

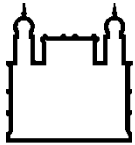
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À  
HEPARINA EM TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi* E SEU  
PAPEL COMO MEDIADORAS DA INVASÃO NA  
CÉLULA HOSPEDEIRA**

**AMANDA RESENDE TUCCI**

Rio de Janeiro  
Maio de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AMANDA RESENDE TUCCI***

Análise da expressão de proteínas de ligação à heparina em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e seu papel como mediadoras da invasão na célula hospedeira

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

**Orientadora:** Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira

**RIO DE JANEIRO**

Maio de 2015

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

T886 Tucci, Amanda Resende

Análise da expressão de proteínas de ligação à heparina em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e seu papel como mediadoras da invasão na célula hospedeira / Amanda Resende Tucci. – Rio de Janeiro, 2015.

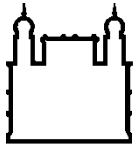
xvi,94 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 70-94

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Proteínas de ligação heparina. 3. Proteoglicano de heparam sulfato. 4. Fator de virulência. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*AMANDA RESENDE TUCCI*

Análise da expressão de proteínas de ligação à heparina em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e seu papel como mediadoras da invasão na célula hospedeira

**Orientadora:** Dra Mirian Claudia de Souza Pereira

**Aprovada em:** 28/05/2015

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Juliana De Meis - Presidente** (IOC, Fiocruz)

**Prof. Dra. Jacenir Santos Mallet** (IOC, Fiocruz)

**Prof. Dr. Maurílio José Soares** (ICC, Fiocruz-PR)

**Prof. Dr. Kátia Calabrese** (IOC, Fiocruz)

**Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas** (ICCF, UFRJ)

Rio de Janeiro, 28 de maio de 2015



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Amanda Resende Tucci**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Mirian Cláudia de Souza Pereira. Ao vigésimo oitavo dia do mês de maio de dois mil e quinze, realizou-se às dez horas, no Auditório Carlos Chagas/Fiocruz, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **"Análise da expressão de proteínas de ligação à heparina em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e seu papel como mediadoras da invasão na célula hospedeira"** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia Celular e Ultra-Estrutura de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Juliana de Meis - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Maurílio José Soares - Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, Dr<sup>a</sup>. Jacenir Reis dos Santos Mallet - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Katia da Silva Calabrese - IOC/FIOCRUZ e Dr. Marcelo Einicker Lamas - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovada da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 28 de maio de 2015.

Dr<sup>a</sup>. Juliana de Meis (Presidente da Banca):

Dr. Maurílio José Soares (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Jacenir Reis dos Santos Mallet (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos amigos espirituais pelo amparo nos momentos de incerteza, pela força para enfrentar as dificuldades e por terem permitido que eu chegasse até aqui.

Agradeço imensamente todo apoio, força e amor que meus pais, Luiz e Mercedes, me deram ao longo da minha vida que se reflete no meu esforço para a construção deste trabalho. Por terem me dado ensinamentos muito valiosos que sempre me impulsionaram a ser uma pessoa melhor. Ao meu pai toda saudade do mundo e à minha mãe toda gratidão pelo zelo que me mostra diariamente em suas ações e gestos. Amo vocês incondicionalmente!

Aos meus irmãos, Erika, Luiz e Bruno, por estarem sempre ao meu lado me ajudando, alegrando, acreditando em mim e investindo no meu futuro. Não poderia ter escolhido irmãos melhores para seguir minha jornada. E ao meu sobrinho Matheus que é minha paixão e minha alegria. Amo muito vocês!

Aos meus familiares pela união de sempre, incentivo, carinho e confiança. Tê-los por perto me dá mais coragem para seguir em frente. E aos meus afilhados que são grandes joias que me foram confiadas e que tornam meus dias mais felizes. Amo todos vocês!

A todos do LUC que me receberam de braços abertos desde iniciação científica e que são pessoas que ajudam muito até hoje. Agradeço o apoio de sempre de todos os técnicos, Liliane, Renata, Dayse e Alanderson (meu amigo, motorista e cantor favorito!), que inúmeras vezes me socorreram durante os experimentos, que sempre me deram uma palavra amiga e que sei que eu perturbei muitas vezes. Também agradeço às pesquisadoras Tatiana Galvão e Claudia Calvet por terem compartilhado comigo ensinamentos ao longo desse tempo. Contudo, devo agradecer muito à Taty que há alguns anos atrás me escolheu como sua aluna de iniciação científica e assim permitiu que eu fizesse parte dessa equipe. Por fim, só posso dizer que fico feliz por trabalhar ao lado de um grupo integrado, empenhado e unido como o nosso!

O laboratório não me proporcionou apenas conhecimento, horas de experimentos e desespero quando tudo dava errado, muito mais que isso, ele me deu amigos para vida. Assim, eu agradeço muito as minhas amigas de

sempre, Tatiana Araújo e Liliane, e também as minhas ex-luquetes, Laura e Líndice (agora um pouquinho mais distantes), por toda a cumplicidade, pelos puxões de orelha e pelo apoio dado quando eu mais precisei. Fico muito feliz pela nossa amizade não está limitada ao laboratório, pelo contrário, fazemos parte uma da vida da outra e sei que sempre poderei contar com vocês. Certamente os estresses do dia-a-dia se tornaram mais leves porque vocês estavam ao meu lado me fazendo sorrir. Vocês são muito especiais para mim!

Agradeço aos amigos que mesmo não estando por perto da mesma forma de antes, continuam sendo sempre especiais. E assim não tenho como esquecer todo apoio, amizade e as palavras de incentivo do Fabrício que desde a seleção do mestrado esteve por perto me acalmando e fazendo acreditar que tudo daria certo e, todas as conversas, risadas e ajuda que eu tive com o Perôny. Agradeço também a participação das queridas Caroline, Nathália e Janaína durante os meus primeiros anos de laboratório.

Além dessas pessoas, não posso deixar de agradecer todo apoio que as novatas Eveline (minha ciumenta querida!), Lorraine e Carolina me dão sempre. Meninas, muito obrigada por todos os meios de cultivo doados, por todas as vezes que coraram para mim, enfim pela ajuda de sempre e pelo incentivo diário. Estar na bioquímica nessa reta final não seria nada fácil se não fosse pela companhia de vocês. Agradeço também a Luciana e Guilherme por todo apoio que me deram no final do mestrado!

Às amigas Daniele e Michelle que mesmo não nos vendo sempre, como era na época da faculdade, estão sempre por perto de alguma forma. E ao Bruno Oliveira que é meu irmão do coração. Obrigada pela amizade e por estarem sempre me alegrando!

À minha turma querida de mestrado e minhas catssauras amigas por toda amizade e incentivo.

Ao Franklin Souza pela ajuda na análise dos testes estatísticos.

À plataforma de citometria de fluxo e a disponibilidade da Cynthia e da Daniela para me atenderem sempre que eu necessitei.

Aos colaboradores, Jacenir Santos-Mallet, Leny Toma e Carlos Roberto Alves.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao Programa de Pós-graduação de Biologia Parasitária, por todo suporte que me foi dado nesses dois anos.

Ao Francisco por toda sua competência, por não medir esforços para me ajudar e por ter sido meu braço direito nesse trabalho. Não tenho palavras para agradecer a disponibilidade, parceria, amizade e todo conhecimento que me foi dado. Muito obrigada não apenas por ter me orientado, mas também por ter me escutado e me apoiado, sobretudo, no final dessa dissertação!

À minha orientadora Mirian Pereira, a quem agradeço pela paciência, aprendizado, compreensão, por estar sempre presente, e pelas palavras de incentivo e calma que foram dadas nos momentos que mais precisei. Fico feliz por ter sido orientada por uma pessoa que além de muito profissional e competente é também muito humana. Enfim, só tenho a agradecer por tudo!

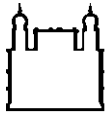
Agradeço aos membros da banca pela gentileza de aceitarem o convite.

Ao CNPq, por todo o auxílio científico, financeiro e material.



**“É preciso força pra sonhar e  
perceber que a estrada vai além  
do que se vê”.**

**(Los Hermanos)**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

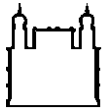
## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise da expressão de proteínas de ligação à heparina em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e seu papel como mediadoras da invasão na célula hospedeira

### RESUMO

Amanda Resende Tucci

A diversidade genética do *Trypanosoma cruzi* influencia diferentes parâmetros biológicos e tem sido apontada como fator importante para o desfecho clínico da doença de Chagas. A expressão diferencial de genes e proteínas entre as diferentes DTUs do *T. cruzi* parece determinar a virulência do parasito e sua capacidade de subverter a resposta imune e persistir no hospedeiro mamífero. Dentre o repertório de moléculas de superfície dos parasitos envolvido no reconhecimento celular, destacamos as proteínas de ligação à heparina (PLHs) que atuam no ciclo de vida de diferentes patógenos intracelulares, incluindo o *T. cruzi*. PLHs desempenham importante papel na citoaderência e entrada do *T. cruzi* através do reconhecimento de proteoglicanos de heparano sulfato (PGHS) na superfície de células de mamíferos. O mecanismo de invasão disparado pela interação PLHs-PGHS, assim como a presença de PLHs em *T. cruzi* de diferentes genótipos (TcI e TcII) ainda não foi elucidado. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de PLHs e glicoproteínas (GPs), gp35/50, gp82 e gp90, envolvidas na invasão de tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCT), tripomastigotas sanguíneos (BT) e metacíclicos (MT) de *T. cruzi* da cepa Y (TcII) e isolado silvestre SMM36 (isolado de espécimes de *Triatoma vitticeps* da região de Santa Maria Madalena, RJ; Zimodema 3), bem como sua atuação nos eventos de internalização destes parasitos. A expressão e localização subcelular de PLHs e GPs em *T. cruzi* foi determinada pela incubação por 1h no gelo de tripomastigotas com 20µg/mL de heparina ou heparano sulfato (HS) conjugados à biotina seguido de processamento para citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. As análises de citometria de fluxo revelaram que tripomastigotas (TCT, BT e MT) de diferentes genótipos (cepa Y e isolado SMM36) possuem uma expressão diferencial de PLHs e GPs em sua superfície. TCTs e BT (cepa Y) possuem elevada expressão de PLHs comparado aos MTs. Cerca de 90% da população de TCTs apresentam marcação positiva para PLHs enquanto apenas 10-25% dos MTs possuem esta proteína expressa na superfície. Em contraste, MTs apresentam níveis mais elevados de gp35/50, gp82 e gp90 comparados aos TCTs. A localização subcelular de PLHs em domínios de sinalização do *T. cruzi* é bastante peculiar. Em TCTs e BT (cepa Y), PLHs estão localizadas na membrana flagelar enquanto as GPs estão distribuídas ao longo do corpo do parasito (TCT e MT), exceto gp90 que é negativa nos TCTs. Ainda, a capacidade invasiva dos parasitos e o papel de proteoglicanos sulfatados foi analisada utilizando células de ovário de hamster chinês competentes (CHO-K1) e mutantes deficientes em glicosaminoglicanos (CHO-745) como modelo experimental de invasão. Os dados quantitativos da infecção revelaram que TCTs (cepa Y e isolado SMM36) são mais infectivos que MTs. TCTs alcançaram um perfil de infecção entre 52-85% após 2h de interação com CHO-K1, de acordo com a razão parasito-célula alvo, enquanto MTs atingiram o máximo de 6% de infecção neste tempo de interação. Embora o percentual de infecção tenha sido similar entre TCTs dos diferentes genótipos, a análise do índice endocítico revelou maior eficiência do isolado SMM36 na invasão, apresentando valores cerca de 40% maior de parasitos interiorizados. Ainda, CHO-745 infectadas com TCT (Y e SMM36) apresentaram redução de aproximadamente 30% nos níveis de infecção quando comparadas a CHO-K1. Este fenômeno não foi observado em MTs mesmo após 24h de interação, cujo percentual de infecção alcançou 37% na maior relação parasito-célula alvo (60:1). Este conjunto de dados sugere que a interação PLHs-PGHS possa disparar vias de sinalização importantes para entrada de parasitos que expressam elevados níveis de PLHs em sua superfície. O mecanismo de invasão mediado pela interação PLHs-PGHS será alvo de futura investigação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Analysis of heparin binding proteins expression in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their role as mediators of host cell invasion**

#### **ABSTRACT**

**Amanda Resende Tucci**

The genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* influences different biological parameters and has been identified as an important factor for the clinical outcome of Chagas' disease. The differential gene and protein expression between different DTUs of *T. cruzi* seems to determine the virulence of the parasite and its capacity to subvert the immune response and persist in the mammalian host. Among the surface molecules repertoire of parasites involved in cell recognition, we highlight the heparin binding proteins (PLHs) acting in the life cycle of different intracellular pathogens, including *T. cruzi*. PLHs play an important role in cytoadherence and entrance of *T. cruzi* by recognizing heparan sulfate proteoglycan (PGHS) in the mammalian cell surface. The mechanism of invasion triggered by PLHs-PGHS interaction, as well as the presence of PLHs in different genotypes (TCI and TCII) of *T. cruzi* has not yet been elucidated. This study aimed to evaluate the expression of PLHs and glycoproteins (GPs), GP35/50, gp82 and gp90, involved in the invasion of cell culture derived trypomastigotes (TCT), bloodstream trypomastigotes (BT) and metacyclics (MT) of *T. cruzi* of Y strain (TCII) and the sylvatic isolate SMM36 (isolated from specimens of *Triatoma vitticeps* from Santa Maria Madalena region, RJ; Zymodeme 3), as well as their role in the events of internalization of these parasites. Expression and subcellular localization of PLHs and GPs in *T. cruzi* was determined by incubation for 1 h on ice of trypomastigotes with 20µg/mL of biotin-conjugated heparin or heparan sulfate (HS) followed by processing for flow cytometry and fluorescence microscopy. The flow cytometry analysis showed that trypomastigotes (TCT, BT and MT) of different genotypes (Y strain and SMM36 isolate) have differential expression of PLHs and GPs on their surface. TCTs and BT (Y strain) have high expression of PLHs compared to MTs. About 90% of TCT population has positive labeling to PLHs while only 10-25% of MTs have expressed this protein on the surface. In contrast, MTs have higher levels of GP35/50, gp82 and gp90 when compared to TCTs. The subcellular localization of PLHs in signaling domains of *T. cruzi* is quite peculiar. In TCTs and BT (Y strain), PLHs are located in the flagellar membrane while GPs are distributed throughout the parasite's body (TCT and MT), except that gp90 is negative in TCTs. Also, the invasive capacity of the parasites, and the role of sulfated proteoglycans were analyzed using wild-type chinese hamster ovary cells (CHO-K1), and its mutant cell line deficient in glycosaminoglycan (CHO-745) as experimental model of invasion. The quantitative data of infection revealed that TCTs (Y strain and SMM36 isolate) are more infective than MTs. TCTs reached a range of infection between 52-85% after 2h of interaction with CHO-K1, according to the parasite- host cell ratio, while MTs reached a maximum of 6% infection at this time of interaction. Although the percentage of infection was similar between TCTs of different genotypes, the analysis of the endocytic index showed higher efficiency of invasion in the SMM36 isolate, showing values about 40% more of internalized parasites. Also, CHO-745 infected with TCT (Y strain and SMM36 isolate) exhibit approximately 30% decrease in infection levels compared to CHO-K1. This phenomenon was not observed in MTs even after 24 hours of interaction, whose percentage of infection reached 37% at the highest parasite-target cell ratio (60: 1). These data suggest that PGHS-PLHs interaction may trigger signaling pathways important for entry of parasites that express high levels of PLHs on its surface. These invasion mechanisms mediated by PLHs PGHS-interaction will be the focus of future research.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Doença de Chagas.....	2
1.2. Agente etiológico, vetor e ciclo biológico.....	6
1.3. Reconhecimento celular e mecanismo de invasão do <i>T. cruzi</i> .....	10
1.3.1. Receptores e ligantes de superfície da célula alvo envolvidos na invasão.....	10
1.3.2. Componentes da superfície do <i>T. cruzi</i> capazes de disparar a invasão.....	16
1.4. Papel de PLHs na interação patógeno-célula hospedeira.....	22
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1 Cultivo celular.....	28
3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	28
3.3 Ensaio de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.....	30
3.4 Extração e dosagem de proteínas.....	32
3.5 Ensaio de eletroforese e Western blotting.....	32
3.6 Interação <i>Trypanosoma cruzi</i> -célula hospedeira.....	33
3.7 Análise estatística.....	34
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>35</b>
4.1 Expressão de glicoproteínas na superfície de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	36
4.2 Localização subcelular de PLHs e GPs em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	41
4.3 Reconhecimento celular: atuação de PLH-PGHS no processo de invasão do <i>T. cruzi</i> .....	48

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Dispersão da doença de Chagas da América Latina para países em diferentes continentes.....	3
Figura 2: Etapas do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
Figura 3: Componentes de superfície da célula de mamíferos envolvidos na internalização do <i>T. cruzi</i> .....	11
Figura 4: Desenho esquemático das moléculas de superfície do <i>T. cruzi</i> .....	17
Figura 5: Análise da expressão de proteínas de ligação à heparina (PLHs) em tripomastigotas de distintas procedências (TCTs, BTs e MTs) da cepa Y e isolado silvestre SMM36.....	37
Figura 6: Análise por citometria de fluxo da expressão de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas de distintas procedências (TCTs, BTs e MTs) da cepa Y e isolado silvestre SMM36.....	38
Figura 7: Análise da expressão de gp82 em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> por Western blotting.....	39
Figura 8: Expressão de gp90 em formas tripomastigotas de distintas procedências.....	40
Figura 9: Distribuição espacial de proteínas de ligação à heparina (PLHs) em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> da cepa Y.....	42
Figura 10: Localização subcelular de proteínas de ligação à heparina (PLHs) em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> do isolado silvestre SMM36.....	43
Figura 11: Detecção de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs), cepa Y, por Imunofluorescência indireta.....	44
Figura 12: Localização subcelular de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y.....	45
Figura 13: Distribuição espacial de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) do isolado silvestre SMM36.....	46
Figura 14: Visualização de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas metacíclicos (MTs) do isolado SMM36.....	47
Figura 15: Participação de proteoglicanos sulfatados da célula hospedeira nos eventos de internalização de tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) em células de ovário de hamster competentes (CHO-K1) e deficientes em glicosaminoglicanos (CHO-745).....	49

Figura 16: Aspecto geral de culturas de células de ovário de hamster competentes (CHO-K1) e deficientes em glicosaminoglicanos (CHO-745) infectadas por tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) da cepa Y	50
Figura 17: Interação de tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) do isolado SMM36 com células CHO-K1 e CHO-745	51
Figura 18: Papel de proteoglicanos sulfatados da célula hospedeira no processo de invasão de tripomastigotas metacíclicos (MTs) em células CHO-K1 e CHO-745	52
Figura 19: Imagens de microscopia de luz de células CHO-K1 e CHO-745 após interação com tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y	53
Figura 20: Interação de tripomastigotas metacíclicos (MTs) do isolado silvestre SMM36 com CHO-K1 e CHO-745	54
Figura 21: Perfil de infecção de células CHO-K1 e CHO-745 após interação com tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y e isolado SMM36	55
Figura 22: Aspecto geral da interação de culturas CHO-K1 e CHO-745 com tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y	56
Figura 23: Micrografia de microscopia de luz da interação de tripomastigotas metacíclicos (MTs) do isolado silvestre SMM36 com células CHO-K1 e CHO-745	57
Tabela 1: Índice endocítico (IE) de CHO-K1 e CHO-745 infectadas com tripomastigotas de distintas procedências	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BSA – albumina de soro bovino
- B<sub>2</sub>R/B<sub>1</sub>R – receptores de bradicinina
- BT – tripomastigotas sanguíneos
- BZ – benzonidazol
- CCC – cardiomiopatia chagásica crônica
- CHO-K1 – células de ovário de hamster competentes
- CHO-745 – células de ovário de hamster deficientes em glicosaminoglicanos
- CS – condroitim sulfato
- Cz – cruzipaina
- DABCO – 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano-trietilenodiamina
- DAPI – 4,6-diamino-2-fenilindol
- DMEM – meio Eagle modificado por Dulbecco
- DS – dermatam sulfato
- DTUs – unidades discretas de tipagem
- FAK – quinase de adesão focal
- GAG – glicosaminoglicano
- GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GIPL – glicoinositolfosfolípideo
- GPI – glicosilfosfatidilinositol
- gp35/50 – glicoproteínas semelhantes à mucina de 35 kDa a 50 kDa
- gp82 – glicoproteína de 82kDa
- gp 90 – glicoproteína de 90kDa
- HBBA – hemaglutininas de ligação à heparina
- Hep – heparina
- HS – heparam sulfato
- LDL - lipoproteínas de baixa densidade
- MASP – proteínas de superfície associadas à mucina
- MEC – componentes de matriz extracelular
- MT– tripomastigotas metacíclicos
- Nfx – nifurtimox
- OPB – oligopeptidase B
- PCR – reação em cadeia de polimerase



PDNF – fator neurotrófico derivado da superfície do parasito  
PGHS – proteoglicano de heparam sulfato  
PFA – paraformaldeído  
PI3-K – fosfatidilinositol 3-quinase  
PKC – proteína quinase C  
PLC – fosfolipase C  
PLH – proteína de ligação a heparina  
p175 – proteína tirosina quinase  
QS – queratam sulfato  
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio  
SFB – soro fetal bovino  
SMM36 – isolado silvestre de Santa Maria Madalena  
TCT – tripomastigotas derivados de cultivo celular  
TGF- $\beta$  – fator de crescimento e transformação beta  
TGF $\beta$ RI – receptor de TGF- $\beta$  tipo 1  
TGF $\beta$ RII – receptor de TGF- $\beta$  tipo 2  
TLR – receptor do tipo Toll  
TRK – receptores tirosina quinases  
TS – trans-sialidases  
Z3 – zimodema III

# INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

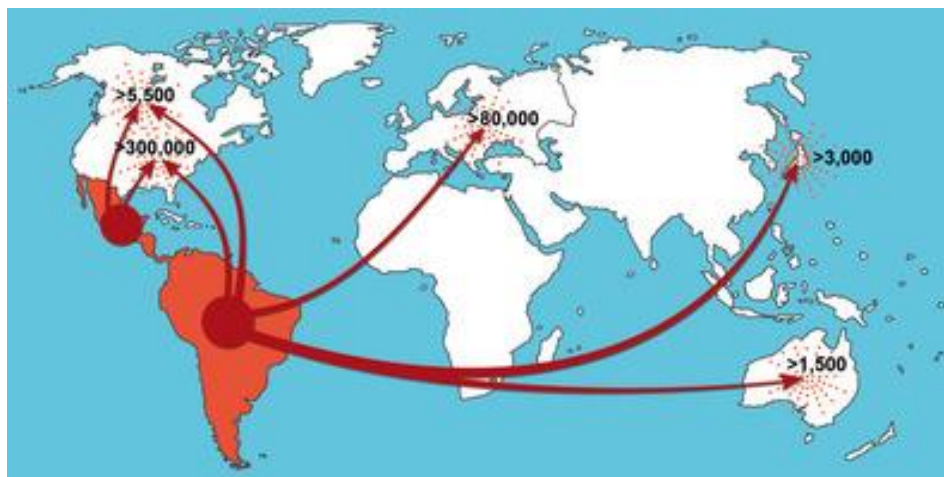
## 1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, foi primeiramente descrita pelo médico sanitarista Carlos Chagas em 1909 no Brasil. Por milhões de anos a parasitose existiu nas Américas Central e do Sul como uma enzootia cuja participação de insetos vetores garantia a disseminação do parasito entre animais silvestres do continente. No entanto, com a chegada dos humanos nas Américas e a rápida conversão do habitat natural do vetor decorrente das modificações antrópicas, criaram oportunidades para o parasito ser transmitido entre animais domésticos e humanos, e tornar-se assim uma antropozoonose endêmica. (Bonney 2014; Coura & Viñas, 2010). Dados da literatura reportaram que os tripanossomos ancestrais do *T. cruzi* eram parasitos monoxênicos de insetos não hematófagos que sofreram intensas modificações morfológicas em decorrência da mudança de hábito do vetor, de modo a se estabelecer nos hospedeiros mamíferos. Embora essa infecção tenha sido identificada em múmias de 9000 anos de idade (Aufderheide et al., 2004), a intensificação de casos de doença de Chagas foi reportada, sobretudo, nos últimos três séculos (Aragão, 1983; Coura, 2007).

Estimativas epidemiológicas recentes indicam que cerca de 6-7 milhões de indivíduos encontram-se infectados no mundo e que aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção (Hotez et al., 2008; WHO, 2015). Diante desse cenário, um índice de 14 mil mortes tem sido registrado somente na América Latina e, embora a taxa anual da doença no Brasil tenha sofrido drástica redução após a implementação de campanhas para o controle vetorial, acredita-se que aproximadamente 4 milhões de pessoas estejam infectadas no país (Martins-Melo et al., 2014; Petherick, 2010). Essa estimativa pode ser maior devido aos casos assintomáticos ocorrentes na doença de Chagas (revisto por Pereira e Navarro, 2013).

Nas últimas décadas, a doença considerada endêmica na América Latina tornou-se globalizada com relatos de casos nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Japão e Austrália (*figura 1*) devido ao intenso processo migratório de indivíduos infectados para essas áreas (Coura & Viñas, 2010). A infecção

nesses países é adquirida principalmente por transfusão sanguínea, transmissão vertical e mais raramente por transplantes de órgãos, tornando-a um problema de saúde pública global (Bonney, 2014; Gascon et al., 2014).



