

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LÍVIA ALMEIDA UEHARA

Determinação da relevância da cruzipaína na interação de *Trypanosoma cruzi* com *Rhodnius prolixus*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dra. Claudia Masini d'Avila Levy
Prof. Dra. Constança Felicia De Paoli de Carvalho Britto

RIO DE JANEIRO
2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

U22

Uehara, Livia Almeida

Determinação da relevância da cruzipaina na interação de
Trypanosoma cruzi com *Rhodnius prolixus* / Livia Almeida Uehara. – Rio
de Janeiro, 2010.

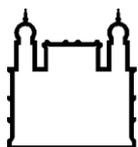
xiii, 63 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e
Molecular, 2010.

Bibliografia: f. 47-63

1. Cruzipaina. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. *Rhodnius prolixus*. I. Título.

CDD 616.936 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LÍVIA ALMEIDA UEHARA

**DETERMINAÇÃO DA RELEVÂNCIA DA CRUZIPAÍNA NA INTERAÇÃO DE
TRYPANOSOMA CRUZI COM *RHODNIUS PROLIXUS***

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

Prof. Dra. Constança Felicia De Paoli de Carvalho Britto

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Patrícia Azambuja – Presidente

Prof. Dr. Jaime Santana

Prof. Dra. Patricia Maria Lourenço Dutra

Prof. Dra. Patricia Cuervo Escobar

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes

Rio de Janeiro, 26 de agosto de 2010

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Mário e minha irmã Aline
pelo amor, dedicação e apoio em toda a
minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar os meus caminhos;

À minha orientadora, Dra. Cláudia Masini d'Ávila Levy, pelo seu apoio, profissionalismo, compreensão e ensinamentos importantes para a minha formação científica; além de ótima orientadora, é uma excelente amiga desde a minha vinda ao laboratório. Obrigada por acreditar em mim e me apoiar sempre!

À Dra. Constança Britto, minha co-orientadora, por todo apoio, incentivo, amizade e confiança que teve por mim, além de ter me acolhido tão bem em seu Laboratório;

Aos Drs. Carlos Roberto Alves e Otacílio Moreira da Cruz pelas conversas científicas e conselhos nas prévias de entrevista de mestrado, seminário discente e defesa da tese, além de serem ótimos amigos;

Às tecnologistas do laboratório, Luiza e Angélica, por terem me ajudado nas novas metodologias empregadas no meu estudo e amizade;

À Dra. Patrícia Azambuja, e aos demais integrantes do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, IOC, pela intensa colaboração, sugestões e contribuição científica;

Ao Dr. José Maurício de Albuquerque-Cunha por toda a colaboração prestada durante o início do meu trabalho e por ter me ensinado as técnicas com o triatomíneo, além de ser um ótimo amigo;

À Dra. Ana Paula Lima, IBCCF, UFRJ pelas sugestões e contribuição científica;

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas: Clarinha, Carol, Bia, Lívia Santos, Ellen, Vítor, André e a todos os demais alunos e pesquisadores pelo companheirismo, apoio, amizade durante o desenvolvimento dessa dissertação de mestrado, o que tornou a elaboração desse trabalho muito agradável;

À minha família que não tenho como agradecer o apoio e o estímulo para seguir em frente, principalmente ao meu querido pai, minha irmã e amiga Aline e tia Solange;

À minha amada mãe, Rosimary (*in memoriam*) pelo eterno amor, carinho e por ser sempre importante na minha vida;

Aos meus amigos de longa data: Mari, Mimi, André e meu cunhado Rafael, pelo apoio, intensas alegrias, risadas e bons momentos;

A todos os meus familiares e demais amigos pelo incentivo e carinho;

A todos não mencionados anteriormente que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. A Família Trypanosomatidae.....	1
2. <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.....	1
3. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	5
4. Peptidases.....	8
5. A cruzipaina.....	9
6. Chagasina – o inibidor natural da cruzipaina.....	13
7. <i>Rhodnius prolixus</i>	15
8. A interação do <i>T. cruzi</i> com o inseto vetor.....	16
II. JUSTIFICATIVA.....	20
III. OBJETIVO GERAL.....	21
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1. Condições de cultivo e obtenção de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
2. <i>Rhodnius prolixus</i>	22
3. Interação do <i>T. cruzi</i> com intestinos dissecados <i>in vitro</i>	22
4. Obtenção de frações enriquecidas da cruzipaina e do extrato bruto de <i>T. cruzi</i>	23
5. Determinação da concentração de proteínas.....	24
6. Análise do perfil proteico da cruzipaina enriquecida por gel SDS-PAGE corado por nitrato de prata.....	24
7. Análise da fração enriquecida da cruzipaina por SDS-PAGE-Gelatina.....	25
8. Interação de <i>T. cruzi</i> com intestinos dissecados <i>in vitro</i> utilizando a cruzipaina enriquecida.....	25
9. Interação de <i>T. cruzi</i> com <i>R. prolixus</i> – infecção.....	26
10. Análise da expressão da cruzipaina de <i>T. cruzi</i> após a colonização de <i>R. prolixus</i> através de citometria de fluxo.....	26

11. Análises estatísticas	27
V. RESULTADOS	28
1. Efeitos dos inibidores de cisteína peptidase sobre o índice de adesão ao epitélio dissecado de <i>R. prolixus</i>	28
2. Efeito do inibidor de cisteína peptidase, cistatina, sobre a interação entre <i>T. cruzi</i> e <i>R. prolixus</i>	29
3. Efeito do anticorpo anti-cruzipaína sobre o índice de adesão ao epitélio dissecado de <i>R. prolixus</i>	30
4. Avaliação do possível envolvimento da cruzipaína na interação entre <i>T. cruzi</i> e hospedeiro invertebrado utilizando inibidor endógeno (chagasina).....	32
5. Avaliação da taxa de adesão de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> que possuem distintas relações cruzipaína-chagasina	33
6. Análises da fração enriquecida da cruzipaína isolada do <i>T. cruzi</i>	34
7. Potencial de reversão da inibição da adesão de pCHAG ao epitélio de <i>R. prolixus</i> pelo suplemento de cruzipaína exógena.....	34
8. Efeito do pré-tratamento do epitélio intestinal do <i>R. prolixus</i> com cruzipaína ativa	36
9. Colonização de <i>R. prolixus</i> por <i>T. cruzi</i> que superexpressa a chagasina	37
10. Modulação da expressão da cruzipaína por <i>T. cruzi</i> após a colonização de <i>R. prolixus</i> ...	38
VI. DISCUSSÃO	39
VII. CONCLUSÕES.....	46
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

RESUMO

DETERMINAÇÃO DA RELEVÂNCIA DA CRUZIPAÍNA NA INTERAÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI* COM *RHODNIUS PROLIXUS*

Lívia Almeida Uehara

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A cruzipaína é a cisteína peptidase mais abundante do *Trypanosoma cruzi*, o qual é o agente etiológico da doença de Chagas. A cruzipaína é um importante fator de virulência do *T. cruzi* envolvida em várias etapas cruciais na interação com células de mamíferos. Essa enzima é expressa em níveis variáveis em todas as formas evolutivas e cepas do parasito, sendo abundantemente expressa nas formas epimastigotas, encontradas apenas no inseto vetor. Esse dado nos levou a investigar se a cruzipaína poderia estar envolvida na interação do *T. cruzi* com células do hospedeiro invertebrado. Para tal, foram analisados os efeitos do pré-tratamento do *T. cruzi* com um painel de diferentes inibidores de cisteína peptidases ou anticorpos anti-cruzipaína na adesão do parasito ao epitélio intestinal médio posterior dissecado de *Rhodnius prolixus*. Paralelamente, foi analisado o índice de adesão ao epitélio do *T. cruzi* que superexpressa a chagasina (pCHAG), um inibidor endógeno da cruzipaína. A taxa de adesão dos parasitos tratados com os inibidores de cisteína peptidase (iodoacetamida, leupeptina, antipaína ou E-64 a 10 µM, ou cistatina a 1 µg/mL) foi em média 70% inferior em comparação aos parasitos não tratados, com exceção do Ca074me (um inibidor de catepsina B) que não mostrou alteração significativa. O tratamento de parasitos com a cistatina apresentou um efeito dose-dependente sobre a taxa de adesão em relação aos parasitos não tratados. Além disso, o tratamento de epimastigotas com anticorpos anti-cruzipaína (1:1000) induziu uma redução significativa de 64% na adesão. Os parasitos pCHAG apresentaram baixa capacidade de ligação ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus*, enquanto o pTEX (plasmídeo sem o gene inserido) não apresentou mudanças significativas na taxa de adesão em relação ao controle. Nós também comparamos a habilidade de vários isolados de *T. cruzi* na adesão ao intestino do *R. prolixus*. A cepa G, que naturalmente apresenta baixíssimos níveis de cruzipaína ativa, apresentou baixa capacidade de interação em comparação às cepas Dm28c, Y e CL Brener. Os intestinos pré-tratados com cruzipaína ativa não produziram uma redução significativa no índice de adesão às células epiteliais do inseto vetor em relação ao controle indicando que o envolvimento da cruzipaína no processo de interação é independente de interação ligante-receptor. A cruzipaína ativa na concentração de 1,5 µg/µL restaurou parcialmente (30%) o nível de adesão do *T. cruzi* pCHAG ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus* em relação a parasitos pCHAG. Ensaios de colonização *in vivo* revelaram que parasitos pCHAG são virtualmente incapazes de colonizar a ampola retal de *R. prolixus*. Além disso, a expressão da cruzipaína em células de *T. cruzi* teve um aumento drástico após a passagem em *R. prolixus*. Coletivamente, nossos resultados sugerem que a cruzipaína participa ativamente da interação entre *T. cruzi* e células epiteliais do hospedeiro invertebrado, através de um mecanismo distinto ao de ligante-receptor.

ABSTRACT

DETERMINATION OF CRUZIPAIN RELEVANCE IN THE INTERACTION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* WITH *RHODNIUS PROLIXUS*

Lívia Almeida Uehara

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cruzipain is the most abundant cysteine peptidase of *Trypanosoma cruzi*, which is the causative agent of Chagas' disease. The cruzipain is an important virulence factor of *T. cruzi*, involved in several crucial steps in the interaction with mammalian cells. This enzyme is expressed at variable levels in all developmental forms and strains of the parasite, being abundantly expressed in epimastigotes forms, found only in the insect vector. This finding led us to investigate whether cruzipain could be involved in the interaction of *T. cruzi* with invertebrate host cells. To this end, we have analyzed the effects of the treatment of *T. cruzi* with a panel of different cysteine peptidase inhibitors or anti-cruzipain antibodies on the parasite adhesion to *Rhodnius prolixus* posterior dissected midgut. In parallel, we have analyzed the adhesion rate of *T. cruzi* that superexpresses chagasin (pCHAG), an endogenous cruzipain inhibitor. The adhesion rate of parasites treated with cysteine peptidase inhibitors (iodoacetamide, leupeptin, antipain or E-64 at 10 μ M or cystatin at 1 μ g/mL) was, in average, 70% lower compared to untreated parasites, except for Ca074me (an inhibitor of cathepsin B) that showed no significant change. Parasites treated with cystatin showed a dose-dependent effect. Furthermore, epimastigotes treated with anti-cruzipain (1:1000) presented a significant reduction of 64% in adhesion. pCHAG parasites showed low ability to bind to intestinal epithelium. We also compared the ability of several *T. cruzi* isolates to adhere to *R. prolixus*. The G strain, which naturally possesses low levels of active cruzipain, adhered to a lesser extent in comparison to Dm28c, Y and CL Brener strains. The intestines pre-treated with active cruzipain did not produce a significant reduction in the adhesion rate to epithelial cells of the insect vector as compared to control, suggesting that the involvement of cruzipain in the interaction process is independent of a ligant-receptor interaction. The active cruzipain at 1,5 μ g/ μ L partially restored (30%) the adherence level of *T. cruzi* pCHAG to *Rhodnius prolixus* posterior dissected midgut in comparison to pCHAG parasites. In vivo infection assays, revealed that pCHAG parasites were virtually unable to colonize *R. prolixus* rectum. Furthermore, the expression of surface cruzipain in *T. cruzi* cells was drastically enhanced after the passage in *R. prolixus*. Collectively, these results suggest that cruzipain mediates actively the interaction between *T. cruzi* and epithelial cells of the invertebrate host through a distinct mechanism of the ligant-receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa com a distribuição da população mundial em 2002.	3
Figura 2. Mortalidade causada pela doença de Chagas em 2002.	3
Figura 3. Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	6
Figura 4. Representação esquemática do ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> dentro do inseto vetor.	7
Figura 5. Esquema de classificação das proteases quanto ao tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio ativo	9
Figura 6. Resíduos catalíticos são mostrados como esferas e bastões: Cis147 em amarelo, His284 em roxo e Asn 304 em rosa.	14
Figura 7. Esquema representando as regiões do sistema digestivo do triatomíneo.	17
Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de células epiteliais do intestino médio posterior (E) de ninfas de 5 ^o estágio de <i>R. prolixus</i> , 10 dias após alimentação com sangue humano.	19
Figura 9. Efeito de inibidores de cisteína peptidase no processo de interação entre <i>T. cruzi</i> e o intestino médio posterior dissecado de <i>R. prolixus</i> .	29
Figura 10. Efeito dose-dependente do inibidor cistatina no processo de interação entre <i>T. cruzi</i> e o intestino médio posterior dissecado de <i>R. prolixus</i> .	30
Figura 11. Efeito do anticorpo anti-cruzipaína no processo de interação entre <i>T. cruzi</i> e intestino médio posterior dissecado de <i>R. prolixus</i> .	31
Figura 12. Análise da taxa de interação do clone Dm28c de <i>T. cruzi</i> , superexpressando ou não a chagasina, com intestinos dissecados de <i>R. prolixus</i> .	32
Figura 13. Análise da taxa de interação em diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> , com intestinos dissecados de <i>R. prolixus</i> .	33
Figura 14. Perfil de proteínas e perfil de peptidases em gelatina da cruzipaína enriquecida.	34
Figura 15. Análise da taxa de interação do clone Dm28c de <i>T. cruzi</i> , superexpressando a chagasina suplementada ou não de cruzipaína exógena com intestinos dissecados <i>R. de prolixus</i> .	35

Figura 16. Análise da taxa de interação da cepa Dm28c de <i>T. cruzi</i> , com intestinos dissecados de <i>R. prolixus</i> , pré-tratando o intestino com cruzipáina.	36
Figura 17. Níveis de infecção de <i>T. cruzi</i> selvagem, pTEX e pCHAG na ampola retal de espécimes de <i>Rhodnius prolixus</i> .	37
Figura 18. Análise da expressão da cruzipáina frente ao desafio do <i>T. cruzi</i> com epitélio intestinal explantado de <i>R. prolixus</i> .	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de inibidores proteolíticos utilizados.	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

μM – Micromolar

μg – Micrograma

BHI– Infusão de Cérebro e Coração

Cruzaína– Cruzipaína recombinante expressa em *E. coli* sem o C-terminal

DNA– Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)

DTT– Ditioneitol

E.C.– Enzyme Commission (Comitê de Nomenclatura Enzimática)

EDTA – Ácido etileno diamino tretra-acético

E-64 – L-trans-epoxisuccinil leucilamido-(4-guanidino) butano

FACS– Fluorescence Activated Cell Sorting (Separador de Células Ativado por Fluorescência)

FITC– Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)

g– Grama

gp63– Glicoproteína 63

gp57/51– Cruzipaína

GPI– Glicosilfosfatidilinositol

h– Hora

IOC– Instituto Oswaldo Cruz

IgG– Imunoglobulina G

kDa– Kilodalton

k-DNA– Kinetoplastid DNA (DNA do Cinetoplasto)

L– Litro

M– Molar

mL– Mililitro

N– Normal

mA– Miliampère

min– Minuto

mm– Milimolar

mM– Milemolar

mW– Megawatt

nm– Nanomolar

PBS– Tampão Fosfato Salina

PMSF– Phenylmethylsulfonyl fluoride

pH– Potencial Hidrogeniônico

RNA– Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)

rpm– Rotações por minuto

SDS– Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS-PAGE– Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS

SFB– Soro Fetal Bovino

sp.– Espécie

v/v– Volume por Volume

V– Volume

I. INTRODUÇÃO

1. A Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae, classificada na ordem Kinetoplastida, compreende um grande número de parasitos monoflagelados eucariotos. Os microrganismos desta família possuem características peculiares como a presença de mitocôndria única, ramificada que se estende por todo o corpo celular. Esta organela contém uma região especializada da matriz mitocondrial, próxima à base flagelar, o cinetoplasto, onde o DNA está compactado. O DNA mitocondrial ou DNA do cinetoplasto (k-DNA) consiste de uma rede de moléculas de DNA circular dupla-fita, concatenadas uma às outras. Esta rede de kDNA é composta por moléculas circulares, consistindo de milhares de minicírculos (5.000 a 10.000 cópias por célula) e um pequeno número de maxicírculos (25 a 50 cópias por célula) (SIMPSON, 1987).

A família Trypanosomatidae apresenta alta relevância médica e econômica, uma vez que agrupa agentes etiológicos de diversas doenças parasitárias humanas de grande impacto social (DE SOUZA, 2002). Além do *Trypanosoma cruzi*, modelo de estudo desse trabalho, causador da doença de Chagas, neste grupo taxonômico, também são encontradas outras espécies do gênero *Trypanosoma*, como o *T. brucei* causador da doença do sono na África (tripanossomíase humana africana), além de espécies do gênero *Leishmania* causadoras de leishmanioses tegumentar e visceral (Calazar) (REY, 2008).

2. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

A doença de Chagas, identificada em 1909 por Carlos Chagas, é causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi* (CHAGAS, 1909). De maneira notável, ele descreveu uma nova doença humana, o protozoário que a causava e o inseto que a transmitia, um hematófago popularmente conhecido como “barbeiro”, muito comum no interior das casas de pau-a-pique típicas das áreas rurais do Brasil. Chagas foi o primeiro cientista a apontar a importância sócio-econômica da doença no país. Além disso, fundou as bases da pesquisa básica realizada em todo o século XX até os dias atuais, essencial no entendimento das interações parasito-hospedeiro (KROPF, 2009).

Atualmente, a doença de Chagas circunscrita à América Latina continua sendo um problema de saúde pública nessa área sendo considerada uma das doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários, junto com a tripanossomíase africana e a

leishmaniose (BOUTAYEB *et al.*, 2007). A doença de Chagas é amplamente distribuída na América Latina e recentemente, devido à migração populacional, diversos países da Europa e EUA, assim como Japão e Austrália, apresentaram casos de infecção (KIRCHHOFF, 1993; KIRCHHOFF *et al.*, 2006; GARRAUD *et al.*, 2007; KIRCHHOFF & PEARSON, 2007; SCHMUNIS, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), as doenças tropicais negligenciadas afetam mais de 1 bilhão de indivíduos em todo o mundo causando aproximadamente 500.000 mortes anuais. A maior parte dos doentes, que vivem em situações de extrema pobreza, encontra-se coinfetada com mais de um patógeno (REDDY *et al.*, 2007).

O impacto das mortes provocadas pela doença de Chagas pode ser claramente visualizado nos mapas apresentados nas figuras 1 e 2. A figura 1 mostra a população total por países ao passo que a figura 2 mostra a dimensão dos territórios demarcados de acordo com a proporção do número absoluto da mortalidade provocada por essa doença, segundo a WHO no ano de 2002. Nesse ano, a doença de Chagas representou 0,03% da mortalidade mundial. A estimativa mais recente indica uma prevalência da infecção humana de cerca de 12 milhões de casos e cerca de 28 milhões de pessoas sob o risco de infecção (DIAS *et al.*, 2008b). A doença de Chagas tem sido reportada como uma infecção oportunista em pacientes infectados com HIV (CORDOVA *et al.*, 2008; RIVERA *et al.*, 2004). Um novo problema epidemiológico, econômico, social e político surgiu pela internacionalização da doença de Chagas causada pelas migrações legais e ilegais de indivíduos latino-americanos oriundos de regiões endêmicas para diversas regiões do mundo não endêmicas, como América do Norte, oeste do Oceano Pacífico e mais recentemente a Europa (COURA & VIÑAS, 2010). Essa disseminação representa um risco para a saúde pública mundial e revela a necessidade da intensificação dos esforços no sentido de ampliar a informação e aplicação de medidas mais rígidas de controle e vigilância da doença de Chagas nos países de origem e de destino (COURA & VIÑAS, 2010).

