em células de ovário de hamster (CHO) *in vitro*. Células CHO-K1 (selvagem) e CHO-745 (mutante deficiente em proteoglicanos) foram infectadas com amastigotas de *T. cruzi* (65:1 parasita-célula hospedeira) por 2h e 4h. Foi observada significativa redução dos percentuais de adesão nas células CHO-745 quando comparadas à linhagem selvagem, atingindo 86% e 66% após 2h e 4h, respectivamente. A invasão de amastigotas foi inibida em CHO-745 quando comparadas às células CHO-K1, com níveis de redução de 74% e 67% após 2h e 4h de interação, respectivamente. (*) Estatisticamente significativo, teste t de Student, $p \leq 0,05$

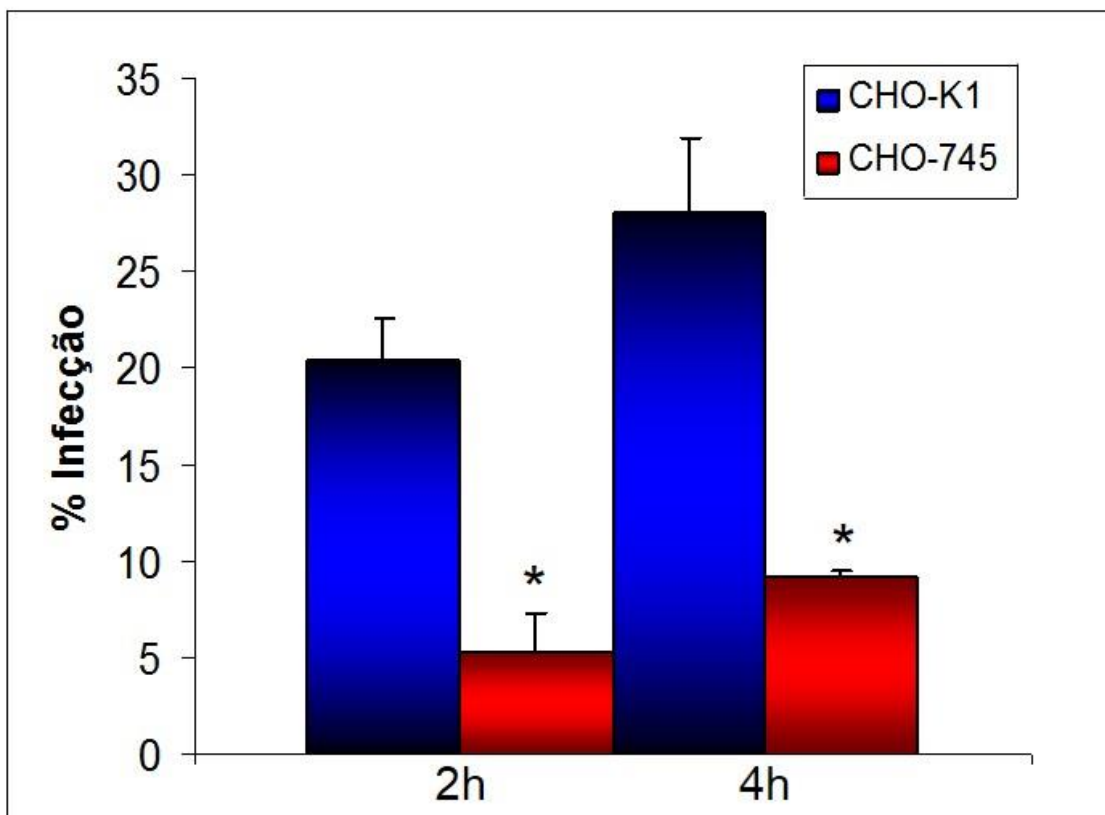
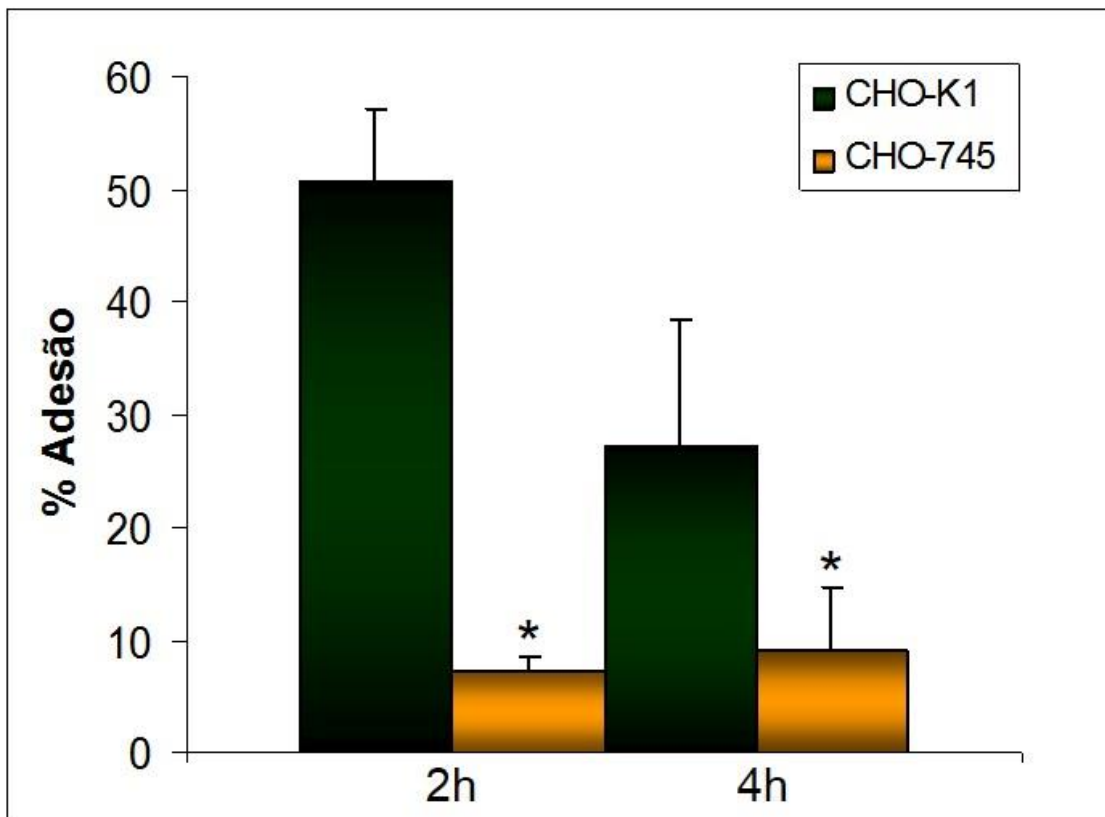
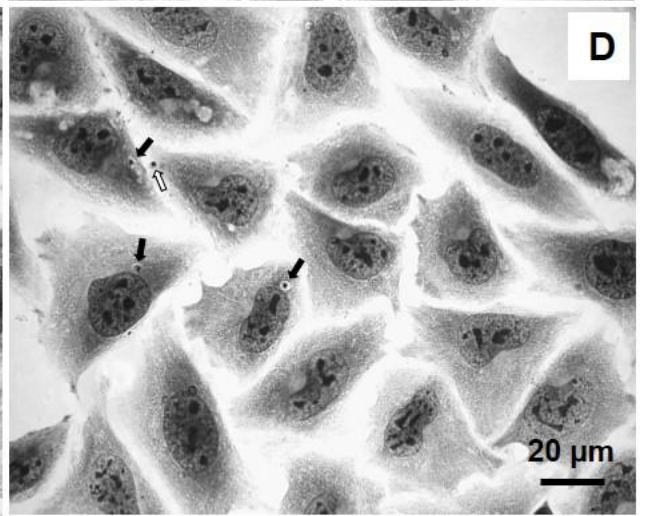
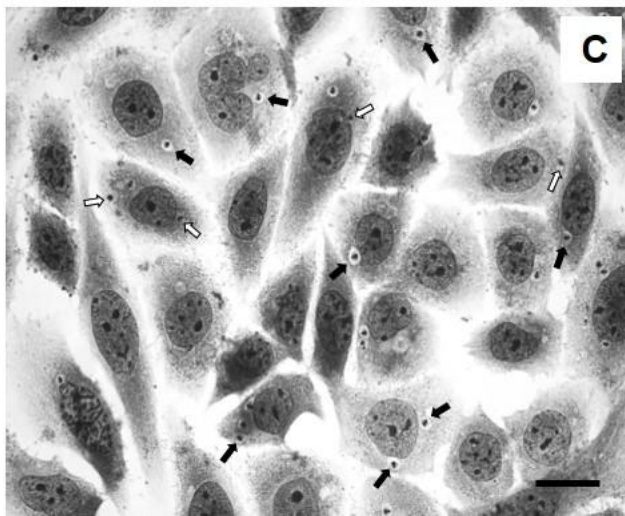
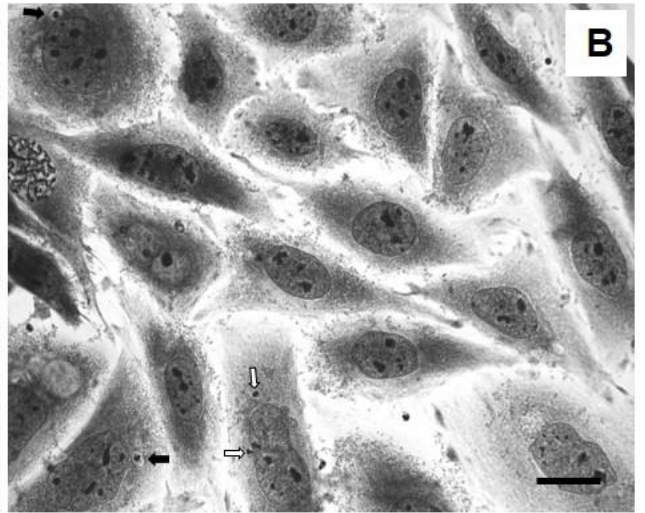
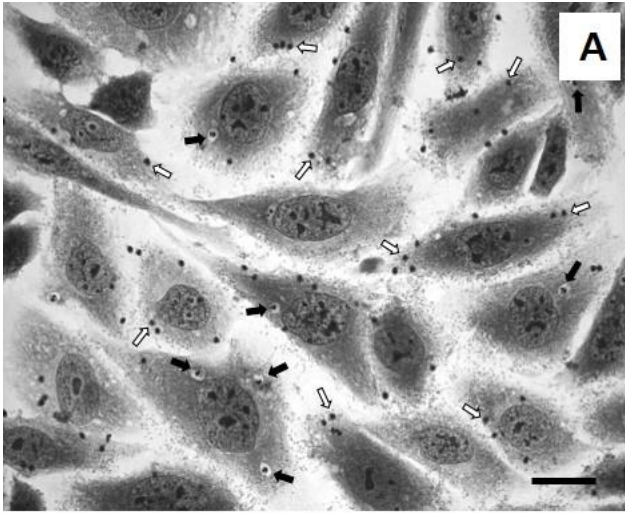


Figura 10 - Aspecto da interação amastigota de *T. cruzi* – células de ovário de hamster (CHO) *in vitro*. (A-C) CHO-K1, selvagem e (B-D) CHO-745, deficiente em proteoglicanos, após 2h (A-B) e 4h (C-D) de infecção. Note, em ambos os tempos de interação, os baixos níveis de adesão (seta branca) e interiorização (seta preta) de amastigotas em células CHO-745, quando comparadas com o tipo selvagem CHO-K1. Barra = 20 μ m.



DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, avanços no conhecimento da biologia do *Trypanosoma cruzi* e sua interação com a célula hospedeira têm contribuído para o entendimento da patogenia da doença de Chagas (De Sousa, 2002). A interação parasita-célula alvo é um processo dinâmico e complexo, sendo a etapa de adesão crucial para o estabelecimento da infecção. O reconhecimento de moléculas na superfície de ambos, o parasita e a célula hospedeira, pode disparar vias de sinalização importantes para a interiorização do parasita (Burleigh e Woolsey, 2002; Calvet et al., 2003, 2004; Scharfstein e Lima, 2008; Woolsey et al., 2003).

Em contraposição ao que era postulado há alguns anos, quando tripomastigotas do *T. cruzi* eram apontadas como única forma infectiva, estudos demonstraram que formas amastigotas também são capazes de invadir células hospedeiras e manter o ciclo infeccioso (Ley et al., 1988; Mortara et al., 2005). Dados indicaram que amastigotas invadem células fagocíticas e fagocíticas não-profissionais *in vitro*, como monócitos e fibroblastos (de Carvalho e de Souza, 1986; Ley et al., 1988). Sua capacidade de invasão também foi comprovada em estudos *in vivo*, onde evidências de parasitemia superior a infecção por tripomastigotas foi observada em camundongos A/J inoculados intraperitonealmente com amastigotas extracelulares (Ley et al., 1988). Ainda, estudos reportaram que amastigotas evadem rapidamente do vacúolo parasitóforo e dispararam o processo de replicação após a invasão da célula hospedeira, enquanto tripomastigotas levam cerca de 20h para iniciar sua proliferação intracelular (Ley et al., 1988, Mortara, 1991).

Embora o *T. cruzi* seja capaz de invadir diferentes tipos celulares, as células musculares cardíacas são notavelmente um alvo preferencial da infecção, podendo acarretar alterações graves do tecido cardíaco nas diferentes fases da doença de Chagas (Cabrine-Santos et al., 2001; Elizari, 1999; Higuchi et al., 2003). Ainda, estudos demonstraram a participação efetiva de amastigotas na progressão e manutenção da infecção, sendo apontada como desencadeadores da miocardite focal (Schafstein e Morrot, 1999). Assim, a proposta inicial deste projeto foi avaliar a capacidade de invasão de formas amastigotas e o papel de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados neste processo, utilizando como modelo de estudo culturas primárias de células musculares cardíacas.

As formas amastigotas de *T. cruzi* foram obtidas após indução em meio acidificado, conforme metodologia descrita por Tomlinson e colaboradores (1995). O estímulo para diferenciação de formas tripomastigotas em amastigotas foi,

primeiramente, a acidificação do meio de cultura e, após 4h, incubação dos parasitas em meio de pH 7,2. Este procedimento visa simular o evento de diferenciação intracelular, onde os parasitas entram em contato com meio ácido após fusão de endosomas tardios e lisosomos com o vacúolo parasitóforo, disparando o processo de diferenciação do parasita. Em seguida, migram para o citoplasma cujo pH é neutro, quando transformam-se em formas amastigotas e iniciam o processo de replicação.

Os resultados obtidos no processo de amastigogênese *in vitro* revelaram diferenciação majoritária de tripomastigotas de *T. cruzi*, clone Dm28c, em amastigotas após 48h de indução em meio ácido. Neste tempo de diferenciação (48h), os parasitas apresentaram (i) morfologia arredondada, (ii) elevados índices de proliferação, (iii) presença de antígeno estágio-específico (Ssp4) e (IV) características ultra-estruturais similares a amastigotas intracelulares. Embora a diferenciação também ocorra após 24h de indução em meio ácido, alguns parasitas com morfologia arredondada ainda apresentavam características ultra-estruturais de tripomastigotas. Este fato poderia gerar resultados falso positivos nos ensaios de competição com GAGs, uma vez que a participação de heparam sulfato (HS) e heparina foi demonstrada na invasão de tripomastigotas em cardiomiócitos (Calvet et al., 2003; Oliveira-Jr et al., 2008).

Diante destes dados, utilizamos em nossos ensaios de interação parasita - célula hospedeira, amastigotas extracelulares obtidas após 48h de amastigogênese *in vitro*. Os resultados da cinética de interação amastigotas-cardiomiócitos revelaram índice de infecção de aproximadamente 25% após 2h de interação na proporção 65:1 parasita/célula hospedeira, apresentando um percentual de invasão inferior ao obtido com formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 2h de interação com cardiomiócitos ($\pm 35\%$ na proporção 10:1 parasita/célula hospedeira; Calvet et al., 2003). Essa diferença pode estar relacionada a baixa mobilidade das formas amastigotas, o que impossibilita uma rápida e efetiva associação com as células alvo *in vitro*, sendo então necessária a utilização de elevada relação parasita-célula hospedeira para obter uma infecção considerável em tempos curtos de interação. Na infecção *in vivo*, as amastigotas são liberadas no espaço intersticial, onde há um contato imediato com células vizinhas, o que favorece o reconhecimento parasita/célula hospedeira. Evidências demonstraram que a liberação de amastigotas no interstício do tecido cardíaco e a infecção de células cardíacas

adjacentes promovem o recrutamento de células do sistema imune e conseqüentemente, a progressão da miocardite (Schafstein e Morrot, 1999). Em contraste com os nossos resultados, em estudos onde o protocolo de centrifugação foi aplicado a fim de promover uma rápida associação parasita-célula hospedeira, amastigotas da cepa G (tipo I) apresentaram capacidade de infecção superior aos tripomastigotas. No entanto, este fenômeno não parece ocorrer com amastigotas da cepa Y e CL (tipo II) que apresentaram índices de infecção inferiores ao observado com as respectivas formas tripomastigotas (Fernandes & Mortara 2004).

Uma vez que as duas formas evolutivas apresentam diferentes antígenos de superfície, é plausível que utilizem moléculas e mecanismos distintos para promoverem sua adesão e interiorização na célula alvo. Neste sentido, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos na tentativa de obter informações sobre as diferentes estratégias de invasão utilizadas por tripomastigotas e amastigotas. Schenkman e colaboradores (1988) demonstraram que tripomastigotas invadem preferencialmente pela região periférica de fibroblastos. Da mesma forma, Mortara (1991) evidenciou a invasão de tripomastigotas, cepa G, majoritariamente pela região baso-lateral de células HeLa. Em contraste, amastigotas invadem células HeLa por sua região apical, sendo observado o recrutamento de actina no sítio de adesão de amastigotas (Mortara, 1991). Além disso, o tratamento de células Vero e HeLa com citocalasina D, droga que inibe a polimerização de actina, não acarretou inibição da adesão de ambas as formas, mas inibe a interiorização de amastigotas (revisto por Mortara et al., 2008; Procópio et al., 1998). Por outro lado, evidências da participação de proteínas do citoesqueleto foram reportadas durante interação de tripomastigotas com células musculares cardíacas e diferentes linhagens celulares (Barbosa e Meirelles, 1995; Rosestolato et al., 2002). Em conjunto, estes dados demonstram que o processo de invasão de tripomastigotas é controverso na literatura e parece estar associado ao genótipo do parasita e da célula alvo, disparando mecanismos de invasão dependentes e independentes do citoesqueleto da célula hospedeira (Ferreira et al., 2006). No entanto, a participação efetiva do citoesqueleto da célula hospedeira tem sido demonstrada no processo de invasão de amastigotas, mas as moléculas mediadoras do reconhecimento e invasão de amastigotas são pouco elucidadas.

A identificação de uma proteína de ligação a GAGs em formas amastigotas (Oliveira-Jr et al., 2008) gerou questionamento sobre a possível participação de

GAGs como mediadores da invasão desta forma evolutiva, como já evidenciado na interação tripomastigota-cardiomiócito (Calvet et al., 2003; Oliveira-Jr et al., 2008). Nossos resultados apontam a participação de proteoglicanos de heparan sulfato (PGHS), mas não condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e queratam sulfato (KS), no reconhecimento de amastigotas em cardiomiócitos. A redução de 65% e 82% no índice de infecção após pré-tratamento de amastigotas com HS e heparina, respectivamente, demonstra que estas moléculas atuam como mediadoras do reconhecimento e deflagram o processo de invasão. A primeira evidência de participação de GAGs no processo de invasão do *T. cruzi* foi reportada por Ortega-Barria e Pereira (1991), onde foi apontada a participação de HS e heparina, mas não CS, no processo de adesão de tripomastigotas de *T. cruzi* em células Vero.

Embora tenha sido demonstrado que a proteína de ligação a heparina do *T. cruzi* tenha afinidade tanto para heparina e HS quanto para CS (Oliveira-Jr et al., 2008), nossos dados em conjunto com os de Calvet e colaboradores (2003) sugerem especificidade no reconhecimento do dissacarídeo constituído de ácido *D*-glucurônico (GlcA) ou ácido *L*-idurônico (IdoA) e *N*-acetil glicosamina ou *N*-sulfo-glicosamina, disparando vias de sinalização capazes de promover a interiorização do *T. cruzi* em cardiomiócitos. Ainda que HS e heparina sejam GAGs estruturalmente semelhantes, heparina é altamente sulfatada, o que lhe confere elevada carga negativa. O alto grau de inibição com este GAG sugere que a sulfatação deste dissacarídeo facilite a associação receptor-ligante. No entanto, o reconhecimento deste dissacarídeo pelo *T. cruzi* não parece ser apenas uma ligação eletrostática, uma vez que CS, DS e KS não acarretaram efeito inibitório da infecção em ambas tripomastigotas (Calvet et al., 2003; Oliveira-Jr et al., 2008) e amastigotas. Além disso, ensaios de interação realizados com o domínio *N*-sulfatado da cadeia de HS e tratamento com clorato de sódio, que reduz a sulfatação e a presença de ácido idurônico na estrutura de HS, demonstrou que a carga negativa modula a aproximação entre receptor-ligante, mas o domínio *N*-sulfatado por si não dispara o processo de invasão de tripomastigotas (Oliveira-Jr et al., 2008). A importância da sulfatação na interação *Plasmodium berghei*-células HepG2 foi demonstrada pela depleção de sulfato das cadeias de HS com clorato de sódio, acarretando uma redução significativa da adesão e invasão deste parasita (Frevet et al., 1994; Pinzon-Ortiz et al., 2001). Ainda, Fadel e Eley (2004) reportaram o importante papel da sulfatação de HS na invasão por *Chlamydia trachomatis*. No entanto, o efeito

inibitório da invasão, após o tratamento da célula hospedeira 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).