**Figura 1:** Dispersão da doença de Chagas da América Latina para os países em diferentes continentes. Em vermelho são representados o fluxo migratório e o número total estimado de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em áreas não endêmicas da doença. Imagem retirada do artigo de Coura & Viñas, 2010.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada por afetar primariamente populações de baixa renda e assim, comprometer a qualidade de vida e a produtividade de trabalhadores, fato esse que reflete na perda econômica de aproximadamente 1,2 bilhões de dólares na América Latina anualmente (Dumonteil et al., 2012; Lee et al., 2010). Diante do quadro crítico enfrentado por esses países, medidas de controle foram iniciadas e, a partir de 1991, a extinta Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) assumiu o controle de todas as doenças endêmicas, e juntamente com o surgimento do programa Iniciativa do Cone Sul, controlaram o vetor domiciliar *Triatoma infestans* e os casos de infecção ocasionados por transfusão sanguínea. Assim, os países da América do Sul como Brasil, Uruguai e Chile receberam o certificado da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), sendo declarada uma área livre da transmissão vetorial pelo *T. infestans* (Bonney, 2014; revisto por Pereira & Navarro, 2013; Schofield et al., 2006). Contudo, estudos recentes indicam o importante papel epidemiológico dos vetores secundários nestas áreas, como é

o caso do *Triatoma maculata* na Colômbia (Cantillo-Barraza et al., 2014) e do *Triatoma vitticeps* no Brasil (Souza et al., 2011).

Surtos de infecção oral pelo *T. cruzi* nas regiões Amazônica e Sul do Brasil tem sido foco de atenção para uma possível reemergência da doença nos últimos anos (Yoshida, 2009). O cenário atual de controle da expansão da doença envolve iniciativas governamentais e privadas que visam (i) reduzir os casos de transmissão oral do *T. cruzi* através de métodos de identificação e prevenção dessa via de contaminação pela inserção de programas de educação em saúde pública, (ii) desenvolver testes e tratamentos para adolescentes antes da gravidez e mulheres em idade reprodutiva a fim de reduzir os casos de transmissão vertical, (iii) facilitar a comercialização de testes de alta qualidade para triagem de sangue e órgãos, bem como preparar profissionais de saúde para reconhecer potenciais fontes de infecção, (iv) acelerar a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos contra doenças tropicais (Tarleton et al., 2014). Estas medidas estão sendo desenvolvidas pela Fundação Bill e Melinda Gates associada a 13 empresas farmacêuticas, com apoio da OMS, um projeto denominado Declaração de Londres que visa erradicação de 10 doenças tropicais negligenciadas até 2020, incluindo a doença de Chagas.

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases clínicas, uma inicial ou aguda, que dura de 1 a 2 meses, caracterizada por replicação intracelular do parasito, intensa parasitemia e sintomas clínicos não-específicos como febre, lesão inflamatória no local de entrada do *T. cruzi* (chagoma), hepatoesplenomegalia, mialgia, exantema em ambas as pernas, edema de rosto e membros inferiores e convulsões (Valente et al., 2008). É relevante considerar que ocorre morte em torno de 2-6% dos casos, ocasionada por miocardite e meningoencefalite, e também que a mortalidade pode ser dependente da cepa do parasito, da dose de inoculação e da imunidade do indivíduo (Carabarin-Lima et al., 2013; Sanches et al., 2014). Durante a fase aguda da infecção, a resposta imune mostra-se efetiva para o controle da carga parasitária no hospedeiro vertebrado, no entanto, ainda pode-se identificar sua persistência em diversos tecidos do hospedeiro (Nagajyothi et al., 2012; Tarleton, 2001; Zhang & Tarleton 1999).

Passado a fase aguda, a maioria dos indivíduos ingressa em uma fase crônica indeterminada que se caracteriza por sorologia positiva e ausência de sintomas. Contudo, cerca de 30% dos casos indeterminados podem se tornar sintomáticos com pacientes apresentando distúrbios cardíacos e/ou digestivos e, menos frequente, neurológicos (Rassi et al., 2000; revisado por Higuchi et al., 2003). A cardiomiopatia é a principal manifestação crônica consistindo de miocardite, destruição tissular, fibrose e resultando em dilatação ventricular. Arritmias cardíacas também podem ser ocasionadas devido à fibrose cardíaca, e assim os indivíduos que apresentam essa sintomatologia tornam-se mais susceptíveis a terem embolia, aumentando a probabilidade dos portadores de doença de Chagas desenvolverem isquemia, doença cerebrovascular e acidente vascular cerebral (Paixão et al., 2009; Sambiasi et al., 2010). A incapacidade laboral e mortalidade geradas pela tripanossomíase americana se devem, principalmente, a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), sendo atualmente a principal causa de insuficiência cardíaca em países da América do Sul (Bocchi 2013).

Um aspecto interessante observado durante a infecção crônica da doença é a presença de células inflamatórias no miocárdio. Os primeiros estudos sugeriam que a patologia poderia ser decorrente da autoimunidade após décadas da infecção, uma vez que técnicas histológicas mostravam ausência de ninhos de amastigotas no tecido avaliado (Engman & Leon 2002; Fernandes e Andrews, 2012; Leon et al., 2001). No entanto, a detecção pela reação em cadeia de polimerase (PCR) de antígenos do parasito nos tecidos de animais infectados e a reagudização da infecção em pacientes portadores da doença crônica imunocomprometidos ou que administram imunossupressores, determinam que a persistência do parasito influencia diretamente a progressão da patogênese nesses indivíduos (Diazgranados et al., 2009; Gutierrez et al., 2009; Lattes & Lasala, 2014; Nagajyothi et al., 2012).

O tratamento terapêutico para doença de Chagas ainda é considerado um grande desafio nos dias atuais, estando restrito apenas ao uso de dois fármacos, o nifurtimox (Nfx – produzido pela Bayer) e o benznidazol (BZ- produzido pela LAFEPE) que atuam com maior eficiência na fase aguda da doença (Coura & Borges-Pereira, 2012; Dias et al., 2014; Rassi et al., 2012). A taxa de cura parasitológica para essas drogas mostra-se variável com a fase

da doença, dose, idade, origem geográfica e duração de tratamento (Santamaria et al., 2014). Dados da literatura demonstraram que o uso contínuo de BZ e Nfx atinge cura de 60% de todos os casos agudos de Chagas e essa taxa se limita para apenas 10-20% dos indivíduos crônicos sintomáticos (Altcheh et al. 2011; Bern, 2011; revisto por Bonney, 2014). Para as crianças, além da utilização desses medicamentos ser mais tolerada e efetiva, as taxas de cura alcançam cerca de 70% para os casos agudos da doença de Chagas, com taxas superiores a 90% para casos de infecção congênita se o tratamento for realizado durante os primeiros cinco anos de vida (Altcheh et al., 2005; Bern et al., 2007; revisto por Bonney, 2014). Além do efeito limitado, o BZ e o Nfx acarretam uma série de efeitos secundários graves que incluem intolerância digestiva, hepatite, neuropatia periférica e erupção que faz com que pacientes não cheguem ao término do tratamento. Outro fator que compromete sua continuidade é o acentuado custo econômico que impede que esses medicamentos sejam disponibilizados para os pacientes que vivem nas áreas mais pobres que, por sua vez, são as maiores vítimas dessa enfermidade. Contudo, é importante considerar que muitos pacientes na fase aguda da infecção desconhecem seu quadro clínico o que impossibilita o uso dessas drogas em estágios iniciais da doença. Diante do cenário atual, o desenvolvimento de vacinas utilizando antígenos, como TSA-1 e Tc-24, e novas drogas tripanocidas se fazem necessárias, uma vez que se prioriza reduzir os efeitos de toxicidade, expandir o público-alvo (utilização de vacina em gestantes, por exemplo) e aumentar a disponibilidade do medicamento, para desta forma minimizar, ou até mesmo curar, a patologia em indivíduos portadores do *T. cruzi* em distintos estágios de desenvolvimento da doença (Carabarin-Lima et al., 2013; Dumonteil et al., 2012; revisto por Bonney, 2014).

## **1.2. Agente etiológico, vetor e ciclo biológico**

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que pertence ao reino Protista, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (ADL et al., 2012). Assim como os demais tripanosomatídeos, esse parasito é caracterizado por apresentar mitocôndria única com uma área dilatada onde se concentra o DNA

mitocondrial chamada cinetoplasto e cuja localização se dá próximo ao flagelo único desse parasito, variando de acordo com o estágio de desenvolvimento apresentado no ciclo de vida (De Souza et al., 2002; Rodrigues et al., 2014). O *T. cruzi* é considerado um parasito heteroxênico por necessitar de dois hospedeiros, invertebrado e vertebrado, para completar seu ciclo evolutivo. Assim, durante a transmissão natural há participação de um inseto vetor, os triatomíneos, que durante o repasto sanguíneo expelem juntamente com suas fezes e urina, as formas infectivas do parasito (Rodrigues et al., 2014). Ainda, relatos de infecção oral foram evidenciados através da ingestão de bebidas e alimentos contaminados decorrentes da trituração de triatomíneos e/ou da eliminação de formas metacíclicas no excremento desses insetos (Pereira et al., 2009). Todavia, outros casos de infecção foram reportados e mostram-se independentes da participação de um hospedeiro invertebrado, como é o caso da transfusão sanguínea, do transplante de órgãos, da transmissão congênita, dos acidentes de laboratório, da ingestão de carnes contaminadas obtidas pelas atividades de caça ou pelo contato com a urina de gambás. (Gutierrez et al., 2009).

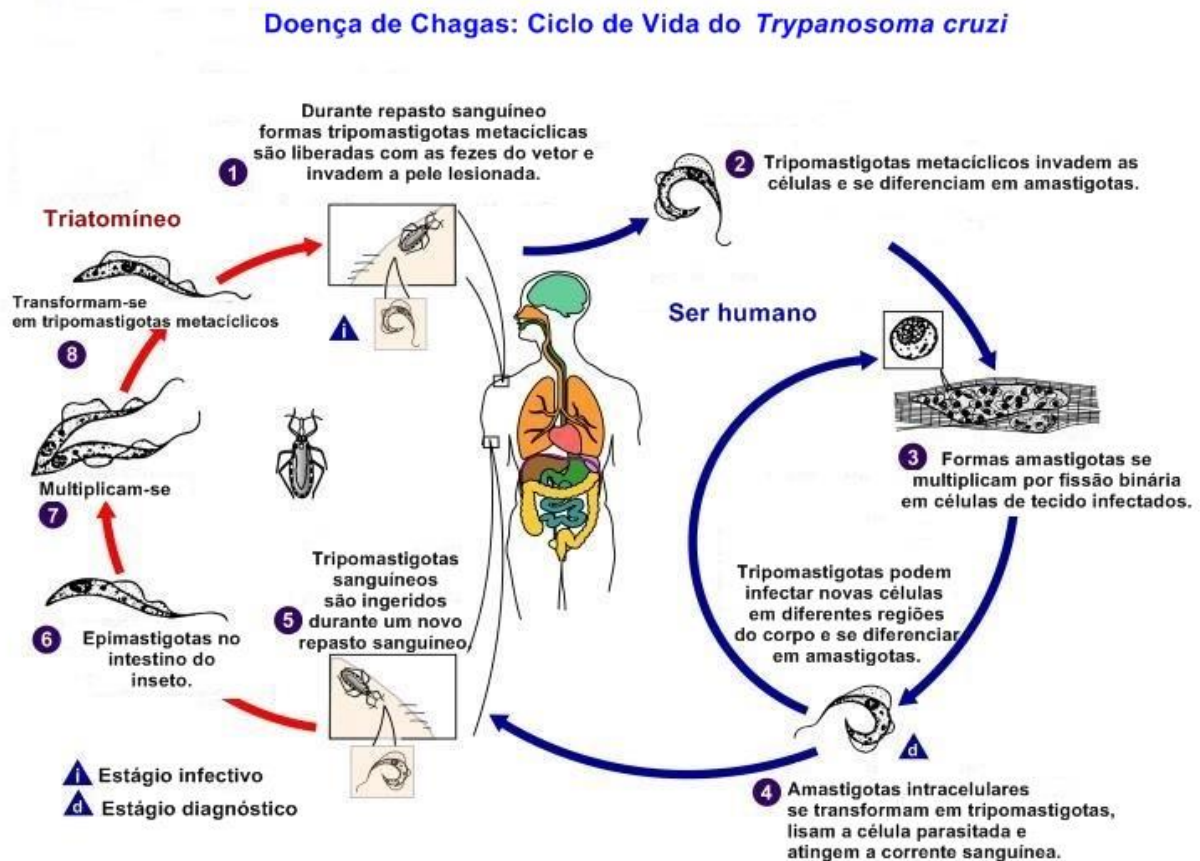
Os triatomíneos são hemípteros pertencentes à família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, popularmente chamados de barbeiros. Dentre as 146 espécies de triatomíneos descritas, cerca de 70 estão naturalmente infectadas pelo *T. cruzi*, no entanto, apenas sete são considerados os principais vetores da doença: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (Argolo et al., 2008; Gurgel-Goncalves, et al., 2012). A dinâmica da população desses vetores é fortemente influenciada pela paisagem e ação antrópica e, desta forma, os distúrbios gerados no habitat desses insetos podem aumentar significativamente a sua abundância e distribuição, permitindo a domiciliação de barbeiros, bem como os riscos de transmissão da doença (Gottdenker et al., 2011; Grijalva et al., 2014). Cabe acrescentar ainda, que a relação entre *T. cruzi*-vetor é muito complexa e envolve a participação de inúmeros componentes de superfície do parasito e das células intestinais do inseto, e que essa interação medeia o estabelecimento e desenvolvimento de formas epimastigotas do *T. cruzi* no trato gastrointestinal dos triatomíneos (Boulanger et al., 2006; Castro et al., 2012; Oliveira-Jr et al., 2012a).



Durante o ciclo de vida, o parasito apresenta três estágios evolutivos distintos – epimastigota, tripomastigota e amastigota - que podem ser identificados de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região de emergência do flagelo (De Souza, 2002; Rodrigues et al., 2014). Os epimastigotas são formas flageladas que se replicam no intestino do inseto vetor, caracterizadas por apresentar o cinetoplasto em forma de bastão e bolsa flagelar posicionados anteriormente ao núcleo. Tripomastigota e amastigota, por sua vez, são encontrados nos hospedeiros mamíferos, sendo o primeiro também evidenciado no trato intestinal do vetor na sua forma metacíclica, e diferem: (i) quanto à capacidade replicativa; (ii) infectividade; e (iii) morfologia. Assim, enquanto o primeiro não se replica, é altamente infectivo, possui morfologia alongada e cinetoplasto arredondado situado posterior ao núcleo; o segundo apresenta morfologia arredondada, menor capacidade infectiva, replicação intracelular e possui o cinetoplasto em forma de bastão anterior ao núcleo (De Souza, 2008; Dias e Coura, 1997; Ley et al., 1988).

No ciclo de vida, formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas durante o repasto sanguíneo do vetor triatomíneo que se alimentam do hospedeiro mamífero infectado. Essas formas não replicativas do *T. cruzi* se diferenciam em epimastigotas e após adesão ao epitélio do trato intestinal do inseto e multiplicação por fissão binária, se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas não replicativas, as quais são liberadas durante um novo repasto sanguíneo com as fezes e urina do vetor. No hospedeiro vertebrado, essas formas infectivas depositadas no sítio de infecção penetram através da área lesionada pela picada do barbeiro ou fissuras na pele, gerando assim uma inflamação local chamada de Chagoma de inoculação (Romaña & Meyer, 1942). Além disso, a penetração pode ocorrer por meio das mucosas, principalmente ocular, sendo denominado sinal de Romaña. Uma vez atravessada essa barreira inicial, tripomastigotas metacíclicos invadem as células hospedeiras, escapam do vacúolo parasitóforo, se diferenciam em amastigotas e após sofrerem sucessivas divisões intracelulares, se rediferenciam em tripomastigotas, lisam a célula e atingem células adjacentes ou a corrente sanguínea, podendo assim infectar distintos tecidos ao longo do corpo humano ou mesmo serem ingeridos pelo inseto durante o novo repasto sanguíneo (*figura 2*). É importante ressaltar que todas as células de mamífero podem ser infectadas pelo *T. cruzi*, sendo

reportado um tropismo deste parasito por células musculares, principalmente cardíacas (Andrade et al., 2010; Melo & Brener 1978), e ainda invasão de células do sistema nervoso central e periférico, células vasculares, células do sistema reticuloendotelial e adipócitos, sendo o tecido adiposo considerado um relevante sítio de infecção do parasito, bem como de evasão do sistema imune do hospedeiro (Andrade & Silva 1995; Ferreira et al., 2011; Machado et al., 2012).



**Figura 2: Etapas do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** (1) Transmissão do parasito através do repasto sanguíneo; (2) Invasão de tripomastigotas metacíclicos na célula de mamífero; (3) Formas amastigotas se multiplicam por divisão binária; (4) Após rediferenciação do parasito, a célula hospedeira é rompida por tripomastigotas; (5) Na corrente sanguínea as formas infectivas do *T. cruzi* pode ser ingerida por triatomíneos; (6 e 7) Proliferação de epimastigotas no trato digestivo do inseto vetor; (8) Formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas através das fezes e urina do barbeiro. Retirado e adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Além de apresentar diferentes formas de desenvolvimento, o *T. cruzi* possui uma acentuada diversidade genética entre as cepas e isolados circulantes na natureza e, diante disso, as populações do parasito foram classificadas inicialmente como duas populações filogeneticamente distintas: TcI e TcII (Zingales et al., 2009). Posteriormente, uma terceira linhagem foi

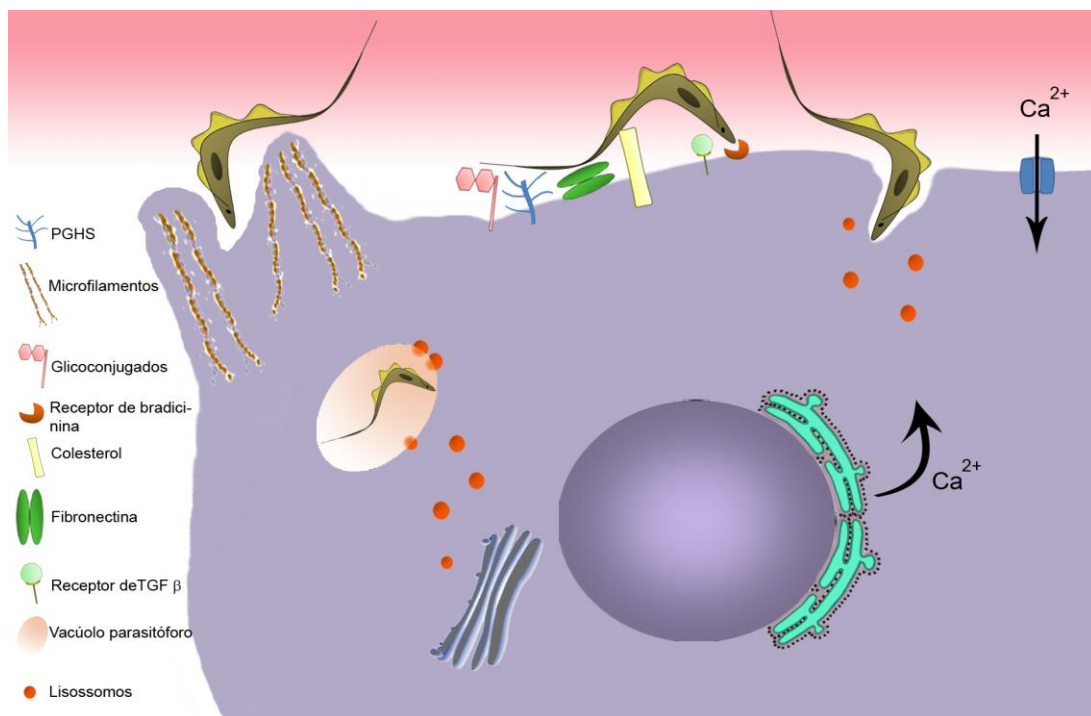
descrita e nomeada como Zimodema III (Z3), a qual foi caracterizada por representar os isolados híbridos do *T. cruzi* participantes do ciclo silvestre da Amazônia (Brandão & Fernandes, 2006). Passados anos de estudos e considerando a heterogeneidade populacional do parasito, uma nova classificação foi estabelecida e atualmente, este protozoário está inserido em seis unidades discretas de tipagem (DTUs), TcI-TcVI, os quais apresentam marcadores moleculares e imunológicos em comum. Segundo alguns autores, o *T. cruzi* I é a DTU mais difundida na Amazônia brasileira, Venezuela, Colômbia, Américas Central e do Norte, sendo assim responsáveis pela maioria dos casos cardíacos relatados em pacientes agudo e crônico da doença de Chagas (Monteiro et al., 2012; Zingales et al., 2009). Ainda, Zingales e colaboradores (2014) abordam que as cepas pertencentes aos grupos TcII, TcV e TcVI têm sido associadas a muitos casos de infecção humana na região do Cone Sudeste da América do Sul, incluindo assim as regiões Central e Atlântica do Brasil. Cabe ser acrescentado ainda, que o TcIII encontra-se principalmente associado ao ciclo silvestre no Brasil e países adjacentes, com raros casos de infecção em humanos, mas com evidências de transmissão principalmente pela infecção oral; e que o TcIV pode ser documentado em infecções humanas na Venezuela (Zingales et al., 2012). Considerando que o entendimento da genética e diversidade do parasito atue como uma importante ferramenta na compreensão do comportamento biológico e evolutivo desse protozoário, tal como na epidemiologia, o estudo taxonômico assume um papel de suma importância na busca do diagnóstico e tratamento da doença de Chagas (Santana et al., 2014), sendo também importante ressaltar que o poliparasitismo por *T. cruzi* e coinfeção com outros agentes patogênicos podem interferir com o fracasso das intervenções terapêuticas (Perez et al., 2014).

### **1.3. Reconhecimento celular e mecanismo de invasão do *T. cruzi***

#### **1.3.1. Receptores e ligantes de superfície da célula alvo envolvidos na invasão**

Para uma infecção bem sucedida, inicialmente é necessário que haja o reconhecimento e adesão entre moléculas presentes na superfície do *T. cruzi* e

da célula alvo, consistindo em uma etapa crucial no processo de invasão e desenvolvimento intracelular do parasito (figura 3). Os componentes de superfície celular presentes em células de mamíferos podem atuar como receptores e/ou ligantes nessa interação, e são representados por distintas classes de moléculas, como por exemplo, carboidratos de glicoconjugados contendo resíduos galactosil, manosil e sialil que participam do processo de citoaderência do *T. cruzi* (Barbosa e Meirelles, 1992, 1993). Proteínas do tipo lectina, como galectina-3, também se ligam a uma mucina de 45 kDa localizada na superfície de tripomastigotas (revisto por Barrias et al., 2013). Cabe acrescentar que além dessa função, galectinas também foram identificadas mediando a conexão entre laminina e as formas infectivas do parasito, facilitando assim sua ligação e internalização em células humanas (Kleshchenko et al., 2004; Moody et al., 2000; revisto por Barria et al., 2013).



**Figura 3. Componentes de superfície da célula de mamíferos envolvidos na internalização do *T. cruzi*.** A interação de ligantes do parasito com receptores da célula alvo podem disparar distintas vias de sinalização que induzem a liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular em ambas as células. Note que os mecanismos de invasão utilizados podem ser dependentes de lisossomos e/ou dependente de citoesqueleto de actina. Além disso, a imagem também retrata a participação de lisossomos na constituição do vacúolo parasitóforo. (Lipoproteínas de baixa densidade - LDL; Proteoglicanos de heparano sulfato - PGHS). Imagem retirada do artigo de Calvet e colaboradores, 2012.

Evidências demonstraram a participação de componentes de matriz extracelular (MEC) – fibronectina, laminina-1, colágeno e heparam sulfato – no reconhecimento e entrada do *T. cruzi* em células hospedeiras. Fibronectina, uma glicoproteína de alto peso molecular encontrada na superfície de células de mamíferos, é reconhecida por receptores de membrana do *T. cruzi* e o bloqueio desta interação receptor-ligante, através de anticorpos anti-fibronectina, reduzem a internalização do parasito, sugerindo que essa molécula desempenha importante papel no sítio de entrada desse patógeno (Ouaisi et al., 1984). É importante ressaltar que esta interação é mediada pelo domínio RGD (Arg-Gly-Asp) na estrutura da fibronectina, o qual é reconhecido pelo parasito disparando sua entrada na célula alvo (Calvet et al., 2004; Pierschbacher e Ruoslahti, 1984). A interação de componentes da superfície do parasito com laminina e colágeno parece favorecer a passagem por barreiras como matriz extracelular e lamina basal (Giordano et al., 1994; Ortega-Barria & Pereira 1991; Ulrich et al., 2002). Estudos recentes revelaram que a adesão de tripomastigotas à fibronectina e laminina promove desfosforilação de proteínas do citoesqueleto do parasito, principalmente  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina e proteínas da região paraflagelar, sugerindo que a transdução de sinal mediada pela interação de MEC com o flagelo do parasito esteja envolvida na entrada do *T. cruzi* (Mattos et al., 2012, 2014).

Outro componente de matriz extracelular, os proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS), proteínas transmembranas (principalmente membros da família sindecan) com longas cadeias de polissacarídeos constituídas de unidades repetidas do dissacarídeo N-acetilglicosamina e ácido urônico, desempenham importante papel no reconhecimento e disparo da invasão do *T. cruzi* em células de mamíferos (Calvet et al., 2003; Ortega-Barria & Pereira, 1991). A remoção de PGHS da superfície celular pela atividade de heparinase II ou ainda o pré-tratamento de tripomastigotas e amastigotas com heparam sulfato (HS) ou heparina solúvel, glicosaminoglicanos (GAGs) estruturalmente similares que diferem no grau de sulfatação, inibe a entrada destes parasitos em cardiomiócitos (Bambino-Medeiros et al., 2011; Calvet et al., 2003; Oliveira Jr. et al., 2008). Além disso, a invasão de tripomastigotas é reduzida em células de ovário de hamster (CHO) deficientes em GAGs (CHO-745) quando comparada ao perfil de infecção de células CHO competentes (CHO-K1)

(Ortega-Barria & Pereira 1991). Embora a carga negativa do HS seja importante na etapa de aproximação inicial do parasito, ensaios de competição com fragmentos da cadeia de HS (N-sulfatado, N-sulfatado/N-acetilado e N-acetilado) demonstraram o importante papel da região N-acetilada/N-sulfatada na entrada do *T. cruzi*. Ainda, é relevante ressaltar a especificidade do reconhecimento HS-ligante da superfície do parasito no disparo da invasão em células de mamíferos, uma vez que outras classes de GAGs sulfatados, que são polissacarídeos compostos por unidades repetidas de dissacarídeos, incluindo condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e queratam sulfato (QS) ou mesmo, a remoção de CS pela enzima condroitinase ABC não foram capazes de inibir a invasão do *T. cruzi* (Calvet et al., 2003; Oliveira Jr. et al., 2008). Interessantemente, GAGs como HS e CS também medeiam a adesão de epimastigotas às células epiteliais do trato intestinal de *Rhodnius prolixus*, sendo este reconhecimento receptor-ligante importante nos diferentes estágios evolutivos do parasito (Oliveira Jr. et al., 2012a).