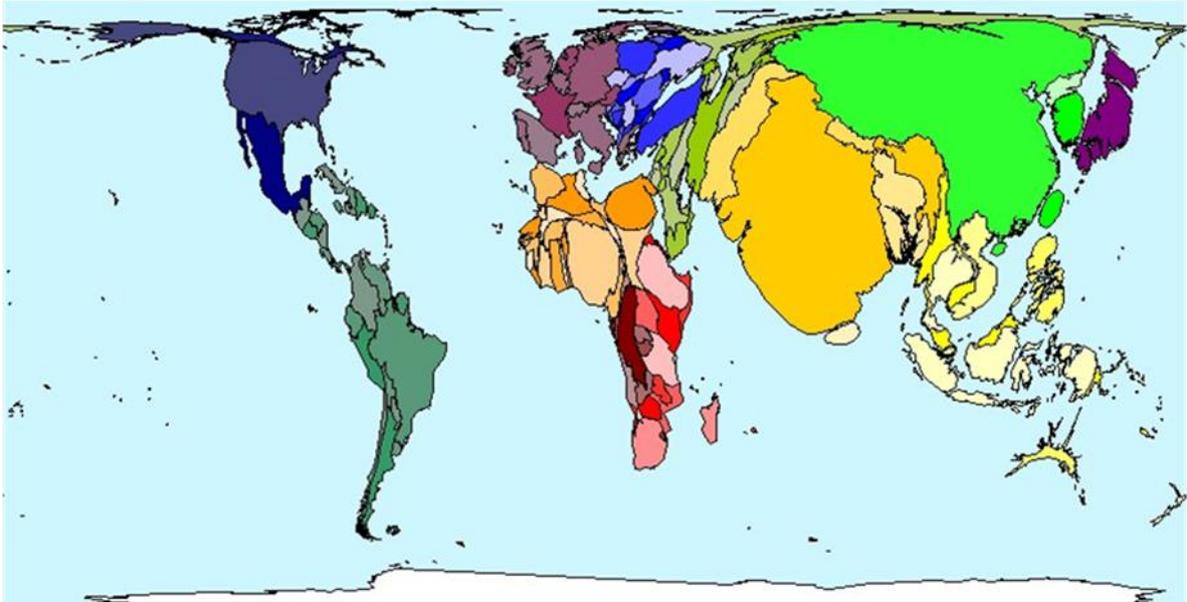


Figura 1. Mapa com a distribuição da população mundial em 2002. Os tamanhos dos territórios representados são distorcidos de acordo com a proporção relativa da população mundial que vive nessas áreas em 2002. Extraído de:[[http:// www.worldmapper.com](http://www.worldmapper.com)]. Acessado em 20 de abril de 2010.

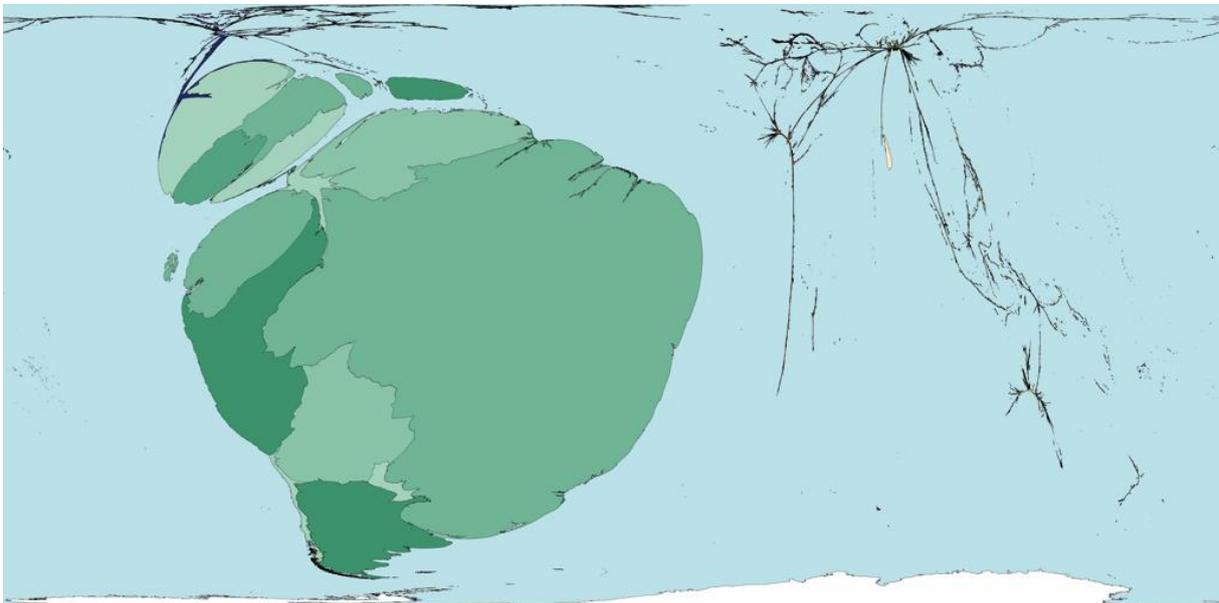


Figura 2. Mortalidade causada pela doença de Chagas em 2002. Os tamanhos dos territórios representados são distorcidos de acordo com a proporção do número absoluto da mortalidade provocada por essa doença em 2002. Extraído de:[[http:// www.worldmapper.com](http://www.worldmapper.com)]. Acessado em 20 de abril de 2010.

A transmissão do *T. cruzi* em humanos ocorre através da picada do inseto hematófago da família Reduviidae, quando formas infectantes do parasito são depositadas pelas fezes na pele do hospedeiro. Apesar desta ser a principal via de transmissão nas áreas endêmicas, o *T. cruzi* pode ser transmitido para o homem por outros mecanismos como: transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes de laboratório e hospitalar, transmissão oral e congênita através da placenta ou canal do parto (DIAS *et al.*, 2008a; FERREIRA & ÁVILA, 2001). Atualmente, a transmissão vetorial é ainda responsável por mais de 70% dos casos em países que não dispõem de um controle vetorial sistemático. Por sua vez, a transmissão transfusional pode ocorrer em mais de 20% dos casos em países onde não há um controle rígido sobre os bancos de sangue como ocorre na Bolívia. O fenômeno da migração rural em direção aos centros urbanos fez surgir a transmissão por transfusão sanguínea no Brasil, sendo que cerca de 70% dos indivíduos infectados estão vivendo nas cidades (DIAS, 2007). A transmissão congênita exibe grande variação regional, de 0.5-10% dos casos em lugares como Chile, Bolívia e Paraguai (COURA & DIAS, 2009). No Brasil, a prevalência da infecção por *T. cruzi* em gestantes se encontra na faixa entre 0,3 a 33% (GONTIJO *et al.*, 2009), justificando a pesquisa da infecção pelo *T. cruzi* nos exames pré-natais e em recém-nascidos filhos de mães infectadas. Por fim, a transmissão oral tornou-se evidente devido aos casos de infecção humana por ingestão de alimentos contaminados com a forma infectante do parasito, estando geralmente relacionada à presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do evento. Diversos casos de doença aguda têm sido detectados no país como os surtos por ingestão de alimentos (NEVES DA SILVA *et al.*, 1968), de cana de açúcar (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991), água (DIAS *et al.*, 2008a) e suco de açaí (DA SILVA VALENTE, VALENTE & FRAIHA NETO, 1999) contaminados com *T. cruzi*. Atualmente, a transmissão oral em humanos pode ser considerada endêmica na Região da Amazônia (FRAIHA *et al.*, 1995; VALENTE, VALENTE & FRAIHA NETO, 1999; JUNQUEIRA *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2008).

Epidemiologicamente podem ser considerados três ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi*. O ciclo de maior importância é o doméstico, já que perpetua a infecção nos seres humanos. No ciclo silvestre, participam triatomíneos que, uma vez contaminados, infectam roedores, marsupiais e outros animais silvestres. O terceiro ciclo é o peridoméstico, do qual participam roedores, marsupiais, gatos e cães que entram e saem das residências, e os insetos silvestres atraídos às casas pela disponibilidade de alimento. Esse ciclo serve de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (REY, 2008). Mais de 130 espécies de triatomíneos representam potenciais vetores de *T. cruzi*. No Brasil, 52 espécies têm sido descritas, mas somente 5 espécies possuem particular importância na transmissão da doença por serem

domiciliadas: *Triatoma infestans*, *Pangstrongylus megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (COURA & DIAS, 2009). No Brasil, no ano de 2006, a *Intergovernment Commission of the Southern Cone Initiative Against Chagas Disease* (Comissão Intergovernamental do Cone Sul) declarou formalmente o país como sendo livre de transmissão domiciliar pelo *T. infestans*, principal vetor do *T. cruzi* no país. Essa espécie também foi eliminada no Chile e Uruguai. Após o controle do *T. infestans*, novas espécies, estão se adaptando ao ambiente doméstico (SCHOFIELD *et al.*, 1999), como *P. megistus* e *Rhodnius prolixus* (REY, 2008; VILLELA *et al.*, 2009).

3. Ciclo de vida do *T. cruzi*

O parasita *T. cruzi* possui três estágios principais de desenvolvimento ao longo do seu ciclo biológico: formas tripomastigotas sanguícolas e amastigotas, encontrados no hospedeiro vertebrado, e formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos no hospedeiro invertebrado (REY, 2008). Estas diferentes formas evolutivas são definidas pelo aspecto geral da célula, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região de emersão do flagelo. As formas amastigotas possuem formato arredondado e um pequeno flagelo não visível em microscopia óptica convencional; as formas epimastigotas possuem o corpo celular alongado e são capazes de divisão, assim como os amastigotas, possuindo o cinetoplasto localizado anterior ao núcleo. As formas tripomastigotas metacíclicos e sanguícolas têm o cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo sendo estas formas incapazes de divisão (Figura 3) (revisto por DE SOUZA, 2002). A alternância entre um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado ao longo do ciclo evolutivo classifica o parasita *T. cruzi* como heteroxênico. Como os ambientes apresentados ao parasito são muito diferentes em suas características físico-químicas, este desenvolveu ao longo da evolução estratégias que o habilitaram a lidar com essas diferenças. Muitas características do parasito como morfologia, ciclos metabólicos, expressão diferenciada de moléculas internas e de superfície, capacidade de infecção, de multiplicação, entre outras, devem ser adequadas a cada novo ambiente.

O flagelo de *T. cruzi* tem estrutura e composição peculiares, que o torna muito importante para alguns aspectos da biologia do protozoário. Além do movimento celular, uma função importante seria a adesão ao epitélio do trato digestivo do inseto, o que é um passo essencial na diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (ZELEDÓN *et al.*, 1984).

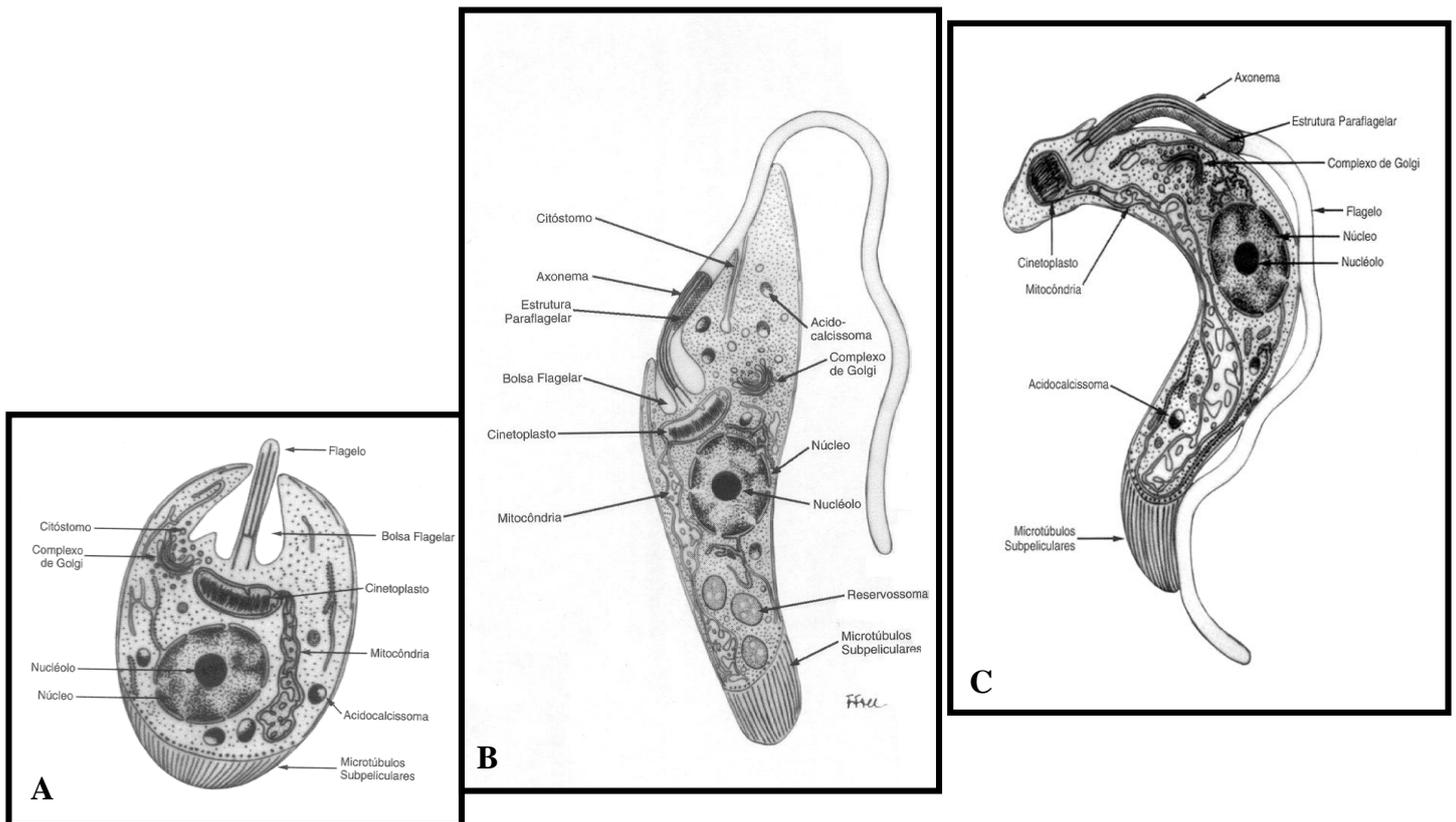


Figura 3. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. A. Amastigota. B. Epimastigota. C. Tripomastigota (Retirado de DE SOUZA, 2002).

O ciclo biológico no hospedeiro invertebrado inicia quando o inseto vetor se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado. Neste processo, formas tripomastigotas sanguícolas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado são ingeridas pelo inseto e constituem uma população heterogênea constituída de duas morfologias básicas, as quais são geralmente descritas como delgadas ou largas e menos de 10% de formas amastigotas. (TYLER & ENGMAN, 2001) (Figura 4). Quando chegam ao estômago (ou intestino médio anterior) do inseto, as formas tripomastigotas sanguícolas transformam-se em formas arredondadas com flagelo livre, geralmente referida como esferomastigota e subsequentemente em epimastigotas. As formas epimastigotas colonizam o intestino médio posterior, onde se multiplicam repetidamente por divisão binária, aderindo às células intestinais através dos hemidesmosomas (ZELEDÓN *et al.*, 1997). No reto, certa proporção de epimastigotas diferencia-se em tripomastigotas metacíclicos, pela adesão por hidrofobicidade à cutícula cerosa que recobre a parede desta região, num processo denominado metaciclogênese. Uma vez completada a diferenciação, os tripomastigotas

metacíclicos se soltam da cutícula, podendo ser eliminados na urina ou fezes do inseto em seu próximo repasto sanguíneo.

Os parasitos depositados na pele do hospedeiro vertebrado podem ter acesso às células do sangue e posteriormente aos demais tecidos do hospedeiro, através de lesão preexistente na pele ou de lesão ocorrida durante a picada do inseto (Figura 4) (revisto por KOLLIEN & SCHAUB, 2000; revisto por DE SOUZA, 2008).

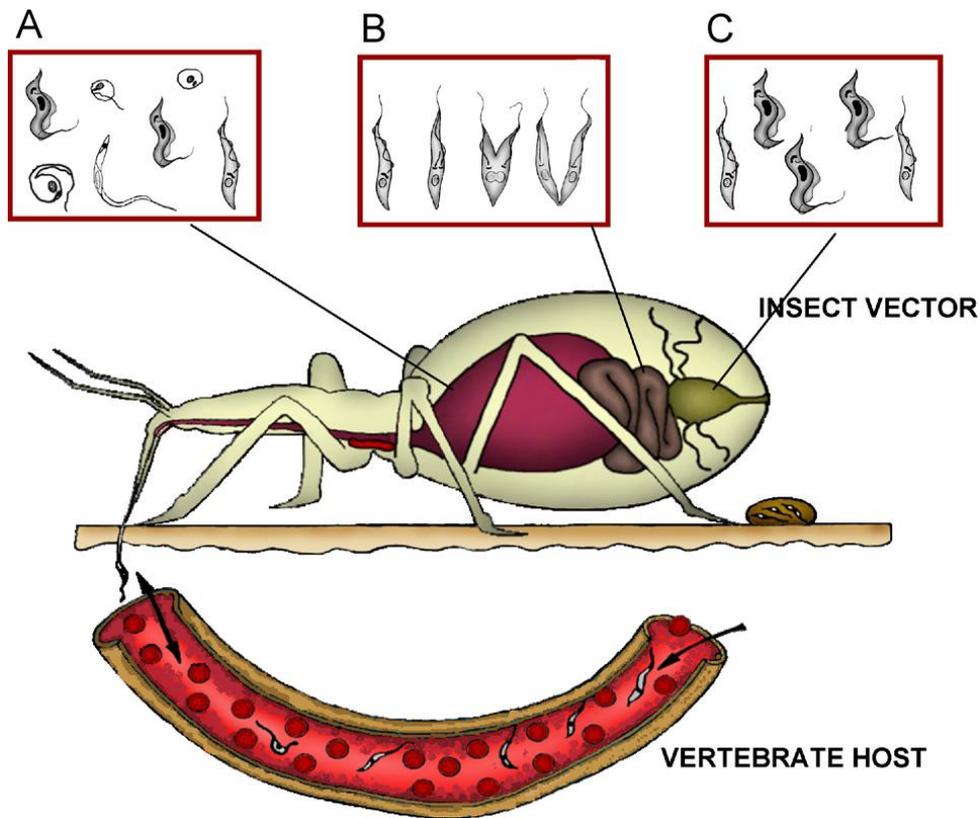


Figura 4. Representação esquemática do ciclo biológico do *T. cruzi* dentro do inseto vetor. O triatomíneo se alimenta de sangue infectado com formas tripomastigotas sanguícolas de um hospedeiro vertebrado, que se diferenciam em epimastigotas e alguns esferomastigotas no estômago (A). No intestino, as formas epimastigotas se multiplicam (B) aumentando a população dos parasitos. Na ampola retal, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor (Retirado de GARCIA *et al.*, 2007).

4. Peptidases

As peptidases, proteases ou peptídeo-hidrolases (E.C. 3.4), são enzimas de ocorrência geral que estão presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos, cuja função básica é catalizar a degradação de ligações peptídicas em proteínas ou fragmentos protéicos, tendo participação importante em inúmeros processos biológicos (BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001). As peptidases são agrupadas em distintos clãs e superfamílias, de acordo com semelhanças estruturais e funcionais (BARRET, RAWLINGS & WOESSNER, 2004).

Essas enzimas desempenham papéis fundamentais em quase todos os fenômenos biológicos e compreendem cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os tipos de organismos. Estima-se que sem esses catalizadores biológicos, as reações de hidrólise poderiam levar centenas de anos. Dado o seu papel fundamental na biologia dos organismos e graças à existência de vários inibidores naturais das peptidases, várias dessas enzimas são de importância médica, com algumas sendo utilizadas como alvo quimioterápico. Anos de análises bioquímicas têm permitido o que permitiu a descrição detalhada do seu mecanismo de catálise, especificidade por substratos e correlação entre estrutura e função. Provavelmente, sabe-se mais sobre a bioquímica e estrutura das peptidases do que de qualquer outra família de enzimas (Revisto por MCKERROW *et al.*, 2008).

Em geral, as peptidases são classificadas com base em três critérios principais: tipo de reação catalisada; natureza química do sítio catalítico e as relações evolutivas relacionadas com aspectos estruturais como sequência de aminoácidos e estrutura da proteína (BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001). Em relação a este último critério, o sequenciamento completo do genoma de diversos microrganismos, levou a uma modernização do sistema de classificação das peptidases, pela necessidade de abranger o diversificado repertório catalítico encontrado na natureza, e de catalogar e sistematizar a grande quantidade de informação produzida ao longo dos anos, particularmente na última década (PAGE & DI CERA, 2008). Dessa forma, foi criado o sistema MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), que agrupa as enzimas em famílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. Por sua vez, as famílias de mesma origem ancestral são agrupadas em clãs. Este tipo de informação é determinado pela estrutura terciária das enzimas (BARRETT, TOLLE & RAWLINGS, 2003).