Além da carga negativa conferida pelo sulfato, ácido siálico também desempenha importante papel no reconhecimento receptor-ligante. O *T. cruzi* não é capaz de sintetizar ácido siálico, no entanto, ele apresenta uma glicoproteína de superfície com atividades neuraminidase e trans-sialidase que desempenha um importante papel na interação parasito-célula hospedeira (Schenkman et al., 1994; Soeiro et al., 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). Esta estratégia torna a superfície do parasita mais carregada negativamente, o que permite uma maior força eletrostática para adesão na célula alvo e, ainda, aumenta a possibilidade de reconhecimento uma vez que expõe sítios de galactose na superfície da célula hospedeira. Assim, tal como ocorre com ácido siálico, a carga negativa de GAGs parece modular a aproximação eletrostática entre a superfície do parasita e da célula alvo.

Nossos dados de interação com células de ovário de hamster deficientes em GAGs (CHO-745) corroboraram a participação de GAGs no processo de invasão de amastigotas. Nossos resultados revelaram que células CHO-745 (mutantes, deficientes na síntese de GAGs) apresentaram percentual de invasão 74% inferior ao apresentado pela linhagem selvagem, CHO-K1, após 2h de interação. Resultados similares foram descritos por Herrera e colaboradores (1994) que demonstraram inibição da invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em células deficientes em GAGs. Da mesma forma, a utilização de GAGs liases como heparitinase e condroitinase revelou a especificidade da ligação do *T. cruzi* com a célula alvo, uma vez que somente o tratamento com a enzima que degrada HS, heparitinase, gerou um efeito inibitório na invasão de tripomastigotas (Calvet et al., 2003; Herrera et al., 1994). Em contraposição, CS exerce importante papel na patologia da malária, mediando adesão de *Plasmodium falciparum* em eritrócitos (Reeder et al., 1999; Robert et al., 1995).

Embora os dados da literatura apontem para a participação de moléculas distintas no reconhecimento das diferentes formas de *T. cruzi*, nossos dados revelaram que ambas as formas, tripomastigotas e amastigotas, reconhecem HS na superfície de cardiomiócitos. Recentemente, estudos revelaram que domínios especializados de membrana, “rafts”, estão envolvidos no processo de invasão de formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (Barrias et al., 2007; Fernandes et al., 2007). Interessantemente, evidências têm demonstrado que PGHS está localizado em domínios lipídicos de membrana, “lipid rafts”, enriquecidos em colesterol (Fuki et al., 2000) e modula eventos de transdução de sinal ativados por fatores de crescimento (Chu et al., 2004).

Outros patógenos também reconhecem proteoglicanos na superfície da célula hospedeira. Dados demonstraram uma infecção bastante reduzida pelo *Toxoplasma gondii* em células CHO deficientes na síntese de HS e heparina (Ortega-Barria e Boothroyd, 1999). Love e colaboradores (1993) sugeriram a presença de uma proteína com afinidade para heparina na superfície de amastigotas de *Leishmania amazonensis*, uma vez que o pré-tratamento dos parasitas com este GAG levou a uma redução de 60% do nível de infecção em macrófagos. A participação de proteoglicanos como mediadores do processo de invasão de bactérias, como *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Orientia tsutsugamushi*, também foi comprovada a partir da utilização de enzimas GAGs liases específicas e linhagens celulares mutantes deficientes em proteoglicanos (Alvarez-Dominguez et al., 1997; Ihn et al., 2000; Plotkowski et al., 2001).

Em conjunto, estes dados demonstram que a utilização de proteoglicanos como via de reconhecimento parasita-célula hospedeira é amplamente difundida, sendo uma estratégia de invasão bastante conservada entre microorganismos patogênicos. Desta forma, avanços no conhecimento da interação patógeno-PGHS, fornecendo informações sobre o reconhecimento do PGHS pela proteína de ligação a heparina da superfície de patógenos, assim como, as vias de sinalização disparadas neste processo, poderão contribuir com alvos potenciais para fins profiláticos e terapêuticos.

CONCLUSÃO

- ✓ A diferenciação de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (clone Dm28c) em formas amastigotas *in vitro* ocorre majoritariamente após 48h de indução em meio ácido, sendo observados parasitas com morfologia, capacidade proliferativa, antígenos de superfície e cinetoplasto semelhantes a amastigotas intracelulares;
- ✓ Formas amastigotas extracelulares, clone Dm28c, são capazes de infectar cardiomiócitos *in vitro*;
- ✓ Glicosaminoglicanos constituídos de ácido *D*-glucurônico/ ácido *L*-idurônico – N-acetil-glicosamina / N-sulfo-glicosamina desempenham importante papel no reconhecimento de amastigotas em cardiomiócitos;
- ✓ A ligação de proteínas de amastigotas com propriedade de ligação a heparina com proteoglicanos de heparan sulfato na superfície de cardiomiócitos dispara o processo de invasão de amastigotas;
- ✓ Condroitim sulfato, dermatam sulfato e queratam sulfato não participam do processo de invasão de amastigotas em cardiomiócitos;
- ✓ Redução na invasão de amastigotas foi evidenciada em linhagens celulares derivadas de ovário de hamster chinês deficiente em GAGs (CHO-745), corroborando a participação de GAGs como mediadores do processo de invasão de amastigotas de *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- 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):143-150. Review.
- Alcântara-Neves NM, Ribeiro-dos-Santos R, Amor AL, Uemura H, Silva-Neto SJ, Eichinger D, Pontes-de-Carvalho L 2004. Parasite-derived trans-sialidase binds to heart tissue in *Trypanosoma cruzi*-infected animals. *Microb Pathog*. 37(5):273-278
- Almeida-de-Faria M, Freymüller E, Colli W, Alves MJ 1999. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol*. 92(4):263-274
- Alvares-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(1):78-88
- Alves MJ, Colli W 2007. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life*. 59(4-5):274-279. Review.
- Angelis M, Cooper J, Freeman RB 2003. Impact of donor infections on outcome of orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl*. 9(5):451-462
- Antas PR, Medrano-Mercado N, Torrico F, Ugarte-Fernandez R, Gómez F, Correa Oliveira R, Chaves AC, Romanha AJ, Araújo-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(2):308-314.
- Araujo-Jorge TC, De Souza W 1988. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Trop*. 45:127-136.

- Barbosa HS, Meirelles MNL 1992. Ultrastructural detection *in vitro* of WGA-, RCA I, and Com A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 78(5):404-409
- Barbosa HS, Meirelles MN 1995. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct Funct.* 20(4):275-284
- Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM 2008. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun.* 23;363(3):828-834
- Braga MV, Urbina JA, de Souza W 2004. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 24(1):72-78.
- Brener, Z 1973: Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27:347-382
- Burleigh BA, Andrews, N.W., 1995. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺ - signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem.* 270:5172-5180
- Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.*4(11):701-711. Review.
- 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(3);160-167
- Calvet CM, Toma L, De Souza FR, Meirelles MN, Pereira MC 2003: Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol.* 50(2):97-103

- Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MNL and Pereira MCS 2004: *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: Role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Parasitology*, 107(1-2):20-30
- Carey DJ 1997. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J.* 327(Pt 1):1-16
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 25(8):471-479
- Cazzulo JJ 2002. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem.* 2:1261–1271
- Chen Q, Sivakumar P, Barley C, Peters DM, Gomes RR, Farach-Carson MC, Dallas SL 2007. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *J Biol Chem.* 7;282(36):26418-26430
- Coura JR 1996. Current prospects of specific treatment of Chagas' disease. *Bol Chil Parasitol.* 51(3-4):69-75.
- Coura JR, de Castro SL 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(1):3-24
- Coura JR 2006. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 3:113-117.
- Croft SL, Barrett MP, Urbina JA 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21(11):508-512
- Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy:

biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(8):3541-3545

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J 1996.

Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest*. 98(8):1709-1712

Da Silveira AB, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum Pathol*. 38(8):1256-1264

De Carvalho TU, de Souza W 1986. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 28(4): 205-212.

De Souza W. 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatides: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis*. 1(1):3

De Souza W. Electron microscopy of trypanosomes--a historical view 2008. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(4):313-325

Dias JC 1986. The Brazilian Chagas' Disease Control Programme in 1986. *Rev Soc Bras Med Trop* 19(3):129-133

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.