O envolvimento de lipídeos também tem sido reportado nos eventos de invasão em células hospedeiras. Estudos evidenciaram que microdomínios da membrana plasmática enriquecidos em colesterol, esfingolipídios, gangliosídeo GM1 e ainda caveolinas, proteínas constituintes de cavéolas, estão implicados no processo de invasão do *T. cruzi* em macrófagos (Barrias et al., 2007), células epiteliais (Fernandes et al., 2007) e cardiomiócitos (Hissa et al., 2012). Ainda, receptores de LDL e fosfatidilinositol, componentes da membrana celular, favorecem a internalização do *T. cruzi* e a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos da célula alvo (Nagajyothi et al., 2011). É importante considerar que a elevada afinidade apresentada entre lipoproteínas e o parasito (Nagajyothi et al., 2011; Prioli et al., 1990) e, a habilidade que amastigotas têm de sequestrar LDL e seu receptor (LDLr) desencadeia o acúmulo destas moléculas no tecido cardíaco infectado, o que tende a alterar a homeostase de lipídeos intracelulares do coração e, conseqüentemente, contribuir com a patogênese da doença de Chagas (Johndrow et al., 2014; Nagajyothi et al., 2011). Além disso, estes componentes disparam vias de sinalização que induzem o recrutamento de lisossomos para a periferia celular (Nagajyothi et al., 2011; Wilkowsky et al., 2001), sendo recentemente reportado

que lisossomos presentes na região cortical são preferencialmente recrutados neste processo de invasão (Hissa & Andrade 2015).

Outros componentes da célula hospedeira foram descritos como protagonistas nos eventos de invasão do *T. cruzi*, incluindo integrinas (Fernández et al., 1993), os receptores TrKA e TrKC, e a ativação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K). Estudos prévios têm demonstrado a interação do parasito com os receptores tirosina quinases, TrKA e TrKC, de neurônios e células gliais, capazes de induzir a internalização do parasito nestas células (de Melo-Jorge et al., 2007; Weinkauff et al., 2011). Recentemente, esses mesmos receptores foram identificados na superfície de cardiomiócitos (Meloni et al., 2010) e fibroblastos cardíacos de camundongos neonatos e adultos (Aridgides, 2013), favorecendo assim o acesso deste protozoário ao coração. Contudo, Aridgides e colaboradores (2013) reportaram que a invasão do tripanossomo nestas células ocorre preferencialmente via receptor TrKC e que o seu contato com o fator neurotrófico derivado da superfície do parasito (PDNF) favorece a entrada do *T. cruzi* em células musculares cardíacas.

A ativação de PI3-K na célula hospedeira, mencionado acima na ativação de receptores tirosina quinase, foi inicialmente apontada como uma relevante ferramenta de invasão utilizada pelo *T. cruzi*. Estudos sobre a atuação dessa enzima na internalização do parasito em macrófagos, onde foi realizado tratamento com wortmanina (inibidor da via de PI3-K), revelou uma redução dose-dependente na entrada de tripomastigotas nessas células (Todorov et al., 2000). Além disso, outros estudos com macrófagos demonstraram a presença de PI3-K e de filamentos de actina no sítio de internalização do parasito na célula alvo (Vieira et al., 2002). Evidências ainda demonstraram que a ativação dessa via por tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCT) em células não fagocíticas desencadeou a entrada do *T. cruzi* através de mecanismos dependentes de lisossomos (revisto por Maeda et al., 2012; Woolsey et al., 2003). Este conjunto de dados sugere o envolvimento de PI3-K em mecanismos de invasão dependente e independente do citoesqueleto.

A entrada do *T. cruzi* também é mediada pela ativação da via de sinalização do fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) (Ming et al., 1995; revisto por Calvet et al., 2012; Waghabi et al., 2005). Pertencente a uma

família multifuncional de proteínas, o TGF- $\beta$  regula diversos processos celulares como a proliferação, diferenciação, morfogênese, homeostase e regeneração tecidual (revisto por Massagué, 2012), e seus efeitos são mediados através da ligação com dois tipos de receptores funcionais - receptor de TGF- $\beta$  tipo 1 e tipo 2 (TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII, respectivamente) - que são componentes transmembranares, do tipo serino/treonina quinase, mediadores da transdução de sinais intracelulares (revisto por Zhao & Chen 2014). É interessante salientar que esses receptores são responsáveis pela fosforilação de moléculas transdutoras, denominadas Smads, as quais atuam como intermediárias nesse evento de sinalização. Portanto, para essa via ser ativada, o TGF- $\beta$  latente se liga ao TGF $\beta$ RII na superfície da célula alvo e, após ativação recruta e fosforila TGF $\beta$ RI que, por sua vez, interage com Smads que são translocadas para o núcleo celular, onde se ligam ao DNA, e regulam a transcrição de genes específicos (Ramos-Mondragón et al., 2008; revisto por Zhao & Chen 2014). Este mecanismo de invasão do *T. cruzi* ainda não foi completamente elucidado, mas a participação PGHS na ativação de vias de sinalização de diferentes fatores de crescimento (Matsuo & Kimura-Yoshida 2013; Nigam & Bush 2014), incluindo sua associação com TGF- $\beta$  latente (Chen et al., 2007; Parsi et al., 2010), sugere que estes componentes de matriz extracelular estejam envolvidos neste processo. Inibidores da via de sinalização do TGF- $\beta$  (SB-431542) são capazes de reduzir a infecção pelo *T. cruzi* em cardiomiócitos através do bloqueio da via de sinalização de Smad2 (Waghabi et al., 2007). A administração oral do inibidor de TGF- $\beta$  (GW788388) inibiu a fibrose no modelo murino de infecção experimental com *T. cruzi* (de Oliveira et al., 2012), sendo esta via atualmente alvo para terapia da doença de Chagas (Araújo-Jorge et al., 2012; Saraiva et al., 2013).

Os receptores de bradicinina (B<sub>2</sub>R/B<sub>1</sub>R) também foram reportados participando da entrada de tripomastigotas em células hospedeiras (Todorov et al., 2003). Neste mecanismo de invasão, a cruzipaina, uma cisteíno protease expressa pelo *T. cruzi*, proteoglicanos de heparan de sulfato (PGHS) e cininogênio, atuam em conjunto a fim de promover a liberação de cinina (revisto por Calvet et al., 2012). Uma vez secretada, esta protease pode se ligar aos receptores B<sub>1</sub>R (expressos em tecidos lesionados) e/ou B<sub>2</sub>R (expressos em células cardiovasculares) que se encontram acoplados a



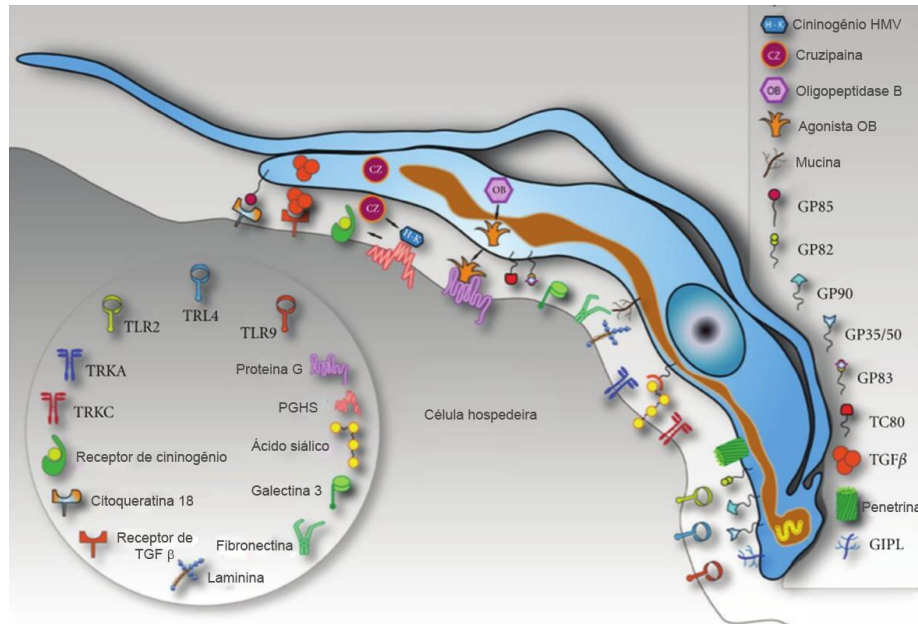
proteína heterodímera G (Leeb – Lundberg et al., 2005; Scharfstein et al. 2000; Villalta et al., 2009). A interação de bradicinina com seus receptores induz a mobilização de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático, mediado pela atuação de  $IP_3$ , e desencadeia a invasão do *T. cruzi*. É importante comentar que esses eventos de ativação tendem a ser dependentes do tipo celular e cepa do parasito estudada (Maeda et al., 2012; revisto por Calvet et al., 2012; Scharfstein et al. 2000).

Outros mecanismos de invasão, cujos receptores e ligantes ainda não estão completamente elucidados, estão envolvidos na entrada do parasito, incluindo os mediados por quinase de adesão focal (FAK), reparo de membrana e autofagia (revisto por Barrias et al., 2013). A entrada do *T. cruzi* disparada por reparo de membrana envolve o influxo de  $Ca^{2+}$  no sítio da membrana lesionada por força mecânica do parasito associado à exocitose de lisossomos com secreção de esfingomielinase, a qual atua sobre esfingolípídeos liberando ceramida e restaura a membrana danificada, permitindo a penetração do parasito (Fernandes et al., 2011). Ainda, o recrutamento de autofagossomos e proteína LC3 autofagossomal foram evidenciados durante processo de invasão do *T. cruzi*, sendo demonstrada a presença de LC3 em vacúolos parasitóforos nascentes (Romano et al., 2009). Recentemente, nosso grupo reportou um novo mecanismo de invasão envolvendo ativação do complexo FAK/Src no processo de invasão. Esta proteína tirosina quinase não receptora é ativada nos estágios iniciais da infecção e o bloqueio de sua ativação, através de inibidores farmacológicos específicos, e seu silenciamento por siRNA inibiram aproximadamente 50% da invasão, demonstrando o envolvimento desta via de sinalização na entrada do parasito (Melo et al., 2014).

### 1.3.2. Componentes da superfície do *T. cruzi* capazes de disparar a invasão

A expressão de componentes de superfície nos diferentes estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* pode estar relacionada aos mecanismos de adaptação aos microambientes distintos que ocupam nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo inúmeras proteínas identificadas desempenhando relevante papel nesse processo adaptativo (Alves et al., 2010; Parodi-Talice et al., 2007). Abordaremos algumas proteínas do repertório de

moléculas de superfície envolvidos na interação *T. cruzi*-célula de mamífero, incluindo proteínas de superfície associadas à mucina, trans-sialidases, cruzipaina, proteases, glicoproteínas, proteínas de ligação a heparina, entre outras (Figura 4).



**Figura 4: Desenho esquemático das moléculas de superfície do *T. cruzi*.** Tripomastigotas apresentam uma multiplicidade de moléculas envolvidas no processo de interação com células de mamíferos, sendo o reconhecimento receptor-ligante essencial para a entrada deste patógeno intracelular obrigatório. (Proteoglicanos de heparam sulfato – **PGHS**; Receptor do tipo Toll – **TLR**; Receptores tirosina quinases – **TRK**; Glicosinotilfosfolípideo - **GIPL**) Imagem retirada do artigo de De Souza e colaboradores, 2010.

Proteínas de superfície associadas à mucina (MASP) foram descritas em formas tripomastigotas (Bartholomeu et al., 2009) e epimastigotas do *T. cruzi* (Gonzalez et al., 2013) e compreendem a segunda mais ampla família de genes do genoma desse parasito (De Pablos & Osuna, 2012; Serna et al., 2014). A família MASP se caracteriza por apresentar uma região central altamente variável e repetitiva, um domínio rico em resíduos treonina e serina, e se ligar a membrana através da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Previato et al., 2004; Urban et al., 2011). As mucinas, primeiramente identificadas em células epiteliais de mamíferos, são funcionalmente essenciais para a proteção e evasão do sistema imune do hospedeiro, assim como necessárias para a propagação do parasito nos hospedeiros vertebrados (Buscaglia et. al., 2006; Gonzalez et al, 2013). Essas proteínas glicosiladas atuam como os principais aceptores de resíduos de ácido siálico, os quais são

transferidos de glicoconjugados do hospedeiro em uma reação que é catalisada pela enzima trans-sialidase codificada pelo *T. cruzi* (Schenkman & Eichinger, 1993). A presença de glicoproteínas semelhantes à mucina, com massa molecular de 35 kDa a 50 kDa (gp35/50), foi identificada na superfície de tripomastigotas metacíclicos, conferindo-lhes alta resistência à ação proteolítica (Mortara et al., 1992). Além disso, a gp35/50 também se relaciona à adesão e ao evento de sinalização que envolve ativação de adenilato ciclase e liberação de  $Ca^{2+}$  de acidocalciossomas no parasito (Neira et al., 2002; revisto por Maeda et al., 2012; Yoshida, 2006) e culmina na internalização do *T. cruzi* através de um mecanismo dependente do citoesqueleto da célula alvo, ou seja, mediado por endocitose (Ferreira et al., 2006).

A superfamília gp85/trans-sialidases (TS) é composta por proteínas ancoradas à superfície do *T. cruzi* capazes remover os resíduos de ácido siálico da superfície da célula hospedeira,  $\alpha$ -2,3 ligados a galactose (Agustí et al., 2007), e transferi-los para moléculas aceptoras semelhantes à mucina presentes na superfície do parasito (Butler et al., 2013; Colli, 1993; Nardy et al., 2013). É importante salientar que este protozoário é incapaz de sintetizar ácido siálico e que a ação de neuraminidase e trans-sialidases das enzimas dessa família é essencial para o processo de invasão do parasito (Mitchell et al., 2013), uma vez que participam dos eventos de (i) adesão, (ii) reconhecimento de múltiplos ligantes da membrana da célula alvo, tais como fibronectina (Ouaisi et al., 1988), colágeno (Santana et al., 1997), laminina (Giordano et al., 1994), vimentina (Ise et al., 2010) e citoqueratina (Magdesian et al., 2001), e (iii) auxiliam o escape de tripomastigotas dos vacúolos parasitóforos (Rubinde-Celis et al., 2006). Evidências ainda revelam que a adesão entre o domínio FLY da TS e filamentos intermediários da proteína citoqueratina 18 ativam vias de sinalização, como ERK1/2, que aumentam a entrada do *T. cruzi* em células de mamíferos (Magdesian et al., 2001; Magdesian et al., 2007; Mattos et al., 2014). Destacamos ainda, que esse mesmo peptídeo da TS reconhece domínios específicos na proteína citoqueratina-18 e vimentina exposta na superfície de células endoteliais e cardiomiócitos, e que essa interação pode contribuir para o tropismo do parasito a esses tipos celulares (Alcântara Neves et al., 2004; Tonelli et al., 2010).

Outros membros da família das trans-sialidases, gp82 e gp90 são glicoproteínas enzimaticamente inativas que podem estar envolvidas diretamente com a adesão, tropismo e invasão de tripomastigotas metacíclicos na célula hospedeira (Do Carmo et al., 2002; Yoshida, 2008). A gp82 é uma molécula altamente conservada (90% de identidade) entre as diferentes cepas do *T. cruzi*. Estas glicoproteínas apresentam o sítio de ligação à célula hospedeira, assim como a sequência de ligação à mucina gástrica de gp82 localizados no domínio C-terminal da molécula (Cortez et al., 2014). A entrada do *T. cruzi* mediada por gp82 envolve a ativação da proteína tirosina quinase (p175) – proteína detectada em tripomastigotas – e de fosfolipase C (PLC) que gera PI3, que por sua vez ativa a proteína quinase C (PKC), culminando com a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático. Neste processo, a elevação de  $Ca^{2+}$  citoplasmático induz a desorganização do citoesqueleto de actina e mobilização de lisossomos para o sítio de entrada do parasito (Cortez et al., 2006; Martins et al., 2011; revisto por Maeda et al., 2012). Assim, compreende-se que esse evento de internalização é um mecanismo de penetração ativa, ou seja, independente do citoesqueleto da célula alvo (Ferreira et al., 2006). Além disso, gp82 parece desempenhar um importante papel durante a infecção oral em mamíferos devido à ligação seletiva de gp82 à mucina gástrica dos seus hospedeiros e sua elevada resistência à ação de enzimas gástricas (Yoshida, 2009).

Em contrapartida, gp90, também expressa nas formas metacíclicas, participa como regulador negativo no processo de internalização desse protozoário e, logo, a habilidade do *T. cruzi* de invadir as células hospedeiras está inversamente associado à expressão dessa molécula em sua superfície celular (Bayer-Santos et al, 2013; Málaga e Yoshida, 2001; revisto por Yoshida 2006). Ao contrário de gp82, a glicoproteína de 90kDa se liga à célula de mamífero sem induzir a ativação de vias de sinalização de  $Ca^{2+}$  (revisto por Maeda et al., 2012). Dados da literatura ainda reportam que a interação de gp90 com o receptor da célula alvo pode disparar vias inibitórias de sinalização, como por exemplo, a via de ativação de tirosinas fosfatases que desfosforilam p175 e inibem a entrada do parasito (Manque et al., 2003). Ainda, a modulação negativa de gp90 foi corroborada pela redução na expressão desta proteína após tratamento de metacíclicos da cepa G com antisenso de

oligonucleotídeos, acarretando maior capacidade invasiva desta cepa (Málaga & Yoshida 2001). Todavia, estudos têm demonstrado que cepas do parasito que apresentam gp90 susceptível à digestão péptica possuem maior capacidade de invadir células alvo, o que indica que a gravidade da doença de Chagas aguda, relatada em pacientes infectados pela rota oral, pode ser resultante da proteólise desta glicoproteína (Cortez et al. 2006; revisto por Yoshida 2009). Evidências também revelaram que apesar da expressão de gp82 ser similar em cepas altamente virulentas, como CL, e pouco invasivas, como G, a expressão diferencial de gp35/50 e gp90, esta última sendo expressa em altos níveis na cepa G, define a capacidade infectiva distinta apresentada pelas cepas citadas (Ruiz et al., 1998).

Assim como as moléculas citadas anteriormente, proteases também desempenham papel relevante nos processos de invasão parasito-célula hospedeira. Embora cinco proteases tenham sido identificadas no *T. cruzi* - cisteíno, serino, treonina, aspártico e metalo proteases - (Alvarez et al., 2012), apenas cisteíno proteases, como cruzipaína (Cz), e serino proteases, como oligopeptidase B (OPB), foram reconhecidas como indutoras nos eventos de mobilização de  $Ca^{2+}$  na célula hospedeira (Aparicio et al., 2004; Burleigh et al., 1997; Santana et al., 1997). Cruzipaína (gp57/51), membro da família papaína, é uma glicoproteína encontrada em todas as formas evolutivas do parasito, mas que é secretada apenas por tripomastigotas metacíclicos (Duschak et al., 2006; Yokoyama-Yasunaka et al., 1994). A superexpressão do receptor  $B_2$  de bradicinina em CHO e células endoteliais de veia umbilical humana associada a atividade de Cz dispara a via de sinalização mediado por bradicinina (revisto por Maeda et al. 2012; Scharfstein et al., 2000). Além disso, esta enzima também promove a adesão do *T. cruzi* em *Rhodnius prolixus*, demonstrando um importante envolvimento no ciclo biológico deste parasito (Uehara et al., 2012). É importante destacar que esta cisteíno protease é considerada um importante fator de virulência (Souto-Padrón et al., 1990; Uehara et al., 2012), e que também é reconhecida como o principal antígeno imunodominante encontrado em pacientes crônicos da doença de Chagas (Cazzulo, 2002; Morrot et al., 1997). O desenvolvimento de inibidores de cruzipaína, os quais bloqueiam o sítio ativo da enzima e inibem o escape da resposta imune e inflamatória e ainda, promovem a morte do parasito pelo acúmulo de

precursores de cruzipaina no Golgi (McKerrow et al., 2009), tem sido considerados importantes agentes terapêuticos e candidatos promissores à terapia da doença (Ndao et al., 2014; Nicoll-Griffith, 2012).

Serino proteases também estão envolvidas no processo de penetração de tripomastigotas em células de mamíferos e, dentre estas a peptidase alcalina de massa molecular de 120kDa, oligopeptidase B, tem sido considerada um relevante fator de virulência do *T. cruzi* (Coetzer et al., 2008). A atuação da OPB mediando o processo de internalização desse patógeno em células não-fagocíticas (Caler et al., 2000) revela que um fator solúvel denominado agonista de  $Ca^{2+}$  é gerado, o qual se liga a receptores da célula alvo e ativa PLC culminando com a produção de  $IP_3$  e liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático (Bastos et al., 2013; revisto por Maeda et al., 2012). A ativação desta via de sinalização recruta lisossomos para o local de entrada do parasito onde se fusionam com a membrana plasmática e dão origem ao vacúolo parasitóforo (Kima et al., 2000; Tardieux et al., 1994). No entanto, estudos com cardiomiócitos revelaram que a geração do agonista de  $Ca^{2+}$  e a desorganização dos filamentos de actina reduziram drasticamente a invasão do *T. cruzi*, demonstrando assim que, dependendo do tipo celular, a ação de OPB não induzirá o aumento da entrada de tripomastigotas na célula alvo (revisto Maeda et al., 2012). TC-80, outra serino protease secretada pelo parasito, está presente nos diferentes estágios evolutivos do *T. cruzi*, mas possui maior atividade em tripomastigotas (Santana et al., 1997). A clonagem e sequenciamento do gene de Tc-80 (Bastos et al., 2005), o qual está presente em cópia única por genoma haplóide, mostrou que a enzima é uma proil endopeptidase (EC 3.4.21.16), também pertencente à família S9A SP, mas distinto do oligopeptidase B. A modelagem estrutural de POP Tc80, com base na enzima cristalizada, sugerem que o POP Tc80 é composto por um domínio /  $\beta$ -hidrolase  $\alpha$  contendo a tríade catalítica Ser548-His667 Asp631- e um domínio não catalítico em  $\beta$ -hélice. Esta enzima, localizada em vesículas próxima a bolsa flagelar, é capaz de degradar colágeno tipo I e IV, sugerindo sua participação na degradação de componentes de matriz extracelular durante processo de invasão do parasito.

Ainda, o *T. cruzi* apresenta moléculas capazes de reconhecer proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) na superfície da célula hospedeira.

Essa propriedade se deve à presença de proteínas de ligação à heparina (PLHs), nomeadas inicialmente de penetrina (60kDa), nas formas tripomastigotas desempenhando importante papel no processo de adesão do parasito aos componentes da matriz extracelular: heparam sulfato e colágeno I e IV (Ortega-Barria & Pereira, 1991). Nos últimos anos, nosso grupo tem focado na caracterização bioquímica e no entendimento da participação destas moléculas na interação com células do hospedeiro vertebrado e invertebrado. Inicialmente, nossos dados revelaram a presença de PLHs com massa molecular de 65.8 kDa e 59 kDa em amastigotas e tripomastigotas do clone Dm28c, as quais se ligam a heparam sulfato (HS) presentes nas células musculares cardíacas através dos domínios N-acetilado e N-sulfatado da cadeia de HS, mediando assim a entrada do parasito nesse tipo celular (Oliveira Jr. et al., 2008). Além disso, dados obtidos por ressonância plasmônica de superfície envolvendo a utilização de chips sensores revestidos com heparina biotinizada, demonstraram que tripomastigotas não submetidos à incubação prévia com GAGs (Heparina e HS) se ligaram fortemente a heparina imobilizada presente na superfície do chip, corroborando desta forma a elevada afinidade e estabilidade de ligação entre PLHs e os glicosaminoglicanos estudados (Oliveira Jr. et al., 2012b). Além disso, demonstramos que PLHs podem se ligar a outro tipo de GAG, o condroitim sulfato (CS), mas que esta interação não desencadeia a invasão em células de mamíferos (Calvet et al., 2003; Revisto por Calvet et al., 2012). Adicionalmente, reportamos que PLHs estão localizadas na superfície de epimastigotas participando da interação com os GAGs situados no epitélio do trato intestinal do vetor *Rhodnius prolixus* (Oliveira Jr. et al., 2012a) e que esta proteína encontra-se distribuída na membrana flagelar de tripomastigotas, apresentando atividade proteolítica de serino protease (Oliveira Jr. et al., 2012b), o que sugere que as PLHs desempenhem relevante papel no ciclo biológico do *T. cruzi*.

#### **1.4. Papel de PLHs na interação patógeno – célula hospedeira**

Diferentes patógenos intracelulares interagem com proteoglicanos de heparam sulfato durante o processo de invasão (Chen et al., 2008; Smith et al., 2006). Esta interação é mediada por proteínas com propriedade de ligação à

heparina, promovendo a adesão e entrada do microorganismo na célula alvo. A proteína p17 no vírus HIV, a qual se caracteriza como importante componente de ligação à heparina e HS, é capaz de interagir especificamente com PGHS expressos na superfície de células T CD4<sup>+</sup> ativadas (Poiesi et al., 2008). Essa proteína regulatória viral aumenta a proliferação de linfócitos T ativados e acentua a replicação do vírus na célula hospedeira, contribuindo com a atividade pro-inflamatória e, conseqüentemente, a infectividade do HIV (De Francesco et al., 1998; Poiesi et al., 2008; Poli & Fauci, 1992). Em *Leptospira interrogans*, bactéria causadora de leptospirose, a imunoglobulina leptospira (Ig-like) proteína B (LigB) foi recentemente identificada como uma adesina capaz de reconhecer PGHS e promover a infecção de diferentes tecidos, sendo o bloqueio da interação LigB-PGHS capaz de reduzir 73% da invasão (Ching et al., 2012). Ainda, análises de proteômica revelaram um repertório de adesinas envolvidas na interação de *Mycobacterium leprae* com células epiteliais, incluindo hemaglutininas de ligação à heparina (HBBA) que atuam potencialmente no reconhecimento de PGHS na superfície destas células, favorecendo a infecção de células epiteliais das vias aéreas (Silva et al., 2013). As HBBA também foram descritas em *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* com papel potencial na interação bactéria-célula epitelial (Bermudez e Goodman, 1996; Menozzi, et al. 1996).