Quanto ao tipo de reação catalisada, as peptidases são classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica (BOND & BUTLER, 1987). Por este critério, as peptidases são divididas em endopeptidases, que degradam ligações peptídicas internas do substrato, e exopeptidases, que degradam ligações peptídicas nas extremidades amino- ou carboxi- terminal, sendo subdivididas em aminopeptidases e carboxi

peptidases (revisto por HOOPER, 2002). As aminoproteases podem liberar um único resíduo de aminoácido (aminopeptidase), um dipeptídeo (dipeptidases) ou um tripeptídeo (tripeptídeo-peptidases). As carboxipeptidases atuam na porção C-terminal da cadeia peptídica e liberam um único aminoácido ou um dipeptídeo (RAO *et al.*, 1998). De acordo com a natureza química do sítio catalítico, as peptidases podem ser também classificadas em seis grandes classes: aspártico-, cisteína-, glutâmico-, metalo-, serina- e treonina- peptidases (Figura 5) (XU *et al.*, 2008). Algumas peptidases não se encaixam nestas grandes classes e formam a subclasse 3.4.99, de mecanismo catalítico desconhecido (BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001).

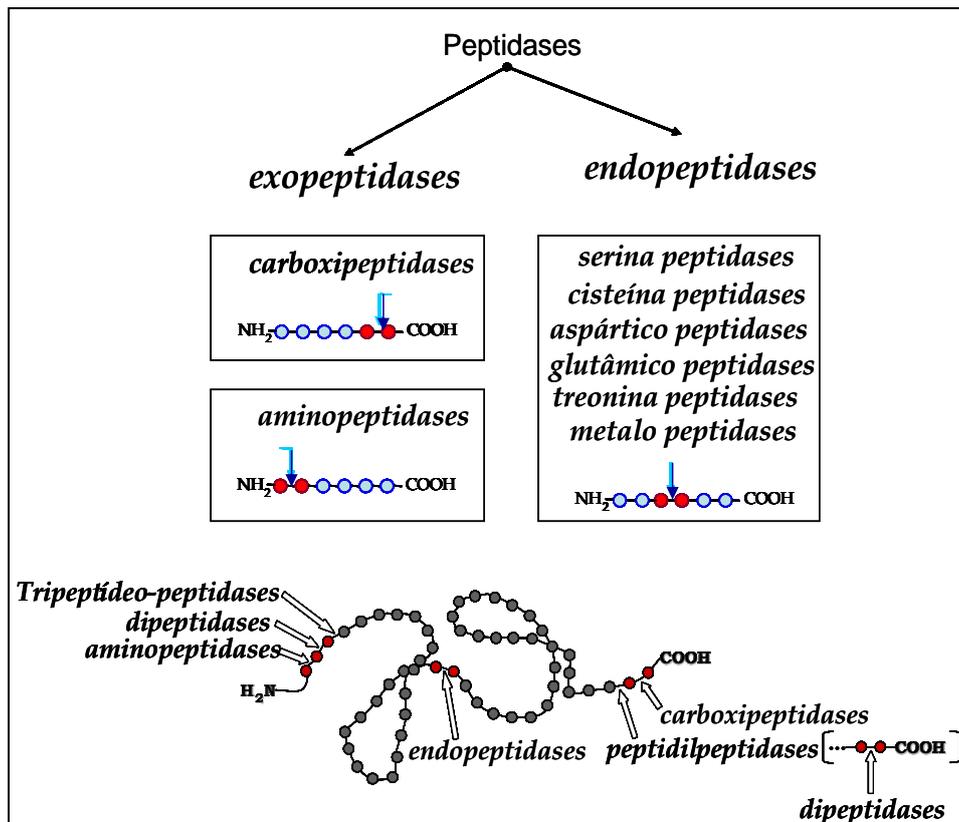


Figura 5. Esquema de classificação das proteases quanto ao tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio ativo (adaptado de BOND & BUTLER, 1987).

5. A cruzipaina

As peptidases podem exercer papéis relevantes na patogênese de inúmeras doenças parasitárias, tendo participação especial durante a ligação e penetração de protozoários parasitas nos tecidos e nas células hospedeiras (MCKERROW, 1989; MCKERROW *et al.*, 1993; 2006). Além disso, as peptidases também podem servir como modelo de estudo tanto

da evolução quanto da função dessas enzimas em geral, por meio de comparações da sequência de aminoácidos, estruturas tridimensionais e mudanças bioquímicas do mecanismo de ação como resposta às novas mudanças ao longo da evolução (RAWLINGS, MORTON & BARRET, 2006; COOMBS & MOTTRAM, 1997; RAO *et al.*, 1998).

Das seis classes de peptidases, as metalo- e as cisteína-peptidases são as mais comumente detectadas nos tripanossomatídeos (BRANQUINHA *et al.*, 1996; SANTOS, A.L.S. *et al.*, 2005). As cisteína peptidases já foram detectadas em muitas espécies de protozoários patogênicos da família Trypanosomatidae e representam moléculas importantes para o ciclo de vida dos parasitos assim como para a interação com o hospedeiro vertebrado, além de estarem envolvidas em processamento de proteínas para fins nutricionais (ROSENTHAL, 1999). Enzimas clássicas deste grupo incluem várias catepsinas lisossomais de mamíferos, proteases citossólicas ativadas por cálcio (calpaínas) e proteases de origem vegetal, como papaína e actinidina, dentre outros (BARRET & RAWLING, 1991).

A papaína (do mamão papaia) é o membro mais bem estudado e, portanto o protótipo da classe das cisteína peptidases, que se caracteriza pela inibição por compostos que apresentam um grupo tiol bastante reativo, como o E-64 [L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano] (BARRET & RAWLING, 1991). Seu sítio ativo é composto por cisteína (Cys25), histidina (His159) e asparagina (Asn175) – numeração da papaína – e, durante a catálise, forma-se um intermediário tiol-éster. Assim como as serina-peptidases, as cisteína-peptidases formam complexos enzimáticos covalentes durante a reação de catálise.

A cisteína peptidase mais abundante do *T. cruzi* é a cruzipaína, cruzaína, ou gp57/51 (SCHARFSTEIN *et al.*, 1986, BONTEMPI, MARTINEZ & CAZZULO, 1989; CAZZULO *et al.*, 1989; 1990, EAKIN *et al.*, 1992; 1993), definida como uma glicoproteína monomérica de aproximadamente 60 kDa pertencente à família das papaínas (CAZZULO *et al.*, 1989; MURTA *et al.*, 1990). A sequência primária da cruzipaína, assim como as cisteínas peptidases de mamíferos, é formada por uma cadeia polipeptídica única, sintetizada sob a forma de pré-pró-proteína. Estas enzimas são produzidas sob formas precursoras, compostas de um peptídeo sinal, um pró-peptídeo (~10kDa), um domínio catalítico central onde está contida a tríade catalítica- Cys25, His159 e Asn175- e uma longa extensão C-terminal (CT), altamente glicosilada, rica em resíduos de treonina e/ou prolina. Essa extensão C-terminal é típica de peptidases de tripanossomatídeos, podendo ser encontrada em *T. cruzi*, *T. brucei* e algumas espécies de *Leishmania*. Entretanto, esse domínio não é essencial para a atividade enzimática dessas enzimas (COOMBS & MOTTRAM, 1997).

Esta enzima possui homologia com a catepsina L de mamíferos e está associada principalmente ao sistema endocítico/lisossomal e reservossomas em epimastigotas (MURTA *et al.*, 1990; SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990; SOARES, SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1992), podendo também estar presente na superfície de amastigotas e epimastigotas e na bolsa flagelar das três formas evolutivas (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990).

Embora níveis comparáveis de RNA mensageiro da cruzipaína estejam presentes em todos os estágios de desenvolvimento do parasito, os níveis e atividade dessa peptidase são aproximadamente dez vezes maiores em epimastigotas, o estágio do parasito encontrado no inseto vetor, sugerindo assim, a regulação nos níveis pós-transcricionais (EAKIN *et al.*, 1992; TOMAS & KELLY, 1996).

A clonagem e o sequenciamento dos genes que codificam a cruzipaína revelaram que esta enzima faz parte de uma família polimórfica, tendo como consequência a expressão de diferentes iso-enzimas. Sendo assim, essa enzima é um complexo de isoformas, cuja heterogeneidade provavelmente resulta da expressão simultânea de diversas cópias gênicas que apresentam um pequeno número de substituição de aminoácidos (LIMA *et al.*, 1994; MOTTRAM *et al.*, 1997).

Dentre as funções atribuídas à cruzipaína, destacamos: sobrevivência e multiplicação dentro da célula hospedeira (MEIRELLES *et al.*, 1992; SANTOS, C.C. *et al.*, 2005), participação na diferenciação desse parasito (BONALDO *et al.*, 1991; TOMAS & KELLY 1996; SANTOS, C.C. *et al.*, 2005), degradação proteica, invasão celular (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990; MEIRELLES *et al.*, 1992; HARTH *et al.*, 1993; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; APARICIO, SCHARFSTEIN & LIMA, 2004; SANTOS, C.C. *et al.*, 2005), escape do sistema imune e autoimunidade (GRUPPI, CERBAN & VOTTERO-CIMA, 1997; TARLETON, 2003; GIRONES, CUERVO & FRESNO, 2005).

A participação da atividade de peptidases no mecanismo de infecção das células do hospedeiro mamífero pelo *T. cruzi* é bem documentada. A cruzipaína está envolvida na invasão de células hospedeiras por tripomastigotas, através de duas vias distintas: uma envolvendo o receptor de bradicinina de subtipo B2R enquanto a outra é definida como sendo receptor independente (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990; MEIRELLES *et al.*, 1992; HARTH *et al.*, 1993; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; APARICIO, SCHARFSTEIN & LIMA, 2004). A cruzipaína, secretada pelo parasito, cliva o cininogênio (substratos naturais da cruzipaína e precursores da bradicinina) gerando cininas, as quais se ligam a receptores de bradicinina (B2R), para estimular a liberação de cálcio (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Este efeito é aumentado na presença de heparan sulfato (LIMA *et al.*, 2002). As cininas atuam sobre

diferentes mecanismos fisiológicos, incluindo o controle da pressão arterial, contração de músculo liso ou relaxamento, permeabilidade vascular e mecanismo de transmissão da dor (FERREIRA *et al.*, 2002). Tradicionalmente categorizados como moduladores da inflamação aguda, mais recentemente, esses peptídeos são reconhecidos em geral como moduladores da homeostase vascular (BHOOLA *et al.*, 1992; SCHMAIER, 2004). Nesse contexto foi demonstrado que formas tripomastigotas de *T. cruzi* sinalizam e invadem células (cardiomiócitos e células endoteliais) que expressam receptores de bradicinina. Foi observado que a cruzipaína é uma molécula importante também na invasão do *T. cruzi*, em células que não expressam receptores para bradicinina (APARICIO, SCHARFSTEIN & LIMA, 2004), sugerindo que a cruzipaína cliva um outro substrato não identificado, que também induz liberação de cálcio.

Naturalmente, a cruzipaína não é a única molécula envolvida na invasão de células hospedeiras e diversas outras moléculas interferem na sinalização da célula hospedeira por diferentes mecanismos, gerando transientes de cálcio e favorecendo a invasão celular, como por exemplo, as glicoproteínas da superfamília das transialidases, expressas na superfície de tripomastigotas (YOSHIDA, 2006).

Estudos utilizando parasitos transfectados que superexpressavam a cruzipaína revelaram um aumento na taxa de metaciclogênese desses parasitos geneticamente modificados, indicando um possível papel da cruzipaína no processo de diferenciação do *T. cruzi* da forma epimastigota para a tripomastigota metacíclica (TOMAS, MILES & KELLY, 1997).

A resposta cruzada já foi observada entre a miosina e antígenos do *T. cruzi*, como a cruzipaína. Camundongos não infectados e imunizados com a cruzipaína do *T. cruzi* apresentam auto-anticorpos contra a miosina cardíaca e esquelética, deposição de IgG e outras alterações cardíacas (GIORDANENGO *et al.*, 2000), que podem ser responsáveis por muitos dos eventos patológicos observados na doença de Chagas. Além disso, conhece-se também a capacidade da cruzipaína na degradação da imunoglobulina G, assim como na inativação de componentes responsáveis pela ativação da cascata do sistema complemento (revisto por CAZZULO, STOKA & TURK, 1997), destacando sua participação no escape do sistema imune do hospedeiro vertebrado.

Devido ao fato dessa enzima participar de inúmeras funções biológicas importantes na interação com células de mamíferos, a cruzipaína tem emergido como alvo promissor para o desenvolvimento de inibidores como drogas anti-parasitárias (MCKERROW, MCGRATH & ENGEL, 1995; MCGRATH *et al.*, 1995). Uma droga candidata K777, inibidor da cruzipaína,

da classe das vinil sulfonas, já se encontra em fase de investigações pré-clínicas. Estudos com essa droga têm bloqueado a infecção do *T. cruzi* em modelos de infecção aguda e não aguda em camundongos além de amenizar danos cardíacos em cachorros (revisto por MCKERROW *et al.*, 2009). Estes dados ilustram claramente porque a cruzipaína é extremamente estudada, porém, o foco sempre esteve voltado para sua relevância na interação com o hospedeiro vertebrado em função da real possibilidade de desenhar drogas eficazes. No entanto, esta molécula é abundantemente expressa pela forma epimastigota do parasito, infectiva apenas para o inseto vetor. Este dado nos levou a questionar se a cruzipaína poderia estar envolvida com a interação do *T. cruzi* com células do hospedeiro invertebrado.

6. Chagasina – o inibidor natural da cruzipaína

Ao longo dos anos, diversos estudos foram desenvolvidos no intuito de entender melhor os processos celulares que estariam envolvidos na degradação de proteínas e no mecanismo de regulação da atividade proteolítica das enzimas. Este controle enzimático é feito normalmente por ativação de pró-enzimas, regulação na expressão e secreção, por degradação específica de enzimas maduras, ou por bloqueio da atividade proteolítica por inibidores endógenos (DUBIN, 2005; RZYCHON, CHMIEL & STEC-NIEMCZYK, 2004). A primeira evidência da presença de inibidores naturais de cisteína peptidase foi descrita em ensaios bioquímicos realizados em extratos de *L. mexicana*, *T. brucei*, *Tritrichomonas foetus* e *Toxoplasma gondii*. Porém, a molécula em *Leishmania* responsável por esta função nunca foi caracterizada (IRVINE, COOMBS & NORTH, 1992).

Em *T. cruzi*, existe um potente inibidor endógeno da cruzipaína, a chagasina, destacando os mecanismos endógenos de regulação de proteólise (Figura 6). A chagasina é um inibidor natural reversível, de alta-afinidade, de cisteína peptidases da superfamília da papaína, sendo um polipeptídeo de cadeia única com 110 resíduos de aminoácidos. Essa proteína também possui propriedades fisico-químicas semelhantes às cistatinas como resistência a fervura e com massa molecular de cerca de 12 kDa. Ensaio bioquímico utilizando a chagasina purificada e/ou recombinante revelaram que ela é um potente inibidor capaz de se ligar não só à cruzipaína, mas também a outros membros da superfamília da papaína (MONTEIRO *et al.*, 2001). A chagasina não tem similaridade de sequência primária com outros inibidores de cisteína peptidases descritos em mamíferos (cistatinas) e em plantas e representa o protótipo de uma nova família de inibidores de enzimas do tipo papaína (classificada como clan IX, família 142 na base de dados do MEROPS).

Níveis variados da chagasina são expressos de acordo com os diferentes estágios do parasito, sendo mais abundantes na forma infectiva (tripomastigota) e muito reduzidos em epimastigota, o oposto é observado para o acúmulo de cruzipaína ativa (MONTEIRO *et al.*, 2001). Estudos ultra-estruturais revelaram que a chagasina e a cruzipaína co-localizam no complexo de Golgi e nos reservossomos nas formas epimastigotas, reforçando a idéia de regulação da atividade da cruzipaína pelo protozoário (SANTOS, C.C. *et al.*, 2005). De fato, a indução da superexpressão do gene da chagasina suprime a atividade da cruzipaína, e o parasito com este fenótipo cresce em meio de cultivo a uma taxa mais baixa, e é menos infectivo para as células do hospedeiro vertebrado (SANTOS, C.C. *et al.*, 2005). Além disso, as formas epimastigotas que superexpressam a chagasina também reduzem em 70% sua diferenciação para as formas tripomastigotas metacíclicas em relação ao parasito selvagem destacando a importância da chagasina na regulação da diferenciação do parasito (SANTOS, C.C. *et al.*, 2005).

Cruzipaína complexada com chagasina



Figura 6. Resíduos catalíticos são mostrados como esferas e bastões: **Cis147** em amarelo, **His284** em roxo e **Asn 304** em rosa. O inibidor complexado à cruzipaína (chagasina) está representado em cinza, associado às esferas e bastões. Extraído de: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/structure?mid=C01.075>.

7. *Rhodnius prolixus*

O *R. prolixus* é um inseto exclusivamente hematófago pertencente à ordem hemíptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (LENT 1948; LENT & JURBERG, 1969; CARCAVALLO *et al.*, 1998). Este triatomíneo compreende a espécie mais estudada dessa subfamília, tendo proporcionado grande número de dados para o conhecimento da fisiologia dos insetos (WIGGLESWORTH, 1972).

Essa espécie está amplamente distribuída pelas Américas Central e do Sul e é apontada como a principal transmissora da doença de Chagas no norte da América do Sul, principalmente na Colômbia e Venezuela (LEHANE & MSANGI, 1991; LENT, 1999). Na Venezuela, esta espécie é encontrada em cerca de 90% da população de triatomíneos capturados dentro das casas, principalmente em tetos de palha, em regiões de até 2000 m acima do nível do mar (REY, 2008).

O ciclo de vida do *R. prolixus* compreende as fases de ovo, cinco estádios de ninfa e adulto, cujo desenvolvimento ocorre através de metamorfose incompleta. A cada estágio, o inseto sofre um processo conhecido como muda ou ecdise que consiste na troca do exoesqueleto antigo por um novo (CARCAVALLO *et al.*, 1997; WIGGLESWORTH, 1972). O inseto se alimenta exclusivamente de sangue em todas as fases de seu ciclo evolutivo, exceto na fase de ovo bastando apenas um repasto sanguíneo saturante para ocorrer a ecdise ou ovipostura (GARCIA *et al.*, 1975).

No ambiente silvestre, *R. prolixus* faz uso de marsupiais e roedores, como fonte de alimento. No ambiente domiciliar, o triatomíneo alimenta-se principalmente de sangue humano, embora utilize também, como fonte alimentar, cães e gatos e chega a ingerir de 10 a 12 vezes o seu peso, em sangue. A fonte sanguínea pode influenciar o seu metabolismo (FRIEND, 1965; VALLE *et al.*, 1987). O desenvolvimento adequado está diretamente relacionado à temperatura ideal (em média 27 a 30 °C). Alterações na temperatura ambiental podem acarretar anormalidades morfológicas e até mesmo a morte do inseto (AZAMBUJA *et al.*, 1991).

Estes insetos são excelentes modelos experimentais para estudos bioquímicos, fisiológicos, celulares e moleculares, pois apresentam facilidade de manuseio, são pequenos e a massa e o número de indivíduos disponíveis para ensaios experimentais são relativamente grandes. Além disso, a maioria das espécies de *Rhodnius* se reproduz facilmente e muitos apresentam ainda o ciclo de vida curto. Em laboratório, em condições controladas de temperatura e umidade constantes de 28 °C e 75% de umidade relativa, respectivamente, tornou-se bastante facilitada a manutenção de colônias de *R. prolixus* pelo fato desta espécie

em aceitar a alimentação em um aparato artificial de alimentação descrito por Garcia *et al.* (1984).

8. A interação do *T. cruzi* com o inseto vetor

A maior parte dos insetos possui uma estrutura anatômica, a membrana peritrófica, composta de quitina e proteínas (peritrofinas), que separa o alimento do epitélio do intestino médio além de delimitar dois espaços luminais, o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico, onde acontecem os eventos hidrolíticos (PETERS, 1992; SHAO, DEVENPORT & JACOBS-LORENA, 2001).

Por não possuírem membrana peritrófica verdadeira, os hemípteros desenvolveram um sistema de membranas bastante peculiar, composto de uma delicada camada lipoproteica que é denominada de membranas perimicrovilares, ou simplesmente PMM (TERRA, 1988). Na superfície apical do epitélio do intestino médio dos insetos hematófagos, as PMM são estruturas que recobrem a membrana plasmática dos microvilos das células epiteliais (ANDRIES & TORPIER, 1982), os interligam e os projetam em direção ao lúmen (BILLINGSLEY & DOWNE, 1986a, GUTIERREZ & BURGOS, 1978; LANE & HARRISON, 1979). A membrana perimicrovilar e a membrana microvilar limitam um espaço fechado, o espaço perimicrovilar (TERRA, 1988; FERREIRA *et al.*, 1988).