Dias JCP 2006. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saúde Pública* 22(10):2020-2021

Dias JCP 2007. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saúde Pública* 1: S13-22

- Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, Araújo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(3):296-300
- Dos Santos FM, Caldas S, de Assis Cáu SB, Crepalde GP, de Lana M, Machado-Coelho GL, Veloso VM, Bahia MT 2008. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance in vivo and its modulation by in vitro culturing and mice infection. *Exp Parasitol.* 120(4):385-90
- Elizari MV 1999. La miocardiopatia chagastica. Perspectiva histórica. *Medicina (Buenos Aires)* 59:5-40
- Elizari MV 2002. Arrhythmias associated with Chagas' heart disease. *Card Electrophysiol Rev.* 6:115-119. Review.
- Fadel S, Eley A 2004. Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulphation in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Med Microbiol.* 53(Pt 2):93-95
- 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
- Fernandes AB, Mortara RA 2004. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. *Microbes Infect* 6:460-467
- Fernandes MC, Cortez M, Yoneyama KAG, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA 2007. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: Implication of cholesterol and host cell microdomains. *International Journal for Parasitology* 37:1431–1441

- Fernández MA, Muñoz-Fernández MA, Fresno M 1993. Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *Eur J Immunol.* 23(2):552-557
- Ferreira D, Cortez M, Atayde VD, Yoshida N 2006. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect Immun.* 74(10):5522-5528
- Filardi, L.S. and Z Brener 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:755-759.
- Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med.* 177(5):1287-1298.
- Frevert U 1994. Malaria sporozoite-hepatocyte interactions. *Exp Parasitol.* 79(2):206-210
- Frevert U 1999. Heparan sulphate and RNA-binding motifs in the malaria circumsporozoite protein. *Biochem Soc Trans.* 27(4):482-487
- Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ 2000. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J.* 351(Pt 3):607-612
- 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(1):85-92
- Guerrini M, Agulles T, Bisio A, Hricovini M, Lay L, Naggi A, Poletti L, Sturiale L, Torri G, Casu B 2002. Minimal heparin/heparan sulfate sequences for binding to fibroblast growth factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 292(1):222-230

- Hardingham TE, Fosang AJ 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6(3):861-870
- Henry-Stanley MJ, Hess DJ, Erickson EA, Garni RM, Wells CL. Role of heparan sulfate in interactions of *Listeria monocytogenes* with enterocytes. *Med Microbiol Immunol.*192(2):107-115
- Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira MEA 1994. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 62:73-83
- Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Erlandsen SL, Wells CL 2006. Heparan sulfate proteoglycans mediate *Staphylococcus aureus* interactions with intestinal epithelium. *Med Microbiol Immunol.* 195(3):133-141
- Higuchi ML, Reis MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, 1997. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 56(5):485-489
- Higuchi ML, Benvenute LA, Reis MM, Metzger, M 2003. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new development. *Cardiovascular Res.* 60(1):96-107
- Hofflin JM, Sadler RH, Araujo FG, Page WE, Remington JS 1987. Laboratory-acquired Chagas disease. *R Soc Trop Med Hyg.* 81(3):437-440
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR 2008. The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2(9):e300
- 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

- Jacquet A, Coulon L, De Nève 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
- Kirchhoff LV, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB 2004. Parasitic diseases of the heart. *Front Biosci.* 9:706-723
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V 1988: Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med.* 168(2):649-659
- Leon JS, Engman DM 2003. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci.* 8:e315-322.
- Lorosa ES, dos Santos CM, Jurberg J 2008. Focus of Chagas disease in São Fidélis, in the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(4):419-420
- Love DC, Esko JD, Mosser DM, A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes wich mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J Cell Biol.* 123(3):759-766
- Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano MA, 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.* 1;276(22):19382-19389
- Magdesian MH, Tonelli RR, Fessel MR, Silveira MS, Schumacher RI, Linden R, Colli W, Alves MJ. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Cell Res.* 1;313(1):210-218
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115(9):1109-1123

Meirelles MN, Chiari E, de Souza W 1982. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. *Acta Trop.* 39(3): 195-203

Meirelles MN, de Araujo-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 myogenesis *in vitro*. *Eur J Cell Biol.* 41(2):198-206

Ming M, Chuenkova M, Ortega-Barria E, Pereira ME 1993. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol.* 59(2):243-252

Moncayo A e Yanine IO 2006. An update on Chagas disease (human american trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 100(8):663-677

Mortara RA 1991. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Experimental Parasitology.* 73(1):1-14

Mortara RA, Andreoli WK, Taniwaki NN, Fernandes AB, Silva CV, Fernandes MC, L'Abbate C, Silva S 2005. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An Acad Bras Cienc.* 77(1): 77-74

Mortara RA, Andreoli WK, Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, L'Abbate C, da Silva S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem.* 47: 101-109

Oliveira FO Jr, Alves CR, Calvet CM, Toma L, Bouças RI, Nader HB, Castro Côrtes LM, Krieger MA, Meirelles Mde N, Souza Pereira MC 2008. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *Microb Pathog.* 44(4):329-338

- Ortega-Barria E, 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(2):411-421
- Ortega-Barria E, Boothroyd JC. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem.* 274(3):1267-1276
- Ouaissi MA, Cornette J, Capron A 1985. *Trypanosoma cruzi*: modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. *Eur J Immunol.* 15(11):1096-1101
- Palomino SA, Aiello VD, Higuchi ML 2000. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol* 94(6):571-579
- Pardo Andreu GL, Inada NM, Pellón RF, Docampo ML, Fascio ML, D'Accorso NB, Vercesi AE 2008. New acridinone derivative with trypanocidal activity. *Int J Antimicrob Agents.* 31(5):502-504
- Perrimon N, Bernfield M 2000. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature.* 13;404(6779):725-728.
- Pinto Dias JC 2006. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med* 144(10):772-774
- Pinzon-Ortiz C, Friedman J, Esko J, Sinnis P 2001. The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for plasmodium sporozoite attachment to target cells. *J Biol Chem.* 276(29):26784-26791
- 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

- Pradel G, Garapaty S, Frevert U 2002. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol.* 45(3):637-651
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease 2001. *Lancet Infect Dis.* 1(2):92-100
- Procópio DO, da Silva S, Cunningham CC, Mortara RA 1998. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol.* 90(1):1-13
- Rassi A 1982. Tratamento etiológico da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 38:277-281
- Reddi HV, Lipton HL 2002. Heparan sulfate mediates infection of high-neurovirulence Theiler's viruses. *J. Virology* 76(16):8400-8407
- Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ, Brown GV 1999. The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(9):5198-5202
- Romaña C 1935. Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjunctivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *MEPRA* 22:16-28
- Robert C, Pouvelle B, Meyer P, Muanza K, Fujioka H, Aikawa M, Scherf A, Gysin J 1995. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. *Res Immunol.* 146(6):383-393

- Rosestolato CT, Dutra Jda M, De Souza W, de Carvalho TM 2002. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct.* 27(2):91-98
- Rue CA and Ryan P 2002. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein C attachment to heparin sulfate proteoglycans. *J. Gen Virol.* 83(Pt 2):301-309
- Sanz-Rodríguez CE, Concepción JL, Pekerar S, Oldfield E, Urbina JA 2007. Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies. *J Biol Chem.* 282(17): 12377-12387
- Santos-Buch CA, Teixeira AR 1974. The immunology of experimental Chagas' disease 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J Exp Med.* 1;140(1):38-53
- Saoncella S, Calautti E, Neveu W, Goetinck PF 2004. Syndecan-4 regulates ATF-2 transcriptional activity in a Rac1-dependent manner. *J Biol Chem.* 279(45):47172-47176
- Scharfstein J, Morrot A 1999: A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:51-63
- Schenkman RP, Vandekerckhove F, Schenkman S 1993. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 61(3):898-902
- Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V 1991. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* 65(7): 1117-1125
- Schenkman S, Pontes de Carvalho L, Nussenzweig V 1992. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J Exp Méd.* 175(2):567-575
- Schenkman RP, Vandekerckhove F, Schenkman S 1993. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 61(3):898-902

- Schenkman S, Eichinger D 1993. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today*. 9(6):218-222
- Schenkman S, Eichinger D, Pereira ME, Nussenzweig V 1994. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol*. 48:499-523. Review.
- Schönherr E, Hausser HJ 2000. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol*. 7(2-4):89-101
- Silva CF, Batista MM, Mota RA, de Souza EM, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro Mde N 2007. Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *Biochem Pharmacol* 73(12):1939-1946
- Sivakumar P, Czirok A, Rongish BJ, Divakara VP, Wang YP, Dallas SL 2006. New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts. *J Cell Sci* 119(Pt 7):1350-1360
- Soeiro M de N, Costa e Silva Filho F, Leal de Meirelles M de N 1995. Alterations in the surface charge of heart muscle cells during interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Biophys*. 26(1):21-44
- Soeiro MN, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles MNL, Araújo-Jorge TC 1999. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. *Cell Struct Funct* 24(3):139-149
- Stecconi-Silva RB, Andreoli WK, Mortara RA. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98(7):953-958
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M 1992. *Clin Microbiol Rev*. 5(4):400-419

- Tanzer ML 2006. Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci.* 11(3):326-331
- 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
- Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR 2006. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(5):463-491
- 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):547-554
- 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.
- Urbina, JA, do Campo, R 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495–501
- Villata 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): 383-338
- 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(14):6909-6918
- WHO – World Health Organization 1991. Special programme for research and training in tropical diseases, eleventh programme report.
- WHO – World Health Organization 2002. Report of the expert committee on the control of Chagas disease. *Technical Report Series* 905. Geneva.

WHO – World Health Organization 2005. Tropical Disease Research: progress 2003-2004. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. *Programme Report 17*, Geneva.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci.* 116(Pt 17): 3611-3622

Yoshida N 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78(1):87-111. Review

Yoshida N 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int.* 57(2):105-109.

Zhang L, Tarleton RL 1999. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis* 180(2): 480-486

ANEXO 1

Running title: HSPG mediates amastigote invasion

**Heparan sulfate proteoglycan triggers invasion of cardiac myocytes by
Trypanosoma cruzi amastigotes**

Bambino-Medeiros R¹, Oliveira-Jr FOR¹, Calvet CM¹, Vicente D¹, , Toma L², Meirelles
MN¹ and Pereira MCS^{1*}.

¹Laboratório de Ultra-estrutura Celular, IOC/FIOCRUZ, RJ, Brazil, ²Departamento de
Bioquímica Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, SP, Brazil.

*Corresponding author: Mirian Claudia S. Pereira. Laboratório de Ultra-estrutura
Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900
Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Email: mirian@ioc.fiocruz.br; Tel. (+55) (21) 2598-4330;
FAX (+55) (21) 2260-4434

Keywords: cardiomyocytes, *Trypanosoma cruzi*, heparan sulfate, recognition
process

ABSTRACT

Cell surface glycosaminoglycans (GAGs) play important role in attachment and invasion of a variety of intracellular pathogens. We have previously demonstrated that heparan sulfate proteoglycan (HSPG) mediate the invasion of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* in cardiomyocytes. Herein, we analyzed whether GAGs are also implicated in amastigotes invasion. Experimental competition assays with soluble GAGs revealed that treatment of *T. cruzi* amastigotes with heparin and heparan sulfate lead to a reduction in the infection ratio, achieving 82% and 65% inhibition of invasion, respectively. Other sulfated GAGs, such as chondroitin sulfate, dermatan sulfate and keratan sulfate, had no effect in the invasion process. In addition, significant decrease in infection occurred after interaction of amastigotes with GAG-deficient Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, decreasing from 20% and 28% in wild-type CHO cells to 5% and 9% in the mutant cells. These findings suggest that uptake of *T. cruzi* amastigotes also involves host cell surface heparan sulfate proteoglycans. The knowledge of the mechanism triggered by heparan sulfate-binding *T. cruzi* proteins may provide new potential candidates for Chagas disease therapy.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas diseases, exploits different strategies to invade mammalian cells. The invasion process is complex and seems to depend on the molecules engaged in the recognition process during *T. cruzi*-host cell interaction, triggering distinct signaling pathways (Fernandes et al., 2006; Ferreira et al., 2006; Yoshida and Cortez 2008). Molecules at the host cell surface, including carbohydrates (Barbosa and Meirelles, 1992; Araújo-Jorge and De Souza, 1988) and extracellular matrix components (Calvet et al., 2003, 2004), and also specialized microdomains at the plasma membrane, as membrane rafts (Barrias et al., 2007; Fernandes et al., 2007), play a key role in the *T. cruzi* invasion process. Although efforts have been made to determine molecules involved in the receptor-ligand recognition during trypomastigotes-host cells interaction, little is known about amastigote forms recognition process.