PLHs também foram identificadas em protozoários do filo Apicomplexa, incluindo *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (Zhang et al., 2014). Evidências demonstram a presença de componentes nas formas taquizoítas de *T. gondii* – ROP2 e ROP4 da róptria, GRA2 de grânulos densos e SAG1 da superfície – capazes de reconhecer GAGs sulfatados (hep e HS) e desencadear a invasão do parasito na célula alvo (Azzouz, et al., 2013; Friedrich, Santos et al. 2010). Em esporozoítas de *P. falciparum*, a proteína de superfície Circunsporozoíta (CS) interage com GAGs presentes na superfície de hepatócitos e desempenha papel relevante nos eventos de aderência e invasão nesse tipo celular (Frevort et al., 1993; Rathore e McCutchan, 2000). CS foi identificada como uma PLH, uma vez que a interação CS-heparina atua como um importante complexo de internalização do *P. falciparum* e essa atividade de ligação foi bloqueada em hepatócitos pré-tratados com heparinase (Rathore & McCutchan 2000).



A interação de *Leishmania spp.* com células de mamíferos também envolve a participação de PGHS. Estudos prévios indicaram que a presença de PLHs na superfície de *Leishmania spp.* pode garantir o sucesso do parasito durante os eventos de adesão, entrada e sinalização em células hospedeiras (Mukhopadhyay et al., 1989). Tal como evidenciado em *T. cruzi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresenta PLHs no flagelo de promastigotas, as quais são capazes de reconhecer ligantes no intestino do inseto vetor (*Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia whitmani*) (Azevedo-Pereira et al., 2007) e formar um complexo de alta afinidade com heparina (De Castro-Côrtes et al., 2012). As PLHs têm se mostrado importante no ciclo biológico destes tripanosomatídeos e, portanto, merece atenção quanto ao detalhamento de suas características bioquímicas, seu perfil de expressão nas formas infectivas e identificação do(s) mecanismo(s) de invasão mediado(s) pela interação PLHs-PGHS que contribuem para persistência do parasito no hospedeiro. O presente estudo está voltado para a análise da expressão destas proteínas em tripomastigotas de origem e genótipos distintos e sua possível associação com a virulência.

# OBJETIVOS

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a expressão de proteínas de ligação à heparina em tripomastigotas de diferentes procedências (cultivo celular, sanguíneo e metacíclico) e genótipos do *T. cruzi* e seu papel no disparo da invasão mediante interação com proteoglicanos sulfatados na superfície da célula hospedeira.

### **2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1. Avaliar a expressão de proteínas de ligação à heparina (PLHs) em tripomastigotas de *T. cruzi*, provenientes de cultivo celular (TCT), tripomastigotas sanguíneos (BT) e metacíclicos (MT) da cepa Y e isolado silvestre de Santa Maria Madalena (SMM36), comparando com a expressão de glicoproteínas (GPs) como gp82, gp90 e gp35/50;

2.2.2. Avaliar a distribuição espacial de PLHs e GPs em tripomastigotas de diferentes estágios de desenvolvimento (TCT, BT e MT) e genótipos do *T. cruzi*;

2.2.3. Avaliar o nível de infecção de TCTs e MTs do *T. cruzi* (cepa Y e isolado silvestre SMM36) em células de ovário de hamster chinês (CHO) e a participação de proteoglicano de heparam sulfato (PGHS) neste processo.

# **MATERIAIS**

# **&**

# **MÉTODOS**

### **3. MATERIAIS & MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivo celular**

Células de rim de macaco verde africano adulto (ATCC CCL-81) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas confluentes foram submetidas à dissociação enzimática com PBS contendo 0,0025% de tripsina e 0,01% de EDTA, pH 7,0 e em seguida, repicadas na proporção de 1:2 para frascos de cultura (75 cm<sup>2</sup> ou 150 cm<sup>2</sup>). Após adesão celular (30 a 60 min de plaqueamento), o meio nutritivo foi trocado e as células mantidas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. As culturas foram repicadas semanalmente e utilizadas para obtenção de tripomastigotas derivados de cultivo celular. Células de ovário de hamster chinês competentes (CHO-K1) e deficientes em glicosaminoglicanos (CHO-745) foram mantidas em frascos de cultura (75 cm<sup>2</sup>) em meio F-12 (GIBCO) acrescido de 10% SFB (GIBCO). Ao atingir confluência, as culturas foram dissociadas com solução de dissociação (0,0025% de tripsina e 0,01% de EDTA em PBS, pH 7,0) e as células isoladas foram semeadas na densidade de 1x10<sup>5</sup> células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 24h de cultivo, o meio nutritivo foi trocado e as culturas mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2. *Trypanosoma cruzi***

##### *A. Tripomastigotas sanguíneos*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, foram obtidas de camundongos *Swiss Webster* infectados no pico da parasitemia (Meirelles e cols., 1984). Vinte camundongos machos (18 a 20g) foram inoculados pela via intraperitoneal com 3x10<sup>5</sup> formas tripomastigotas e no 7<sup>o</sup> dia pós-infecção (dpi), pico da parasitemia, foi realizado o isolamento e purificação dos parasitos. Os camundongos foram submetidos à eutanásia pelo método de CO<sub>2</sub> e o sangue obtido por punção cardíaca, utilizando-se 0,2 mL de citrato de sódio a 3,8% como anticoagulante. Com a finalidade de separar as células sanguíneas e obter o plasma sanguíneo enriquecido em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o

sangue total foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 rpm (200 g). O plasma sanguíneo foi removido e centrifugado por 15 minutos a 3.500 rpm (2500 g) para sedimentação dos parasitos. Para remoção das plaquetas, o sedimento, contendo os parasitos e plaquetas, foi ressuspensão em meio DMEM suplementado com 20% de SFB e mantido por 20 minutos em banho-maria a 37 °C. Ao final desse procedimento, o grumo de plaquetas foi removido e os parasitos foram centrifugados por 15 minutos a 3.500 rpm (2500 g). O sedimento contendo os parasitos foi ressuspensão em 2mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e número de parasitos/mL determinado pela quantificação em câmara de Neubauer ( $n^\circ$  de parasitos x diluição x  $10^4$ /mL) ao microscópio óptico Zeiss, sob contraste de fase. Todos os procedimentos com animais experimentais foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais experimentais (CEUA) Fiocruz sob licença LW-37/13.

#### *B. Formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular (TCT)*

As culturas de células Vero com 24 h de cultivo foram infectadas com formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, cepa Y ou com o isolado silvestre SMM36, na relação de 10:1 parasito/célula hospedeira. O *T. cruzi* SMM36 foi isolado de *Triatoma vitticeps* coletados em áreas peridomiciliares, na localidade de Triunfo cuja latitude é de 22° 02' 52''S e longitude de 41° 56', 32'' W, onde está situado o Município de Santa Maria Madalena, RJ (Santos-Mallet et al., 2008). Este isolado silvestre foi gentilmente cedido pela Dra. Jacenir Santos Mallet (IOC, Fiocruz). No 4º dpi, os tripomastigotas livres no sobrenadante das culturas, liberados pela ruptura das células infectadas, foram recolhidos e lavados em DMEM acrescido com 0,5% de albumina de Soro Bovino (BSA; Sigma). Após sucessivas lavagens, o sedimento contendo os parasitos foi ressuspensão em DMEM (2mL) e o número total de parasitos/mL determinado por quantificação em câmara de Neubauer. Os parasitos isolados foram mantidos no gelo e processados de acordo com o ensaio experimental.

### C. Formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (Camargo et al. 1964) contendo 10% de SFB e mantidas em estufa incubadora para BOD a 28°C, de acordo com Camargo e colaboradores (1964). As passagens dos parasitos de diferentes genótipos (cepa Y e isolado silvestre SMM36) foram realizadas semanalmente sob a relação de  $1 \times 10^6$  parasitas/mL, determinada pela quantificação em câmara de Neubauer. Os parasitos de fase Log, fase exponencial de crescimento, foram utilizados na indução de metacicloênese *in vitro*.

### D. Formas tripomastigotas metacíclicas (MT)

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y ou o isolado silvestre SMM36, foram cultivados em meio LIT (Camargo et al., 1964) acrescido com 10% de hemácia durante 5 dias a 28 °C. Ao atingir a concentração de  $3 \times 10^7$  parasitos/mL, os parasitos foram transferidos para meio Grace's (GIBCO) e mantidos a 28 °C por 7 dias em estufa incubadora para BOD. Posteriormente, os parasitos foram lavados e ressuspensos em tampão PSG (3,8mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 57,1mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 44,8mM de NaCl, 55,5 mM de  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) e purificados em coluna de DEAE sepharose, previamente equilibrada no mesmo tampão. Os tripomastigotas metacíclicos (MTs) eluídos da coluna foram centrifugados e ressuspensos em meio nutritivo (DMEM ou F-12) suplementado com 0,5% de BSA. O número total de parasitos/mL foi determinado por quantificação em câmara de Neubauer.

### 3.3. Ensaios de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

Para detecção de proteínas de ligação a heparina (PLHs),  $2 \times 10^6$  tripomastigotas metacíclicos (MT) e derivados de cultivo celular (TCT) de genótipos distintos, cepa Y (TcII; Zingales et al., 2009) e SMM36 (Zimodema 3; Santos-Mallet et al., 2008) foram incubados por 1 h no gelo com 20 µg/mL de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) conjugados à biotina - heparina (Hep) e heparam sulfato (HS) - em DMEM suplementado com 0,5% BSA. Após

incubação com GAGs, os parasitos foram fixados por 5 min a 4 °C com 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS, pH 7,2. Após sucessivas lavagens em PBS, os tripomastigotas foram incubados por 1 h a temperatura ambiente com estreptavidina conjugada a FITC (1:200). Os GAGs biotinilados utilizados nos distintos ensaios experimentais foram gentilmente cedidos pela Dra. Leny Toma do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Em ensaios comparativos e independentes, essas formas evolutivas (MT e TCT) foram submetidas à incubação por 1h no gelo com anticorpos monoclonais anti-gp82 (3F6), anti-gp35/50 (2B10) ou anti-gp90 (1G7). Posteriormente, os parasitos fixados em PFA e lavados em tampão de bloqueio (PBS contendo 4% BSA, pH 7,0) foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo-Alexa 546 (1:200). Para detecção do DNA, os parasitos foram corados com 10 µg/mL de 4', 6- diamidino-2-phenylindole (DAPI), e, em seguida, lavados em PBS e aderidos em lamínulas de vidro, previamente recobertas com 0,1% de poli-L-lisina (Sigma). As amostras foram montadas em 2,5% de 1'4-diazabicyclo-(2.2.2)-octane (DABCO; Sigma) em PBS contendo 50% de glicerol e seladas com esmalte. Os controles negativos foram preparados na ausência de GAGs biotinilados e anticorpos primários específicos para as glicoproteínas anteriormente citadas. Por fim, as amostras foram visualizadas por microscopia de fluorescência e as imagens obtidas utilizando o microscópio de epifluorescência Zeiss Axio-Imager M1 equipado com o software de processamento de imagem digital AxioVision (Zeiss).

Para análise de citometria de fluxo, os parasitos foram processados como descrito acima e analisados utilizando o FACSCalibur, BD Bioscience, USA. As análises foram realizadas adquirindo 30.000 eventos totais para cada amostra. Inicialmente foi determinada a população de interesse utilizando os parâmetros morfológicos (tamanho e granulosidade). Os dados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados utilizando o programa CellQuest versão 4.2 (Becton & Dickinson).



### **3.4. Extração e dosagem de proteínas**

Proteínas totais de formas tripomastigotas (TCT, BT e MT) de *T. cruzi* foram extraídas pelo tampão de lise (Tris 50mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, pH 8,0) contendo inibidores de proteases (Sigma Chemical Co.; AEBSF– [4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoridehydrochloride, aprotinina, hidrocloreto de bestatina, E-64–[N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate salt, Pepstatin A) e fosfatases (Sigma Chemical Co.; Cantharidin, (–)-p-Bromolevamisole oxalate e Calyculin A). A lise foi complementada pela homogeneização do extrato parasitário em vortex a cada 10 minutos durante 1 h, seguido pela centrifugação por 5 minutos a 10.000 rpm (10700 g) sob a temperatura de 4 °C. Após isso, o sobrenadante foi recolhido e as proteínas extraídas foram dosadas segundo o método de Folin (Lowry et al., 1951). Para esta análise, foi construída uma curva padrão contendo a solução de 1 mg/mL de BSA, desta foram retirados diferentes volumes variando de 10 a 50 µL e foi acrescido água tridestilada (MiliQ) para um volume final de 200 µL. Nas duplicatas, com volume de 5 e 10 µL por amostra, foi acrescida água tridestilada (MiliQ) para 200 µL. Nas citadas soluções, foi acrescentado 1 mL de mistura reativa (10mL de solução alcalina (0,1M NaOH e 0,18M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 100µl tartarato de sódio e potássio 2% e 100µl sulfato de cobre 1% CuSO<sub>4</sub>). Após 10 minutos de incubação, foi colocado 100 µL de Follin Ciocateus (Merck) em uma proporção de 1:3 nas soluções, as quais foram deixadas durante 30 minutos no escuro. A concentração de proteínas foi determinada através de leitura em espectrofotômetro no filtro de 617 nm.

### **3.5. Ensaio de eletroforese e Western blotting**

A separação eletroforética ocorreu em gel de poliacrilamida 12%, contendo SDS, e as amostras (40 µg) utilizadas nesse procedimento foram previamente suplementadas com 5% de β-mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos em banho seco. Após essa etapa foi realizada a transferência das proteínas do parasito para membrana de nitrocelulose e a detecção das glicoproteínas foi realizada pela incubação com anticorpos primários específicos, mAb anti-gp82 (3F6); mAb anti-gp90 (1G7); mAb anti-gp35/50 (2B10), diluídos 1:2000 em

TBST+ 1% de BSA. Estes anticorpos foram gentilmente cedidos pela Dra. Jacenir Santos-Mallet.

Após incubação overnight a 4° C do anticorpo primário, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-camundongo 1:10000 diluído em solução de bloqueio para posterior revelação por quimioluminescência (Super Signal) e exposição em filme de raio-X. Cabe acrescentar que o GAPDH de *Trypanosoma brucei* – adotado como padrão interno da reação – foi revelado após incubação da membrana por 1 h a temperatura ambiente com anticorpo anti-GAPDH, diluído 1:5000 em TBST+ 5% de leite desnatado, e com anticorpo secundário anti-coelho na diluição de 1:10000 nesta mesma solução de bloqueio.

### **3.6. Interação *Trypanosoma cruzi* – célula hospedeira**

Para avaliar o papel de PLHs presentes na superfície de tripomastigotas de diferentes genótipos (Cepa Y e isolado silvestre SMM36) e procedência (MT e TCT), no processo de invasão do *T. cruzi*, células CHO competentes (CHO-K1) e deficientes em GAGs (CHO-745) foram infectadas por 2h e 24h com formas tripomastigotas metacíclicas (MT) ou por 2h com tripomastigotas derivadas de cultivo celular (TCT) na relação de 10:1; 20:1; 30:1 parasitos/célula hospedeira, sendo a proporção de 60:1 também utilizada na interação com MT. Após incubação, as culturas foram lavadas em meio F-12 simples e fixados em Bouin (75 mL de solução de ácido pícrico a 1,2%, 25 mL de formalina (40% formaldeído) e 5 mL de ácido acético) por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas contendo as células foram coradas por 30-40 minutos a temperatura ambiente com Giemsa (1:10), desidratadas em gradientes de concentração da mistura acetona/xilol e montadas em Permount. O percentual de infecção e número total de parasitos intracelulares foi determinado por quantificação randômica de no mínimo de 200 células por microscopia de luz. O índice endocítico foi obtido pelo valor da porcentagem de células que endocitaram multiplicado pela média de parasitos intracelulares. Os dados estatísticos foram obtidos utilizando o teste *t*-Student.

### **3.7. Análise estatística**

O teste *t*-Student foi utilizado para determinar a significância das diferenças entre as médias do ensaio de invasão. Os dados da população de tripomastigotas (TcII e Z3) que expressam PLHs e GPs foram analisados através da determinação da média  $\pm$  desvio padrão e foram comparados pela análise de variância (ANOVA). O valor  $p \leq 0.05$  foi considerado significativo.

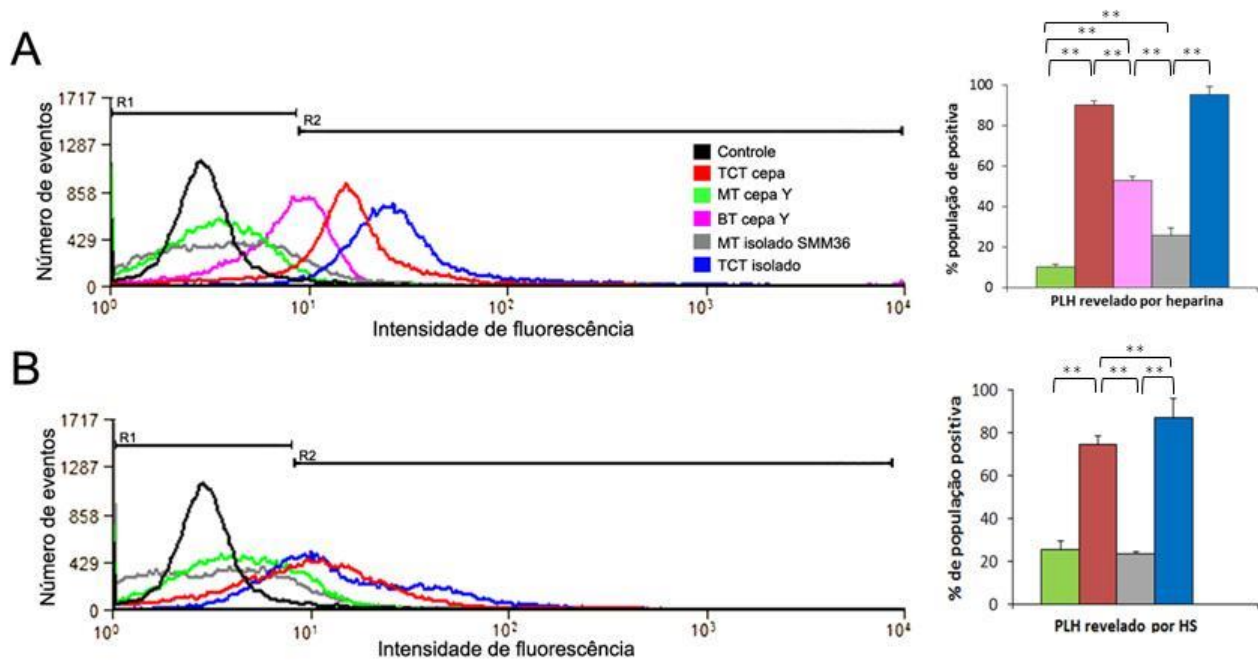
# RESULTADOS

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Expressão de glicoproteínas na superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi***

A expressão de PLHs e glicoproteínas (gp82, gp90 e gp35/50) na superfície celular de tripomastigotas de distintas procedências (TCT e MT) e genótipos de *T. cruzi* (cepa Y e isolado silvestre SMM36) foi determinada por citometria de fluxo. Os ensaios com tripomastigotas vivos a 4°C permitiram a detecção das proteínas de superfície dos parasitos, evitando marcação intracelular e eliminação dos glicosaminoglicanos (GAGs) e anticorpos associados à superfície por *shedding*. As análises dos histogramas de intensidade de fluorescência revelaram uma expressão diferencial de PLHs e GPs nestes parasitos (*Figura 5 e 6*). Cerca de 90% e 75% da população de TCTs, cepa Y, apresentaram proteínas com propriedade de ligar à heparina (Hep) e heparano sulfato (HS), respectivamente. MTs, cepa Y, apresentaram baixa expressão de PLHs em sua superfície, sendo evidenciado que somente 10% da população é capaz de ligar à heparina enquanto 25% da população reconhece heparano sulfato (*Figura 5*). Esta discrepância na expressão de PLHs entre TCTs e MTs nos levaram a questionar se tripomastigotas sanguíneos (BT), cepa Y, expressam PLHs em sua superfície. Nossos resultados revelaram que a expressão de PLHs em BT é intermediária aos TCTs e MTs, sendo evidenciado a presença de PLHs em 53% da população destes parasitos (*Figura 5*).

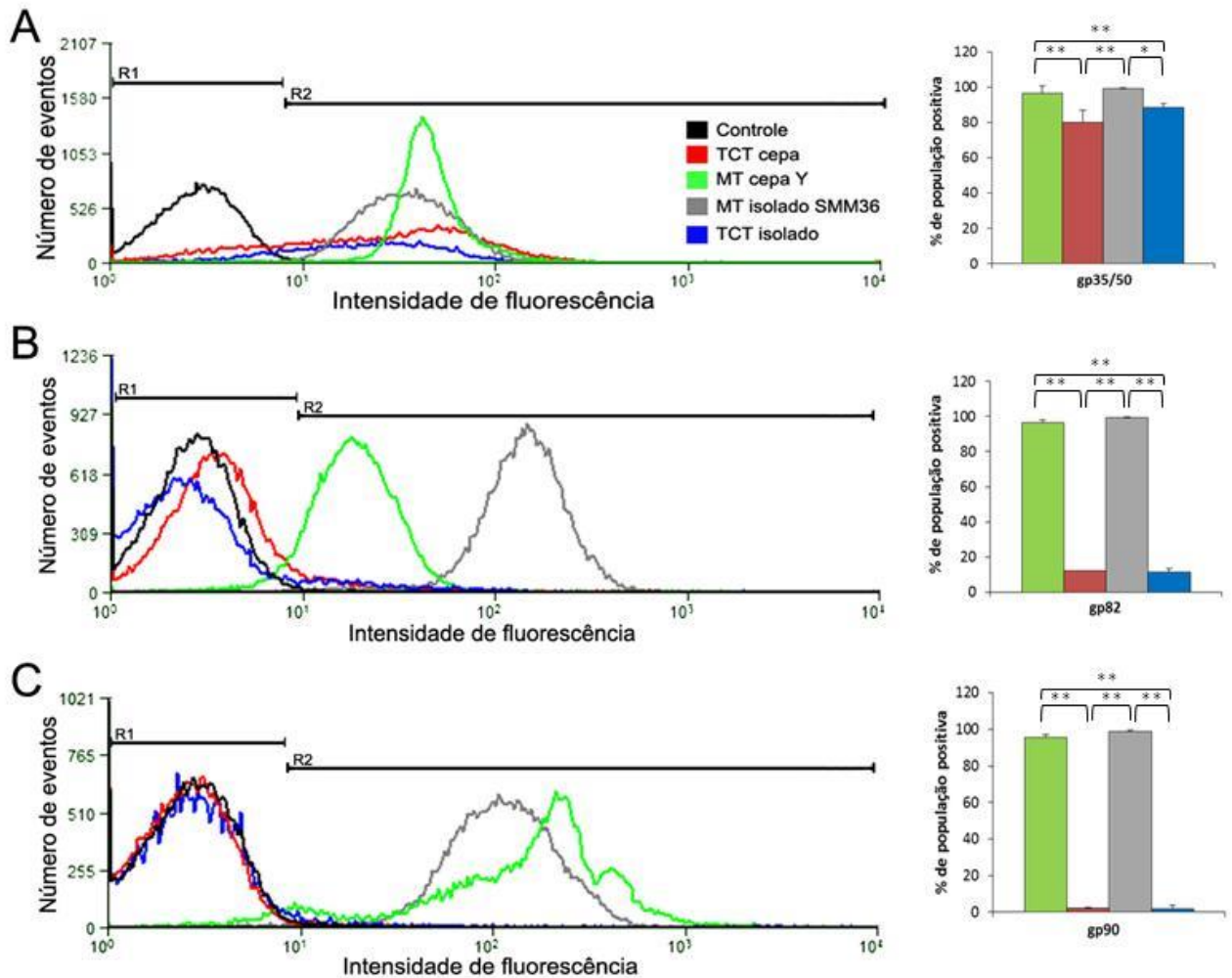
O histograma de intensidade de fluorescência revelou ainda que TCTs do isolado silvestre SMM36 apresentam maior expressão de PLHs comparados aos demais parasitos analisados. A detecção de PLHs com GAGs biotinilados revelou aproximadamente 95% e 86% da população positiva após incubação com heparina e HS, respectivamente. As análises realizadas com MT do isolado SMM36 revelaram que, tal como a cepa Y, a detecção de PLHs foi reduzida em tripomastigotas dessa procedência, alcançando uma população positiva 3,8X menor do que a identificada em TCT. Apenas 25% e 23% da população foi positiva para PLHs revelados por heparina e HS, respectivamente (*Figura 5*).



**Figura 5. Análise da expressão de proteínas de ligação à heparina (PLHs) em tripomastigotas de distintas procedências (TCTs, BTs e MTs) da cepa Y e isolado silvestre SMM36.** Tripomastigotas incubados com 20 $\mu$ g de heparina ou HS biotinilados foram processados para citometria de fluxo. O histograma de intensidade de fluorescência demonstra elevada expressão de PLHs revelado por heparina (A) e heparan sulfato (B; HS) em tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) e tripomastigotas sanguíneos (BT) da cepa Y comparado aos metacíclicos (MTs) de diferentes genótipos de *T. cruzi*. Os gráficos representam o perfil da população positiva para PLHs, onde 90% e 95% da população de TCTs (cepa Y e isolado SMM36) foi revelada por heparina e 75% e 86% da população revelado por heparan sulfato, respectivamente. Em contraste, MTs da cepa Y e isolado SMM36 possuem uma população reduzida que expressa PLHs, alcançando 10% - 25% e ~25% em ambos genótipos quando detectado por heparina e HS, respectivamente. Marcação positiva para PLHs foi evidenciada em 53% da população de BTs quando revelados por heparina (A). R1 e R2 representam níveis distintos de intensidade de fluorescência. Dados obtidos de 3 ensaios experimentais. Teste ANOVA  $p < 0,001$  (\*\*).