Essas membranas perimicrovilares são produzidas continuamente no intestino médio (LANE & HARRINSON, 1979; SILVA *et al.*, 1995). Estudos anteriores demonstraram que as PMM atingem o máximo de desenvolvimento em torno do 10º dia após alimentação em *T. infestans* e *R. prolixus* (BILLINGSLEY & DOWNE, 1983; GUTIERREZ & BURGOS, 1978; NOGUEIRA *et al.*, 1997). Após esse tempo, as PMM começam a degenerar e são excretadas junto com as fezes durante a próxima alimentação do triatomíneo (BILLINGSLEY & DOWNE 1983; 1985). Em *R. prolixus*, ela está presente desde os estágios de ninfa em insetos alimentados ou não. Isso demonstra que essa é uma estrutura permanente e de grande importância para a digestão e barreira de proteção contra agressões e presença de microorganismos nesses insetos (LANE & HARRISON, 1979), além de servir como proteção às células epiteliais intestinais, uma vez que as separa do conteúdo intestinal (WIGGLESWORTH, 1972). A PMM pode compartimentalizar o processo digestivo das moléculas oriundas das diferentes etapas de digestão em Heterópteros superiores com digestão luminal, como faz a membrana peritrófica em espécies de insetos de outras ordens como Lepidoptera e Diptera (TERRA, 1990; TERRA & FERREIRA, 1994). A PMM também

é importante na imobilização de enzimas numa grande área para evitar a excreção peritrófica (CRISTOFOLLETTI *et al.*, 2003).

Os eventos hidrolíticos ocorrem em três distintos compartimentos do *R. prolixus*: no lúmen, no espaço perimicrovilar e lisossomos. Portanto, estes espaços podem funcionar como uma barreira física ou fisiológica para enzimas, exercendo o papel de uma membrana peritrófica. Finalmente, já foi demonstrado que essa membrana tem como função adicional a de cristalizar e detoxificar a heme no lúmen intestinal do *R. prolixus* (SILVA *et al.*, 2007).

O sistema digestivo do triatomíneo pode ser observado no esquema representativo da Figura 7. Esse sistema digestivo consiste basicamente em uma porção dilatada, intestino médio anterior ou “crop” (estômago), representada pela região I e outra tubular, intestino médio posterior, ou simplesmente, intestino (região II), o qual ainda pode ser subdividido em intestino anterior e intestino posterior (BILLINGSLEY & DOWNE, 1986a; 1986b; BILLINGSLEY, 1990). Esse último se insere na porção dilatada do reto, chamada de ampola retal (ZELEDÓN, BOLAÑOS & ROJAS, 1984), representada pela região III, onde nessa mesma região se inserem os túbulos de Malpighi (WIGGLESWORTH, 1972), representado no esquema pela seta.



Figura 7. Fotografia representando as regiões do sistema digestivo do triatomíneo. I- intestino médio anterior ou estômago II- intestino médio posterior ou intestino. III- ampola retal. Barra: 52 mm (adaptado de KOLLIEN & SCHAUB, 2000).

A co-evolução de parasitos e insetos tem requerido o desenvolvimento de estratégias sofisticadas baseadas tanto em mecanismos do inseto vetor quanto dos parasitos, os quais agem facilitando o desenvolvimento do parasito ou sua ruptura no hospedeiro invertebrado. O estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* no tubo digestivo do inseto vetor é dependente e regulado por fatores fisiológicos e bioquímicos do inseto vetor, como proposto por Carlos Chagas e Emanuel Dias (revisto por GARCIA *et al.*, 2007). O processo de interação do

parasito com o inseto vetor culmina com a efetivação da metacicloogênese do protozoário, dentro do tubo digestivo do inseto.

No que se refere ao estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* no tubo digestivo do inseto vetor, o intestino médio representa o local chave da interação parasito-inseto vetor. É onde ocorre o armazenamento e digestão do sangue ingerido contendo os parasitos e onde se iniciam os processos de transformação. O ambiente hostil do intestino médio aparece como primeiro obstáculo para os parasitos, induzindo modificações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas para que completem seus ciclos de desenvolvimento (LEHANE & BILLINGSLEY, 1996).

A aderência do parasito na superfície das células epiteliais é um dos processos importantes dessa interação fisiológica. Um dos importantes estágios no ciclo do desenvolvimento de *T. cruzi* dentro de seu hospedeiro invertebrado é a interação entre a superfície do protozoário e moléculas presentes na membrana perimicrovilar do trato intestinal de triatomíneos, assim como na superfície celular e nos microvilos das células intestinais. A interação com diferentes estruturas pode influenciar tanto na quantidade de tripanossomos como também na sua diferenciação (KOLLIEN, SCHMIDT & SCHAUB, 1998; GONZALEZ *et al.*, 1999; OLIVEIRA & DE SOUZA, 2001; AZAMBUJA, RATCLIFFE & GARCIA, 2005). Após o repasto sanguíneo, PMMs (Figura 8) agem como um sítio de adesão para epimastigotas de *T. cruzi*, um processo que parece ser um fator básico para o estabelecimento do parasito no inseto vetor (GARCIA, GONZALEZ & AZAMBUJA, 1999; GARCIA & AZAMBUJA, 2004). Em relação à adesão, Pereira e colaboradores (1981) demonstraram a existência de lectinas, com especificidade para diferentes tipos de açúcares, no intestino médio de *R. prolixus*. Um fato interessante é que somente as formas epimastigotas, que colonizam o inseto vetor, possuem os ligantes para essas lectinas. Além disso, o processo de reconhecimento em que formas epimastigotas aderem ao epitélio do intestino envolve moléculas de glicoinositol fosfolípídeos (GIPLs) (NOGUEIRA *et al.*, 2007), abundantes na superfície de epimastigotas (COLLI & ALVES, 1999). O *T. cruzi knockout* de *gp72* resultou na não aderência do flagelo do parasito ao epitélio do intestino e apresentou uma diminuição drástica na população de parasitos no inseto vetor (DE JESUS *et al.*, 1993).

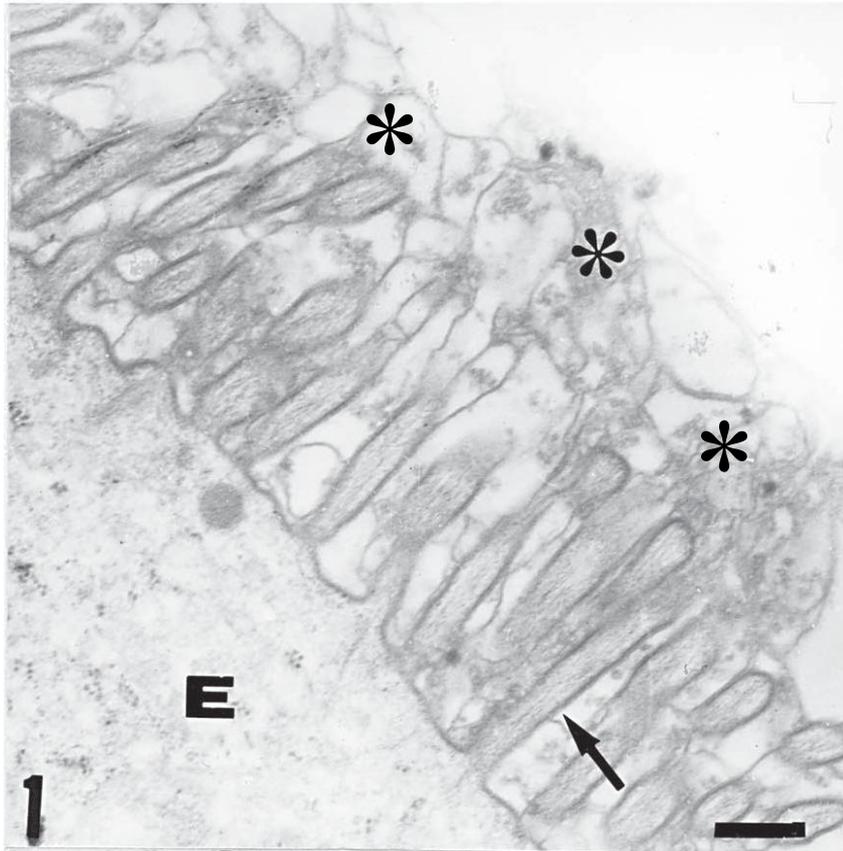


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de células epiteliais do intestino médio posterior (E) de ninfas de 5º estágio de *R. prolixus*, 10 dias após alimentação com sangue humano. A região apical dessas células mostra um largo número de longas microvilosidades densas, que são homogeneamente distribuídas (seta) e membranas perimicrovilares (PMM) recobrindo a microvilli que se estendem ao lúmen do intestino médio (em asteriscos) 23,000×. Barra: 0.5 μm (extraído de: ALBUQUERQUE- CUNHA *et al.*, 2004).

II. JUSTIFICATIVA

Os estudos acerca das moléculas relevantes para o ciclo de vida do *T. cruzi* têm tido como foco o processo de interação das formas infectivas com células de mamíferos (BURLEIGH & WOOLSEY 2002; TAN & ANDREWS 2002; VIEIRA *et al.*, 2002; revisto por YOSHIDA, 2006), visando o desenvolvimento de drogas. Entretanto, alguns estudos focaram-se na identificação e caracterização de importantes moléculas-chave presentes na superfície do parasito, que poderiam participar da interação com o hospedeiro invertebrado, tais como: os glicoinositolfosfolipídeos (NOGUEIRA *et al.*, 2007) e a gp72 (DE JESUS *et al.*, 1993; BASOMBRIIO *et al.*, 2002). A cruzipaína é abundantemente expressa nas formas epimastigotas do *T. cruzi*, que são encontradas no inseto vetor. A função da cruzipaína como molécula-chave em diversas etapas da interação *T. cruzi* com células de hospedeiros vertebrados tem sido amplamente estudada, mas a possível relevância desta peptidase na interação com insetos hematófagos nunca foi explorada. Indícios de que esta molécula possa ser relevante para o processo de adesão foram demonstrados no flagelado de plantas *P. serpens*, que possui uma proteína homóloga à cruzipaína responsável, pelo menos em parte, pela adesão do flagelado à glândula salivar de *O. fasciatus* (SANTOS *et al.*, 2006b). Tendo em vista a falta de informações acerca das moléculas relevantes na interação do *T. cruzi* com o hospedeiro invertebrado, o objetivo deste estudo é avaliar o papel da cruzipaína do *T. cruzi* na interação com o inseto vetor. A identificação de moléculas-chave na interação dos tripanossomatídeos com seus hospedeiros invertebrados é válida para melhor compreensão da bioquímica e fisiologia destes protozoários, assim como para esclarecer alguns aspectos da interação parasito-hospedeiro invertebrado.

III. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar se a cruzipaína do *Trypanosoma cruzi* participa na interação com o inseto vetor, *Rhodnius prolixus*.

1. Objetivos específicos

1.1. Avaliar o efeito do pré-tratamento do *T. cruzi* com anticorpos anti-cruzipaína e com um painel de inibidores de cisteína-peptidase sobre a interação com *R. prolixus*;

1.2. Avaliar o efeito sobre o índice de adesão do pré-tratamento de epitélio intestinal de *R. prolixus* com a cruzipaína enriquecida;

1.3. Comparar o índice de adesão *in vitro* ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus*, bem como a taxa de colonização (*in vivo*) do *T. cruzi* selvagem, *T. cruzi* transfectado apenas com o vetor de transferência episomal (pTEX) e *T. cruzi* transfectado com o vetor contendo o gene da chagasina (pCHAG);

1.4. Avaliar a expressão da molécula de cruzipaína pelo parasito após a colonização do *R. prolixus*, através de citometria de fluxo, empregando anticorpos anti-cruzipaína.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Condições de cultivo e obtenção de *Trypanosoma cruzi*

No presente trabalho foram utilizados parasitos da espécie *T. cruzi*, cepa Dm28c e um clone Dm28c que superexpressa a chagasina (pCHAG), bem como um controle contendo apenas o plasmídeo sem gene inserido (pTEX). Os parasitos transfectados foram gentilmente cedidos pela Dra. Ana Paula C. Lima (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ). Parasitos da cepa G, Y e do clone CL Brener também foram usados e fazem parte da Coleção do nosso laboratório (Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas). Os parasitos foram mantidos por incubação a 28 °C em 5 mL de meio complexo: infusão de cérebro e coração (BHI - 3,7%), suplementado com hemina (0,002%) e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor. Os parasitos transfectados foram mantidos em cultura neste meio suplementado com 800 µg/mL de geneticina.

2. *Rhodnius prolixus*

Os exemplares de *R. prolixus* que foram usados nesse estudo fazem parte da colônia do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, IOC-FIOCRUZ. Os insetos foram mantidos em condições controladas de temperatura e umidade (27 °C ± 2 e 65% ± 5). Os insetos da colônia são alimentados quinzenalmente com sangue de coelho desfibrinado em aparato de alimentação artificial (GARCIA *et al.*, 1984).

3. Interação do *T. cruzi* com intestinos dissecados *in vitro*

Dez dias após os insetos serem alimentados, os intestinos médios posteriores foram removidos, longitudinalmente seccionados e gentilmente lavados em PBS (tampão fosfato de sódio 20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.2) para expor a superfície luminal do intestino. Após essa etapa, os fragmentos intestinais foram colocados em tubos eppendorfs e então, incubados por 15 min a temperatura ambiente, sob leve agitação, com os parasitos, coletados durante a fase exponencial ($2,0 \times 10^7$ em 100 µL de PBS). Os parasitos selvagens foram pré-tratados ou não com um painel de inibidores proteolíticos (Tabela 1) ou anticorpos anti-cruzipaina policlonais nas diluições de 1:1000 e 1:2500 por 1 h (gentilmente cedido pelo Dr. Juan Jose Cazzulo, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires,

Argentina). Paralelamente, fragmentos intestinais também foram incubados com parasitos selvagem, pTEX, pCHAG, nas mesmas condições anteriores, bem como com diferentes cepas do *T. cruzi* (G, Dm28c, Y, CL Brener). Quatro intestinos dissecados foram adicionados por tratamento. Após a incubação com os parasitos, os fragmentos intestinais foram estendidos em lamínulas de vidro para contar o número de parasitos aderidos por 100 células epiteliais, escolhidas randomicamente, em 10 diferentes campos de cada preparação intestinal. O tratamento com os inibidores nas condições acima descritas não alteraram a viabilidade dos parasitos, conforme observado pela exclusão do corante vital Trypan Blue e mobilidade dos parasitos. As concentrações de anti-cruzipaína empregadas não causaram aglutinação.

Tabela 1. Lista de inibidores proteolíticos utilizados.

Subclasse enzimática-alvo	Seletividade	Inibidor	Concentração
Cisteína peptidases	Catepsina L	Iodoacetamida	10 µM
	Catepsina L/B/H/serina peptidases/calpaína	Leupeptina	10 µM
	Catepsina L/serina peptidases	Antipaína	10 µM
	Catepsina L/H/B/calpaína	E-64	10 µM
	Catepsina L	Cistatina	1 µg/mL
	Catepsina B	CA074me	20 µM

4. Obtenção de frações enriquecidas da cruzipaína e do extrato bruto de *T. cruzi*

A cruzipaína natural foi isolada de lisados das formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c, previamente crescidas, por 7 dias, até atingir fase estacionária, em um volume final de 4 L, segundo Murta *et al.* (1990). Brevemente, uma massa de 9 g de células foi ressuspensa em 25 mL de água apirogência pH 5.6, contendo inibidores de peptidases: EDTA 2 mM, PMSF 1 mM e pepstatina 1 µg/mL. Os parasitos foram lisados através de ciclos de sonicação com pulsos de ~ 60 volts por 30 min. Após verificar a lise por microscopia óptica, a suspensão foi centrifugada (10.000 × g por 1 h), e o sobrenadante foi coletado. Posteriormente, o sobrenadante foi tratado com HCL 12 N, pH 4.2 a 4 °C, overnight, sob leve agitação e posteriormente centrifugado (10.000 × g por 1 h). Ao sobrenadante foi acrescido sulfato de amônio saturado pH 4.7, para um volume final de 950 mL e seguiu-se nova precipitação a 4 °C, overnight, sob leve agitação. O pellet foi ressuspensa em 30 mL de PBS-

EDTA 2 mM e submetido à diálise contra acetato de sódio, NaCl 15 mM, pH 5.0, num volume final de 4 L overnight. Após a diálise, realizou-se a extração por butanol previamente saturado com 1:1 (v/v) de PBS, a 4 °C, sob leve agitação. Por fim, a fase aquosa foi recolhida e submetida novamente ao processo de diálise contra PBS-EDTA 2 mM. Após a diálise, a atividade da cruzipaina com o substrato específico para cisteína peptidases (Z-Phe-Arg-AMC) foi testada para verificar a funcionalidade dessa enzima. Alíquotas da cruzipaina enriquecida foram estocadas e congeladas a -70 °C.

O extrato do parasito foi obtido a partir de 10^8 células coletadas no meio da fase logarítmica de cultivo, lavadas três vezes com PBS e lisadas a 4 °C pela adição de 100 µL de tampão SDS-PAGE modificado (Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, Triton X-100 0.1%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0.015%) para análise das peptidases, e o mesmo tampão acrescido de 5% de 2-β-mercaptoetanol, seguido de fervura da amostra durante 5 min para análise do perfil de proteínas.

5. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas do extrato total e da fração enriquecida da cruzipaina foi determinada segundo o método de Lowry *et al.*, (1951), usando soro albumina bovina como padrão. Triplicata de alíquotas de cada amostra (5, 10 e 15 µl) foram diluídas em q.s.p. 400 µl de H₂O. Posteriormente, em cada tubo foram acrescentados 2 mL da mistura reativa (hidróxido de sódio 0,1 M, carbonato de sódio 0,18 M, tartarato de sódio 0,02% e sulfato de cobre 0,01%). Após 10 min de incubação com a mistura reativa, 200 µl de Follin Ciocateus (Merck) diluído 1:3 foi adicionado em cada amostra, e seguido de incubação por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as absorbâncias foram analisadas a 617 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100–Amersham Biosciences) e a concentração protéica das amostras foi determinada com base na densidade óptica (DO) das amostras e da curva padrão obtida de BSA (estoque a 1 mg/mL) nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL.

6. Análise do perfil proteico da cruzipaina enriquecida por gel SDS-PAGE corado por nitrato de prata

A fração enriquecida da cruzipaina (2,8 µg) e o extrato total do parasito (28 µg) foram adicionados de tampão de amostra (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,01% e β-mercaptoetanol 1 mM) e aplicadas em SDS-PAGE a 10%, contendo

gel de empacotamento 3%, de acordo com o sistema descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi processada a 120 V/60 mA, a 4 °C. As massas moleculares dos polipeptídeos foram estimadas através da comparação da migração destes com a de proteínas padrão (Page ruler plus prestained protein ladder-Fermentas). Para visualização das proteínas presentes nos géis, estes foram corados com nitrato de prata segundo protocolo de Gonçalves *et al.* (1990).

7. Análise da fração enriquecida da cruzipaína por SDS-PAGE-Gelatina

Para análise qualitativa da atividade da cruzipaína enriquecida do *T. cruzi*, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com 0,1% de gelatina copolimerizada. A fração enriquecida da cruzipaína (2,8 µg) e o extrato total do parasito (28 µg) foram adicionadas de tampão de amostra (Tris 125 mM, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,002%). A eletroforese foi processada a 120 V/60 mA, a 4 °C. Em seguida, os géis foram lavados por 2 vezes em Triton X-100 2,5% e incubados em tampão de proteólise (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, suplementado com DTT 10 mM) por 24 h a 37 °C. Finalmente, os géis foram corados por 2 h com azul de Coomassie R-250 em metanol-ácido acético-água (50:10:40) e descorados “overnight” em uma solução contendo metanol-ácido acético-água (50:10:40). As massas moleculares destas peptidases foram estimadas através da comparação da migração destes com a de proteínas padrão (Page ruler plus prestained protein ladder-Fermentas).

8. Interação de *T. cruzi* com intestinos dissecados *in vitro* utilizando a cruzipaína enriquecida

Intestinos médios posteriores foram explantados após o décimo dia de alimentação dos triatomíneos conforme descrito anteriormente. Após essa etapa, os fragmentos intestinais foram pré-tratados individualmente a temperatura ambiente com 1,5 µg/µL de cruzipaína exógena previamente extraída de *T. cruzi* ou cruzipaína inativada por calor por 15 min. Após esse tratamento, os intestinos foram cuidadosamente lavados em PBS, e a interação foi realizada com *T. cruzi* clone Dm28c, conforme descrito no item 3. Paralelamente, parasitos que superexpressam a chagasina – pCHAG foram incubados por 15 min a temperatura ambiente com o intestino explantado de *R. prolixus* acrescidos ou não de concentrações crescentes de cruzipaína exógena (1,5; 3 e 4,5 µg/µL), e a interação com o epitélio médio posterior dissecado de *R. prolixus* foi realizada conforme descrito no item 3.