Cell surface heparan sulfate proteoglycans (HSPG) consist of heparan sulfate (HS) glycosaminoglycan (GAG), composed of alternating units of hexuronic acid [*D*-glucuronic acid (GlcA) or *L*-iduronic acid (IdoA)] and *D*-*N*-acetylglucosamine, covalently linked to specific core proteins (Bernfield et al., 1999; Dietrich et al., 1998). This molecule is ubiquitously distributed in the surface of mammalian cells and participates in many biological processes (reviewed by Ori et al., 2008; Yung and Chan 2007). A wide variety of bioactive proteins, including grow factors, chemokines and cytokines, are modulated by HSPG, which acts as key regulator of mitogenic factors at the cell surface (reviewed by Yung and Chan 2007; Chen et al., 2007). Furthermore, studies have demonstrated that HSPG mediate the invasion process of many intracellular pathogenic microorganisms (Chen et al., 2008; Reddi and Lipton 2002; Plotkowski et al., 2001; Jacquet et al., 2001), including *Trypanosoma cruzi*

(Calvet et al., 2003; Oliveira-Jr et al., 2008; Ortega-Barria and Pereira 1991). The presence of heparin-binding protein has been demonstrated in both infective forms of *T. cruzi* (Ortega-Barria and Pereira, 1991; Oliveira-Jr et al., 2008), but its role in the amastigote invasion has not been demonstrated yet. In this study, we evaluated the participation of sulfated proteoglycans in the invasion process of amastigote forms of *T. cruzi* in cardiomyocytes.

MATERIAL AND METHODS

Cardiomyocyte cultures

Primary cultures of heart muscle cells were obtained from 18-day-old mouse embryos as previously described (Meirelles et al., 1986). Briefly, ventricular cardiac cells were isolated by enzymatic dissociation using 0.025% trypsin (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) and 0.01% collagenase (Worthington Co., New Jersey, USA). The isolated cells were plated at a density of 8×10^4 cells/ml into 24-wells culture dishes containing glass coverslips coated with 0.01% gelatin (Sigma). The cells were cultivated in Dulbeccos' modified Eagle medium (DMEM; Sigma) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Sigma), 2.5 mM CaCl₂, 1 mM L-glutamine (Sigma), 2% chicken embryo extract plus antibiotics and maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The animal procedures were approved by animal care and use committee (license 0230-04).

Amastigogenesis in vitro

Culture-derived trypomastigotes, clone Dm28c, were obtained from Vero cultures at day 4 post-infection. The amastigogenesis in vitro procedure was modified from Tomlinson and co-workers (1995). Trypomastigotes (1×10^6 parasites/ml) were incubated for 4 h at 37 °C in RPMI 1640 medium, pH 5.0, supplemented with 1% FBS. Afterwards, acid-induced parasites were, then, centrifuged at 2100x g for 10 min and the sediment was resuspended in RPMI 1640 medium, pH 7.2, supplemented with 1% FBS. The parasites were transferred to 75 cm² flask culture ($1 \times 10^7/10$ ml) and maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Parasite morphology was observed daily with an inverted phase contrast microscope (Axiovert Zeiss). The parasite growth was monitored at 24, 48 and 72h after acid-induction by counting them in a Neubauer chamber. Samples were processed for indirect immunofluorescence and transmission electron microscopy.

Parasite-host cell interaction

Forty-eight hours cardiomyocyte cultures were infected with 48h-acid-induced amastigote forms of *T. cruzi*, clone Dm28c, at a ratio of 30:1, 50:1 and 65:1 parasites/host cell. After interaction, the cultures were fixed for 5 min at room temperature with Bouin fixative (75 ml 1.2% aqueous picric acid solution, 25 ml formalin (40% formaldehyde) and 5 ml glacial acetic acid) and stained with Giemsa. The infection level was determined after 2, 4, 24 and 48h of infection by quantifying a minimum of 200 cells in random selected microscopic fields. The invasion assay was performed in duplicate in three independent experiments. Amastigotes differentiation index lower than 95% was not employed in the parasite-host cell interaction assays.

Glycosaminoglycans competition assay

Glycosaminoglycans competition assay

To investigate the participation of GAGs on parasite invasion, 48h-acid-induced amastigote forms of *T. cruzi*, Dm28c, were pretreated for 1h on ice with 20 mg/ml of heparin, heparan sulfate (HS), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS) or keratan sulfate (KS). After treatment, the amastigotes were incubated, at a ratio of 65:1 parasites/host cell, for 2 h at 37°C with the target cells. After interaction, cells were fixed with Bouin fixative and stained with Giemsa. The percentage of infection was determined as described above.

Chinese Hamster Ovary cells (CHO cells)

CHO (CHO-k1, wild type) and glycosaminoglycans-deficient (CHO-745) cells were plated at 5×10^4 cells/ml in Ham's F-12 medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 7% FBS on 24-wells culture dishes containing glass coverslips and grown for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were infected with 48h-acid-induced amastigotes at a ratio of 65:1 parasites/host cell. After 2 h and 4h of interaction, the cells were fixed with Bouin fixative and stained with Giemsa. The percentage of infection was determined as described above.

Indirect immunofluorescence

Acid-induced parasites were adhered to poly-L-lysine-coated glass coverslip and fixed for 20 min at 4 °C with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2. Following blockage with PBS containing 2% BSA, the parasites were incubated overnight at 4°C with anti-Ssp3 (1:100) or anti-Ssp4 (1:100) monoclonal antibodies. After rinsing, the cells were incubated for 1h at 37 °C with FITC-

conjugated anti-mouse IgG (1:200; Sigma). The DNA was detected with 10 mg/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole dye (DAPI; Sigma) and the coverslips were mounted with 2.5% 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO; Sigma) in PBS containing 50% glycerol, pH 7.2. Controls were performed by incubation with homolog serum or by omission of the primary antibody. Images were acquired using a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope (Zeiss) equipped with a cooled CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ).

Transmission electron microscopy

Acid-induced *T. cruzi* were collected at 24 and 48h and fixed for 1h at 4°C with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH7.2, containing 3.5% sucrose. After washing, the parasites were post-fixed for 1 h at 4 °C with 1% osmium tetroxide (OsO₄) in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH7.2, containing 3.5% sucrose. The samples were dehydrated in an acetone series and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with 5% uranyl acetate and 2% lead citrate and then observed in a Zeiss EM10c transmission electron microscope.

Statistical analysis

Student's t-test was used to determine the significance of differences between means in the invasion assays; a p value ≤ 0.05 was considered significant.

RESULTS

We used amastigote forms of *T. cruzi*, obtained by medium acidification (Tomlinson et al., 1995), to analyze the participation of sulfated proteoglycans of cardiomyocytes in the invasion process of amastigotes. First, we evaluated the process of amastigogenesis *in vitro* of *T. cruzi*, clone Dm28c. The light microscopy revealed morphological transformation of *T. cruzi* tripomastigotes, showing rounded or oval-shaped parasites, similar to intracellular amastigotes, after 24 h of amastigogenesis induction (Fig. 1A). The analysis of parasite growth demonstrated a peak of proliferation at 48 h of amastigogenesis *in vitro*, with a 65% increase in the number of parasites (Fig. 1B). The stage-specific antigen of amastigotes, Ssp4, was also detected at the surface of the acid-induced parasites (1C-D) and few parasites, mainly epimastigotes-like, were Ssp3 positive (Fig. 1E-F). In the other hand, the ultrastructural analysis demonstrated that 24h-induced parasites cultures still displayed many intermediate forms with round-shaped kinetoplast, characteristic of trypomastigotes (2A), while the transformation process was completed after 48h of amastigogenesis with a homogeneous population displaying disk-shaped kinetoplast positioned between the nucleus and flagellum and signs of cellular division process (Fig. 2C). Therefore, all experimental assays were performed with 48h-induced parasites.

To investigate the ability of amastigotes, Dm28c clone, to invade cardiomyocytes, primary cultures of cardiomyocytes were infected at a ratio of 30:1, 50:1 and 65:1 parasites/host cell for 2, 4, 24 and 48 hours of infection. The kinetic study revealed high levels of infection at different time course, achieving a minimal of 10% after 2 h of interaction and a maximal of 51% after 48 h of infection at a ratio of 30:1 and 65:1, respectively (Fig. 3). Therefore, in order to avoid shedding of binding

molecules from the parasite surface in the invasion assay, we performed the competition with soluble glycosaminoglycans (GAGs) at short time of interaction (2 h) using a ratio of 65:1 parasite/host cell, which reaches approximately 25% of infection.

Next, we analyzed the involvement of sulfated GAGs in the recognition and invasion process of amastigotes in cardiomyocytes. The 48 h-acid-induced parasites were pre-treated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of soluble sulfated GAGs, including heparan sulfate (HS), heparin, dermatan sulfate (DS), chondroitin sulfate (CS) and keratan sulfate (KS). Our results revealed that treatment of amastigotes with both HS and heparin, GAGs consisting of repeated alfa-linked-disaccharides, inhibit amastigotes invasion in cardiomyocytes. A drastic reduction in the level of infection was noticed when the amastigotes were treated with heparin, decreasing from 25% in control to 45% of infection ($p \leq 0.0001$), which represents 82% inhibition of the parasite invasion. A significant reduction was also observed after pre-treatment of the parasites with HS, achieving 8.7% ($p \leq 0.0004$) of infection that corresponds to 65% of invasion inhibition. The role of heparin and HS in *T. cruzi* invasion was clearly visualized by light microscopy, showing few cells with interiorized parasites (Fig. 5B and 5C). In contrast, the other sulfated GAGs examined here, CS, DS and KS, which are GAGs consisting of beta-linked disaccharides, did not inhibit the amastigotes invasion process, reaching an infection level similar to control (Fig. 4 and 5D).