Visando uma análise comparativa entre PLHs e outras proteínas envolvidas no processo de invasão do *T. cruzi*, avaliamos a expressão das glicoproteínas gp82, gp90 e/ou gp35/50 nos diferentes genótipos deste parasito (cepa Y e isolado silvestre SMM36). Em TCTs da cepa Y e isolado SMM36, a expressão de gp35/50, revelada pelo anticorpo 2B10, foi evidenciada em 80% e 88% da população, respectivamente, enquanto apenas 11% da população destes parasitos foi positiva para gp82 (anticorpo 3F6). Destacamos que gp35/50 é a mais expressa das glicoproteínas analisadas em TCTs. Interessantemente, os TCTs analisados (cepa Y e isolado SMM36) foram negativos para gp90, apresentando um perfil de marcação similar ao controle negativo (Figura 6). Em

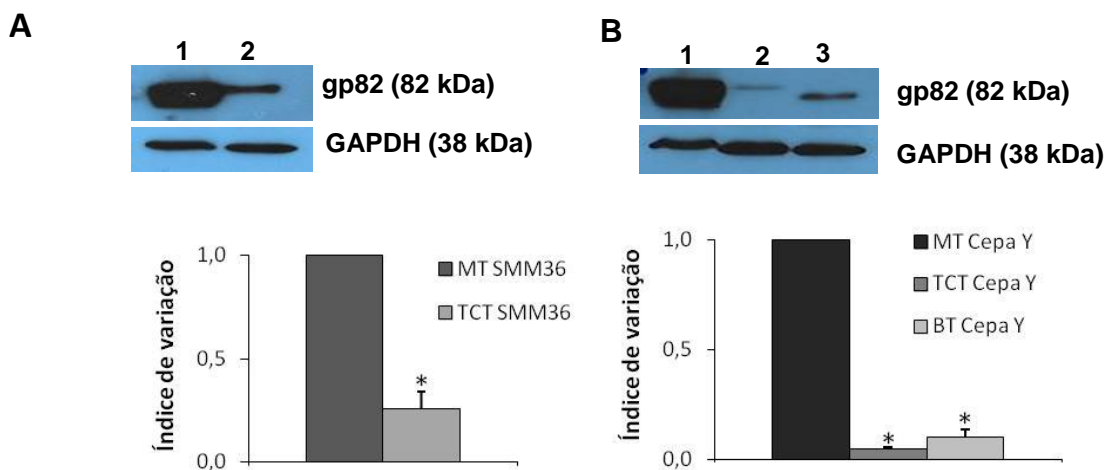
contraste, MTs da cepa Y e isolado SMM36 apresentam valores  $\geq 95\%$  da população positiva para gp82, gp90 e gp35/50 (Figura 6). Entretanto, é importante ressaltar que em MTs a expressão de gp82 é maior no isolado SMM36 enquanto gp90 é mais expressa na cepa Y.



**Figura 6. Análise por citometria de fluxo da expressão de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas de distintas procedências (TCTs, BTs e MTs) da cepa Y e isolado silvestre SMM36.** Tripomastigotas de diferentes genótipos e procedência apresentam expressão diferencial destas glicoproteínas (GPs). (A) o perfil de expressão de gp35/50 é bastante similar entre os parasitos. (B) Gp82 foi expressa apenas em 11% da população de TCTs de ambos os genótipos enquanto gp90 (C) não foi revelada na superfície deste parasitos. Elevada expressão de gp82 e gp90 foi evidenciada em MTs dos diferentes genótipos, sendo destacado níveis superiores de gp82 e gp90 em MTs do isolado SMM36 e cepa Y, respectivamente. Análise obtida de 3 ensaios experimentais. Teste ANOVA  $p < 0,01$  (\*);  $p < 0,001$  (\*\*).

Este conjunto de resultados demonstra um perfil de expressão mais acentuado de PLHs em TCTs nos diferentes genótipos quando comparados com MTs, os quais possuem uma elevada expressão de GPs, com exceção de gp35/50 que encontra-se expressa em todos parasitos estudados.

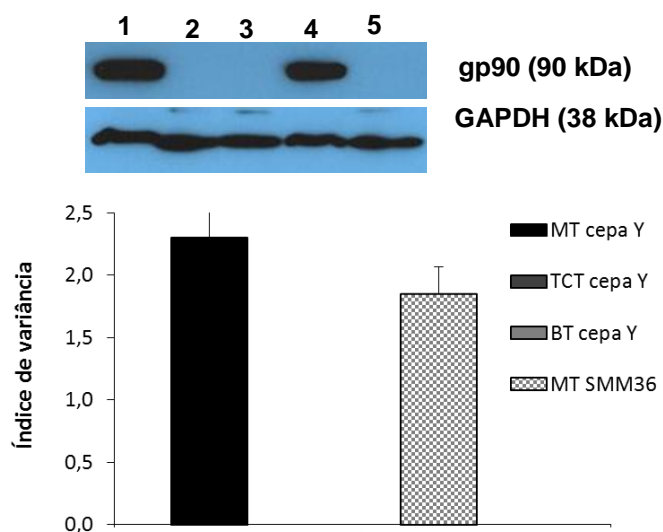
Para confirmar os dados obtidos por citometria de fluxo, realizamos o método semi-quantitativo de Western blotting a fim de avaliarmos a expressão das glicoproteínas gp82, gp90 e gp35/50 em TCT, BT e MT da cepa Y e isolado SMM36. Nestes ensaios utilizamos como padrão interno a proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *T. brucei*, enzima residente no glicosomo e participante da via glicolítica do parasito. A análise de densitometria revelou uma elevada expressão de gp82 em MT da cepa Y e isolado SMM36 comparado com TCT e BT dos diferentes genótipos de *T. cruzi* estudados. Ainda, nossos resultados demonstram que a expressão deste constituinte de superfície celular é 4X superior em MT do isolado silvestre SMM36 quando comparados aos TCTs. Esta diferença ainda é mais acentuada quando comparamos os parasitos de diferentes procedências da cepa Y, alcançando níveis de gp82 em MT de 21X e 10X maiores que TCT e BT, respectivamente (*Figura 7*).



**Figura 7. Análise da expressão de gp82 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* por Western blotting.** Tripomastigotas metacíclicos (MT, linha 1) do isolado silvestre SMM36 (A) e cepa Y (B) possuem níveis protéicos de gp82 superiores ao perfil observado em tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCT, linha 2) e sanguíneos<sup>1</sup> (BT, linha 3). Os valores de expressão de gp82 foram determinados pela razão entre esta proteína e o padrão interno GAPDH de *T. brucei*. (<sup>1</sup>) Ensaio realizado apenas com a cepa Y de *T. cruzi*. Dados obtidos de 2 ensaios experimentais. (\*) Teste *t*-student  $p \leq 0,03$ .



Além disso, avaliamos a expressão de gp90 em tripomastigotas da cepa Y e isolado SMM36. Nossos resultados corroboram os dados de citometria de fluxo, sendo observado elevada expressão de gp90 em MTs de diferentes genótipos e ausência desta proteína em TCTs (cepa Y e isolado SMM36) e BT (cepa Y) (Figura 8). Infelizmente, não foi possível avaliar a expressão de gp35/50 devido a problemas na detecção destas proteínas com anticorpo monoclonal 2B10 por Western blotting.

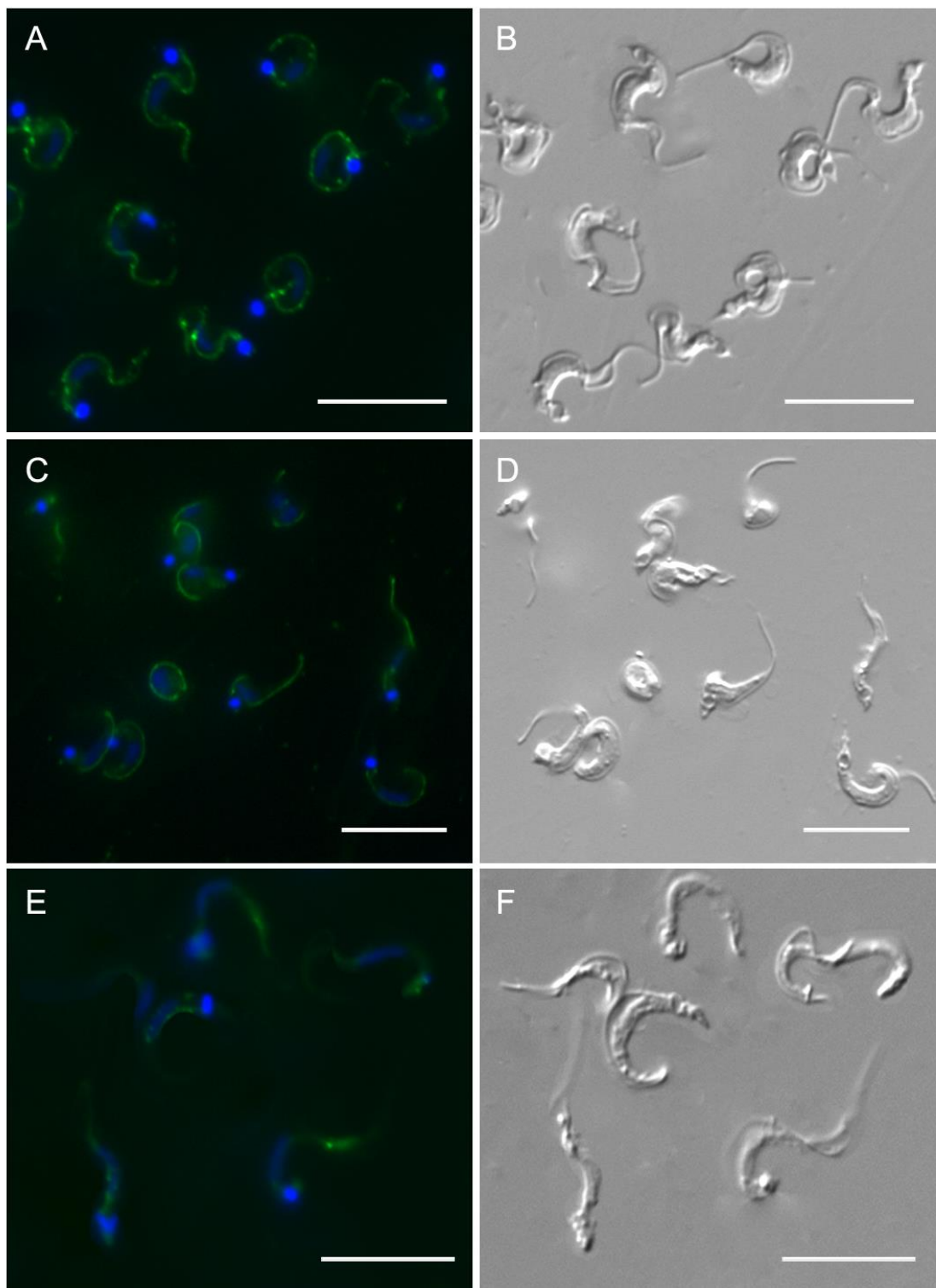


**Figura 8. Expressão de gp90 em tripomastigotas de distintas procedências.** A análise por Western blotting demonstrou que tripomastigotas metacíclicos (MT) da cepa Y (linha 1) e isolado SMM36 (linha 4) apresentam elevada expressão de gp90, contrastando com a ausência de marcação para esta glicoproteína em tripomastigotas sanguíneos (BT) da cepa Y (linha 3) e derivados de cultivo celular (TCT) da cepa Y (linha 2) e isolado SMM36 (linha 5). Os valores de expressão de gp90 foram determinados pela razão entre esta proteína e o padrão interno GAPDH de *T. brucei*. Dados obtidos de 2 ensaios experimentais.

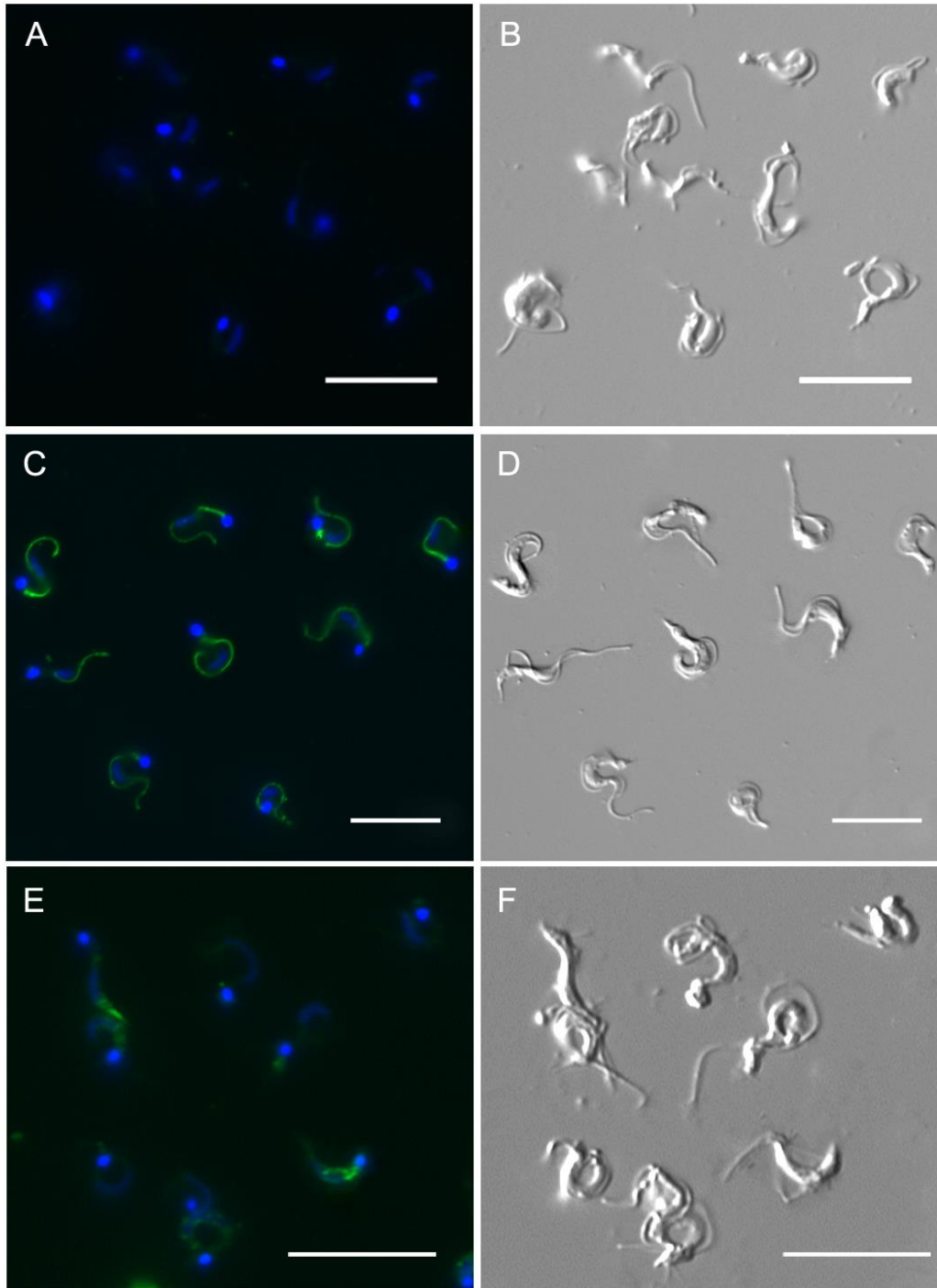
#### **4.2. Localização subcelular de PLHs e GPs em formas tripomastigotas de *T. cruzi***

Uma vez avaliada a expressão de PLHs e GPs na superfície de tripomastigotas, direcionamos nossa análise à distribuição espacial destes componentes de superfície celular por microscopia de fluorescência. Nossos resultados demonstraram que embora PLHs sejam reveladas nos diferentes tripomastigotas e genótipos de *T. cruzi* considerados nesse estudo, o perfil de localização desses componentes variam entre as formas TCT, BT e MT do parasito. Além disso, a visualização de GPs nas diferentes formas infectivas do protozoário também demonstrou que sua distribuição é notavelmente distinta daquela observada para PLHs. TCTs (cepa Y e isolado SMM36) e BT (cepa Y) apresentaram intensa marcação fluorescente na membrana flagelar após detecção de PLHs com heparina e HS biotinizados e posterior revelação com avidina-FITC (*Figuras 9 e 10*). Em contraste, PLHs foram observadas na superfície celular em regiões próximas ao núcleo e bolsa flagelar nos MTs (cepa Y e isolado SMM36) (*Figuras 9 e 10*).

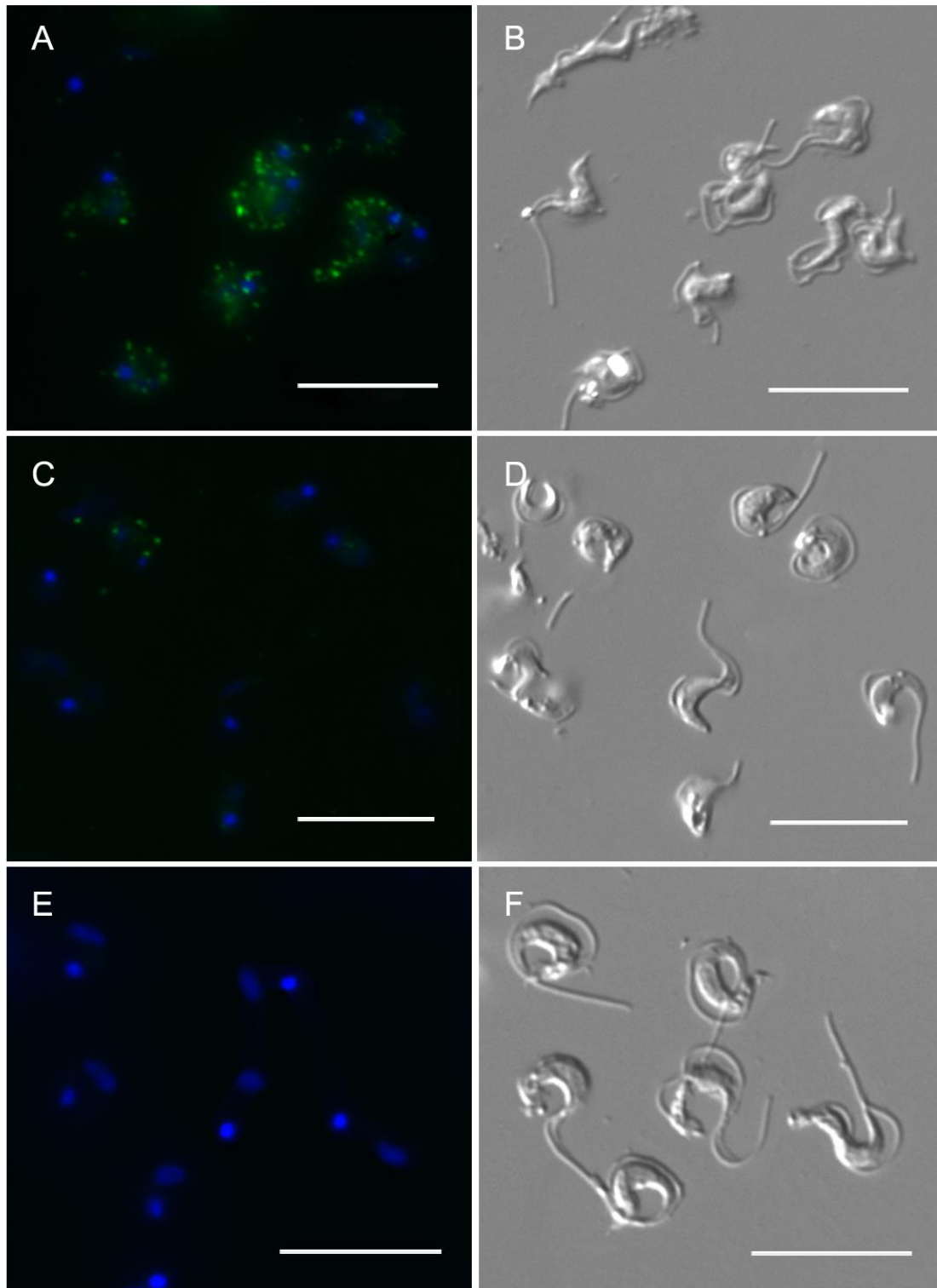
Por outro lado, a localização das GPs não se restringe a membrana flagelar dos tripomastigotas. MTs revelados com anticorpo anti-gp82 apresentaram marcação intensa distribuída homogeneamente por todo o corpo do parasito (*Figuras 12 e 14*). Perfil similar de marcação foi evidenciado para gp90, sendo visualizados MTs fortemente marcados (*Figuras 12 e 14*), enquanto para gp35/50 a intensidade de marcação é similar a gp82 e menor que gp90, embora também distribuída de forma difusa pelo corpo do parasito (*Figuras 12 e 14*). Em contrapartida, TCTs apresentam uma fluorescência reduzida para gp82 e ausência de marcação para gp90, mas com sinal positivo para gp35/50 (*Figuras 11 e 13*).



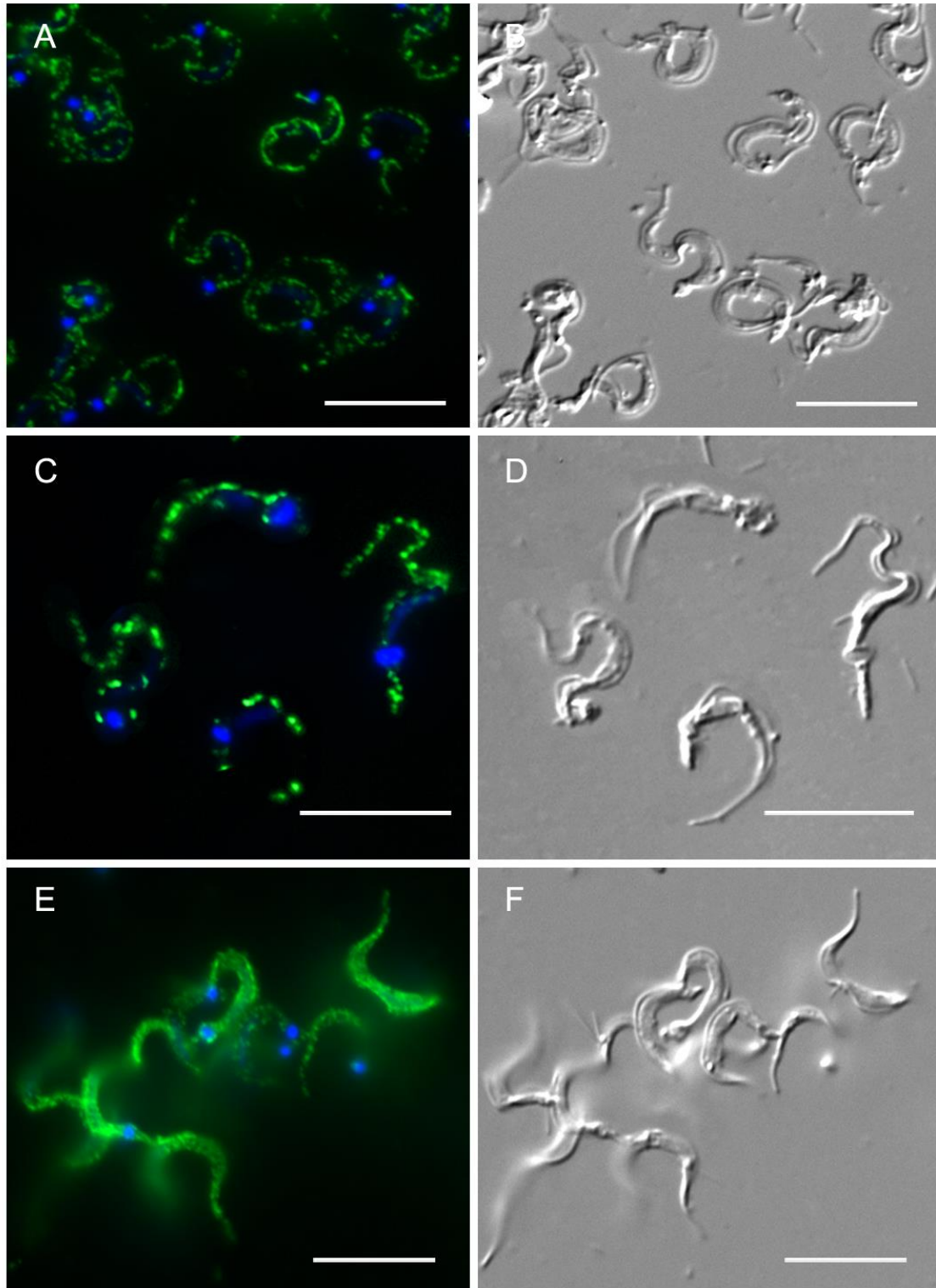
**Figura 9. Distribuição espacial de proteínas de ligação à heparina (PLHs) em tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y.** A localização subcelular de PLHs foi evidenciada pela incubação (1h no gelo) de tripomastigotas vivos com 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina (A, C e E). Note a distribuição de PLHs (verde) na membrana flagelar em tripomastigotas derivados de cultivo celular (A; TCTs) e tripomastigotas sanguíneos (C; BTs) e ainda, próximo ao núcleo e bolsa flagelar de tripomastigotas metacíclicos (E; MTs). DNA foi detectado pela coloração pelo DAPI (azul), revelando núcleo e cinetoplasto do parasito (A, C e E). Contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC; B, D e F). Imagem representativa de >5 ensaios experimentais. Barra =10 $\mu\text{M}$ .