9. Interação de *T. cruzi* com *R. prolixus* – infecção

Ninfas de quinto estágio foram coletadas randomicamente após a muda e mantidas em jejum por 15 a 20 dias. Após este período, as ninfas foram alimentadas no sistema em sangue de coelho citratado contendo 9×10^6 células de *T. cruzi* por mililitro de sangue (pTEX, pCHAG e selvagem), conforme descrito por Garcia *et al.* (1984). No 20º e 30º dia após a alimentação dos triatomíneos em sangue de coelho citratado, 8 retos explantados foram homogeneizados em 1 mL de PBS e a quantificação do número total de parasitos vivos foi realizada por contagem em câmara de Neubauer em duplicata. Este experimento foi realizado em duplicata, quatro vezes independentemente.

10. Análise da expressão da cruzipaína de *T. cruzi* após a colonização de *R. prolixus* através de citometria de fluxo

Para determinar os níveis de expressão da cruzipaína do *T. cruzi* após 30 dias de colonização de *R. prolixus*, um pool de oito ampolas retais provenientes do ensaio de colonização foram cuidadosamente explantadas e homogeneizadas em 1 mL de PBS. No intuito de re-isolar ou enriquecer os parasitos, as células foram centrifugadas a $300 \times g$ por 1 minuto, o pellet foi incubado por 30 min a 28 °C e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a $1500 \times g$ por 5 min. As células coletadas após contato com o reto através de processos de centrifugações (no mínimo de 10^6 células/mL) foram fixadas em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído por 30 min a 26 °C. Em seguida, essas células foram lavadas por 2 vezes em PBS e incubadas com o anticorpo primário anti-cruzipaína (1:2000) (MURTA *et al.*, 1990) e secundário marcado com fluoresceína isotiocianato (FITC) na diluição de 1:100 numa solução de PBS. Células de *T. cruzi* (5×10^6 células/mL) ou células da ampola retal do triatomíneo não tratadas e tratadas com o anticorpo primário foram utilizadas como controles. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS e submetidas à análise em citômetro de fluxo (EPICS ELITE flow cytometer - Coulter Eletronics, Hialeah, FL, USA) equipado com laser de argônio 15 mW com emissão a 488 nm.

11. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em quadruplicata e repetidos pelo menos 2 vezes. Os dados foram analisados estatisticamente usando o teste t de Student e o teste ANOVA, usando o programa Sigma Plot 2002 (SPSS Inc). Os valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

V. RESULTADOS

1. Efeitos dos inibidores de cisteína peptidase sobre o índice de adesão ao epitélio dissecado de *R. prolixus*

Com o objetivo de avaliar se os inibidores de cisteína peptidase têm efeito sobre o índice de adesão ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus*, os inibidores de cisteína peptidase descritos na Tabela 1 foram adicionados às formas epimastigotas de *T. cruzi* (2×10^7 células) durante 60 min, a temperatura ambiente, condição que não altera a viabilidade das células (dados não mostrados). Após esse tratamento, as células foram lavadas e colocadas para interagir com o epitélio médio posterior dissecado de *R. prolixus*. Após este processo, muitos parasitos foram visualizados aderidos às células epiteliais pelos seus flagelos em parasitos não tratados (dados não mostrados). Parasitos pré-tratados com os cinco inibidores de cisteína peptidase (cistatina a 1 $\mu\text{g/mL}$, antipaína, E-64, leupeptina, iodocetamida em uma concentração final de 10 μM) apresentaram uma taxa de adesão aproximadamente 70% menor do que o controle. Tendo em vista que uma cisteína peptidase do tipo Catepsina B de cerca de 30 kDa também é uma atividade proeminente em extratos do parasito (GARCIA *et al.*, 1998), testamos o efeito de um inibidor específico de catepsina B, o CA074me, que não produziu uma redução significativa no índice de adesão às células epiteliais do inseto vetor (Figura 9).

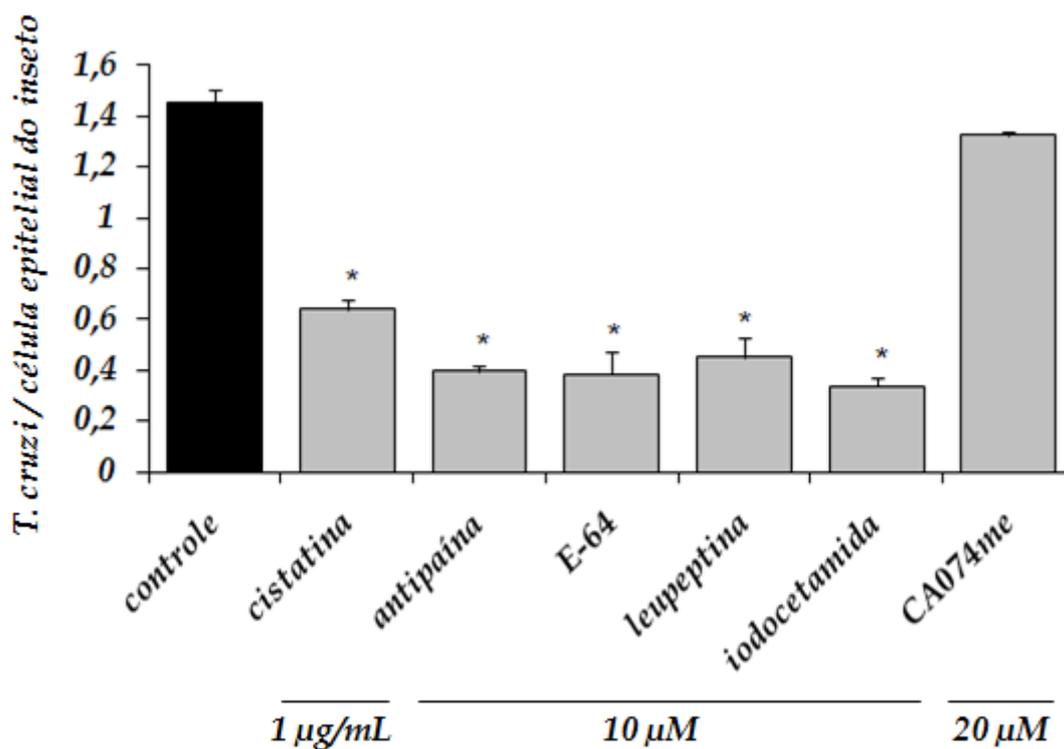


Figura 9. Efeito de inibidores de cisteína peptidase no processo de interação entre *T. cruzi* e o intestino médio posterior dissecado de *R. prolixus*. Os parasitos ($2,0 \times 10^7$ células) foram tratados durante 60 min a temperatura ambiente com cistatina (1 µg/mL), antipaína, E-64, leupeptina, iodocetamida em uma concentração final de 10 µM ou CA074me a 20 µM. A viabilidade dos parasitos não foi afetada pelos tratamentos utilizados neste conjunto de experimentos. Após a interação com as células intestinais epiteliais, o número de parasitos/célula epitelial intestinal foi estimado através da contagem randômica de no mínimo 100 células epiteliais. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados com 4 intestinos por tratamento. Os parasitos tratados com inibidores de cisteína peptidase que tiveram um índice de adesão com as células significativamente diferente dos não tratados (controle) usando o teste *t* Student ($P < 0,001$) estão marcados com um asterisco.

2. Efeito do inibidor de cisteína peptidase, cistatina, sobre a interação entre *T. cruzi* e *R. prolixus*

Com o objetivo de avaliar se o inibidor de cisteína peptidase, cistatina, tem efeito dose-dependente sobre o índice de adesão ao epitélio dissecado de *R. prolixus*, o composto foi adicionado em diferentes concentrações (0,1, 1, 2,5 e 10 µg/mL) às formas epimastigotas de *T. cruzi* durante 60 min, a temperatura ambiente, condições que não alteram a viabilidade das

células (dados não mostrados). Após esse tratamento, procedeu-se a interação ao epitélio médio posterior dissecado de *R. prolixus*. O pré-tratamento das células com o inibidor de cisteína peptidase nas concentrações acima foi dose-dependente, como pode ser observado na figura 10.

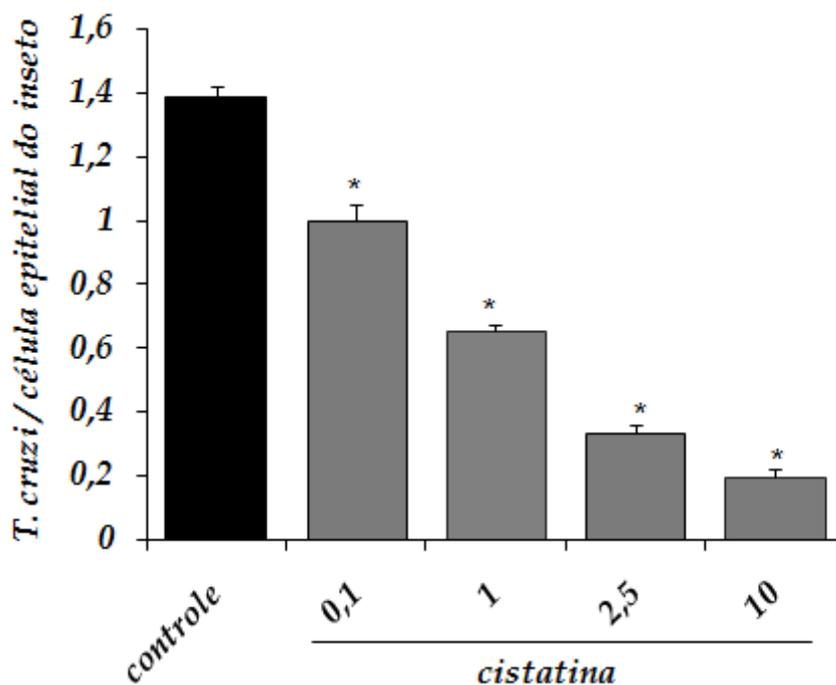


Figura 10. Efeito dose-dependente do inibidor cistatina no processo de interação entre *T. cruzi* e o intestino médio posterior dissecado de *R. prolixus*. Os parasitos ($2,0 \times 10^7$ células) foram tratados durante 60 min a temperatura ambiente com diferentes concentrações de cistatina (0,1, 1, 2,5 e 10 µg/mL). A viabilidade dos parasitos não foi afetada pelos tratamentos utilizados neste conjunto de experimentos. Após a interação com as células intestinais epiteliais, o número de parasitos/célula epitelial intestinal foi estimado através da contagem randômica de no mínimo 100 células epiteliais. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados com 4 intestinos por tratamento. Os parasitos tratados com o inibidor cistatina que tiveram um índice de adesão com as células significativamente diferente dos não tratados (controle) usando o teste *t* Student ($P < 0,00000001$) estão marcados com um asterisco.

3. Efeito do anticorpo anti-cruzipaína sobre o índice de adesão ao epitélio dissecado de *R. prolixus*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram pré-tratadas com anticorpos anti-cruzipaína policlonais na diluição 1:1000 ou 1:2500 (concentrações não aglutinantes) durante 60 min a

temperatura ambiente. Após esse tratamento, seguiu-se a interação com o epitélio médio posterior dissecado de *R. prolixus*. O tratamento das células com o anticorpo na diluição de 1:1000 induziu a uma redução significativa de 64% na taxa de adesão ao epitélio dissecado do inseto em relação aos parasitos não tratados. O tratamento dos parasitos com o anticorpo na diluição de 1:2500 apresentou uma redução de 25%, em relação ao controle. Como controle da especificidade do ensaio, o tratamento dos parasitos com soro pré-imune (1:1000) não apresentou alterações significativas, em relação ao controle (Figura 11).

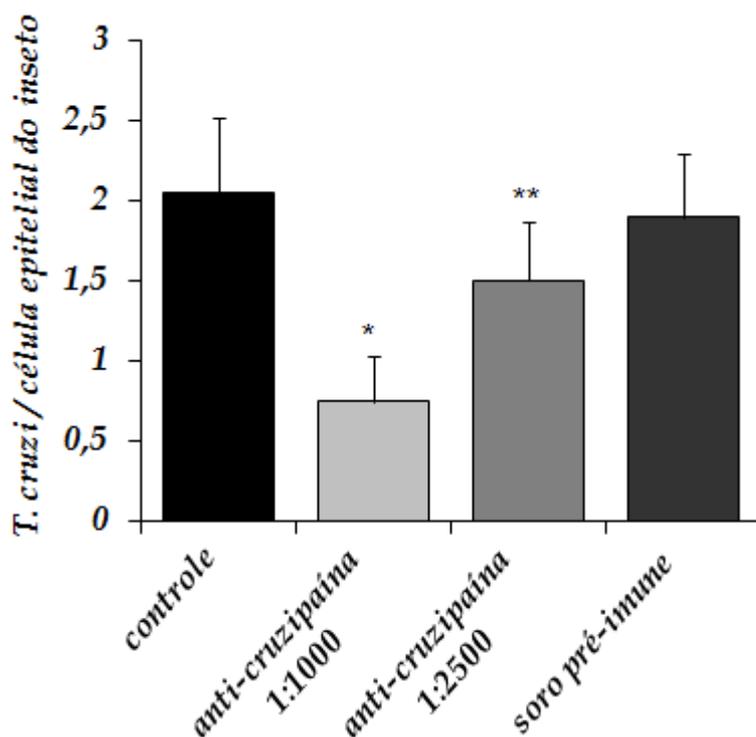


Figura 11. Efeito do anticorpo anti-cruzipaína no processo de interação entre *T. cruzi* e intestino médio posterior dissecado de *R. prolixus*. Os parasitos ($2,0 \times 10^7$ células) foram tratados durante 60 min a temperatura ambiente com anticorpos anti-cruzipaína na diluição de 1:1000 ou 1:2500. A viabilidade dos parasitos não foi afetada pelos tratamentos utilizados neste conjunto de experimentos. Após a interação com as células intestinais epiteliais, o número de parasitos/célula epitelial intestinal foi estimado através da contagem randômica de no mínimo 100 células epiteliais. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados com 4 intestinos por tratamento. Parasitos tratados com anti-cruzipaína na diluição de 1:1000 ou 1:2500 tiveram um índice de adesão significativamente diferente de células não tratadas (controle) usando o teste *t* Student (* $P = 0,000802$; ** $P = 0,004351$).

4. Avaliação do possível envolvimento da cruzipaina na interação entre *T. cruzi* e hospedeiro invertebrado utilizando inibidor endógeno (chagasina)

No intuito de avaliar o índice de adesão de parasitos transfectados com um vetor contendo o gene da chagasina, que expressa cerca de quatro vezes mais chagasina (SANTOS, C.C. *et al.*, 2005), formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2,0 \times 10^7$ células) das três condições de experimentação (selvagem ou pTEX – vetor vazio – ou pCHAG) foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente com o intestino dissecado de *R. prolixus*. Os resultados demonstraram que o *T. cruzi* pCHAG apresentou baixa capacidade de ligação ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus*, enquanto o pTEX, controle do plasmídeo, não apresentou mudanças na taxa de adesão em relação ao controle (Figura 12).

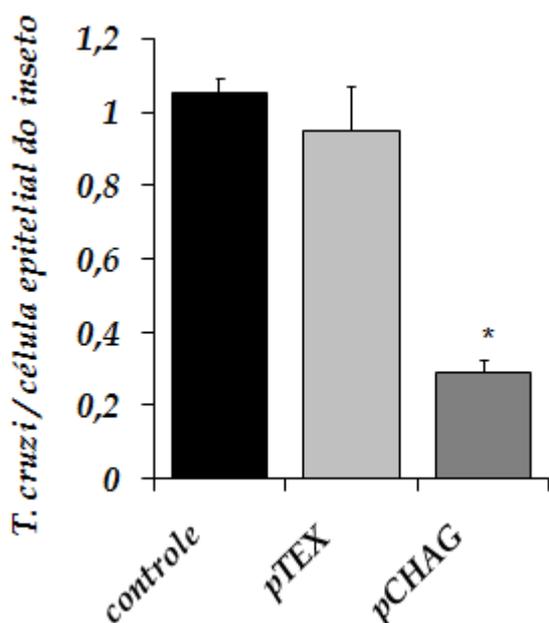


Figura 12. Análise da taxa de interação do clone Dm28c de *T. cruzi*, superexpressando ou não a chagasina, com intestinos dissecados de *R. prolixus*. Formas epimastigotas ($2,0 \times 10^7$ células) selvagem, transfectadas com o vetor vazio (pTEX) ou com o vetor contendo o gene da chagasina (pCHAG) foram incubadas com os intestinos dissecados do triatomíneo por 15 min a temperatura ambiente. Após a interação com as células intestinais epiteliais, o número de parasitos/célula epitelial intestinal foi estimado através da contagem randômica por no mínimo 100 células epiteliais. O controle foi realizado utilizando parasitos sem nenhuma modificação genética. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados com 4 intestinos por tratamento. Parasitos pCHAG tiveram um índice de adesão com as células significativamente diferente do controle e dos parasitos pTEX usando o teste ANOVA ($P \leq 0,000001$).

5. Avaliação da taxa de adesão de diferentes cepas de *T. cruzi* que possuem distintas relações cruzipaína-chagasina

Distintas cepas de *T. cruzi* possuem diferenças no balanço estequiométrico cruzipaína:chagasina (SANTOS, C.C. *et al.*, 2005). Dessa forma, (2×10^7 células) das cepas Dm28c, CL Brener, Y e G foram incubadas por quinze min a temperatura ambiente com o intestino dissecado de *R. prolixus*. Os resultados demonstraram que o *T. cruzi* cepa G apresentou baixa capacidade de ligação ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus* em relação aos outros diferentes isolados de *T. cruzi* (Figura 13).

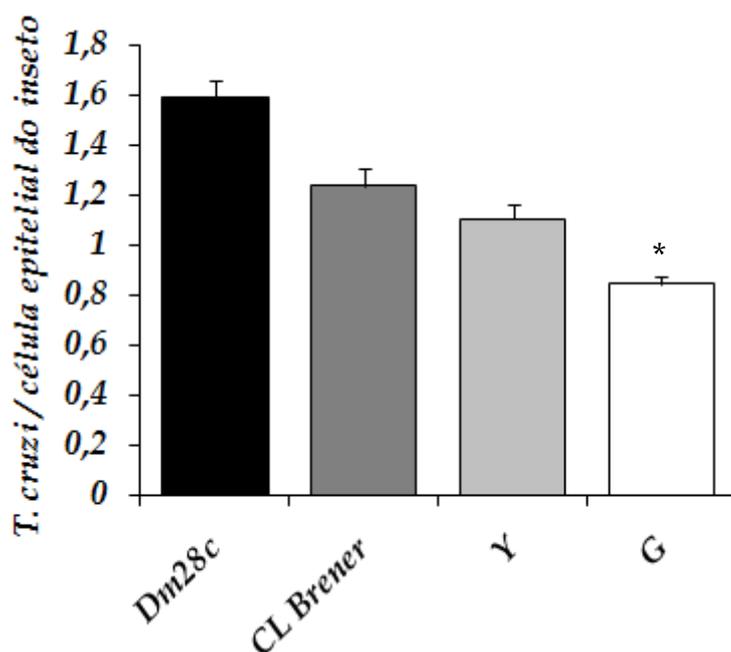


Figura 13. Análise da taxa de interação em diferentes cepas de *T. cruzi*, com intestinos dissecados de *R. prolixus*. Formas epimastigotas ($2,0 \times 10^7$ células) das cepas Dm28c, CL Brener, Y e G foram incubadas com os intestinos dissecados do triatomíneo por 15 min a temperatura ambiente. Após a interação com as células intestinais epiteliais, o número de parasitos/célula epitelial intestinal foi estimado através da contagem randômica por no mínimo 100 células epiteliais. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados com 4 intestinos por tratamento. A cepa G aderiu significadamente menos ao epitélio que os demais isolados (teste ANOVA $P \leq 0,05$).

6. Análises da fração enriquecida da cruzipáina isolada do *T. cruzi*

Com o objetivo de avaliar se a cruzipáina pode atuar como um ligante direto, interagindo com possíveis receptores no epitélio intestinal do inseto, objetivamos primeiramente obter uma fração enriquecida desta enzima. A análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE, corado por nitrato de prata, revelou duas bandas características de 72 e 55 kDa e um enriquecimento considerável da cruzipáina, que preservou sua atividade proteolítica. Além disso, esse mesmo perfil de expressão também foi observado no gel SDS-PAGE-gelatina (Figura 14).