The involvement of GAGs in amastigotes invasion was also evaluated using proteoglycan-deficient mutant of Chinese hamster ovary (CHO) cells. Wild-type CHO cells (CHO-K1) and GAG-deficient cells (CHO-745), cell mutant defective in GAG biosynthesis due to the xylosyl transferase depletion, were infected for 2 h and 4 h with 48h-acid-induced parasites at a ratio of 65:1 parasite-host cell. Our results demonstrated that amastigote invasion was impaired in CHO-745 mutant when

compared to the wild-type CHO-K1. The percentage of infection reduced significantly from 20.3% and 28% in CHO-K1 to 5.3% ($p \leq 0.0009$) and 9% ($p \leq 0.013$) in CHO-745 after 2h and 4h of infection, respectively (Fig. 6 and 7).

DISCUSSION

Intracellular pathogen-host cell interactions are dynamic and complex processes, where the parasite attachment is a primary requisite to establish the infection. Glycosaminoglycans interact with cell surface molecules of a variety of intracellular pathogens, which enable the attachment and triggers parasite invasion (Moelleken and Hegemann 2008; Schuksz et al., 2008; Tossavainen et al., 2006; Yokoyama et al., 2006). Therefore, efforts have been made to identify heparin-binding proteins involved in the parasite host-cell recognition and their application as a prospective target for diagnostic or therapy.

In *T. cruzi* infection, both trypomastigotes and amastigotes are able to invade mammalian cells and sustain the intracellular cycle (Ley et al., 1988). Although distinct mechanisms and signaling pathways involved in invasion process have been reported between these infective forms (reviewed by Mortara et al., 2008), the molecules required to amastigotes invasion have been poorly investigated. The detection of glycosaminoglycans-binding proteins in amastigote forms of *T. cruzi* (Oliveira-Jr et al., 2008) opened the question whether sulfated proteoglycans also mediate amastigotes invasion. Therefore, we performed the acid-induction amastigogenesis to analyze the amastigote-cardiomyocyte interplay. The analysis of the amastigotes differentiation process *in vitro* revealed that differentiated parasites were prevalent after 48h of amastigogenesis. The kinetic study of amastigote-cardiomyocyte interaction demonstrated that acid-induced amastigotes, clone

Dm28c, displayed low level of infection at early stage of interaction (2h), achieving a maximal of 25% at a multiplicity of 65:1 parasite-host cell, when compared to the culture-derived trypomastigotes infection (35%) at a ratio of 10:1 parasite-host cell (Calvet et al., 2003). The discrepancy between amastigotes and trypomastigotes invasion may be related to the lower motility of amastigotes, preventing the prompt association between parasites and target cells *in vitro*, and/or divergences of molecules implicated in the recognition process. In fact, in the scenario of *in vivo* infection, amastigotes released by cardiomyocytes rupture are mostly retained in the interstitial space of cardiac tissue, favoring the recognition of neighboring cells and also the recruitment of inflammatory cells involved in the pathology of Chagas disease (Scharfstein and Morrot 1999). Our findings contrast with those of previous studies of extracellular amastigotes invasion, applying the centrifugation protocol to provide immediate parasite-host cell association, that have demonstrated high infectivity of amastigotes, G strain, when compared to metacyclic trypomastigotes (Procopio et al., 1998; Mortara et al., 2005). However, this phenomenon seems to be cell type- and parasite genotype-dependent since it did not occur with MDCK cells and also with *T. cruzi* strains as Y and CL (Mortara et al., 2005), suggesting possible differences in the receptors/ligands recognition.

Since it has also been demonstrated that RhoA GTPases plays a key role in the invasion of lineage cells by extracellular amastigotes (Fernandes and Mortara 2004; Mortara et al., 2005) and that HSPG-microbes interaction activate several signaling pathways, including PI3-kinase, focal adhesion kinase (FAK) and RhoA GTPases, triggering their internalization by endocytosis (reviewed by Chen et al., 2008; Veetil et al., 2006), we investigated the participation of sulfated proteoglycans in amastigote-cardiomyocyte invasion. Our result showed that treatment of acid-

induced amastigotes with heparin and heparan sulfate prevent cardiomyocyte invasion, achieving 82% and 65% of inhibition, respectively. Similar to trypomastigotes, acid-induced amastigotes recognition is mediated by GAGs containing alfa-linked disaccharides, while the other negatively charged GAGs, as chondroitin sulfate, dermatan sulfate and keratan sulfate, did not elicit amastigotes invasion. Although *T. cruzi* heparin-binding ligand has the ability to bind most sulfated glycosaminoglycan (Oliveira-Jr et al., 2008), only heparan sulfate recognition triggers trypomastigotes and amastigotes invasion.

Few molecules have been demonstrated to mediate amastigote-host cell recognition. Mammalian lectins, such as mannose-binding proteins (MBP) and mannose receptor, are involved in the *T. cruzi* uptake by phagocytic cells (Kahn et al., 1995, 1996). The SA85-1 expressed by amastigotes interacts strongly with MBP, but does not mediate MBP binding to trypomastigotes, suggesting a stage-specific recognition involved in amastigote attachment and invasion (Kahn et al., 1996). In addition, it has been recently shown that membrane rafts, enriched in sphingolipids, cholesterol, ganglioside GM1, are implicated in the internalization of both amastigote and trypomastigote infective forms (Barrias et al., 2007; Fernandes et al., 2007). Interesting, evidences have demonstrated that heparan sulfate proteoglycan are localized in cholesterol-rich lipid rafts domains (Fuki et al., 2000) and modulate signal transduction events activated by fibroblast grow factor-2 at specialized membrane microdomains, favoring an effective sensitivity to diluted ligands (Chu et al., 2004).

In summary, we provide evidence supporting the participation of the GAGs containing alfa-linked disaccharides, HS and heparin, in the invasion of *T. cruzi* amastigotes. Investigations of signaling pathways that are triggered by binding of

amastigotes to heparan sulfate may provide insights into the mechanisms underlying *T. cruzi* amastigotes infection.

Acknowledgments

The authors thank Caroline Amaral for technical support. The anti-Ssp3 and anti-Ssp4 monoclonal antibodies were kindly supplied by Dr Marco Krieger from Instituto de Biologia Molecular do Paraná. IBMP, FIOCRUZ. This work was supported by grants from Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. Araújo-Jorge TC, De Souza W 1998. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Trop.* 45(2):127-36.
2. Barbosa HS, de Meirelles Mde N 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(5):404-9.
3. Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM 2007. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun.* 363(3):828-34.

4. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. 1999. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 68:729-77. Review.
5. Calvet CM, Toma L, De Souza FR, Meirelles M de N, Pereira MC 2003. Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol.* 50(2):97-103.
6. Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MNL, Pereira MC 2004. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: Role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitology*, 107(1-2):20-30
7. Chen Q, Sivakumar P, Barley C, Peters DM, Gomes RR, Farach-Carson MC, Dallas SL 2007. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *J Biol Chem.* 282(36):26418-30.
8. Chen Y, Goette M, Liu J, Park PW. 2008. Microbial Subversion of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Mol Cells.* 26(5), in press.
9. Chu CL, Buczek-Thomas JA, Nugent MA 2004. Heparan sulphate proteoglycans modulate fibroblast growth factor-2 binding through a lipid raft-mediated mechanism. *Biochem J.* 379(Pt 2):331-41.
10. 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 (Noisy-le-grand).* 44(3):417-29.
11. Fernandes AB, Mortara RA 2004. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic

trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. *Microbes Infect.* 6(5):460-7.

12. Fernandes AB, Neira I, Ferreira AT, Mortara RA 2006. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitol Res.* 100(1):59-68.

13. Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA 2007. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol.* 37(13):1431-41.

14. Ferreira D, Cortez M, Atayde VD, Yoshida N. 2006. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect Immun.* 74(10):5522-8.

15. Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ 2000. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J.* 351 Pt 3:607-12.

16. Jacquet A, Coulon L, De Nève 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.

17. Kahn SJ, Wleklinski M, Ezekowitz RA, Coder D, Aruffo A, Farr A 1996. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infect Immun.* 64(7):2649-56.

18. Kahn S, Wleklinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M 1995. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med.* 182(5):1243-58.

19. Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med.* 168(2):649-59.
20. Meirelles MN, de Araujo-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 myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol.* 41(2):198-206.
21. Moelleken K, Hegemann JH 2008. The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Mol Microbiol.* 2008 Jan;67(2):403-19.
22. Mortara RA, Andreoli WK, Taniwaki NN, Fernandes AB, Silva CV, Fernandes MC, L'Abbate C, Silva S 2005. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An Acad Bras Cienc.* 77(1):77-94. Review
23. Mortara RA, Andreoli WK, Fernandes MC, da Silva CV, Fernandes AB, L'Abbate C, da Silva S 2008. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem.* 2008;47:101-9. Review.
24. Oliveira FO Jr, Alves CR, Calvet CM, Toma L, Bouças RI, Nader HB, Castro Côrtes LM, Krieger MA, Meirelles Mde N, Souza Pereira MC. 2008. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *Microb Pathog.* 44(4):329-38.
25. Ori A, Wilkinson MC, Fernig DG. 2008. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Front Biosci.* 13:4309-38. Review.
26. Ortega-Barria E, Pereira ME 1991. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell.* 67(2):411-21.

27. Plotkowski MC, Costa AO, Morandi V, Barbosa HS, Nader HB, de Bentzmann S, Puchelle E. 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):183-90.
28. Procópio DO, da Silva S, Cunningham CC, Mortara RA 1998. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol.* 90(1):1-13
29. Reddi HV, Lipton HL 2002. Heparan sulfate mediates infection of high-neurovirulence Theiler's viruses. *J Virol.* 76(16):8400-7
30. Scharfstein J, Morrot A. 1999. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:51-63. Review.
31. Schuksz M, Fuster MM, Brown JR, Crawford BE, Ditto DP, Lawrence R, Glass CA, Wang L, Tor Y, Esko JD 2008. Surfen, a small molecule antagonist of heparan sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(35):13075-80.
32. 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.
33. Tossavainen H, Pihlajamaa T, Huttunen TK, Raulo E, Rauvala H, Permi P, Kilpeläinen I 2006. The layered fold of the TSR domain of *P. falciparum* TRAP contains a heparin binding site. *Protein Sci.* 15(7):1760-8
34. Veetil MV, Sharma-Walia N, Sadagopan S, Raghu H, Sivakumar R, Naranatt PP, Chandran B 2006. RhoA-GTPase facilitates entry of Kaposi's sarcoma-associated

herpesvirus into adherent target cells in a Src-dependent manner. J Virol. 80(23):11432-46.

35. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. 2006. Erythrocyte invasion by Babesia parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. Vet Parasitol. 138(1-2):22-32.

36. Yoshida and Cortez 2008. Trypanosoma cruzi: parasite and host cell signaling during the invasion process. Subcell Biochem. 47:82-91. Review.

37. Yung and Chan 2007. Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? Perit Dial Int. 27 Suppl 2:S104-9. Review.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Amastigogenesis of *T. cruzi in vitro*. (A) Parasite morphology observed through phase contrast microscopy after 24h of trypomastigotes acid induction, showing rounded or oval-shaped parasites with short free flagellum similar to intracellular amastigotes. (B) Proliferation curve of amastigotes *in vitro*, showing a peak at 48h with an increase of 65% in the number of parasites. The amastigotes growth was arrested after 72h with a 13% decrease in amastigote number. (C-D) In the peak of amastigote proliferation (48h), an intense staining of Ssp4 (green), the stage specific antigen of amastigotes, was detected in parasite surface. (E-F) Note that only few parasites were Ssp3 positive (green) after 48 h of amastigogenesis *in vitro*. (D-F) DNA labeling with DAPI (blue) stained nucleus and kinetoplast of parasites. Bar (A) 50 μm and (C-F) 20 μm .

Figure 2. Ultrastructural analysis of amastigogenesis process *in vitro*. After 24h of acid induction, both intermediate forms with round-shaped kinetoplast characteristic

of trypomastigotes (A) and amastigotes forms displaying disk-shaped kinetoplast (B) were observed. Amastigotes with 48h of induction presented disk-shaped kinetoplast positioned between the nucleus and flagellum (C), demonstrating a complete transformation process at this time. White arrows show signs of cellular division process. (K) Kinetoplast; (N)Nucleus. Bar 0.5 μ m.

Figure 3. Kinetic study of amastigote-host cell interaction. Cardiomyocytes were infected at a ratio of 30:1, 50:1 and 65:1 amastigotes/host cell for 2, 4, 24 and 48 hours of infection. Amastigotes were able to invade cardiomyocytes in a minimal infection level of 10 % (30:1), reaching 25% (65.1) after 2 h of interaction. A high level of infection, 51%, was achieved after 48 h of interaction at a ratio of 30:1 and 65:1 amastigotes/ host cell.

Figure 4. Sulfated glycosaminoglycans (GAGs) are involved in cardiomyocyte invasion by *T. cruzi* amastigotes. Pre-treatment of amastigotes with 20 g/ml of heparin and heparan sulfate (HS) resulted in a statistically significant inhibition of 82% and 65% in the infection ratio of cardiomyocytes (2h). In contrast, chondroitin sulfate (CS), keratan sulfate (KS) and dermatan sulfate (DS) pre-treatment of amastigotes did not inhibit the invasion process, reaching an infection level similar to control. (*) Student's t-test: statistically significant $p \leq 0.05$.

Figure 5. Interaction of cardiomyocytes and *T. cruzi* amastigotes. (A) Cardiomyocytes infected with amastigotes (2h of interaction), displaying internalized (\blackrightarrow) and attached (\rightleftharpoons) parasites. The infection of cardiomyocytes with amastigotes pre-treated with 20 μ g/ml of heparin (B) and heparan sulfate (C) resulted in a significant reduction of infection, showing few cells with interiorized or attached parasites, while chondroitin sulfate (D), keratan sulfate and dermatan sulfate (data not shown) did not alter amastigotes invasion. Bar=20 μ m.

Figure 6. Amastigote invasion in Chinese hamster ovary (CHO) cells. CHO-K1 (wild-type) and CHO-745 (proteoglycan-deficient mutant) cultures were infected with

amastigotes of *T. cruzi* for 2h and 4h. Amastigote invasion was impaired in CHO-745 mutant when compared to the wild-type CHO-K1, with a statistically significant inhibition in the infection level of 74% and 67% after 2h and 4h of interaction, respectively. (*) Student's t-test: statistically significant $p \leq 0.05$.

Figure 7. Aspect of Chinese hamster ovary (CHO) cell cultures infected with *T. cruzi* amastigotes. (A-C) CHO-K1 wild-type and (B-D) CHO-745, proteoglycan-deficient cells, after 2h (A-B) and 4h (C-D) of infection. Note the low levels of infection in CHO-745 cultures (B-D), with few interiorized (➡) and attached (⇔) parasites, either after 2h or 4h of interaction, when compared with the wild-type, CHO-K1. Bar=20µm.