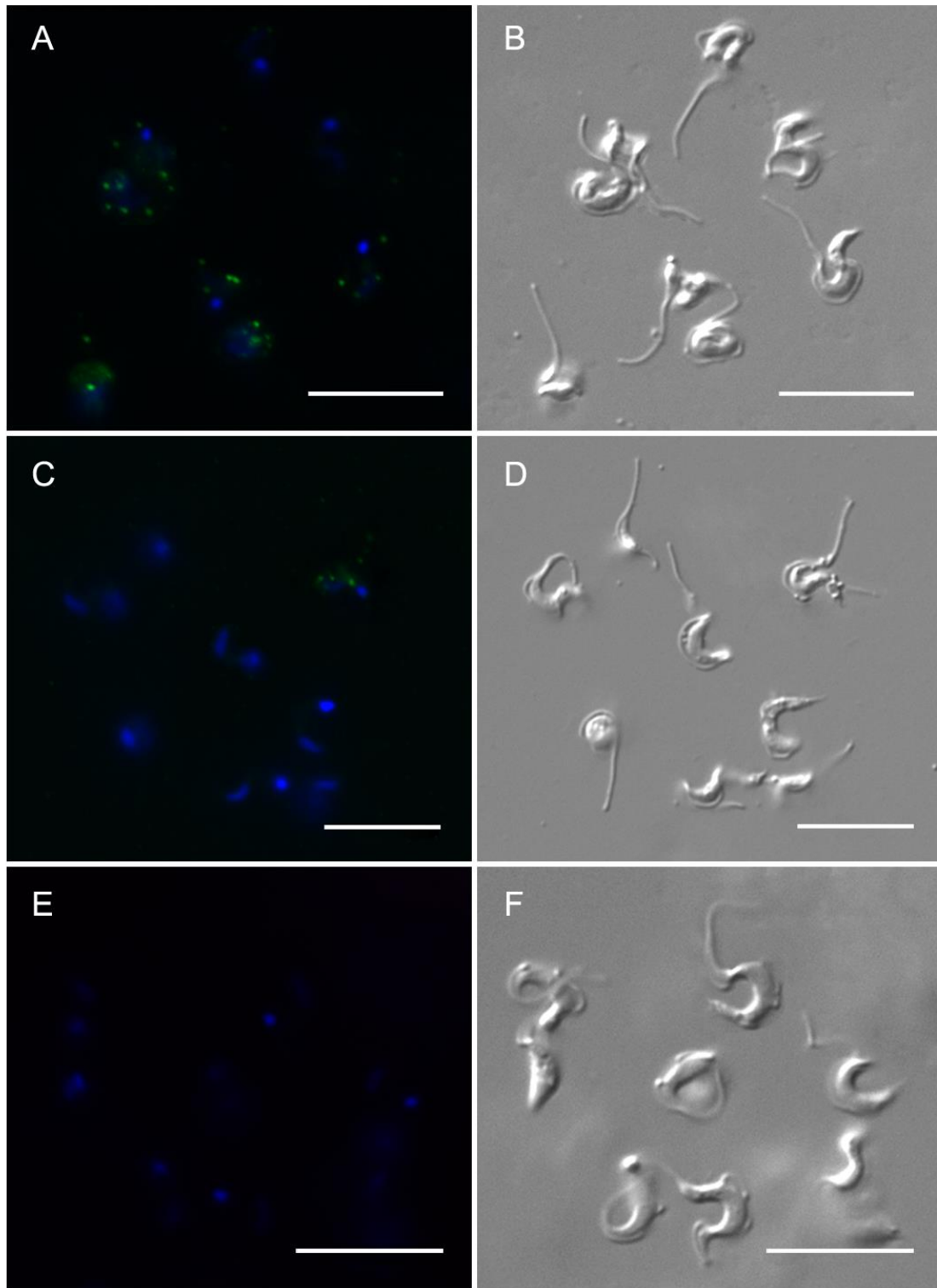
**Figura 10. Localização subcelular de proteínas de ligação à heparina (PLHs) em tripomastigotas de *T. cruzi* do isolado silvestre SMM36.** Dupla marcação de PLHs (verde) e DNA (azul) com heparina-biotinilada e DAPI. (A) Controle negativo obtido pela omissão de GAGs biotinilados e incubação com estreptavidina-FITC. Tripomastigotas vivos foram incubados por 1h no gelo com 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina (C e E). (C) Tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) do isolado silvestre SMM36 apresentam intensa marcação para PLHs ao longo da membrana flagelar. (E) Em tripomastigotas metacíclicos (MTs), PLHs foram visualizadas na superfície celular próxima a região nuclear. Imagens de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) do campo microscópico correspondente ( B, D e F). Núcleo e cinetoplasto do *T. cruzi* foram detectados pelo DAPI (azul), corante de DNA (A, C e E). Imagem representativa de >5 ensaios experimentais. Barra =10 $\mu\text{M}$ .



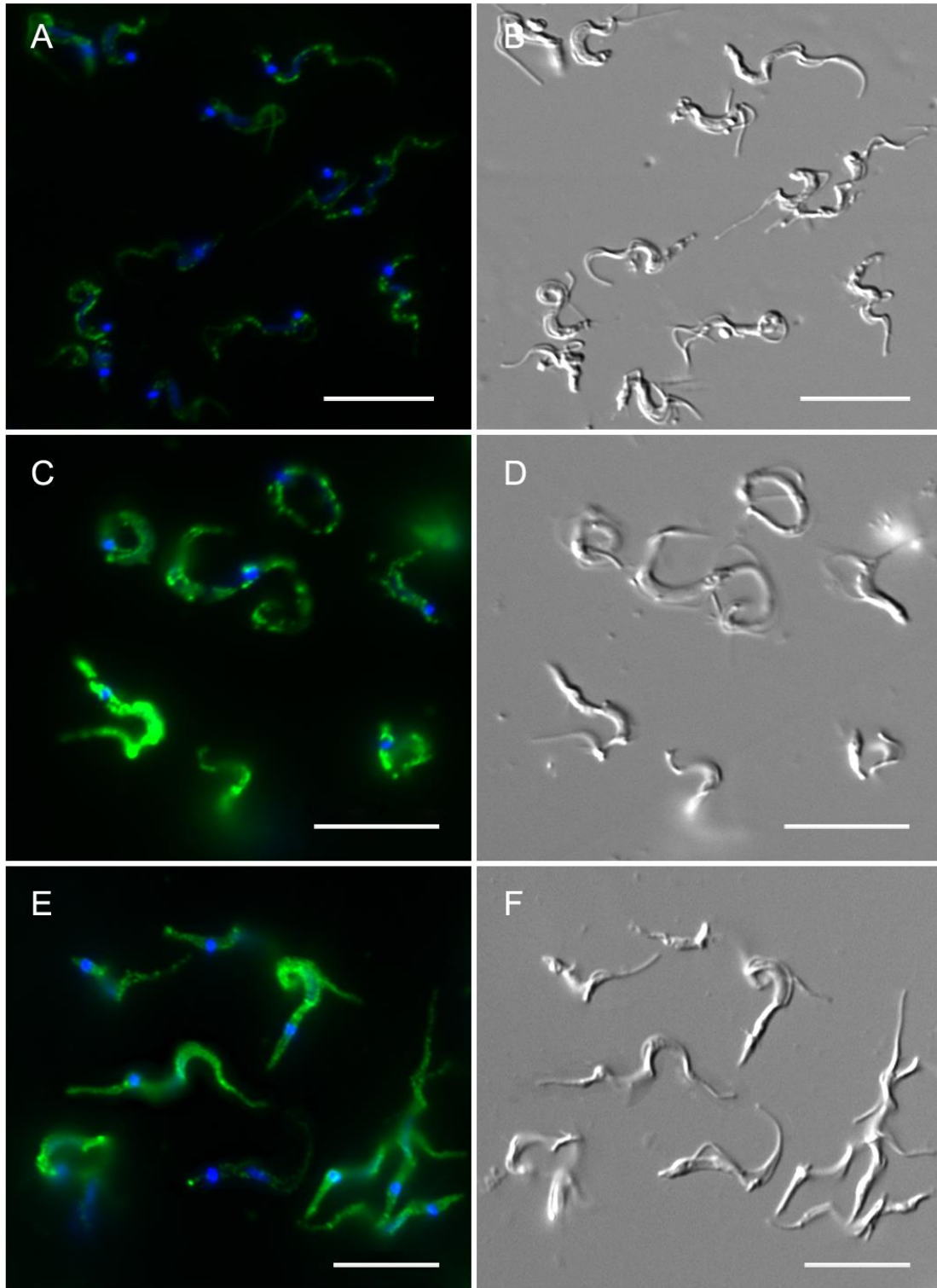
**Figura 11. Detecção de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs), cepa Y, por imunofluorescência indireta.** TCTs vivos foram incubados por 1h no gelo com anticorpos anti-2B10, anti-3F6 e anti-1G7 (verde). A análise por microscopia de fluorescência revelou a presença de gp35/50 ao longo do corpo do parasito (A), sendo observada uma reduzida marcação para gp82 (C) e ausência de gp90 na superfície do parasito (E). Imagens de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) são visualizadas em B, D e F. A coloração pelo DAPI (azul), corante de DNA, revelou núcleo e cinetoplasto do parasito (A, C e E). Imagem representativa de >5 ensaios experimentais. Barra =10μM.



**Figura 12. Localização subcelular de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y.** A localização destas glicoproteínas (GPs) de superfície foi revelada após incubação de MTs vivos (1h no gelo) com anticorpos específicos para estas glicoproteínas (verde). Note que gp35/50 (A), gp82 (C) e gp90 (E) encontram-se distribuídas homogeneamente ao longo do corpo do parasito. O controle negativo, preparado na ausência de anticorpos específicos para GPs, não apresentou sinal positivo (dado *não mostrado*). A coloração do núcleo e cinetoplasto foi obtida por DAPI, corante de DNA (A, C e E). Contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC; B, D e F). Imagem representativa de >5 ensaios experimentais Barra =10µM.



**Figura 13. Distribuição espacial de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) do isolado silvestre SMM36.** Análise por microscopia de fluorescência demonstrou a presença de gp35/50 em toda superfície do parasito (A). Sinal fluorescente reduzido foi observado para gp82 (C; anticorpo anti-3F6) e ausência de marcação foi evidenciada para gp90 (E; anticorpo anti-1G7). Núcleo e cinetoplasto foram evidenciados pelo DAPI (azul) (A, C e E). Contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) do campo microscópico correspondente (B, D e F). Imagem representativa de >5 ensaios experimentais Barra =10µM.



**Figura 14. Visualização de gp35/50, gp82 e gp90 em tripomastigotas metacíclicos (MTs) do isolado SMM36.** As glicoproteínas de superfície foram reveladas pela incubação (1h no gelo) com anticorpos específicos (verde). Note a distribuição difusa de gp35/50 (A), gp82 (C) e gp90 (E) evidenciada ao longo de todo corpo do parasito. Imagens de contraste interferencial diferencial de Nomarski (DIC) são visualizadas em B, D e F. DAPI (azul) revelou núcleo e cinetoplasto do *T. cruzi* (A, C e E). Imagem representativa de >5 ensaios experimentais Barra =10 $\mu$ M.



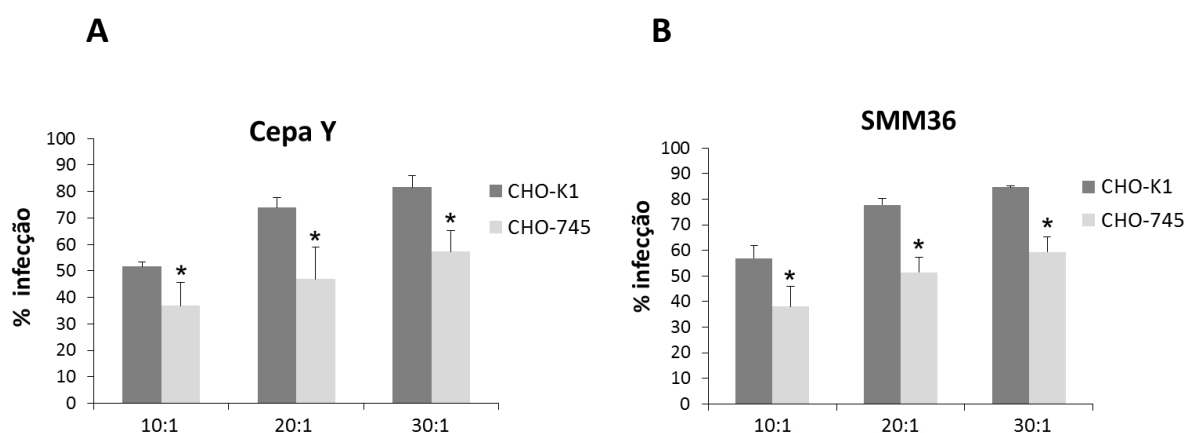
#### **4.3. Reconhecimento celular: atuação de PLH-PGHS no processo de invasão do *T. cruzi***

Considerando a expressão diferencial de PLHs entre os tripomastigotas de diferentes procedências (MT, TCT e BT) evidenciada neste estudo e a participação de proteoglicano de heparan sulfato (PGHS) na invasão do *T. cruzi* (Calvet et al., 2003), nos questionamos se a expressão de PLHs poderia ser um fator de virulência destes parasitos, favorecendo sua interação com PGHS e disparo da invasão. Para responder esta questão, utilizamos como modelo as culturas CHO-K1 e CHO-745, competentes e deficientes em glicosaminoglicanos, respectivamente. Culturas com 80% de confluência foram infectadas por 2h a 37°C com tripomastigotas de distintas procedências (TCT e MT) e diferente relação parasito-célula hospedeira (10:1, 20:1 e 30:1), sendo o perfil de infecção e índice endocítico (cálculo do percentual de células infectadas X número médio de parasitos/célula infectada) determinado por microscopia de luz.

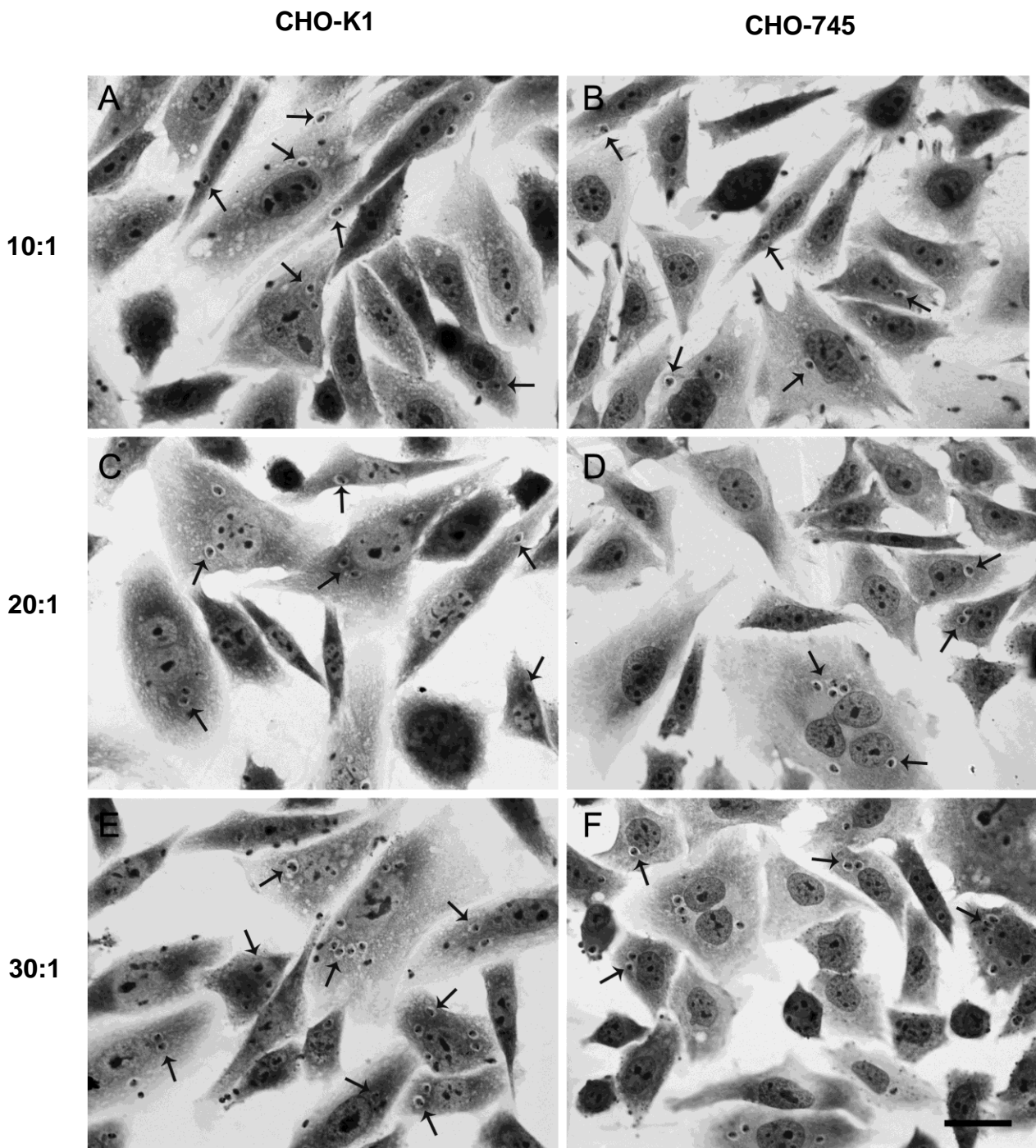
Nossos resultados revelaram um perfil de infecção similar entre TCTs da cepa Y e SMM36 em CHO-K1, variando entre 52% - 85% de acordo com a relação parasito-célula alvo. Na razão de 10:1, obtivemos 52% e 57% de infecção para a cepa Y e SMM36, respectivamente, enquanto em proporções maiores, estes valores atingiram 74% e 82% ou 78% e 85% nas relações de 20:1 e 30:1 das cepas Y e SMM36, respectivamente (*Figura 15*). É importante ressaltar que embora ocorra uma pequena diferença no perfil de infecção das culturas CHO-K1, a capacidade invasiva entre os parasitos destas DTUs foi distinta. A determinação do índice endocítico revelou que as culturas infectadas com TCTs do isolado SMM36 apresentaram maior número de parasitos internalizados (143 - 558/100 células) do que as culturas submetidas à infecção com a cepa Y (102 - 449/100 células), sendo os índices relacionados à razão parasito:célula alvo retratados na tabela 01.

Ao analisarmos o perfil de infecção de CHO-745 evidenciamos uma redução significativa no percentual de células infectadas e também no índice endocítico, comparado aos valores encontrados em CHO-K1 (*Figuras 16 e 17; Tabela 1*). Na proporção de 10:1 parasito-célula alvo observamos que a invasão alcançou 38% para ambos os genótipos de *T. cruzi* (cepa Y e isolado SMM36). Contudo, as demais relações foram caracterizadas por apresentar perfis de infecção

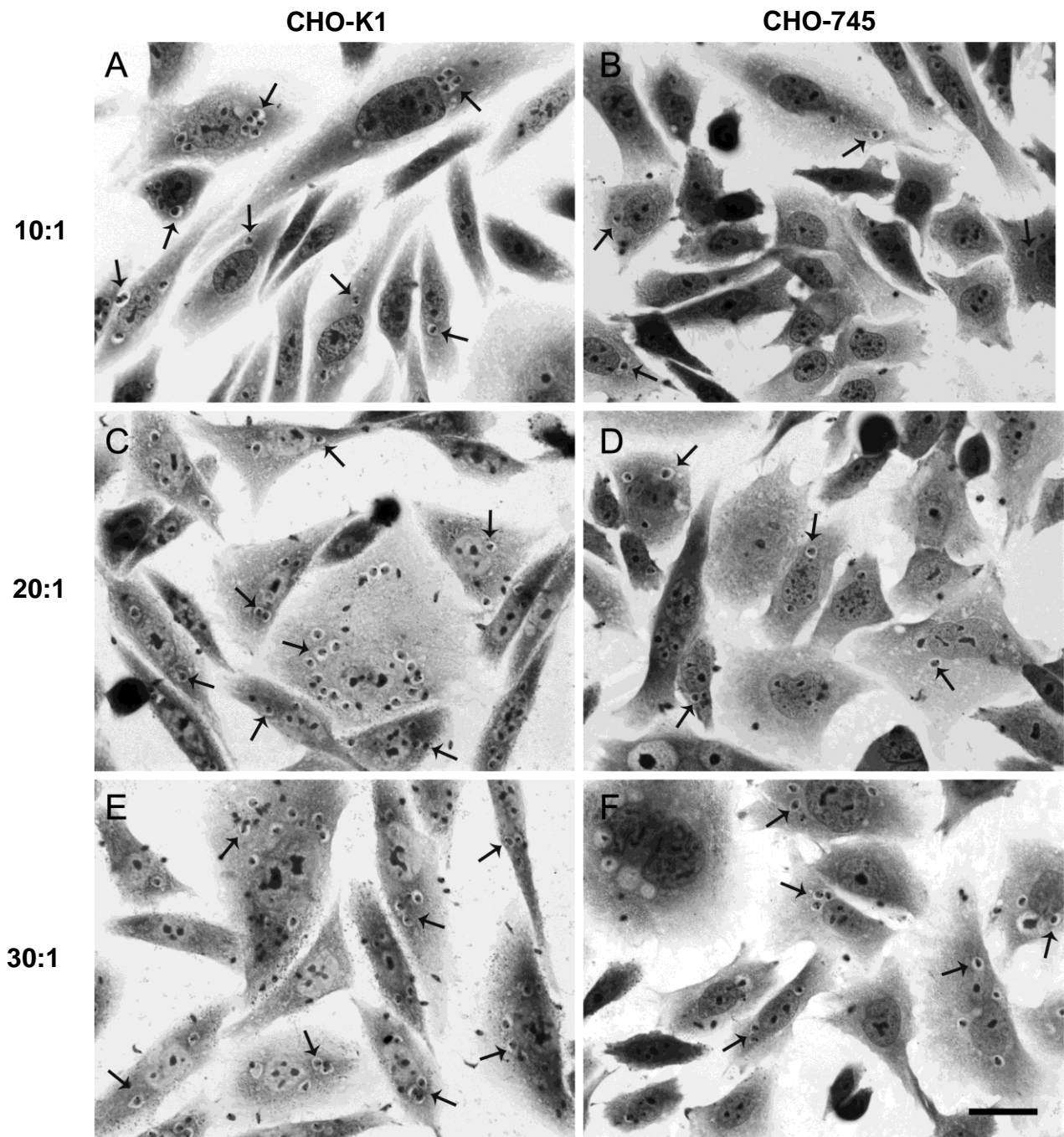
muito próximos, sendo a proporção 20:1 representada por 47% e 51% e de 30:1 por 57% e 59% mediante infecção com a cepa Y e SMM36, respectivamente (*Figura 15*). Estes valores alcançam em média uma inibição da invasão em CHO-745 de aproximadamente 30% comparado a CHO-K1. Esse percentual de inibição é ainda mais elevado se considerarmos o IE, onde obtivemos uma redução da internalização  $\geq 50\%$  em CHO-745 (*Tabela 1*). Além disso, destacamos que o índice endocítico de culturas CHO-K1 infectadas com TCTs do isolado SMM36 foi superior ( $\leq 40\%$ ) à infecção pela cepa Y (*Tabela 1*).



**Figura 15.** Participação de proteoglicanos sulfatados da célula hospedeira nos eventos de internalização de tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) em células de ovário de hamster competentes (CHO-K1) e deficientes em glicosaminoglicanos (CHO-745). (A e B) Determinação do percentual de infecção de TCTs da cepa Y (A) e isolado SMM36 (B) após 2h de interação com CHO-K1 e CHO-745 em diferentes proporções parasito-célula hospedeira. Note que o percentual de infecção aumenta proporcionalmente a relação parasito-célula alvo, atingindo o máximo de 80% em CHO-K1 na proporção 30:1 em ambos os genótipos de *T.cruzi*. Inibição de aproximadamente 30% na entrada do parasito foi evidenciada em CHO-745 nos distintos genótipos. Dados obtidos de 3 ensaios experimentais (\*)Teste *t*-student  $p \leq 0,05$ .

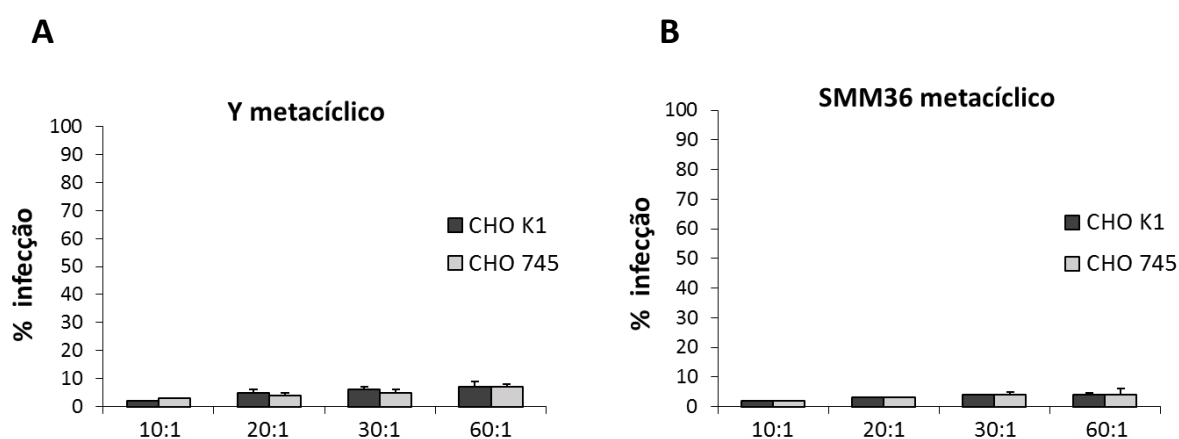


**Figura 16.** Aspecto geral de culturas de células de ovário de hamster competentes (CHO-K1) e deficientes em glicosaminoglicanos (CHO-745) infectadas por tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) da cepa Y. Culturas de CHO-K1 (A, C e E) e CHO-745 (B, D e F) foram incubadas por 2h com TCTs da cepa Y com diferentes relações parasito-célula hospedeira 10:1 (A e B), 20:1 (C e D), 30:1 (E e F). Note a presença de parasitos intracelulares (seta) e redução do perfil de infecção em células mutantes. Imagem representativa de 3 ensaios experimentais. Barra: 20 $\mu$ M.