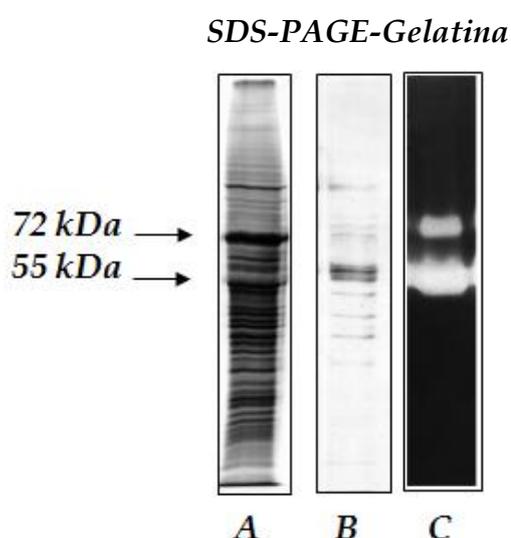


Figura 14. Perfil de proteínas e peptidases da fração enriquecida de cruzipáina. As proteínas do extrato total de *T. cruzi*, 28 μg (A) e fração enriquecida da cruzipáina 2,8 μg (B) foram separadas em SDS-PAGE e visualizadas após coloração com nitrato de prata. (C) Análise por SDS-PAGE-Gelatina da fração enriquecida de cruzipáina (2,8 μg). A massa molecular relativa está representada à esquerda (em kDa).

7. Potencial de reversão da inibição da adesão de pCHAG ao epitélio de *R. prolixus* pelo suplemento de cruzipáina exógena

Formas epimastigostas de *T. cruzi* que superexpressam a chagasina (pCHAG) foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente com o intestino explantado de *R. prolixus* acrescidos ou não de concentrações crescentes de cruzipáina (1,5; 3 e 4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Parasitos sem modificação genética foram também utilizados como controle do ensaio. Os resultados indicaram que a cruzipáina ativa na concentração de 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ restaurou parcialmente o nível

de adesão do *T. cruzi* pCHAG ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus* em relação a parasitos pCHAG. No entanto, concentrações maiores da cruzipaina não potencializaram esse efeito, pelo contrário, houve uma discreta diminuição da adesão (Figura 15) em relação a adição de 1,5 µg/µL.

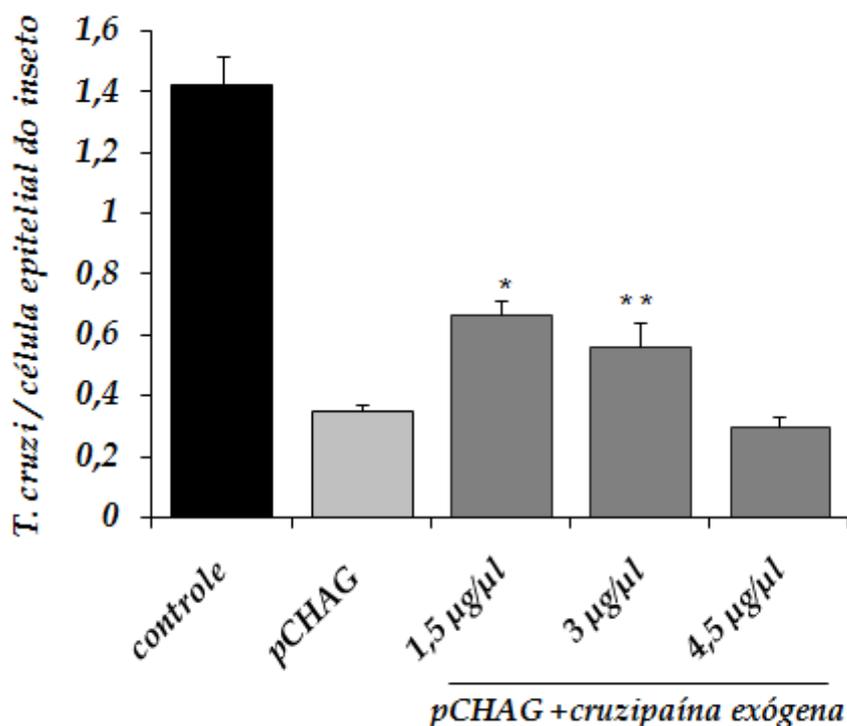


Figura 15. Análise da taxa de interação do clone Dm28c de *T. cruzi*, superexpressando a chagasina suplementada ou não de cruzipaina exógena com intestinos dissecados *R. de prolixus*. Formas epimastigotas ($2,0 \times 10^7$ células) transfectadas com o vetor contendo o gene da chagasina (pCHAG) foram incubadas com os intestinos dissecados do triatomíneo suplementadas com cruzipaina exógena por 15 min a temperatura ambiente. Após a interação com as células intestinais epiteliais, o número de parasitos/célula epitelial intestinal foi estimado através da contagem randômica por no mínimo 100 células epiteliais. O controle foi realizado utilizando parasitos sem nenhuma modificação genética. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados com 4 intestinos por tratamento. O controle foi realizado utilizando parasito selvagem. Parasitos pCHAG suplementados com cruzipaina exógena tiveram um índice de adesão significativamente diferente de células não tratadas (pCHAG) usando o teste *t* Student (* $P = 0,0002288$; ** $P = 0,036544$).

8. Efeito do pré-tratamento do epitélio intestinal do *R. prolixus* com cruzipáina ativa

Os intestinos foram pré-tratados individualmente com 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cruzipáina exógena ativa ou inativada por calor 15 min a temperatura ambiente. Após esse tratamento, os intestinos foram lavados cuidadosamente em PBS e seguiu-se a interação do epitélio médio posterior dissecado de *R. prolixus* com formas epimastigostas de *T. cruzi* Dm28c por 15 min a temperatura ambiente. Os intestinos pré-tratados com cruzipáina ativa ou inativa não produziram uma redução significativa no índice de adesão do parasito às células epiteliais do inseto vetor em relação ao controle (Figura 16).

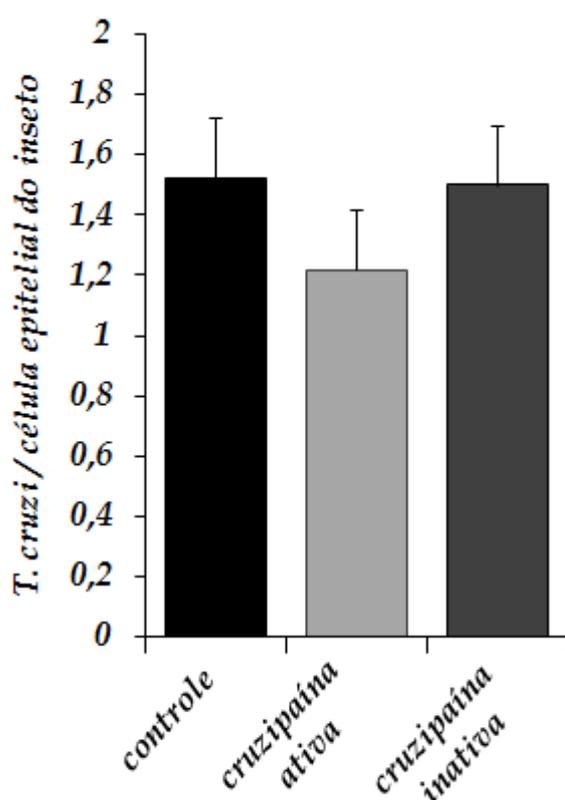


Figura 16. Análise da taxa de interação da cepa Dm28c de *T. cruzi*, com intestinos dissecados de *R. prolixus*, pré-tratando o intestino com cruzipáina. Os intestinos foram pré-tratados com cruzipáina ativa ou inativada por calor por 15 min. Após a interação com as células intestinais epiteliais, o número de parasitos/célula epitelial intestinal foi estimado através da contagem randômica por no mínimo 100 células epiteliais. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados com 4 intestinos por tratamento. Os resultados não foram estatisticamente significantes em relação ao controle.

9. Colonização de *R. prolixus* por *T. cruzi* que superexpressa a chagasina

Com o objetivo de comparar os níveis de infecção *in vivo* de *T. cruzi* selvagem, pTEX e pCHAG na ampola retal de *R. prolixus*, ninfas de quinto estágio mantidas em jejum foram alimentadas em aparato de sangue artificial com sangue de coelho citratado contendo 9×10^6 células de *T. cruzi* por mililitro. Os resultados demonstraram que no vigésimo dia após alimentação com sangue infectado por *T. cruzi*, parasitos transfectados contendo o gene da chagasina (pCHAG) apresentaram baixa capacidade em colonizar a ampola retal do *R. prolixus*. Por sua vez, o parasito pTEX apresentou taxas de adesão similares aos parasitos controle. Por fim, no trigésimo dia após infecção, parasito pCHAG também apresentou uma adesão reduzida à ampola retal do inseto vetor em relação ao parasito pTEX ou ao parasito controle (Figura 17).

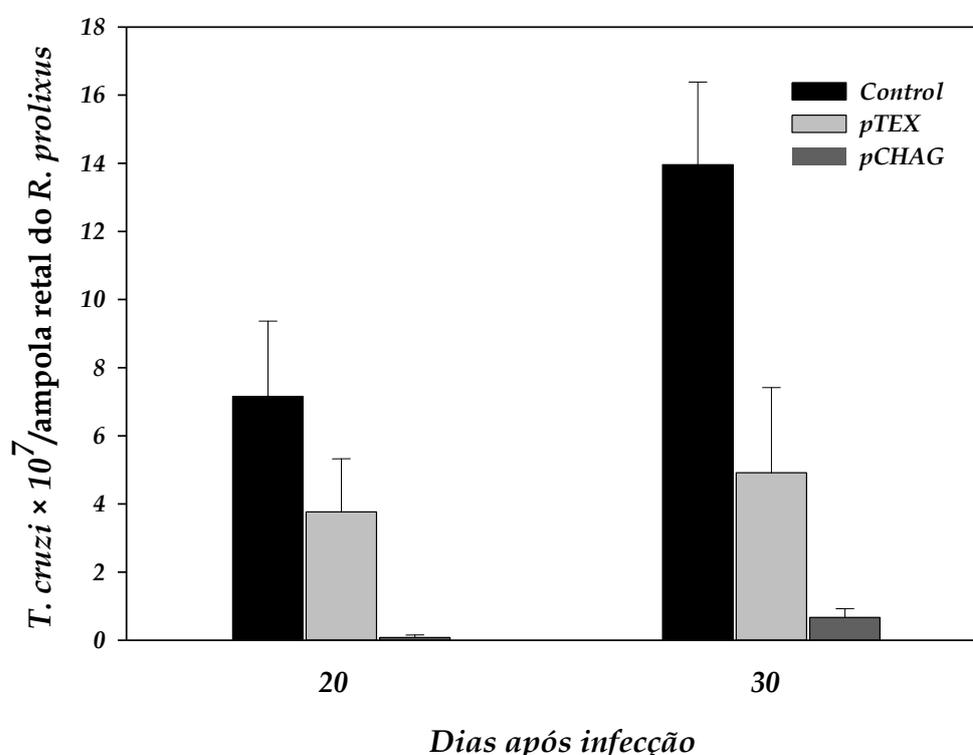


Figura 17. Níveis de infecção de *T. cruzi* selvagem, pTEX e pCHAG na ampola retal de espécimes de *Rhodnius prolixus*. As ninfas de 5^o estágio foram alimentadas no sistema de aparato artificial com sangue de coelho citratado contendo 9×10^6 células de *T. cruzi* por mililitro (pTEX, pCHAG e selvagem). No 20^o e 30^o dias após infecção, 8 ampolas retais foram explantadas, homogeneizadas em 1 mL de PBS e a quantificação do número total de parasitos vivos foi realizado através da câmara de Neubauer em triplicata. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de quatro experimentos. Parasitos pCHAG tiveram um índice de adesão com as células significativamente diferente do controle e dos parasitos pTEX usando o teste ANOVA ($P \leq 0,05$).

10. Modulação da expressão da cruzipaina por *T. cruzi* após a colonização de *R. prolixus*

Com o objetivo de determinar os níveis de expressão da cruzipaina do *T. cruzi* após passagem em *R. prolixus*, células re-isoladas após a colonização ou células obtidas de cultura foram incubadas com anticorpos anti-cruzipaina policlonais na diluição de 1:2000 e analisadas por FACS. Os resultados indicam que as células que foram re-isoladas após a passagem pela ampola retal de *R. prolixus* mostraram um aumento significativo da expressão da cruzipaina após 30 dias de infecção. Esses resultados permitiram constatar que a passagem dos flagelados pela ampola retal dos triatomíneos causou um aumento significativo na expressão dessa cisteína peptidase, quando comparados com as células cultivadas em meio de cultivo BHI (Figura 18).

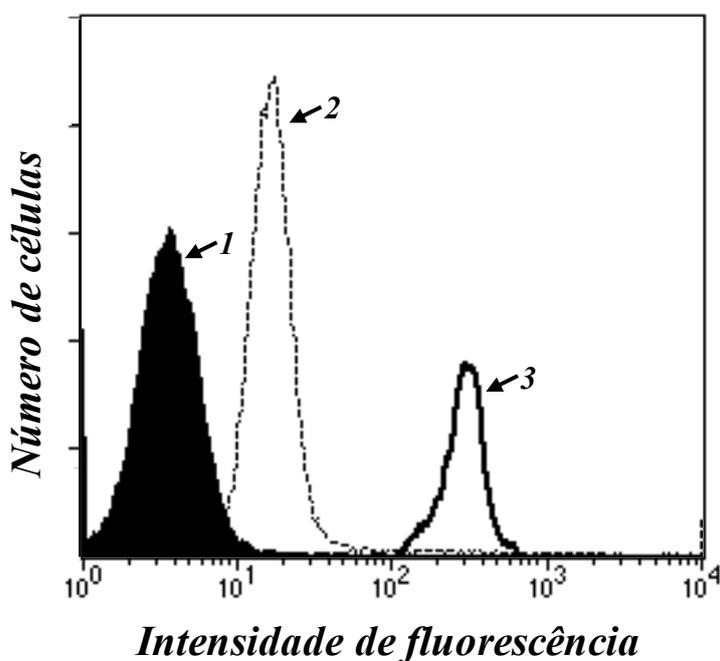


Figura 18. Análise da expressão da cruzipaina frente ao desafio do *T. cruzi* com epitélio intestinal explantado de *R. prolixus*. (A) Citometria de fluxo demonstrando o perfil de ligação do anticorpo anti-cruzipaina à superfície celular de *T. cruzi* após contato com a ampola retal de *R. prolixus* após o 30º dia de infecção. As células re-isoladas (3) ou células de cultura (2) foram incubadas com anticorpo anti-cruzipaina (1:2000) por 1 h, conforme descrito na seção de material e métodos. Em seguida, estas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína (FITC) e observadas através de citometria de fluxo. A autofluorescência corresponde aos parasitos tratados somente com anticorpo secundário (1). Dados representativos de dois experimentos realizados com 10.000 células. A curva 3 representa 10.000 eventos cruzipaina-positivos.

VI. DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos apresentam um amplo e variado conjunto de peptidases extracelulares e/ou intracelulares, as quais regulam a expressão de funções específicas requeridas nos estágios de vida do parasito (VERMELHO *et al.*, 2007). Cisteína peptidases, da superfamília da papaína de protozoários patogênicos, são importantes para sobrevivência e interação com o hospedeiro vertebrado. A cruzipaína é a cisteína peptidase mais abundante do *T. cruzi*, o qual é o agente etiológico da doença de Chagas. Atualmente, já está bem estabelecido que as cisteínas peptidases de tripanossomatídeos patogênicos desempenham funções biológicas cruciais, além de desempenharem funções essenciais em diversas etapas da infecção no hospedeiro vertebrado, tais como: funções catabólicas gerais, degradação de proteínas do hospedeiro, adesão, evasão da resposta imune, nutrição e patogênese no hospedeiro mamífero.

Diversos grupos de pesquisa se dedicaram a identificar e caracterizar as moléculas-chaves do *T. cruzi* envolvidas na interação com o hospedeiro vertebrado, visando à identificação de alvos promissores para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas. Por outro lado, poucos estudos têm se focado na identificação de moléculas importantes para o processo de interação do *T. cruzi* com o inseto vetor. Nosso grupo vem estudando algumas peptidases que podem ser essenciais no ciclo de vida dos tripanossomatídeos, como a gp63 e a cruzipaína (SANTOS *et al.*, 2006a, 2006b). Tripanossomatídeos “inferiores” são aqueles que a priori não infectam humanos ou hospedeiros vertebrados ao longo do seu ciclo de vida. Homólogos da cruzipaína já foram descritos nos tripanossomatídeos *Blastocrithidia culicis* e *Phytomonas serpens*. Neste último, análises por citometria de fluxo confirmaram que proteínas homólogas à cruzipaína localizam-se na superfície celular do parasito. O pré-tratamento do parasito com inibidores de cisteína peptidase ou com anticorpos anti-cruzipaína inibe significativamente a adesão deste tripanossomatídeo à glândula salivar do inseto fitófago *Oncopeltus fasciatus* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2005, SANTOS *et al.*, 2006b; SANTOS *et al.*, 2007).

Um processo essencial da interação parasito-inseto vetor consiste na adesão do parasito às PMM presente na superfície das células epiteliais. O desenvolvimento das PMM está diretamente relacionado com o crescimento e diferenciação do *T. cruzi* nos insetos vetores (ISOLA, LAMMEL & GONZÁLEZ-CAPPA, 1986; BURGOS *et al.*, 1989; GARCIA *et al.*, 1989; NOGUEIRA *et al.*, 1997; GONZALEZ *et al.*, 1998; 1999). Por isso as moléculas presentes na superfície desempenham papel fundamental no ciclo de vida dos parasitos. A

membrana das formas epimastigotas de *T. cruzi* é majoritariamente composta por glicoinositolfosfolípídeos (GIPLs), que promovem o ancoramento de proteínas à bicamada lipídica da membrana do parasito (COLLI & ALVES, 1999). Diversos trabalhos relatam a importância das GIPLs para os tripanosomatídeos. Em relação a sua fase de desenvolvimento no inseto, as GIPLs são responsáveis pela adesão dos parasitos à membrana intestinal do inseto vetor, o que sugere que as GIPLs possam ser essenciais no processo de infecção do *T. cruzi* no inseto vetor (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Além disso, um *T. cruzi knockout* de *gp72* possui como característica o desacoplamento do flagelo da bolsa flagelar (apomastigota), com consequente diminuição na colonização do epitélio intestinal do *T. infestans* (DE JESUS *et al.*, 1993). Além disso, outro estudo mostrou que a infecção com esse mutante apresentou um número reduzido (menos de 1% em relação ao controle) de parasitos liberados nas fezes do inseto vetor (BASOMBRIIO *et al.*, 2002). Entretanto, a reduzida sobrevivência do mutante pode ser em virtude tanto da falta de GP72 em si, ou da deficiência das propriedades do flagelo quase ausente desse mutante, que pode vim a ser essencial para o estabelecimento da infecção no inseto vetor (DE JESUS *et al.*, 1993). Acredita-se também que a adesão constitui um pré-requisito para a diferenciação para a forma infecciosa, mas pouco se sabe sobre como a adesão dos epimastigotas desencadeia o processo de diferenciação após o estresse nutricional (FIGUEIREDO, ROSA & SOARES, 2000). Por fim, um recente estudo do nosso grupo sugere que um inibidor de calpaínas pode estar atuando de alguma forma na inibição da adesão dos epimastigotas ao substrato, uma vez que a adesão ao intestino médio do inseto é inibida por MDL28170 (ENNES-VIDAL, 2010).

Até o presente momento, pouco se sabe sobre as moléculas que são relevantes para a interação do *T. cruzi* com o hospedeiro invertebrado. Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a participação da cruzipaína na interação *T. cruzi* com o inseto vetor. Nossos resultados indicam que o pré-tratamento das formas epimastigotas do *T. cruzi* por 1 h com os cinco inibidores de cisteína peptidase (cistatina, antipaína, E-64, leupeptina e iodoacetamida) levou a uma drástica redução, em torno de 70% na adesão dos parasitos ao epitélio dissecado de *R. prolixus* em relação a parasitos não tratados, o que sugere que a cruzipaína poderia desempenhar um importante papel na etapa do ciclo de vida do parasito. Tendo em vista que uma atividade de cisteína peptidase, do tipo catepsina B, de cerca de 30 kDa é duas vezes mais proeminente em extratos de formas epimastigotas do que na outras formas evolutivas do parasito (GARCIA *et al.*, 1998), também testamos o efeito de um inibidor específico de catepsina B, o CA074me. Entretanto, esse inibidor de catepsina B não produziu uma redução significativa no índice de adesão às células epiteliais do inseto vetor.

Entretanto, a participação de outras peptidases no processo de adesão ao epitélio intestinal do inseto vetor não pode ser descartada, uma vez que os inibidores apesar de específicos possuem seletividade questionável. A antipaína, por exemplo, é mais específica para cisteína peptidases do tipo papaína do que o inibidor leupeptina, que inibe catepsina B e serina peptidases (KNIGHT, 1980; UMEZAWA, 1976).

A atividade das cisteínas peptidases do tipo papaína também são reguladas por grande número de inibidores de natureza proteica que possuem alta afinidade e seletividade (LECAILLE, KALETA & BROMME, 2002). Cistatinas são inibidores endógenos, que formam complexos reversíveis, de alta afinidade, de caráter competitivo com suas peptidases-alvo, pertencentes à família de inibidores I25, Clan IH (MEROPS). Esses inibidores de cisteínas peptidases foram agrupados numa superfamília denominada cistatina, uma vez que a determinação da sequência de aminoácido se das propriedades bioquímicas desses inibidores tem mostrado relações, a níveis de estrutura e função, com o inibidor isolado da clara de ovo de galinha (BARRETT, 1987). Por este motivo, a super família das cistatinas podem ser divididas em três grandes famílias. famílias 1, 2 e 3, conhecidas como estefinas, cistatinas e cininogênio, respectivamente (TURK & BODE, 1991; BARRETT, 1987).