Figure 1

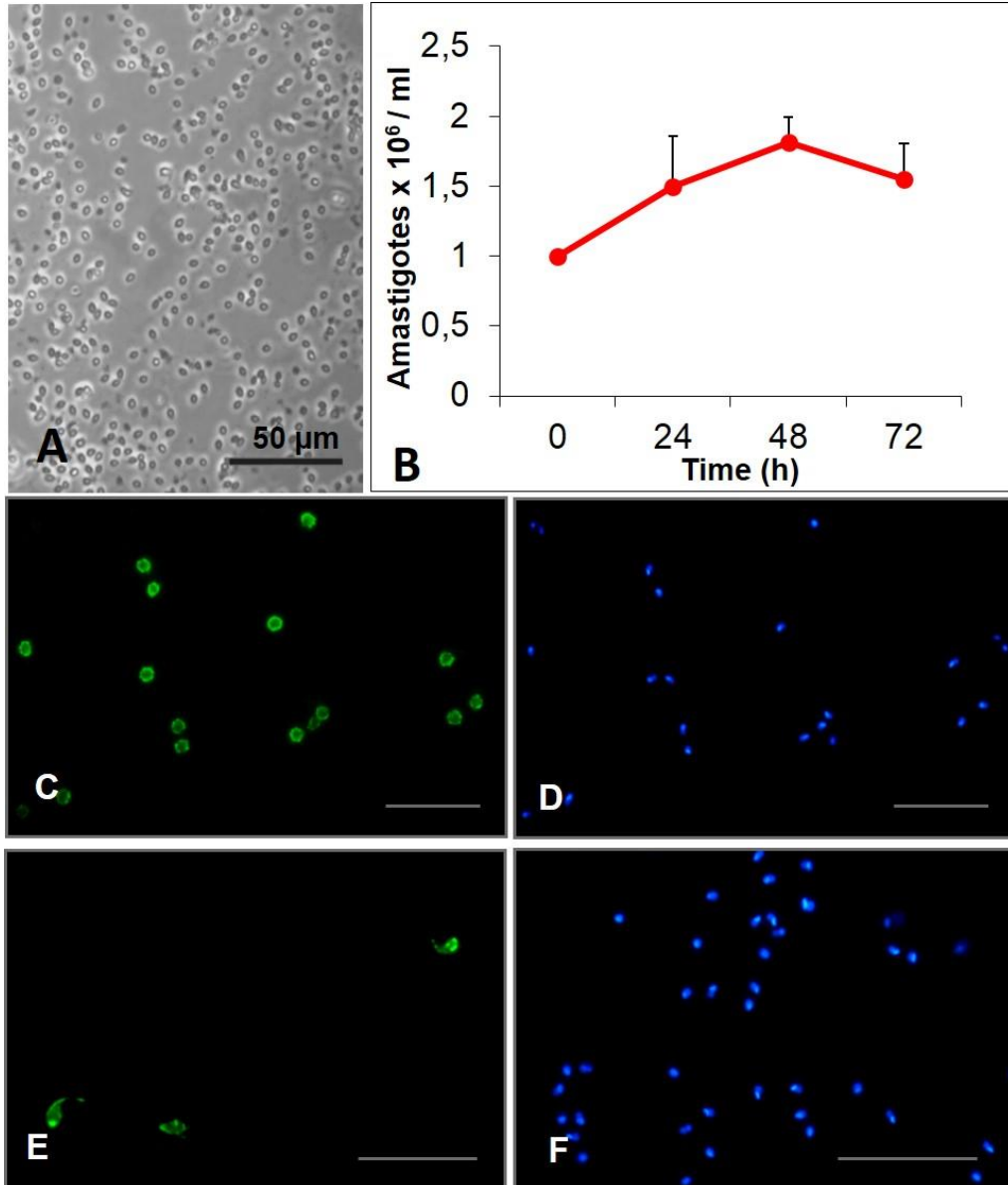


Figure 2

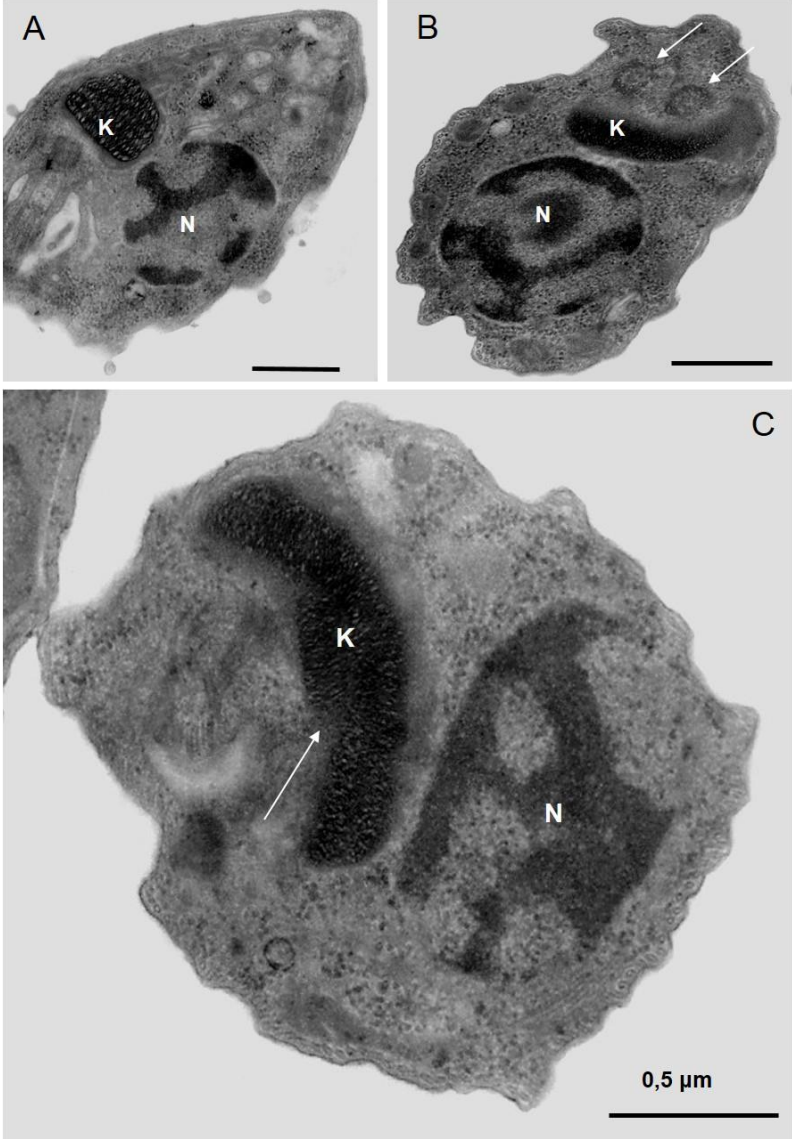


Figure 3

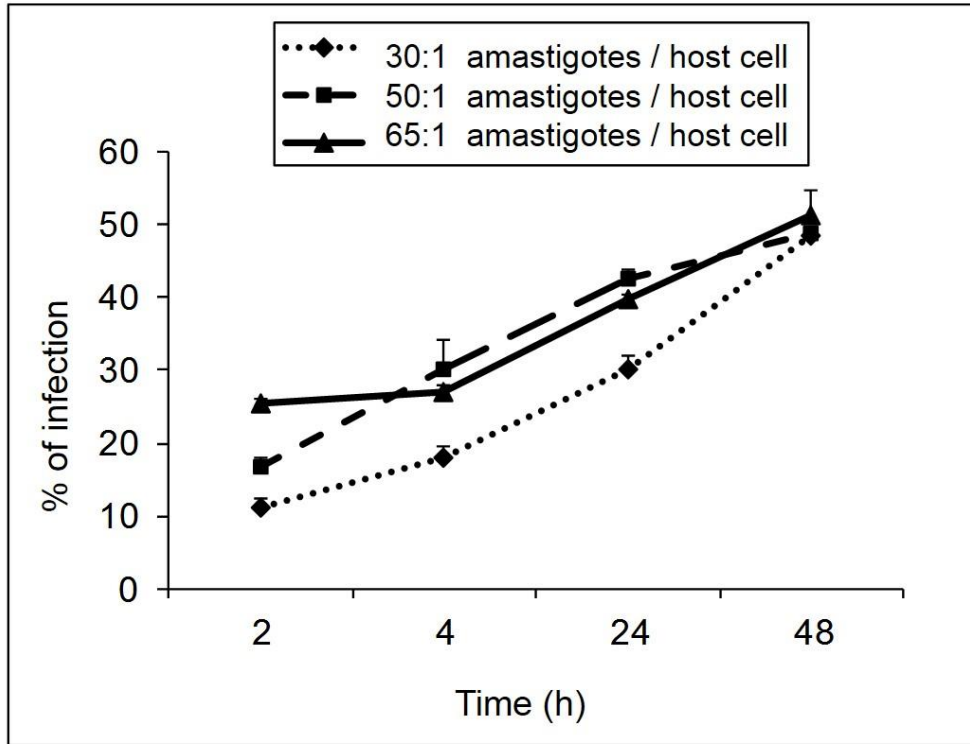


Figure 4

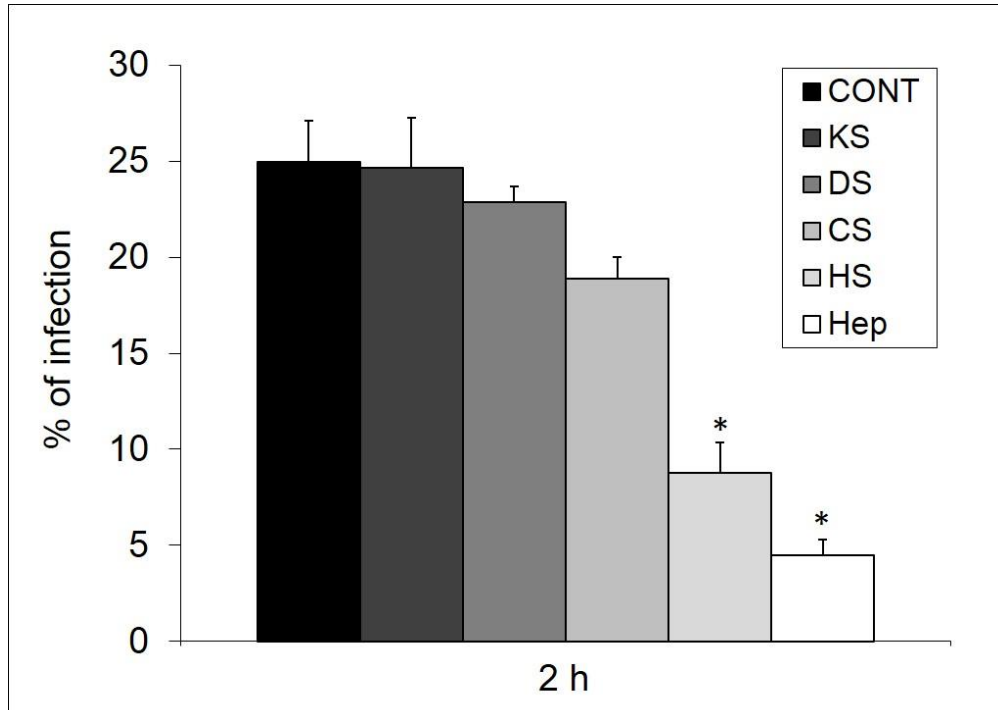


Figure 5

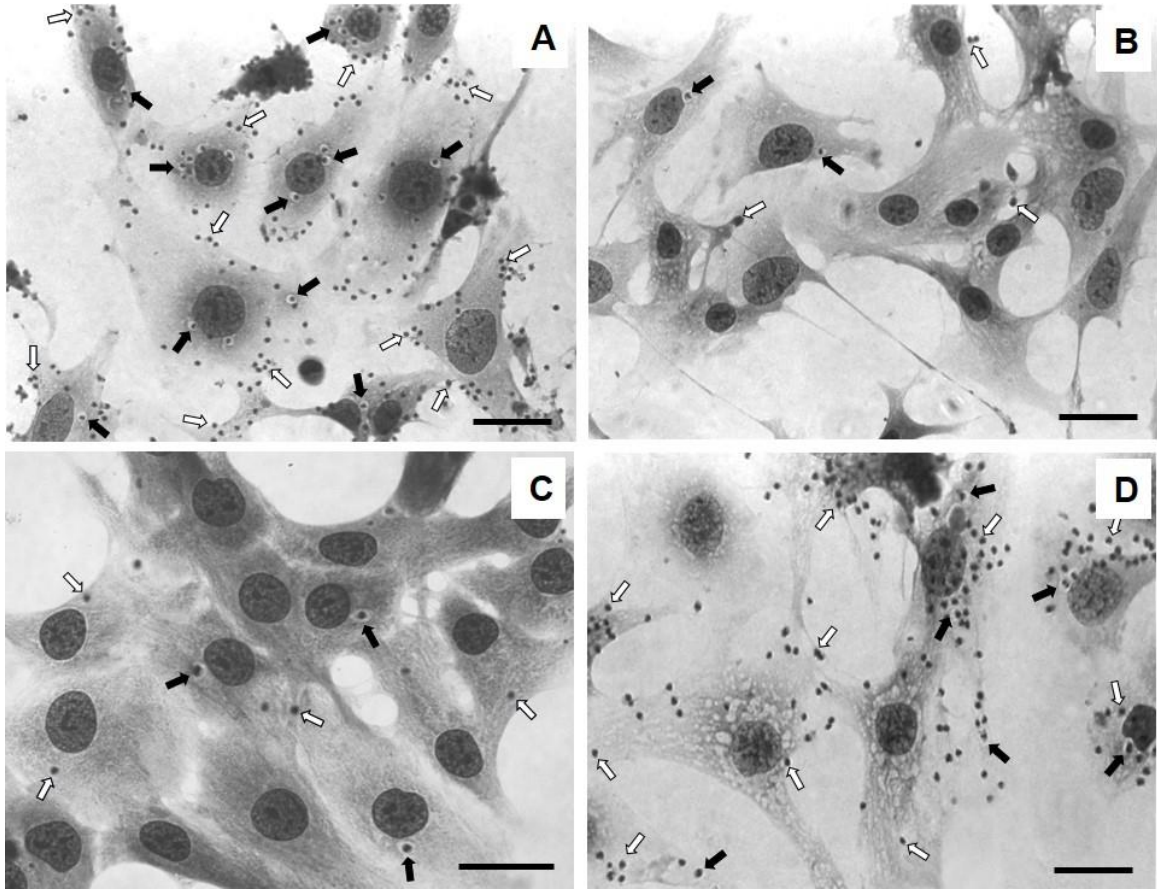


Figure 6

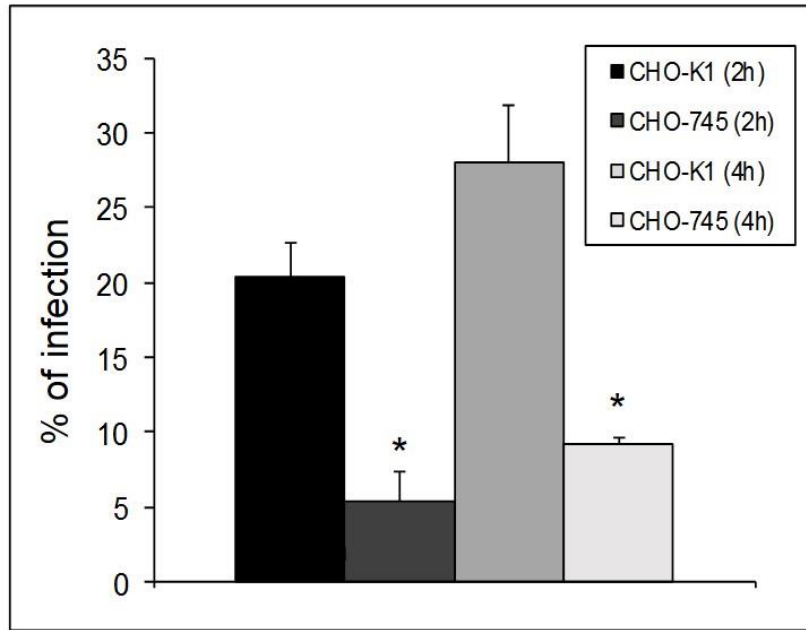


Figure 7