Inibidores endógenos de peptidases de alta afinidade, reguladores da atividade intracelular dessas peptidases, foram identificados em plantas e mamíferos. A presença de inibidores protéicos em protozoários foi descrita e estudos com *Leishmania*, *Plasmodium*, *T. brucei*, *T. cruzi* têm demonstrado que estes parasitos podem utilizar mecanismos semelhantes de regulação de proteases. Em 2001, Monteiro e colaboradores clonaram do *T. cruzi* e expressaram a chagasina, um inibidor endógeno reversível de cisteínas peptidases de alta afinidade que possui algumas propriedades fisico-químicas semelhantes às cistatinas. A identificação e caracterização da chagasina do parasito com alta especificidade para a cruzipaína destacam as peculiaridades dos mecanismos de regulação da proteólise nestes protozoários (MONTEIRO *et al.*, 2001) . A chagasina potencialmente inativa enzimas do tipo papaína através da formação de complexos moleculares de 1:1 cruzipaína-chagasina, estáveis de alta afinidade no *T. cruzi*, que resulta no controle da atividade catalítica da cruzipaína. Nossos resultados demonstraram que parasitos pré-tratados com concentrações crescentes (0,1; 1; 2,5 e 10 µg/mL) de cistatina, inibidor de cisteína peptidase, reduziu a adesão de forma dose-dependente ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus*.

Portanto, apesar da questionável seletividade de alguns inibidores, a cistatina possui alta especificidade para cruzipaína. Além disso, o anticorpo policlonal contra a cruzipaína na diluição de 1:1000 também demonstrou ser capaz de reduzir significativamente (64%) o número de parasitos aderidos ao epitélio do intestino médio do inseto vetor, em relação a

parasitos controles. Esse efeito pode ser causado por inibição alostérica, alterando a conformação tridimensional da cruzipaína e, conseqüentemente, bloqueando os sítios de ligação da enzima.

Sabe-se que o *T. cruzi* apresenta um alto nível de diversidade genética entre os seus diferentes isolados e os critérios para o agrupamento desses isolados estão bem documentados (ZINGALES *et al.*, 2009). A avaliação do perfil de expressão e atividade tanto da enzima quanto do inibidor poderiam estar contribuindo para a heterogeneidade biológica observadas entre as diferentes cepas de *T. cruzi*. Tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa G são menos infectivos que a cepa Dm28c ou Silvio X10/6, principalmente por causa da atividade reduzida da cruzipaína (APARICIO, SCHARFSTEIN & LIMA, 2004). SANTOS, C.C. *et al.* (2005) ao analisar diferentes isolados de *T. cruzi* como as cepas Dm28c, Y, Silvio X10/6, CL e Brazil mostraram que o balanço estequiométrico da taxa molar enzima:inibidor se preserva constante, onde a relação molar se manteve em 50:1. No entanto, a cepa G apesar de apresentar níveis similares de chagasina que a cepa Dm28c, apresentou uma drástica redução na atividade da cruzipaína. Com isso, a cepa G apresentou uma mudança drástica na taxa molar de 5:1. Esse fenótipo observado na cepa G é similar ao detectado nos parasitos pCHAG, sugerindo que o aumento da expressão da chagasina, altera a taxa molar deste parasito (SANTOS, C.C. *et al.*, 2005). Nossos resultados demonstram que o *T. cruzi* cepa G apresentou baixa capacidade de ligação ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus* em relação aos outros diferentes isolados de *T. cruzi* analisados: Dm28c, Y, CL Brener, sugerindo uma mudança biológica dessa cepa, provavelmente devido a baixa atividade de cruzipaína.

Parasitos pCHAG possuem capacidade reduzida de se diferenciarem em formas tripomastigotas. Além disso, formas tripomastigotas são menos infectivos em células de mamíferos *in vitro* do que o parasito selvagem (SANTOS, C.C. *et al.*, 2005). No presente trabalho, esses parasitos foram utilizados como modelo para investigar o papel da cruzipaína na interação com *R. prolixus*. A comparação da adesão do *T. cruzi* selvagem com amostras do parasito transfectados apenas com o plasmídeo de expressão (pTEX) ou contendo o gene da chagasina (pCHAG) revelou que os parasitos que superexpressam a chagasina apresentaram índices de adesão consideravelmente menores que o controle ou o parasito com o plasmídeo sem o gene-alvo, corroborando, que a cruzipaína possa participar do processo de adesão ao epitélio intestinal do triatomíneo.

Visando dar maior abordagem biológica aos nossos resultados, ninfas de 5º estágio foram alimentadas com sangue de coelho citratado infectado com *T. cruzi*: selvagem, pTEX e pCHAG. Os níveis de infecção da ampola retal dos triatomíneos foram comparados entre os três sistemas de *T. cruzi* acima descritos. Os resultados demonstraram que no vigésimo e

trigésimo dias após alimentação com sangue infectado por *T. cruzi*, parasitos transfectados contendo o gene da chagasina (pCHAG) apresentaram baixa capacidade em colonizar a ampola retal do *R. prolixus*. Por sua vez, o parasito pTEX apresentou taxas de adesão similares aos parasitos controle. O reto é considerado uma região de estresse, em que se induz a metaciclogênese no inseto vetor. Outros estudos relataram uma densidade populacional alta do *T. cruzi* mais concentrada no compartimento retal do triatomíneo (SHAUB 1989; CORTEZ *et al.*, 2002). Neste trabalho, foi observado alto índice de formas epimastigotas na ampola retal, como também tripomastigotas metacíclicos (dados não mostrados), o que está de acordo com outros trabalhos onde se verificou alto índice de epimastigotas, formas intermediárias como também tripomastigotas metacíclicos (DIAS, 1934; GARCIA & DEVORAK, 1982; GARCIA & AZAMBUJA, 1991; SCHAUB, 1989; CORTEZ *et al.*, 2002). Esses resultados corroboram os dados anteriores sugerindo a participação ativa da cruzipaina no processo de colonização com o inseto vetor. A transmissão do agente etiológico da doença de Chagas, *T. cruzi*, está relacionada com o hábito de vida hematófago dos vetores, como estratégia para obter nutrientes. O *T. cruzi* e hemípteros provavelmente não co-evoluíram para facilitar a transmissão da doença de Chagas (TAKANO-LEE & EDMAN, 2002). Entretanto, para o sucesso da transmissão vetorial é necessário um alto grau de interação entre os triatomíneos vetores e os parasitos. Para tal, os parasitos passam por três estágios de diferenciação no intestino do inseto vetor. Nesse contexto, o parasito sofre ao longo do seu ciclo biológico, várias mudanças morfológicas e bioquímicas, no intuito de sobreviver no intestino do inseto vetor, de invadir e sobreviver dentro do hospedeiro vertebrado, além de escapar do seu sistema imunológico.

Uma vez estabelecido que a cruzipaina participa ativamente do processo colonização do inseto vetor, nos propusemos a investigar o mecanismo de ação. Nesse sentido, nós testamos se a cruzipaina poderia atuar como um ligante direto, interagindo com possíveis receptores no epitélio intestinal do inseto. Nossos resultados não comprovaram essa hipótese, pois quando os intestinos foram pré-tratados individualmente com 1,5 µg/µL de cruzipaina exógena não foi observada uma redução significativa no índice de adesão às células epiteliais do inseto vetor em relação ao controle. Similar efeito foi observado quando a cruzipaina foi inativada por calor, perdendo sua conformação tridimensional e consequentemente sua função.

A participação de peptidases na adesão dos parasitos às células hospedeiras, atuando como ligante, foi previamente demonstrado para a metalopeptidase gp63. A ação da gp63 promovendo a adesão de *Leishmania* a macrófagos pode ser tanto direta, via receptor-ligante ou indiretamente, promovendo a opsonização do macrófago, pela conversão de C3b em C3bi.

Diversos estudos mostraram que a gp63 ou anticorpos anti-gp63 monoclonais inibiram a adesão do parasito ao macrófago ou a fagocitose pelo macrófago (RUSSEL & WILHELM, 1986; WILSON & HARDIN, 1988; CHANG & CHANG, 1986). Ademais, uma sequência conservada SRYD possui reação antigênica cruzada com o peptídeo RGDS da fibronectina e o peptídeo contendo SRYD inibe a adesão do parasito, sugerindo que essa região pode estar envolvida na direta ligação aos macrófagos do hospedeiro vertebrado (SOTERIADOU *et al.*, 1992). Além disso, a gp63 também parece se ligar diretamente a um receptor ainda não identificado no epitélio intestinal do inseto hospedeiro de tripanossomatídeos “inferiores” (D’AVILA-LEVY *et al.*, 2006).

Com o intuito de verificar se a inibição da adesão de pCHAG pode ser potencialmente revertida pelo suplemento de cruzipaína exógena, parasitos pCHAG foram incubados com concentrações crescentes da fração enriquecida da cruzipaína. Os resultados indicam que a cruzipaína ativa na concentração de 1,5 µg/µL restaurou parcialmente (30%) o nível de adesão do *T. cruzi* pCHAG ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus* em relação a parasitos pCHAG. Interessante notar que concentrações maiores da cruzipaína (3 µg/µL e 4,5 µg/µL) não potencializaram esse efeito, pelo contrário, houve uma discreta diminuição do processo de adesão ao epitélio. Esse resultado parece indicar que concentrações muito elevadas de cruzipaína exógena exercem um efeito negativo sobre o processo de adesão ao epitélio intestinal do inseto vetor. Especulamos ainda, que a concentração de 1,5 µg/µL já é muito além de uma concentração fisiológica normal da cruzipaína, portanto, pretendemos testar em breve o efeito de concentrações menores desta enzima.

Ensaio de citometria de fluxo com anticorpos anti-cruzipaína mostraram parasitos reisolados após passagem em *R. prolixus* apresentaram uma expressão de cruzipaína consideravelmente maior quando comparadas com as células obtidas de cultura. Outros estudos demonstraram que uma cepa atenuada de *Leishmania major* mostrou conteúdo reduzido e reduzida atividade enzimática de gp63. Entretanto, após passagem seriadas desses parasitos em *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire ou em camundongos houve uma restauração da atividade proteolítica de gp63 em níveis similares a uma cepa virulenta de *L. major* (SÁDLOVÁ *et al.*, 2006). Níveis reduzidos de gp63 são frequentes em promastigotas de *Leishmania* que se submetem a longas passagens *in vitro* (CHAUDHURI & CHANG 1988; LIMA *et al.*, 2009; SANTOS-GOMES & ABRANCHES, 1996; SEAY, HEARD & CHAUDHURI, 1996; WILSON, HARDIN & DONELSON, 1989). Outro estudo demonstrou um aumento na expressão da molécula similar à gp63 em *Herpetomonas samuelpessoai* após passagem pelo inseto *A. aegypti*, após colonização por 6 dias, através da análise de citometria de fluxo. Nesse contexto, os parasitos crescidos no meio de cultura apresentaram 40% das

células marcadas, ao passo que aqueles que entraram em contato com o intestino do inseto apresentaram 95% das células marcadas com o anticorpo anti-gp63 (PEREIRA *et al.*, 2010). A capacidade infectiva ou virulência do *T. cruzi* consiste de características complexas que dependem de um conjunto de múltiplos genes, de subfunções e de uma série de reações enzimáticas. Cepas atenuadas de *T. cruzi* TUL 0, TCC e Y null exibem reduzido conteúdo e expressam baixos níveis de cruzipaína ativa quando comparadas com as respectivas cepas virulentas TUL 2, Tulahuen e Y, sugerindo forte correlação entre virulência/atenuação de cepas de *T. cruzi* mantidas por longo tempo em cultura e a importância das funções da cruzipaína na infectividade. Esse estudo demonstrou um gradiente de infectividade exibindo um decréscimo de atividade da cruzipaína onde cepas virulentas > y null > TCC > TUL 0. Essas mudanças podem ocorrer de uma maneira gradual, progressiva e podem ser acompanhadas por mutações pontuais no gene da cruzipaína. Análises por western blot e atividade proteolítica demonstraram que formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa TCC apresentaram notável redução na concentração e atividade da cruzipaína quando comparadas com a cepa parental Tulahuen. Ademais, a análise da sequência de um gene da cruzipaína no par Tulahuen/TCC indicou 20 mudanças de aminoácidos na cepa atenuada (Duschak *et al.*, 2001). Por fim, nosso estudo mostra que a cruzipaína é uma das moléculas envolvidas na interação com o hospedeiro invertebrado e de fato, nossos resultados demonstraram que esta enzima do *T. cruzi* tem papel na colonização bem sucedida nas células epiteliais intestinais do inseto vetor. Em conclusão, os resultados obtidos nesse estudo acrescentam novos conhecimentos, nunca antes relatados, sobre a participação da cruzipaína do *T. cruzi* na colonização do inseto vetor, *R. prolixus*. Novas perspectivas no controle da doença de Chagas podem ser reveladas a partir do conhecimento de aspectos básicos da interação parasito-inseto vetor. Os dados apresentados nesta dissertação sugerem que a cruzipaína participa ativamente no processo de adesão do *T. cruzi* com células epiteliais de *R. prolixus*.

VII. CONCLUSÕES

- Parasitos pré-tratados com os cinco inibidores de cisteína peptidase (cistatina, antipaína, E-64, leupeptina e iodoacetamida) apresentaram uma taxa de adesão ao epitélio dissecado de *R. prolixus* aproximadamente 70% menor do que o controle.
- CA074me, um inibidor específico de catepsina B, não produziu uma redução significativa na taxa de adesão.
- O tratamento de parasitos com o inibidor específico de catepsina L, cistatina, teve um efeito dose-dependente sobre a taxa de adesão.
- O tratamento de parasitos com anticorpo policlonal anti-cruzipaína (1:1000) induziu a uma redução significativa (64%) na taxa de adesão.
- *T. cruzi* pCHAG apresenta baixa capacidade de ligação ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus*, enquanto o pTEX, não apresentou mudanças na taxa de adesão em relação ao controle *in vitro*, o que não ocorreu com parasito pTEX *in vivo*.
- A cepa G apresentou baixa capacidade de interação ao epitélio dissecado de *R. prolixus* em relação aos diferentes isolados de *T. cruzi*: Dm28c, Y, CL Brenner.
- A cruzipaína ativa na concentração de 1,5 µg/µl restaurou parcialmente (30%) o nível de adesão do *T. cruzi* pCHAG ao epitélio intestinal dissecado de *R. prolixus* em relação a parasitos pCHAG.
- A cruzipaína não participa como um ligante direto no processo de interação.
- A expressão da cruzipaína aumentou consideravelmente após a passagem dos parasitos selvagem pela ampola retal de *R. prolixus*.
- Coletivamente, nossos resultados sugerem que a cruzipaína participa ativamente no processo de adesão do *T. cruzi* com células epiteliais de *R. prolixus*, através de um mecanismo distinto ao de ligante-receptor.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P.; SOUZA, W.; GONZALEZ, M.S, et al. Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut epithelial cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 815-22, 2004.

ANDRIES, J.C.; TORPIER, G. An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepa cinerea* (Insecta, Heteroptera): Ultrastructure and Genesis. *Biol Cell*, 46 p. 195-202, 1982.

APARICIO, I.M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A.P. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect Immun*, v. 72, p. 5892–902, 2004.

AZAMBUJA, P.; GARCIA E.S. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, v. 7, n. 9, p. 240-4, 1991.

AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE.; N.A, GARCIA.; E.S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*, v. 77 p. 397-404, 2005.

BARRET, A.J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *TIBS*, v. 12, p. 193-196, 1987.

BARRET, A.J, RAWLINGS, N.D. Proteinases. *Biochemical Journal*, v. 19, p. 707-715, 1991.

BARRETT, A.J, RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Bio*, v. 134 n. 2-3, p. 95-102, 2001.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.G.; WOESSNER, J.F. Handbook of Proteolytic Enzymes. San Diego (CA): (Eds.) Academic Press Ltd, 2004.

BARRETT, A.J.; TOLLE, D.P.; RAWLINGS, N.D. Managing peptidases in the genomic era. *Biol Chem*, v. 384, v. 6, p. 873-82, 2003.

BASOMBRIO, M.A.; GOMEZ, L.; PADILLA, A.M.; CIACCIO, M.; NOZAKI, T.; CROSS, G.A. Targeted deletion of the gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors. *J Parasitol*, v. 88, p. 489-493, 2002.

BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, v. 44, n. 1 p. 1–80, 1992.

BILLINGSLEY, P.F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu Rev Entomol*, v. 35, p. 219–248, 1990.

BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian J Zool*, v. 61, p. 2574-2586, 1983.

BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Cellular localization of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Cell and Tissue. Res*, v. 241, p. 421-428, 1985.

BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Acta Trop*, v. 43, p. 355-366, 1986a.

BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E. Nondigestive cell types in the midgut epithelium of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*, v. 23, p. 212–216, 1986b.

BONALDO, M.C.; D'ESCOFFIER, L.N.; SALLES, J.M.; GOLDENBERG S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol*, v. 73, p. 44-51, 1991.

BOND, J.S.; BUTLER, P.E. Intracellular proteases. *Ann Rev Biochem*, v. 56, p. 333-364, 1987.

BONTEMPI, E.J.; MARTINEZ, J.; CAZZULO, J.J. Subcellular localization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 33, p. 43-48, 1989.

BRANQUINHA, M.H.; VERMELHO, A.B.; GOLDENBERG, S.; BONALDO, M.C. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, v. 43, p. 131-135, 1996.

BOND, J.S., BUTLER, P.E. Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem*, v. 56, p. 333-64, 1987.

BOUTAYEB, A. Developing countries and neglected diseases: challenges and perspectives. *Int J Equity Health* 2007; 6:20.

BURGOS, M.H.; GUTIERREZ, L.S.; LAMMUEL, E.; ISOLA, E.L.D. Midgut extract rich in peritrophic membrane from *Triatoma infestans* induces differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopía electrónica y biología celular*, v. 13, p. 151–166, 1989.

BURLEIGH, B.A, WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*, v. 4, p. 701-711, 2002.

CARCAVALLO, R.U.; GIRÓN, I.G.; JURBERG, J.; LENT, H. Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas. Rio de Janeiro: Editoria Fiocruz; 1997.

CARCAVALLO, R.U.; RODRÍGUEZ, M.E.F.; SALVATELLA R.; CURTO DE CASAS, SI.; SHERLOCK, IS.; GALVÃO, C.; et al. Habitats e fauna relacionada. In: Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas (RU Carcavallo, I Galindez Girón, J Jurberg & H Lent org.) Rio de Janeiro: Editoria Fiocruz; 1998.

CAZZULO, J.J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; WERNSTEDT, C.; HELLMAN, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 33, p. 33-41, 1989.

CAZZULO, J.J.; HELLMAN, U.; COUSO, R.; PARODI, A.J.A. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol Biochem Parasitol*, v. 38, p. 41-48, 1990.

CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol Chem*, v. 378, p. 1-10, 1997.

CHAGAS, C.R.J. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHANG, C.S.; CHANG, K.P. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of leishmaniamacrophage binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 83, p. 100–4, 1986.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania Mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, v. 27, p. 43-52, 1988.

COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.94, p. 37–49, 1999.

COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology*, v.114 p. S61–S80, 1997.

CORDOVA, E.; BOSCHI, A.; AMBROSIONI, J.; CUDOS, C.; CORTI, M. Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992–2007. *Int J Infect Dis*, v. 12, n. 6, p. 587–592, 1997.

CORTEZ, M.G.R.; GONZALEZ, M.S.; CABRAL, M.M.O.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Dynamic development of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*: role of decapitation and ecdysone therapy. *Parasitol Res*, v. 88, p. 697-703, 2002.

COURA, J.R.; DIAS, J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 31-40, 2009.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, p. 465:S6 S7, 2010.

CRISTOFOLLETT, P.T. ; RIBEIRO, A.F. ; DERAISON, C. ; RAHBE, Y. ; TERRA, W.R. Midgut adaptation and enzyme distribution in a phloem feeding insect, the *pea aphid acyrthosiphom pisum*. *J Insect Physiol*, v. 49, n. 1, p. 11-24, 2003.

D'AVILA-LEVY, C.M.; ARAUJO, F.M.; VERMELHO, A.B.; SOARES, R.M.; SANTOS, AL.; BRANQUINHA, M.H. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. *Parasitology*, v. 130, p. 413-420, 2005.

D'AVILA-LEVY, C.M.; DIAS, F.A.; NOGUEIRA DE MELO, A.C.; MARTINS, J.L.; LOPES. A.H.; SANTOS, A.L.S.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. Insights into the role of gp63-like proteins in lower trypanosomatids. *FEMS Microbiol Lett*, v. 254, p. 149-156, 2006.

DA SILVA VALENTE, S.A, DE COSTA VALENTE, V.; NETO, H.F. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 395-8, 1999.

DE JESUS, A.R.; COOPER, R.; ESPINOSA, M.; GOMES, J.E.P.L.; GARCIA, E.S.; PAUL, S.; et al. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *J Cell Sci*, v. 106, n. Pt 4, p. 1023-1033, 1993.

DE SOUZA, W. From the Cell Biology to the Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids: Dreams and Reality. *Kinetop Biol Dis*, v. 1, p. 3-24, 2002.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes – a historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.103, n. 4, p. 313–325, 2008.

DIAS, E. Estudos sobre o *Schyzotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 28, p. 1-110, 1934.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad. saúde pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 513-22, 2007.

DIAS, J. C.P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS. A.V, MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008a.

DIAS, J.C.P.; PRATA, A.R.; CORREIA, D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, p. 193-196, 2008b.

DUBIN, G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci*, v. 262, n. 6, p. 653-69, 2005.

DUSCHAK, V.G.; CIACCIO, M.; NASSER, J.R.; BASOMBRÍO, M.A. Enzymatic activity, protein expression and gene sequence of cruzipain in virulent and attenuated *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol*, v. 87, p. 1016, 2001.

EAKIN, A.E.; MCGRATH, M.E.; MCKERROW, J.H.; FLETTERICK, R.J.; CRAIK, C.S. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, v. 268, p. 6115-6118, 1993.

EAKIN, A.E.; MILES, A.A.; HARTH, G.; MCKERROW, J.H.; CRAIK, C.S. The sequence, organization and expression of the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, v. 267, p. 7411-7420, 1992.

ENNES-VIDAL, V.; MENNA-BARRETO, R.F.S.; SANTOS, A.L.S.; BRANQUINHA, M.H.; D'AVILA-LEVY, CM. Calpaínas em *Trypanosoma cruzi*: participação no ciclo de vida, diferenciação e infectividade. Rio de Janeiro. Dissertação – Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz; 2010.

FERREIRA, A.W; ÁVILA, S.L.M. Doença de Chagas. In:_____. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. cap. 22. p. 241-249.

FERREIRA, C.; RIBEIRO, A.F.; GARCIA, E.S.; TERRA, W.R. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem*, v. 18, p. 521– 530, 1998.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J.B; CALIXTO, JB. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at spinal level. *Neuropharmacol*, v. 43, p. 1188-1197, 2002.

FRAIHA NETO, H.; VALENTE, SAS, VALENTE, V.C; PINTO, A.Y.N. Doença de Chagas - endêmica na Amazônia? *An Acad Med Pará*, v. 6, p. 5357, 1995.

FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; ROSA, D.S.; SOARES, M.J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol*, v. 86, p. 1213-1218, 2000.

FRIEND, WG. The gorging response in *Rhodnius prolixus* Stal. *Can J Zool*, v. 43, p. 125-132, 1965.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, v. 7, p. 240–244, 1991.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi*-triatomine interaction. *Toxicon*, v. 44, p. 431–440, 2004.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P.; FORSTER, H.; REMBOLD, H. Feeding and molt inhibition by azadirachtins A, B and 7-acetyl-azadirachtin A in *Rhodnius prolixus* nymphs. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. C 39c, p. 1155-1158, 1984.

GARCIA, E.S.; DVORAK, J.A. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *Am J Trop Med Hyg*, v. 31, p. 259-262, 1982.

GARCIA, E.S; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P.; REMBOLD, H. Chagas' disease and its insect vector. Effect of azadirachtin A on the interaction of a triatomine host (*Rhodnius prolixus*) and its parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Zeitschrift für Naturforschung C Journal of Biosciences*, v. 44, p. 317–322, 1989.

GARCIA, E.S.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 213–216, 1999.

GARCIA, E.S.; MACARINI, J.D.; GARCIA, M.L.; UBATUBA, F.B. Feeding of *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *An Acad Bras Cienc*, v.47, 3-4, p.537-45, 1975.

GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol*, v. 53 p. 11-21, 2007.

GARCIA, M.P.; NÓBREGA, O.T.; TEIXEIRA, A.R.; SOUSA, M.V.; SANTANA, JM. Characterisation of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. *Mol Biochem Parasitol*, v. 91, n. 2, p. 263-72, 1998.

GARRAUD, O.; ANDREU, G.; ELGHOZZI, M.H.; LAPERCHE, S.; LEFRÈRE, J.J. Measures to prevent transfusion-associated protozoal infections in nonendemic countries. *Transfusion Clinique et Biologique, Paris*, v. 5, n. 2, p. 110-112, 2007.

GIORDANENGO, L.; MALDONADO, C.; RIVAROLA, H.W.; IOSA, D.; GIRONES, N.; FRESNO, M et al. Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. *Eur J Immunol*, v. 30, p. 3181-3189, 2000.

GIRONES, N.; CUERVO, H.; FRESNO M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 296, p. 89–123, 2005.

GONTIJO, E.D.; ANDRADE, G.M.Q.; SANTOS, S.E.; GALVÃO, L.M.C, MOREIRA, E.F.; PINTO, F.S.; DIAS, J.C.P.; JANUÁRIO, J.N. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 18, n. 3, p. 243-254, 2009.

GONÇALVES, AM., NEHME, N.S.; MOREL, C.M. An improved silver staining procedure for schizodeme analysis in polyacrylamide gradient gels. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 85, n. 1, p. 101-6, 1990.

GONZALEZ, M.S.; NOGUEIRA, N.F.S; FEDER, D.; DE SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. Role of the head in the ultrastructural midgut organization in *Rhodnius prolixus* larvae: evidence from head transplantation experiments and ecdysone therapy. *J Insect Physiol*, v. 44, p. 553–560, 1998.

GONZALEZ, M.S.; NOGUEIRA, N.F.S.; MELLO, C.B.; DE SOUZA, W.; SCHAUB, G.A, AZAMBUJA P, et al. Influence of brain and Azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, v. 92, p. 100–108, 1999.

GRUPPI, A.; CERBAN, F.M.; VOTTERO-CIMA, E. Exoantigens from *Trypanosoma cruzi* contain cruzipain. *Acta Trop*, v. 63, p. 141-149, 1997.

GUTIERREZ, L.S.; BURGOS, M.H. The intestine of *Triatoma infestans*. II. The surface coat of midgut. *J Ultrastruct Res*, v. 63, p. 244-251, 1978.

HARTH, G.; ANDREWS, N.; MILLS, A.A.; ENGEL, J.C.; SMITH, R.; MCKERROW, J.H. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 58, p. 17-24, 1993.

HOOPER, N.M. Proteases: a primer. *Essays Biochem*, v. 38, p. 1-8, Review, 2002.

IRVINE, J.W.; COOMBS, G.H.; NORTH, M.J. Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors of parasitic protozoa. *FEMS Microbiol Lett*, v. 75, n. 1, p. 67-72, 1992.

ISOLA, E.L.D.; LAMMEL, E.M.; GONZÁLEZ-CAPPA, S.M. *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Experimental Parasitology*, v. 62, p. 329–335, 1986.

JUNQUEIRA, A.C.V.; ALBAJAR, P.V.; COURA, JR. Doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In JR Coura, Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. p.595-601.

KIRCHHOFF, LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease) – a tropical disease now in the United States. *N England J Med*, v. 329, n. 9, p. 639-44, 1993.

KIRCHHOFF, L.V.; LOMELI-GUERRERO, A.; PAREDES-ESPINOZA, M.; RONGUEARROR, C.S.; DELGADO-MEJIA, M.; PENA-MUNOZ, J.G. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion, Filadelfia*, v. 46, n. 2, p. 298-304, 2006.

KIRCHHOFF, L.V.; PEARSON, R.D. The emergence of Chagas disease in the United States and Canada. *Current Infection Disease Reports*, Filadelfia, v. 9, n. 5, p. 347-350, 2007.

KNIGHT, C.G. Human cathepsin B. Application of the substrate N-benzyloxycarbonyl-L-arginyl-L-arginine 2-naphthylamide to a study of the inhibition by leupeptin. *Biochem J*, v. 89, n. 3, p. 447–453, 1980.

KOLLIEN, A.H.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G.A. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Trop*, v. 70, p. 127–141, 1998.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol Today*, v. 16, p. 381-387, 2000.

KROPF, S.P. Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença do Brasil (1909-1923). *Hist. cienc. saude-Manguinhos*, v. 16, n. 1, p. 205-227, 2009.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; BROMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev*, v. 102, n. 12, p. 4459-88, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

LANE, N.J, HARRISON J.B. An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. *J Insect SCI*, v. 39, p. 355-372, 1979.

LEHANE, M.J, BILLINGSLEY, P. *Biology of the Insect Midgut*. 1 ed. Londres: Chapman & Hall; 1996. 504 p.

LEHANE, M.J.; MSANGI, A.R. Lectin and peritrophic membrane development in the gut of *Glossina m. morsitans* and a discussion of their role in protecting the fly against trypanosome infection. *Med Vet Entomol*, v. 5, p. 495–501, 1991.

LENT, H. O Gênero *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Ver Bras Biol*, v. 8, p. 297-339, 1948;

LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 89-92, 1999.

LENT, H, JURBERG, J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859 com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Brasil Biol*, v. 29, n. 4, p. 487-560, 1969.

LIMA, A.K.C.; ELIAS, C.G.R.; SOUZA, J.E.; SANTOS, A.L.S.; DUTRA, P.M.L. Dissimilar peptidase production by a virulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. *Parasitology*, 136, p. 1179–1191, 2009.

LIMA, A.P.C.A.; TESSIER, D.C.; THOMAS, D.Y.; SCHARFSTEIN, J.; STORER, A.C.; VERNET, T. Identification of new cysteine protease isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 67, p. 333-338, 1994.

LIMA, A.P.C.A.; ALMEIDA, P.C.; TERSARIOL, I.L.S.; SCHMITZ, V.; SCHMAIER, A.H.; JULIANO, L.; et al. Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. *J Biol Chem*, v. 277, n. 8, p. 5875-5881, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, AL.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 267-275, 1951.

MCGRATH, M.E.; EAKIN, A.E.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H.; CRAIK, C.S.; FLETTERICK, R.J. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J Mol Biol*, v. 247, n. 2, p. 251-259, 1995.

MCKERROW, J.H. Parasite proteases. *Exp Parasitol*, v. 68, p. 111-115, 1989.

MCKERROW, J.H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol*, n. 1, p. 497-536. Review, 2006.

MCKERROW, J.H. ; DOYLE, P.S. ; ENGEL, J.C. ; PODUST, L.M. ; ROBERTSON, S.A. ; FERREIRA, R. ; et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 263-269, 2009.

MCKERROW, J.H.; MCGRATH, M.E.; ENGEL, J.C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitology Today*, v. 11, p. 279-282, 1995.

MCKERROW, J.H.; ROSENTHAL, P.J.; SWENERTON, R.; DOYLE, P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr Opin Infect Dis*, v. 21, n. 6, p. 668-672, Review, 2008.

MCKERROW, J.H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P.J.; BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol*, v. 47, p. 821-853, 1993.

MEIRELLES, M.N.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S.G.; COSTA, E.M.; MURTA, A.C.M.; et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol*, v. 52, p. 175-184, 1992.

MONTEIRO, A.C.; ABRAHAMSON, M.; LIMA, A.P.; VANNIER-SANTOS, M.A.; SCHARFSTEIN, J. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-

binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*, v. 114, p. 3933-3942, 2001.

MOTTRAM, J.C.; FRAME, M.J.; BROOKS, D.R.; TETLEY, L.; HUTCHISON, J.E.; SOUZA, A.E.; et al. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania Mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem*, v. 272, n. 22, p. 14285-93, 1997.

MURTA, A.C.M.; PERSECHINI, P.M.; DE SOUTO PADRÓN, T.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J.A.; SCHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of GP59/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol*, v. 43, p. 27-38, 1990.

NEVES DA SILVA, N.; CLAUSELL, D.T.; NÓLIBOS, H.; MELLO, AL.; OSSANAI, J.; RAFONE, T.; et al. Surto Epidêmico de Doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med trop São Paulo*, v. 10, n. 5, p. 265-276, 1968.

NOGUEIRA, N.F.; GONZALEZ, M.S.; GARCIA, E.S.; DE SOUZA, W. Effect of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol*, v. 69, n. 1, p. 58-63, 1997.

NOGUEIRA, N.F.; GONZALES, M.S.; GOMES, J.E.; DE SOUZA, W.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P.; et al. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, v. 116, p. 120-128, 2007.

OLIVEIRA, M.A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol*, v. 77, p. 22-26, 2001.

PAGE, M.J.; DI CERA, E. Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem*, v. 283, n. 44, p. 30010-4, 2008.

PEREIRA, M.E.A.; ANDRADE, A.F.B.; RIBEIRO, J.M.C. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science*, v. 211, p. 597-600, 1981.

PEREIRA, F.M.; DIAS, F.A.; ELIAS, C.G.R.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SILVA, C.S.; SANTOS-MALLET, JR.; et al. Leishmanolysin-like Molecules in *Herpetomonas samuelpessoai* Mediate Hydrolysis of Protein Substrates and Interaction with Insect. In press, *Protist*, 2010.

PETERS, W. Peritrophic membranes. In: Peters, W. (Ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; 1992. p 238

PINTO, A.Y.N.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FERREIRA-JUNIOR, A.G.; COURA, J.R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, p. 602-614, 2008.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.62, n. 3, p. 597-635, Review, 1998.

RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, v. 34, p. D270–D272, 2006.

REDDY, M.; SUDEEP, S.G.; KALKAR, S.R.; WU, W.; ANDERSON, P.J.; ROCHON, P.A. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases. *JAMA*, v. 298, p. 1911-1924, 2007.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 295.

RIVERA, J.; HILLIS, L.D.; LEVINE, B.D. Reactivation of cardiac Chagas' disease in acquired immune deficiency syndrome. *Am J Cardiol*, v. 94, n. 8, p. 1102–1103, 2004.

ROSENTHAL, P.J. Peptidases of protozoan parasites. *Adv Parasitol*, v. 43, p. 106-159, 1999.

RUSSELL, D.G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol*, v. 136, p. 2613–20, 1986.

RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol*, v. 51, n. 4, p. 861-73, 2004.

SÁDLOVÁ, J.; VOLF, P.; VICTOIR, K.; DUJARDIN, J.C.; VOTÝPKA, J. Virulent and attenuated lines of *Leishmania major*: DNA karyotypes and differences in metalloproteinase GP63. *Folia Parasitol*, v. 53, p. 81–90, 2006.

SANTOS, A.L.S.; ABREU, C.M.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R.M. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology*, v. 130, p. 79-88, 2005.

SANTOS, A.L.S.; BRANQUINHA, M.H.; D'AVILA-LEVY, CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras Cienc*, v. 78, p. 687-714, 2006a.

SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; DIAS, F.A.; RIBEIRO, R.O.; PEREIRA, F.M.; ELIAS, C.G.R.; et al. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *Int J Parasitol*, v. 6, p. 47-5, 2006b.

SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; ELIAS, C.G.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes Infect*, v. 9, p. 915-921, 2007.

SANTOS, C.C.; SANT'ANNA, C.; TERRES, A.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A.P.C. Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J Cell Sci*, v. 118, p. 901-915, 2005.

SANTOS-GOMES, G.M.; ABRANCHES, P. Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitol*, v. 43, p. 7-12, 1996.

SCHARFSTEIN, J.; SCHECHTER, M.; SENNA, M.; PERALTA, J.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; MILES, MA. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J Immunol*, v. 137, n. 4, p. 1336-1341, 1986.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.; LIMA, A.P.; MORROT, A.; et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med*, v. 192, p. 1289-300, 2000.

SCHAUB, GA. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in the small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp parasitol*, v. 65, p. 260-273, 1989.

SCHMAIER, A.H. The physiologic basis of assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system. *Thromb Haemost*, v. 91, p. 1-3, 2004.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 75-85, 2007.

SEAY, M.B.; HEARD, P.L.; CHAUDHURI, G. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect Immun*, v. 64, p. 5129–5137, 1996.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol*, v. 47, n. 2, p. 119–125, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.; et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 33, n. 5, p. 351-7, 1991.

SCHOFIELD, C.J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J.P. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 375-8, 1999.

SILVA, C.P.; RIBEIRO, A.F.; GULBENKIAN, S.; TERRA, W.R. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *J Insect Physiol*, v. 41, p. 1093–1103, 1995.

SILVA, J.R.; MURY, F.B.; OLIVEIRA, M.F.; OLIVEIRA, P.L.; SILVA, C.P.; DANSA-PETRETSKI. Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem Molec Biol*, v. 37, n. 6, p. 523–531, 2007.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol*, v. 41, p. 363-382, 1987.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*, v. 102, p. 157-167, 1992.

SOTERIADOU, K.P.; REMOUNDOS, M.S.; KATSIKAS, M.C.; TZINIA, A.K.; TSIKARIS, V.; SAKARELLOS, C.; et al. The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin. *J Biol Chem*, v. 267, p. 13980–5, 1992.

SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O.E.; CAZZULO, J.J.; DE SOUZA, W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci*, v. 96, p. 485-490, 1990.

TAN, H.; ANDREWS, N.W. Don't bother to knock--the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*, v. 18, p. 427-428, 2002.

- TARLETON, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*, v. 19, n. 10, p. 447–451, 2003.
- TAKANO-LEE, M.; EDMAN, J.D. Lack of manipulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) vector competence by *Trypanosoma cruzi*. *J Med Entomol*, v. 39, p. 44–51, 2002.
- TERRA, WR. Physiology and Biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective – *Braz J Med Biol Res*, v. 21, p. 675-734, 1998.
- TERRA, WR. Evolution of digestive systems of insects. *Annu Rev Entomol*, v. 35, p. 181–200, 1990.
- TERRA, W.R, FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Com Biochem Physiol*, v. 109B, p. 1– 62, 1994.
- TOMAS, A.; KELLY, J.M. Stage regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA. *Mol Biochem Parasitol*, v. 76, p. 103, 1996.
- TOMAS, A.M.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem*, v. 244, p. 596–603, 1997.
- TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*, v. 2850, p. 213-219, 1991.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The Life Cycle Of *Trypanosoma cruzi* Revisited. *Int J Parasitol*, v. 31, p. 472-481, 2001.
- UMEZAWA, H. *Methods in Enzymology*, v. 45, p. 679-683, 1976.
- VALLE, D.; LIMA-GOMES, J.E.P.; GOLDENBERG, S.; GARCIA, E.S. *Rhodnius prolixus* vitellogenesis: Dependence upon the blood source. *J Insect Physiol*, v. 33, p. 249-254, 1987.
- VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. I, p. 395-398, 1999.

VERMELHO, A.B.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S.; D' AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S.; MELO, A.C.N.; SILVA, F.P.J.R.; et al. Trypanosomatidae peptidases: a target for drug development. *Curr Enz Inhib*, v. 3, n. 1, p. 19–48, 2007.

VIEIRA, M.; DUTRA, J.M.; CARVALHO, T.M.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SOUTO-PADRON, T.; SOUZA, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol*, v. 118, p. 491-500, 2002.

VILLELA, M.M, SOUZA, J.M.; MELO, V.; DE P, DIA. Evaluation of the Chagas Disease Control Program and presence of *Panstrongylus megistus* in central-western Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saude Publica*, v. 25, n. 4, p. 907-17, 2009.

WIGGLESWORTH, V.B. The principles of insect physiology. London. 7th Ed. Chapman e Hall Ltda; 1972.

WILSON, M.E.; HARDIN, K.K. The major concanavalin A-binding surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes is involved in attachment to human macrophages. *J Immunol*, v. 141, p. 265–72, 1988.

WILSON, M.E.; HARDIN, K.K.; DONELSON, J.E. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* in virulent and attenuated promastigotes. *J Immunol*, v. 143, p. 678–684, 1989.

World Health Organization (WHO), 2008. Control of Neglected Tropical Diseases. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases>. acessado em: 20 set. 2009.

XU, X.; YU, D.; FANG, W.; CHENG, Y.; QIAN, Z.; LU, W.; CAI, Y.; FENG, K. Prediction of peptidase category based on functional domain composition. *J Proteome Res*, v. 7, n. 10, p. 4521-4, 2008.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc*, v. 78, p. 87-111, 2006.

ZELEDÓN, R.; ALVARENGA, N.J.; SCHOSINSKY, K. In: Chagas Disease. *Pan American Health Organization*, v. 347, p. 59-66, 1997.

ZELEDÓN, R.; BOLAÑOS, R.; ROJAS, M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop*, v. 41, n. 1, p. 39-43, 1984.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; CAMPBELL, D.A.; FERNANDES, O. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, p. 1051-1054, 2009.