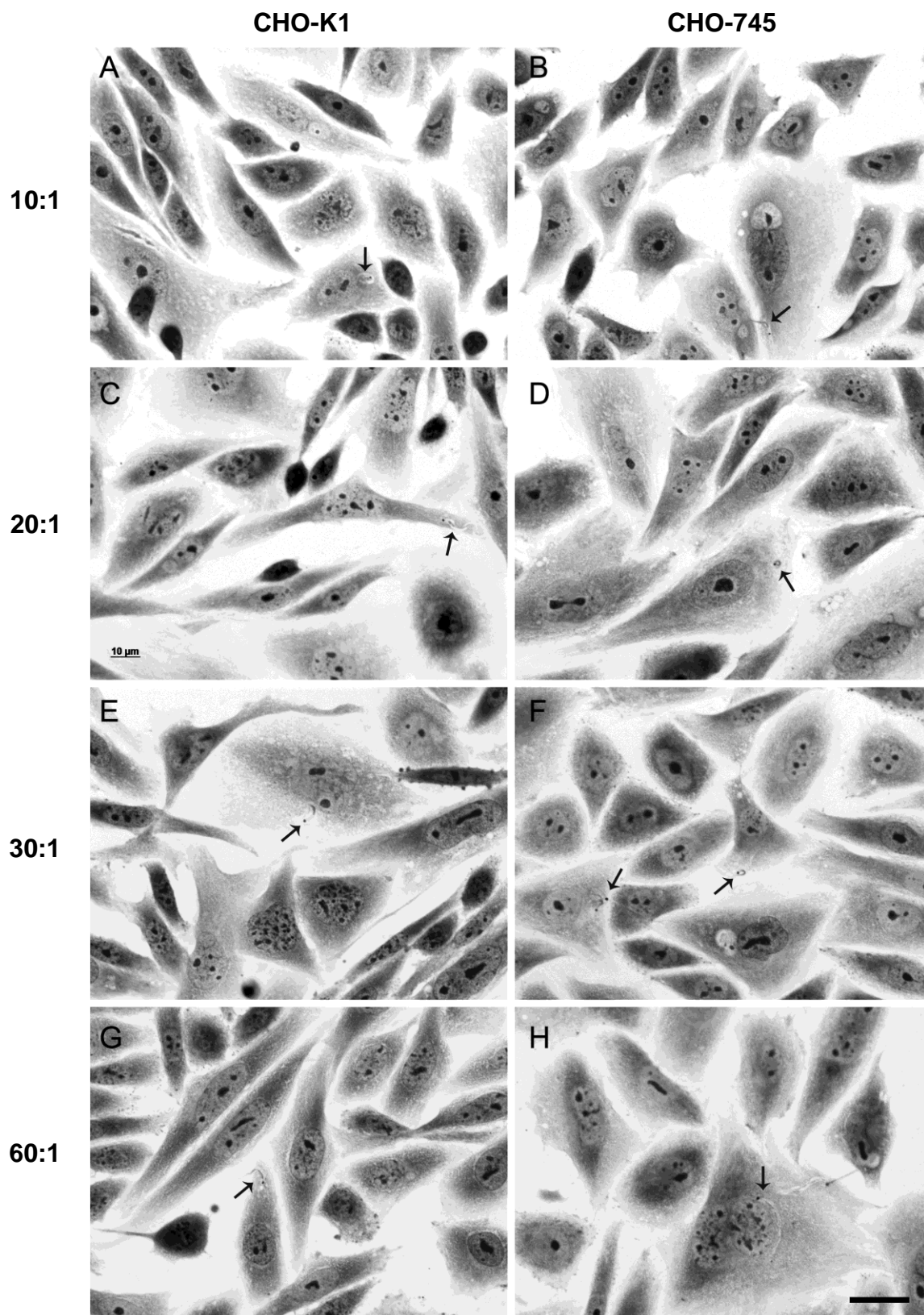


**Figura 17.** Interação de tripomastigotas derivados de cultivo celular (TCTs) do isolado SMM36 com células CHO-K1 e CHO-745. Culturas CHO-K1 (A, C e E) e CHO-745 (B, D e F) foram incubadas por 2h com TCTs do isolado silvestre SMM36 na razão de 10:1 (A e B), 20:1 (C e D) e 30:1 (E e F) parasito-célula alvo. O número de parasitos intracelulares (setas) em CHO-K1 aumenta proporcionalmente a razão parasito-célula alvo comparado com CHO-745. Este evento é claramente visualizado na proporção 20:1 (C) e 30:1 (E). Imagem representativa de 3 ensaios experimentais. Barra: 20 $\mu$ M.

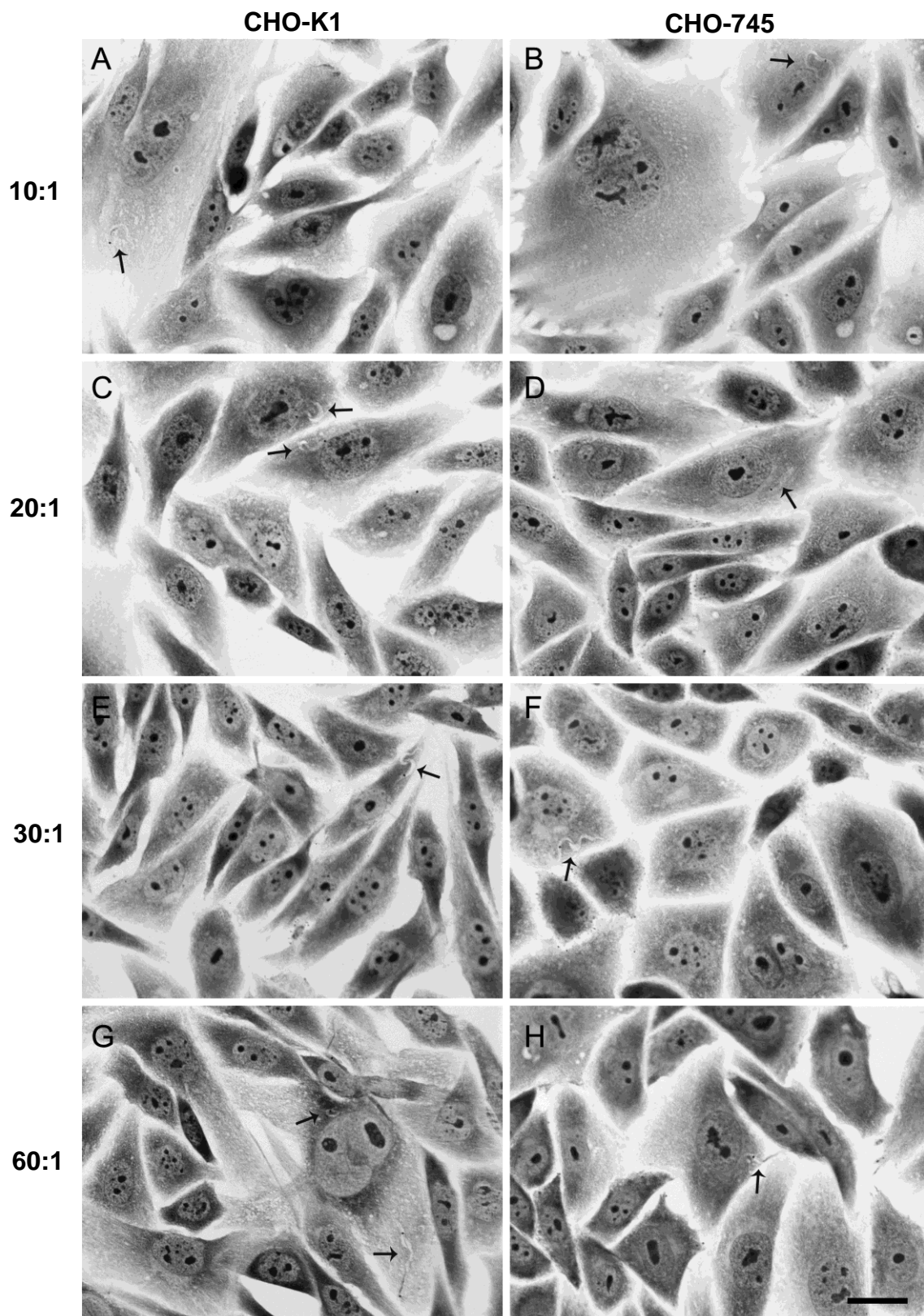
A capacidade invasiva de formas metacíclicas do *T. cruzi* também foi avaliada através da sua interação com a linhagem celular CHO-K1 e CHO-745, enfocando a participação de GAGs neste processo. Os ensaios de infecção (2h) com MT (cepa Y e isolado SMM36) foram realizados nas mesmas proporções parasito-célula alvo (10:1, 20:1 e 30:1). Contudo, nossos resultados demonstraram um perfil máximo de infecção de 6%. Desta forma, incluímos a relação 60:1 parasito-célula hospedeira como estratégia de alcance de níveis de infecção mais expressivos. Curiosamente, a aplicação do dobro da relação parasito-célula alvo não induziu a elevação do percentual de infecção, permanecendo valores  $\leq 8\%$  para os diferentes genótipos de *T. cruzi* (Figura 18). Destacamos que não houve alteração no perfil de infecção e IE entre as células competentes e deficientes em GAGs (Figuras 19 e 20; Tabela 1).



**Figura 18. Papel de proteoglicanos sulfatados da célula hospedeira no processo de invasão de tripomastigotas metacíclicos (MTs) em células CHO-K1 e CHO-745.** (A e B) A interação de formas metacíclicas (cepa Y e isolado SMM36) com células competentes (CHO-K1) e deficientes em GAGs (CHO-745) por 2h resultou em baixos níveis de infecção independente da proporção parasito-célula alvo (10:1, 20:1 e 30:1) e genótipo de *T. cruzi* (cepa Y e isolado SMM36). Resultados obtidos de 3 ensaios experimentais.

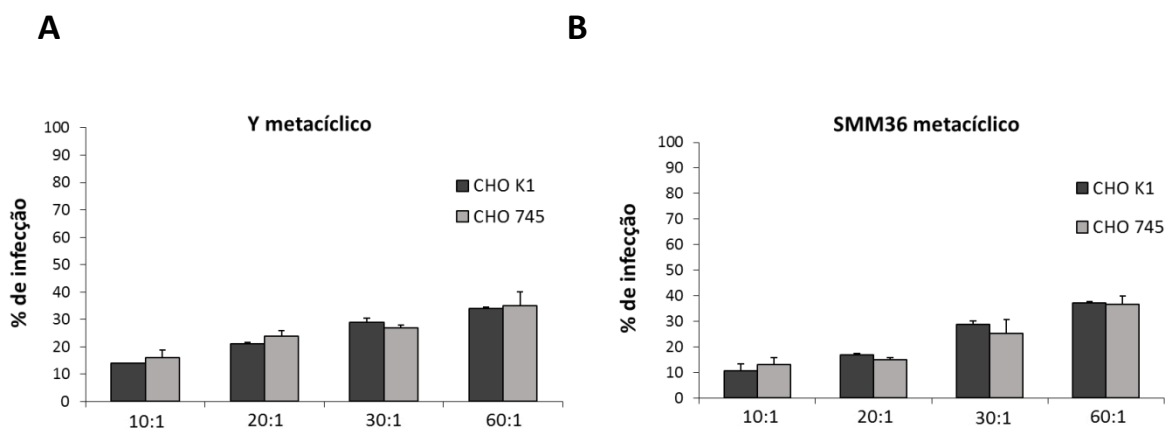


**Figura 19.** Imagens de microscopia de luz de células CHO-K1 e CHO-745 após interação com tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y. Culturas de CHO-K1 (A, C, E e G) e CHO-745 (B, D, F e H) foram infectadas por 2h a 37°C com MTs da cepa Y em diferentes proporções parasito-célula alvo. Note a presença de parasitos intracelulares (seta) e perfil de infecção similar entre as células CHO-K1 e CHO-745 na relação parasito-célula alvo de 10:1 (A e B), 20:1 (C e D), 30:1 (E e F) e 60:1 (G e H). Imagem representativa de 3 ensaios experimentais Barra: 20µM.



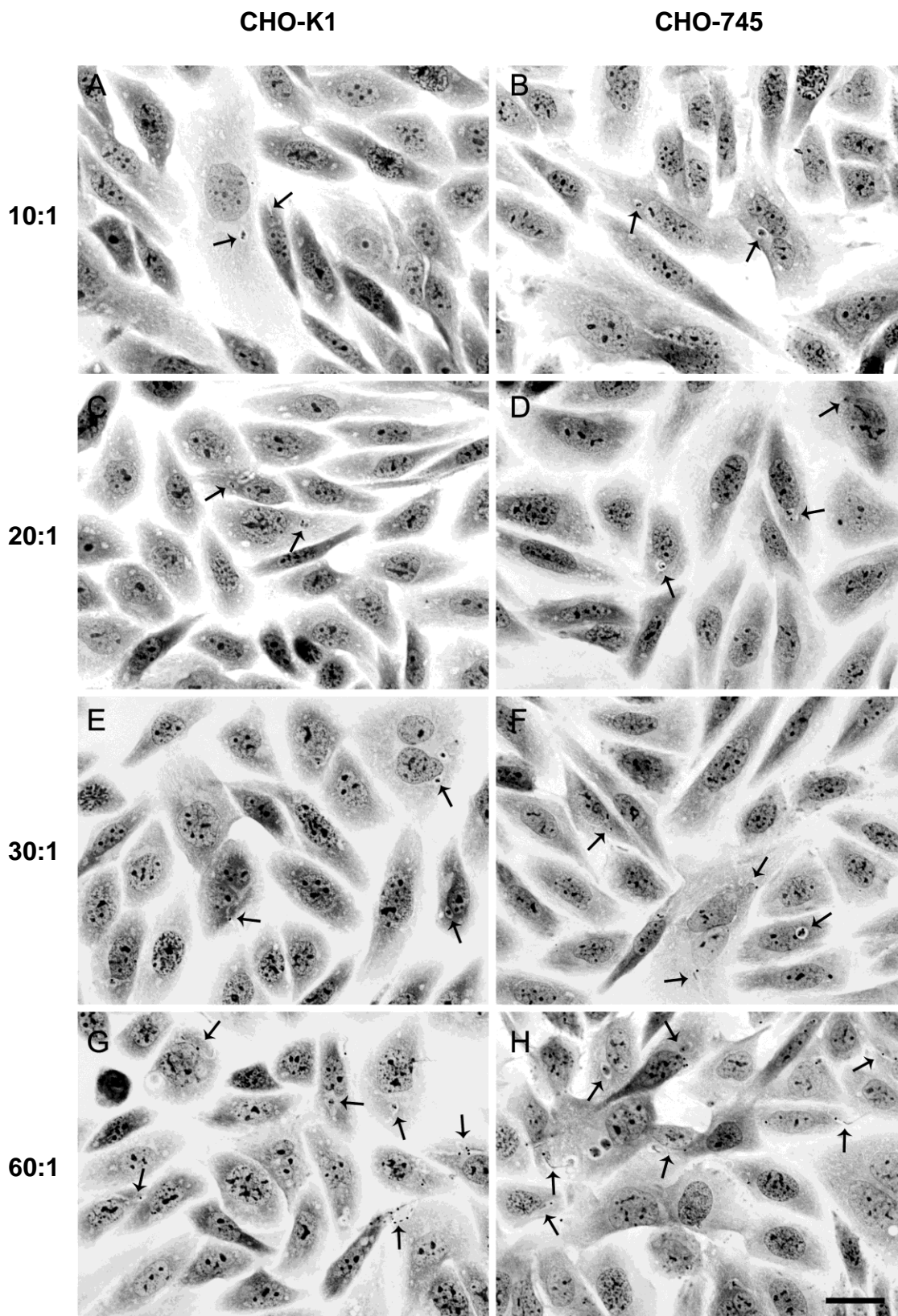
**Figura 20.** Interação de tripomastigotas metacíclicos (MTs) do isolado silvestre SMM36 com células CHO-K1 e CHO-745. Ensaios de 2h de infecção de CHO-K1 (A, C, E e G) e CHO-745 (B, D, F e H) com MTs de SMM36 apresentaram perfil de infecção similar entre células competentes (CHO-K1) e deficientes em GAGs (CHO-745). Observe o reduzido número de parasitos intracelulares (seta) nas culturas infectadas com diferentes proporções parasito-célula alvo, incluindo 10:1 (A e B), 20:1 (C e D), 30:1 (E e F) e 60:1 (G e H). Imagem representativa de 3 ensaios experimentais. Barra: 20 $\mu$ M.

Em virtude dos baixos índices de infecção, ampliamos o tempo de interação para 24 h visando avaliar se a taxa de infecção permaneceria reduzida ou atingiria valores próximos daqueles obtidos nos ensaios com TCTs (2h) dos distintos genótipos. Nossos resultados revelaram elevação do nível de infecção neste tempo de interação, mas com perfil similar entre as células controles e mutantes. Em culturas CHO-K1, o percentual de infecção atingiu 14% e 11% na relação de 10:1, 21% e 17% na razão 20:1 e na maior proporção (60:1) cerca de 34% e 37%, mediante a infecção com MT da cepa Y e SMM36, respectivamente (*Figura 21*). Todavia, na relação 30:1, a média de 29% foi alcançada para ambos os genótipos do *T. cruzi*. Os dados de quantificação da infecção das culturas CHO-745 revelaram que o número de células infectadas alcançou valores próximos a 15% (cepa Y e isolado SMM36) na menor proporção parasito-célula hospedeira (10:1). Além disso, evidenciamos níveis máximos de infecção de 24%, 27% e 37% nas razões de 20:1, 30:1 e 60:1, respectivamente, sendo estes valores aproximadamente 2X inferiores aos níveis de infecção observados nos TCTs (2h) (*Figura 21*). Ainda, ressaltamos que não houve alteração significativa no número de parasitos interiorizados entre os genótipos e tipos celulares analisados (*Figuras 22 e 23; Tabela 1*).

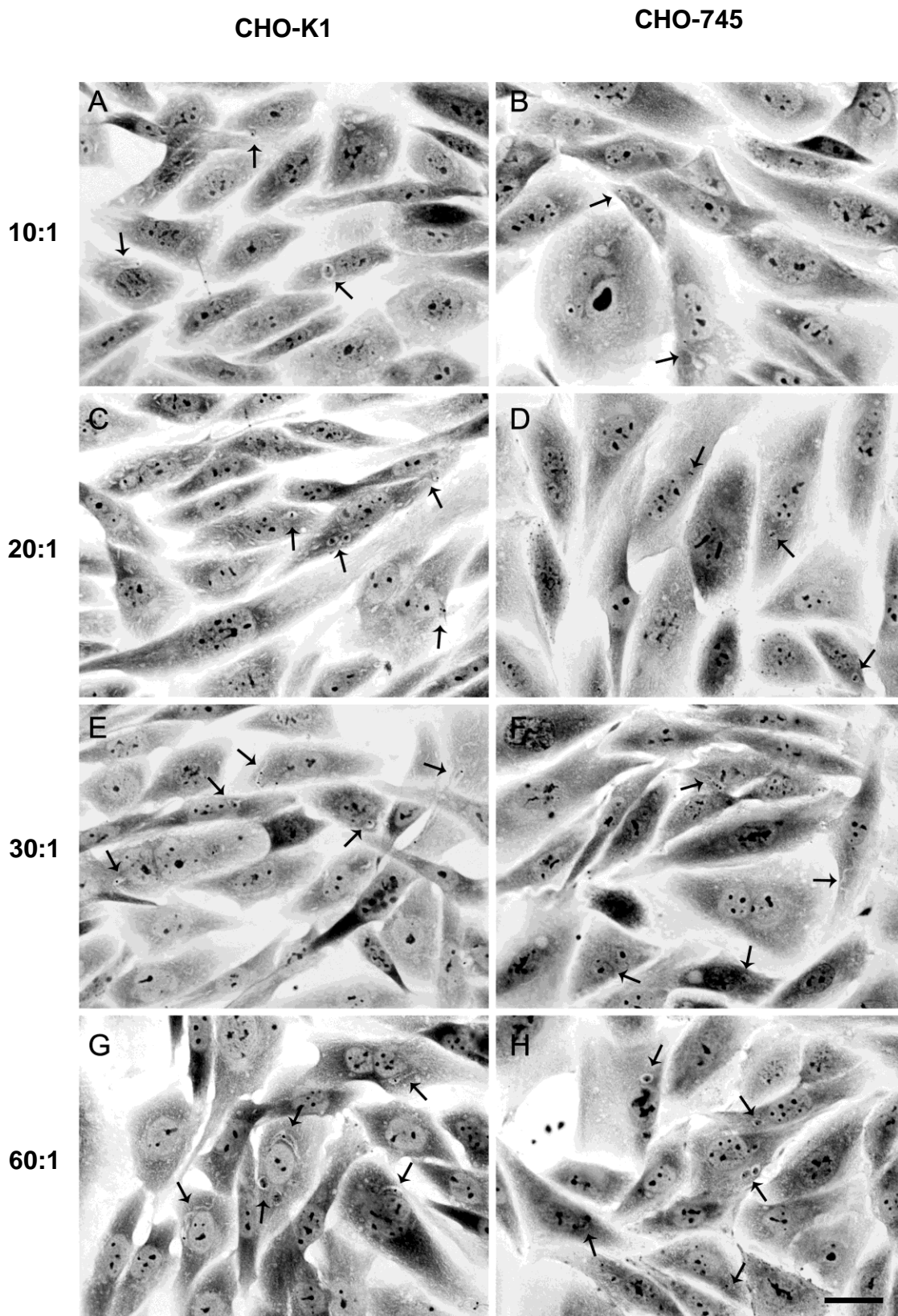


**Figura 21.** Perfil de infecção de células CHO-K1 e CHO-745 após interação com tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y e isolado SMM36. Ensaios de 24h de interação com MTs da cepa Y (A) e isolado SMM36 (B) revelaram uma infecção proporcional à razão parasito-célula alvo, alcançando o máximo de infecção de 37% na relação de 60:1. Não foi observado diferenças no percentual de infecção entre células competentes (CHO-K1) e deficientes em GAGs (CHO-745) nos diferentes genótipos de *T. cruzi*. Dados obtidos de 3 ensaios experimentais.





**Figura 22.** Aspecto geral da interação de culturas CHO-K1 e CHO-745 com tripomastigotas metacíclicos (MTs) da cepa Y. Culturas de células competentes (CHO-K1; A, C, E e G) e deficientes em GAGs (CHO-745; B, D, F e H) foram incubadas por 24h com MTs da cepa Y. O perfil de infecção foi similar em células CHO-K1 e CHO-745 e proporcional a relação parasito-célula alvo. Parasito intracelular (seta). Relação parasito-célula hospedeira de 10:1 (A e B), 20:1 (C e D), 30:1 (E e F) e 60:1 (G e H). Imagem representativa de 3 ensaios experimentais. Barra: 20 $\mu$ M.



**Figura 23.** Micrografia de microscopia de luz da interação de tripomastigotas metacíclicos (MTs) do isolado silvestre SMM36 com células CHO-K1 e CHO-745. Ensaios de 24h de infecção de CHO-K1 (A, C, E e G) e CHO-745 (B, D, F e H) com MTs do isolado SMM36. Note a presença de parasitos intracelulares (seta) e perfil similar de infecção entre as células competentes e mutantes nas diferentes proporções parasito-célula alvo. Razão 10:1 (A e B), 20:1 (C e D), 30:1 (E e F) e 60:1 (G e H). Imagem representativa de 3 ensaios experimentais. Barra: 20 $\mu$ M.

ÍNDICE ENDOCÍTICO								
Relação Parasito/célula alvo	TCT (2h)				MT (2h)			
	Cepa Y		Isolado SMM36		Cepa Y		Isolado SMM36	
	CHO-K1	CHO-745	CHO-K1	CHO-745	CHO-K1	CHO-745	CHO-K1	CHO-745
10:1	101±9	53±3*	143±2 <sup>†</sup>	76±3*	2±0	3±0	2±0	2±0
20:1	223±26	94±13*	337±12 <sup>†</sup>	156±13*	5±1	5±1	3±0	3±0
30:1	449±43	150±0*	558±14 <sup>†</sup>	188±15*	6±1	5±1	3±0	3±0
60:1	-	-	-	-	8±2	8±2	4±1	4±2

ÍNDICE ENDOCÍTICO				
MT (24h)				
Relação Parasito/célula alvo	Cepa Y		Isolado SMM36	
	CHO-K1	CHO-745	CHO-K1	CHO-745
10:1	18±0	21±3	12±4	16±4
20:1	32±3	33±1	21±2	22±2
30:1	42±1	41±1	43±0	45±6
60:1	57±3	60±2	63±7	60±1

**Tabela 1: Índice endocítico (IE) de CHO-K1 e CHO-745 infectadas com tripomastigotas de distintas procedências.** Ensaios de 2h de infecção de culturas CHO-K1 e CHO-745 com TCTs da cepa Y e isolado SMM36 demonstraram redução significativa do IE em células deficientes em GAGs (\*). O valor de IE em culturas infectadas com MTs é inferior aos TCTs mesmo após 24h de infecção. O valor de IE de células CHO-K1 infectadas com TCTs do isolado SMM36 (<sup>†</sup>) é significativamente superior ao TCTs da cepa Y. No entanto, células infectadas com MTs de ambos os genótipos (2h e 24h) apresentaram níveis similares de internalização do parasito na célula alvo. Resultados obtidos de 3 ensaios experimentais. Teste *t*-student (\*)  $p \leq 0,05$  e (<sup>†</sup>)  $p \leq 0,01$ .

# DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

Patógenos intracelulares desenvolveram estratégias distintas para subverter a resposta imune e estabelecer a infecção e persistência em hospedeiros mamíferos, permitindo a propagação de sua espécie (Deretic & Levine, 2009). O reconhecimento entre ligantes e receptores presentes na superfície do parasito e célula alvo é identificado como evento primordial e pré-requisito para uma infecção bem sucedida. A adesão inicial recorrente desse processo pode levar a ativação de vias de sinalização específicas que culminam na entrada do parasito (Barrias et al., 2013; Dawn et al., 2014; Popoff et al., 2014). Dentre o repertório de moléculas de superfície dos parasitos envolvido no reconhecimento celular, destacamos as proteínas de ligação à heparina (PLHs) que atuam no ciclo de vida de diferentes patógenos como *Plasmodium sp* (Mathias et al., 2013; Armistead et al., 2011; Kobayashi et al., 2010), *Leishmania sp* (de Castro Côrtes et al., 2012a,b) e *T. cruzi* (Calvet et al., 2003; Oliveira-Jr et al., 2008, 2012a,b), favorecendo o reconhecimento entre células de mamíferos e do inseto vetor. Desta forma, PLHs têm sido apontadas como candidatas promissoras para terapia de algumas doenças infecciosas.

Nosso grupo tem investido no entendimento da interação entre PLHs e proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS) no processo de invasão do *T. cruzi*. Dados prévios demonstraram a participação efetiva do PGHS mediando o reconhecimento e invasão de tripomastigotas e amastigotas em cardiomiócitos (Calvet et al., 2003; Oliveira-Jr et al., 2008; Bambino-Medeiros et al., 2012) e ainda, com células do epitélio do trato intestinal de *Rhodnius prolixus* (Oliveira-Jr et al., 2012a), demonstrando a importância destes ligantes no ciclo biológico do *T. cruzi*. Recentemente, a caracterização bioquímica de PLHs do *T. cruzi* revelou sua atividade proteolítica de serino protease (Oliveira-Jr et al., 2012b), sugerindo um complexo cenário de interações biomoleculares na entrada do parasito. Apesar dos avanços no conhecimento sobre as PLHs, questões relacionadas à expressão diferencial destas proteínas nos genótipos do *T. cruzi* e seu papel na virulência do parasito não foram ainda elucidados.

A diversidade genética do parasita é, sem dúvida, um fator importante que influencia vários parâmetros biológicos (revisado por Zingales et al., 2012), e tem sido sugerido que pode ser parcialmente responsável pelos diferentes

desfechos clínicos da doença de Chagas (Macedo et al., 2004). O mapeamento filogenético associado às análises proteômicas apontam para expressão diferencial de proteínas entre as diferentes DTUs, demonstrando que 29 de 261 proteínas foram superexpressas em estoques de *T. cruzi* pertencentes à mesma DTU (Telleria et al., 2010). Ainda, a capacidade invasiva do *T. cruzi* e o mecanismo disparado na entrada do parasito também parecem ser modulados pela expressão diferencial de componentes de superfície nos distintos genótipos e estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (Ruiz et al., 1998; Risso MG et al., 2004; Ferreira et al., 2006).

Nossos dados de expressão de PLHs não revelaram diferenças entre os dois genótipos de *T. cruzi* analisados (TcII e Z3), mas o perfil de expressão desta proteína foi claramente distinto entre os tripomastigotas de diferentes procedências. A maior expressão de PLHs em populações de TCTs da cepa Y (TcII) e SMM36 (Z3) e ainda BT (cepa Y, TcII) comparado aos MTs destas mesmas DTUs aponta para o relevante papel de PLHs na entrada de formas TCTs e BTs do *T. cruzi*. Assim, considerando que o mecanismo de invasão de MTs é modulado pela expressão das glicoproteínas de superfície gp82, gp35/50 e gp90 (Do Carmo et al., 2002; Ferreira et al., 2006; revisto por Maeda et al., 2012; Yoshida, 2008), avaliamos se estas proteínas poderiam ser também preferencialmente expressas em TCTs e BT dos diferentes genótipos. Surpreendentemente, PLHs se revelaram como proteínas majoritárias em TCTs e BT quando comparadas a gp82 e gp90. As análises de Western blotting confirmaram a reduzida expressão de gp82 e ausência de gp90 em TCTs de ambos os genótipos e BT da cepa Y. Por outro lado, o perfil de expressão destas proteínas foi inversamente proporcional em MTs, onde os níveis de expressão de gp82 e gp90 foram consideravelmente superiores a PLHs, corroborando dados da literatura que reportam a expressão de gp82 e gp90 em MTs (Cortez et al., 2014; Málaga & Yoshida, 2001; revisto por Maeda et al., 2012;). Ressaltamos, porém, expressão similar de gp35/50 em TCTs e MTs dos diferentes genótipos evidenciado pela análise de citometria de fluxo.

A expressão diferencial de glicoproteínas como gp82, gp35/50 e gp90 foi previamente reportada em *T. cruzi* de diferentes genótipos (Ruiz et al., 1998). Embora cepas G (TCI) e CL (TcVI) expressem um perfil similar de gp82, os níveis de gp90 e gp35/50 são distintos entre as duas cepas, modulando a

capacidade invasiva através do disparo de mecanismos distintos de invasão (Yoshida 2006). A presença de elevados níveis de gp35/50 e gp90 na cepa G, modulando negativamente gp82 e favorecendo o reconhecimento por gp35/50, libera  $Ca^{2+}$  de acidocalciossomo e dispara um mecanismo de invasão dependente de citoesqueleto (Ferreira et al., 2006; revisado por Maeda et al. 2012). Em contraste, a elevada expressão de gp82, ausência de gp90 e reduzida expressão de gp35/50 na cepa CL foram os principais responsáveis por definir a elevada capacidade infectiva deste parasito. A interação de gp82 com a superfície da célula alvo, que libera  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático em ambos o parasito e célula hospedeira, dispara um mecanismo de invasão dependente de lisossomos (Martins et al., 2011). Portanto, a expressão de PLHs e gp35/50 em TCTs da cepa Y e isolado SMM36 sugere o disparo de mecanismos alternativos de invasão, independente de lisossomos.

A presença de gp90 no *T. cruzi* cepa Y é conflitante com os dados reportados por Ruiz e colaboradores (1998) que demonstraram a ausência desta glicoproteína na superfície destes parasitos. Curiosamente, dados recentes do grupo revelaram a expressão diferencial de gp82 em duas amostras de *T. cruzi* denominadas como cepa Y (Cortez et al., 2012). As linhagens derivadas da cepa Y, identificadas como Y30 (TcII) e Y82 (TcVI), reagem com anticorpo anti-3F6, que reconhece a proteína estágio específico gp82 e liga a uma proteína relacionada de 30 kDa no isolado Y30. No entanto, embora Y30 dispare um mecanismo de invasão dependente de lisossomos, este parasito apresenta baixa propriedade infectiva no epitélio gástrico, provavelmente em virtude de mudanças na sequência peptídica correspondente ao sítio de ligação à mucina gástrica. A infecção de células HeLa por Y30 também foi inferior ao isolado Y82, mesmo em proporções parasito-célula hospedeira superiores, demonstrando a ineficiência de invasão deste parasito. Este conjunto de dados sugere a presença de subpopulações em cepas que podem apresentar perfil distinto de expressão de proteínas de superfície e, portanto, podem determinar maior ou menor virulência de parasitos dentro da mesma cepa. Em nosso estudo, TCT e BT da cepa Y tiveram níveis de expressão de PLHs distintos, sendo evidenciado uma redução de 41% da população positiva para PLHs em BT, mas foram negativos para gp90 e apresentaram baixa expressão de gp82. Este fato pode estar

relacionado com a seleção de populações que melhor se adaptaram ao microambiente. Portanto, é possível que a infecção cíclica de TCTs em células de mamíferos, que expressam HS abundantemente na superfície celular, selecione populações do parasito que expressam elevados níveis de PLHs. Por outro lado, BT, que interage com diferentes mediadores sanguíneos e necessita invadir rapidamente diferentes tecidos para escapar do sistema imune, pode apresentar múltiplos ligantes como estratégia de invasão, incluindo PLHs. No entanto, é importante ressaltar que não houve reatividade com proteínas de massa molecular de 30 kDa.

Curiosamente, as proteínas da família das trans-sialidases (TS), envolvidas no processo de invasão, também são diferencialmente expressas nas diferentes DTUs do *T. cruzi*. Cepas de *T. cruzi* TcII (isolados RA, Q501/3, Br e Cvd) expressam e secretam níveis de TS superiores ao TcI (isolados CA-I, K-98, Hc e Ac). Este perfil distinto de TS conferiu elevada virulência das cepas TcII em modelo experimental animal, identificando TS como importante fator de virulência em BTs (Risso et al., 2004). Recentemente, a análise da expressão de genes de TS em diferentes DTUs do *T. cruzi* revelou a ausência de genes TS inativo (iTS) em TcI, TcIII e TcIV, juntamente com a presença de aTS/iTS nas cepas TcII e TcVI (virulentas), sugerindo uma correlação entre a ausência de iTS com a menor virulência do parasito (Burgos et al., 2013). Ainda, a ligação de TS em células cardíacas in vivo parece desempenhar um papel importante na patogênese da doença de Chagas, aumentando o parasitismo tissular e inflamação do miocárdio devido aos mecanismos imune efetores específicos contra antígenos do parasito (Alcântara-Neves et al., 2004; Trocoli Torrecilhas et al., 2009). Neste contexto, a microvasculopatia induzida pelo *T. cruzi* e sua associação com a ativação do sistema cinina por cruzipaina, onde o receptor de bradicinina-1 (BK<sub>1</sub>R) sustenta a resposta inflamatória e BK<sub>2</sub>R, juntamente com endotelina-1, orchestra o derrame de plasma no tecido cardíaco, favorece a invasão de células cardiovasculares, inflamação e remodelamento cardíaco (Scharfstein et al., 2013). Interessantemente, estudos apontam para a participação de PLHs, secretada por neutrófilos, em derrame vascular e formação de edema inflamatório através de associação com receptores endotelina-1 em pacientes sépticos (Persson et al., 2014). Este conjunto de dados nos leva a questionar se as PLHs do *T. cruzi* poderiam, tal



como cruzipaina, participar de outros eventos biológicos envolvidos na patogênese da doença de Chagas.

Outra abordagem deste estudo refere-se à localização subcelular de PLHs e GPs em tripomastigotas de diferentes procedências e DTUs. Relatamos que a localização de gp82, gp90 e gp35/50 encontra-se dispersa em toda superfície celular das formas tripomastigotas (TCT e MT) da cepa Y e SMM36, com exceção de gp82 e gp90 que é pouco expressa ou ausente em TCTs, respectivamente. Estes achados corroboram dados previamente publicados que demonstram a localização de GPs (gp35/50, gp82 e gp90) e trans-sialidases distribuídas por todo o corpo de MTs (Bayer-Santos et al., 2013; Buschiazzo et al., 2012; Cordero et al., 2008). Por outro lado, as análises de microscopia de fluorescência revelaram a presença de PLHs apenas na membrana flagelar de TCTs (cepa Y e SMM36) e BT da cepa Y. Em contraste, um número reduzido de tripomastigotas metacíclicos dos diferentes genótipos apresentou PLHs localizada em regiões da membrana próxima ao núcleo do parasito. Nossos resultados reforçam dados prévios do grupo que demonstraram a localização específica de PLHs na membrana flagelar em TCTs do clone Dm28c (Oliveira Jr et al., 2012b) e promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (De Castro-Côrtes et al., 2012a). A membrana flagelar do *T. cruzi* é enriquecida em microdomínios lipídicos de membrana (*lipid rafts*) que estão associados a intensa sinalização (Maric et al., 2010), sendo demonstrado que determinadas proteínas são localizadas exclusivamente ou concentradas na membrana flagelar, como ocorre com as proteínas de ligação à  $Ca^{2+}$  (Maric et al., 2011). Recentemente, estudos demonstraram que a interação de gp85, membros da superfamília de trans-sialidase, com componentes de matriz extracelular disparam a fosforilação de proteínas do domínio paraflagelar e alfa-tubulina desencadeando a entrada do parasito (Mattos et al., 2012), demonstrando que proteínas estruturais do flagelo cooperam no disparo de vias de sinalização. Portanto, é possível que a localização de PLHs neste sítio dinâmico de sinalização favoreça sua interação com seu receptor e coordene os mecanismos envolvidos na entrada do parasito.

Neste contexto, avaliamos a participação de PLHs no processo de invasão de tripomastigotas das DTUs estudadas (TcII e Zimodema 3) a fim de determinar o papel da interação PLHs-PGHS na invasão dos diferentes

tripomastigotas e genótipos de *T. cruzi*. Como estratégia experimental, realizamos ensaios de infecção em células de ovário de hamster chinês competentes (CHO-K1) e deficientes em glicosaminoglicanos (CHO-745). Evidenciamos que TCTs da cepa Y e isolado SMM36 apresentam menor capacidade invasiva em CHO-745 quando comparadas com as células competentes. A deficiência em GAGs na superfície celular acarretou uma redução de aproximadamente 30% da entrada do parasito independente das proporções parasito-célula alvo adotadas. Embora não tenha sido observado diferenças no percentual de infecção entre TCTs da cepa Y e isolado SMM36 em CHO-K1, os valores de índice endocítico foram significativamente superiores na infecção com SMM36, sugerindo uma maior avidéz destes parasitos no disparo da invasão.

A discrepância da capacidade invasiva entre TCTs e MTs é bastante relevante, sendo evidenciado uma notável redução de 54% na entrada de MTs mesmo após tempos longos de interação (24h) e proporção parasito-célula alvo 2X superior (razão 60:1). Por outro lado, apenas a invasão de TCTs foi significativamente reduzida na interação com células CHO-745, demonstrando claramente o papel da interação PLHs-GAGs neste processo. É fato que os resultados de interação com MTs excluiu a participação de PLHs na entrada destes parasitos, mas aponta sua ineficiência de invadir esta célula de origem epitelial. Estes dados são conflitantes com os achados de infecção oral, onde MTs são capazes de invadir o epitélio gástrico mediado por um mecanismo dependente de gp82 (Yoshida 2009). No entanto, a elevada expressão de gp90 em MTs das diferentes DTUs estudadas (TcII e Z3) pode ser um fator determinante neste processo, uma vez que esta proteína foi descrita como reguladora negativa de gp82 (Cortez et al., 2006). Por outro lado, a baixa infecção de MTs tem sido reportada em modelos de infecção animal (Dias et al., 2013; Vieira et al., 2009), exceto por infecção via oral onde BT raramente inicia a infecção de mucosas (Hoft 1996). Ainda, estudos realizados em modelo murino e canino inoculados com MT ou BT demonstraram perfil distinto de infecção. A infecção por BT acarreta elevado parasitismo tissular e maior expressão de quimiocinas e citocinas próinflamatórias na fase aguda de infecção enquanto MT apresentou parasitemia subpatente com expressão de IL-10, sugerindo que a infecção natural ou via transfusional podem

desencadear interações parasito-hospedeiro distintas durante a fase aguda e influenciar aspectos imunopatológicos da doença de Chagas (de Souza et al., 2014; Vieira et al., 2012).

Em conjunto, os dados de expressão de PLHs e GPs associados ao perfil de infecção em TCTs apontam para um mecanismo de infecção mediado por PGHS e modulado por citoesqueleto, uma vez que TCTs expressam níveis elevados de PLHs e gp35/50. Embora o mecanismo de invasão dependente de lisossomos tenha sido descrito como única via de entrada por décadas, múltiplos mecanismos de invasão são atualmente reconhecidos como estratégia de interiorização e persistência do *T. cruzi* (Fernandes e Andrews 2012; Ferreira et al., 2006; Romano et al. 2009, 2012; Rosestolato et al., 2002; Todorov et al, 2000). Nosso estudo contribui para um melhor entendimento da relação entre proteínas de superfície, com enfoque em PLHs e GPs, genótipo e forma evolutiva do *T. cruzi* no processo de invasão. Recentemente, reportamos um novo mecanismo de invasão do *T. cruzi* mediado por quinase de adesão focal (FAK) (Melo et al., 2014), que modula citoesqueleto em diferentes eventos biológicos (Parsons, 2003). Considerando que a ativação de FAK seja regulada por agregação de integrinas e/ou PGHS (Bass et al., 2002; Hall et al., 2011; Schaller et al., 2010), nossa hipótese é pautada no disparo da ativação de FAK mediado pela interação PLHs-PGHS na superfície celular, levando a agregação de PGHS e autofosforilação de FAK, modulando positivamente a entrada do parasito. A via de sinalização de TGF-beta é outra via ativada na entrada do *T. cruzi* (Ming et al., 1995; Waghbi et al., 2005) que pode ser orquestrada pela interação PGHS e PLHs. Evidências demonstram a associação de HS e TGF-beta latente na superfície celular e a participação de PGHS como apresentadores de TGF-beta ativo ao receptor tipo II desta via de sinalização (Chen et al., 2007; Parsi et al., 2010). Portanto, TGF-beta latente poderia ser ativado na superfície celular pela atividade proteolítica de PLHs durante sua interação com PGHS, desencadeando a fosforilação de Smads e ativação de diferentes vias envolvidas com a modulação do citoesqueleto (Maddala et al., 2003; Moustakas & Heldin et al., 2008). Os dados deste estudo juntamente com resultados prévios do grupo fornecem fortes evidências da participação de PLHs e PGHS na entrada do *T. cruzi*. O esclarecimento dos mecanismos

disparados pela interação PLHs-PGHS é, sem dúvida, de grande interesse e será foco de futura investigação.

# CONCLUSÃO

## **6. CONCLUSÕES**

1. Tripomastigotas de genótipos e procedência distintas apresentam expressão diferencial de proteínas de ligação à heparina (PLHs) e glicoproteínas (GPs) como gp35/50, gp82 e gp90 em sua superfície. TCTs apresentam maior expressão de PLHs e gp35/50 enquanto MTs possuem elevados níveis de gp82, gp35/50 e gp90.
2. PLHs apresentam distribuição espacial distinta nos tripomastigotas de diferentes procedências, estando localizadas na membrana flagelar de TCTs e próximo ao domínio nuclear em MTs. GPs estão distribuídas por todo o corpo do parasito, exceto gp90 que é negativa em TCTs.
3. TCTs apresentam elevado perfil de infecção em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), sendo a capacidade invasiva de SMM36, determinada pelo índice endocítico, relacionada com a maior expressão de PLHs.
4. PLHs não desempenham papel importante na invasão de tripomastigotas metacíclicos (cepa Y e isolado SMM36) onde a deficiência em glicosaminoglicanos (GAGs) em células mutantes não alterou o perfil de infecção.
5. A inibição da interação PLHs-GAGs no modelo CHO-745 induz redução na entrada de TCTs de ambos os genótipos do *T. cruzi*.

### **Conclusão geral**

PLHs são expressas diferencialmente na superfície de tripomastigotas de distintas procedências e genótipos do *T. cruzi* e modulam a interação com PGHS como estratégia de invasão do parasito.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADL SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick RS, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012. Sep; 59(5):429-93.
- Agustí R, Giorgi ME, de Lederkremer RM. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* efficiently transfers alpha-(2-->3)-linked N-glycolylneuraminic acid to terminal beta-galactosyl units. *Carbohydr Res.* 2007. 26;342(16):2465-9.
- Alcântara-Neves NM, Ribeiro-dos-Santos R, Amor AL, Uemura H, Silva-Neto SJ, Eichinger D, Pontes-de-Carvalho L. Parasite-derived trans-sialidase binds to heart tissue in *Trypanosoma cruzi*-infected animals. *Microb Pathog.* 2004. 37(5):273-8.
- Alves LR, Avila AR, Correa A, Holetz FB, Mansur FC, Manque PA, de Menezes JP, Buck GA, Krieger MA, Goldenberg S. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* 2010. 452(2):72-8.
- Altchek J, Biancardi M, Lapena A, Ballering G, Freilij H. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* . 2005. 38 (Suppl. 2): 41–45.
- Altchek J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics.* 2011. 127(1): e212– e218.
- Alvarez VE, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2012. 824(1):195-206.
- Andrade LO, Galvão LM, Meirelles MN, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2010. 105(6):834-7.

- Andrade ZA, Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1995. 90:521–522.
- Aparicio IM, Scharfstein J, Lima APCA. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infection and Immunity*. 2004. 72 (10): 5892-5902.
- Aragão MB. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia? *Rev Saúde Públ*. 1983. 17: 51-55.
- Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Bailly S, Feige JJ. The TGF- $\beta$  pathway as an emerging target for Chagas disease therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2012. 92(5):613-21. Review.
- Argolo AM, Féliz M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. *Imperial Novo Milênio: Fundação Oswaldo Cruz*. 2008.
- Aridgides D, Salvador R, and PereiraPerrin M. *Trypanosoma cruzi* highjacks TrkC to enter cardiomyocytes and cardiac fibroblasts while exploiting TrkA for cardioprotection against oxidative stress. *Cell Microbiol*. 2013. 15(8): 1357–1366
- Armistead JS, Wilson IB, van Kuppevelt TH, Dinglasan RR. A role for heparan sulfate proteoglycans in *Plasmodium falciparum* sporozoite invasion of anopheline mosquito salivary glands. *Biochem J*. 2011. 15;438(3):475-83.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streit J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004.101 (7): 2034-9.
- Azevedo-Pereira RL, Pereira MCS, Oliveira-Jr FOR, Brazil RP, Côrtes LMC, Madeira MF, Santos ALS, Toma L, Alves CR. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Vet Parasitol*. 2007. 145: 234–239.
- Azzouz N, Kamena F, Laurino P, Kikkeri R, Mercier C, Cesbron-Delauw MF, Dubremetz JF, De Cola L, Seeberger PH. *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures. *Glycobiology*. 2013. 23(1):106-20.
- Bambino-Medeiros B, Oliveira Jr FOR, Calvet CM, Vicente D, Toma L, Krieger MA, Meirelles MN, Pereira MCS. Involvement of host cell heparan sulfate



- proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. *Parasitology*. 2011. 138: 593–601.
- Barbosa, HS, Meirelles, MNL. Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCA 1, and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 1992. 78:404-409.
- Barbosa HS, Meirelles MN. The role of RCA-binding sites in the adhesion of *Trypanosoma cruzi* to heart muscle cells, as revealed by electron spectroscopic imaging. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1993. 25(1):47-51.
- Barrias ES, Carvalho TC, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology.* 2013. Review.
- Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007. 363(3): 828-34.
- Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Lea AC, daRocha WD, Pais FS, Macedo C, Djikeng A, Teixeira SMR, El-Sayed NM. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research.* 2009. 37(10): 3407–3417.
- Bass MD, Humphries MJ. Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem. J.* 2002. 368, 1–15.
- Bastos IM, Grellier P, Martins NF, Cadavid-Restrepo G, de Souza-Ault MR, Augustyns K, Teixeira AR, Schr vel J, Maigret B, da Silveira JF, Santana JM. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J.* 2005. 388(Pt 1): 29-38.
- Bastos IM, Motta FN, Grellier P, Santana JM. Parasite prolyl oligopeptidases and the challenge of designing chemotherapeutics for Chagas disease, leishmaniasis and African trypanosomiasis. *Curr Med Chem.* 2013; 20(25):3103-15. Review.

- Bayer-Santos E, Cunha-e-Silva NL, Yoshida N, Franco da Silveira J. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasit Vectors*. 2013. 6:127.
- Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Inf,ct. Immun*. 1996. 64:1400-1406
- Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*. 2011. 364(26): 2527– 2534.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *Journal of the American Medical Association*. 2007. 298(18): 2171–2181.
- Bocchi EA. Heart failure in South America. *Curr Cardiol Rev*. 2013. 9(2):147-56. Review.
- Bonney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*. 2014. 21, 11. Review.
- Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol*. 2006. 22: 262–268.
- Brandão A, Fernandes O. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, and the Zymodeme III isolates. *Exp Parasitol*. 2006. 112(4):247-52.
- Burgos JM, Risso MG, Brenière SF, Barnabé C, Campetella O, Leguizamón MS. Differential distribution of genes encoding the virulence factor trans-sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete typing units. *PLoS One*. 2013. 8(3):e58967.
- Burleigh BA, Caler EV, Webster P, Andrews NW. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. *J. Cell Biol*. 1997. 136: 609–620.

- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia MJ. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: Host Dependent Coat Diversity. *Nature Rev Microbiol.* 2006. 4: 229–236.
- Buschiazzo A, Muiá R, Larrieux N, Pitcovsky T, Mucci J, Campetella O. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog.* 2012. 8(1):e1002474.
- Butler CE, de Carvalho TM, Grisard EC, Field RA, Tyler KM. Trans-sialidase stimulates eat me response from epithelial cells. *Traffic.* 2013. 18: 12078.
- Caler EV, Morty RE, Burleigh BA, Andrews NW. Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2000. 68(12):6602-10.
- Calvet CM, Melo TG, Garzoni LR, Oliveira- Jr. FOR, Silva Neto DT, Meirelles MN, Pereira MCS. Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte. *Frontiers in Immunology.* 2012. Review.
- Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression *in vitro* and *in vivo*. *Exp Parasitol.* 2004. 107 (1-2): 20-30.
- Calvet CM, Toma L, De Souza FR, Meirelles MN, Pereira MCS. Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol.* 2003. 50 (2): 97-103.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964. 6:93-100.
- Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, Jansen AM, Triana-Chávez O. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasit Vectors.* 2015. Sep 22;8(1):482.

- Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, Baylón-Pacheco L, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA, Arce-Fonseca M. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Elsevier Acta Trop.* 2013. 127: 126– 135.
- Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES. *Trypanosoma cruzi* Immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS One.* 2012. 7, e36591.
- Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2002. 2:1261–1271.
- Centers of disease control and prevention. Life cycle. Atlanta, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 19/07/14.
- Chen Q, Sivakumar P, Barley C, Peters DM, Gomes RR, Farach-Carson MC, Dallas SL. Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *J Biol Chem.* 2007. 282(36):26418-30.
- Chen Y, Götte M, Liu J, Park PW. Microbial Subversion of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Mol. Cells OS.* 2008. 415-426. Minireview.
- Ching AT, Fávoro RD, Lima SS, Chaves Ade A, de Lima MA, Nader HB, Abreu PA, Ho PL. *Leptospira interrogans* shotgun phage display identified LigB as a heparin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012. 427(4): 774-9
- Coetzer TH, Goldring JP, Huson LE. Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis. *Biochimie.* 2008. 90(2): 336-44.
- Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 1993. 7(13):1257-64. Review.
- Cordero, E. M., Gentil, L. G., Crisante, G., Ramírez, J. L., Yoshida, N., Añez, N. and Franco da Silveira, J. (2008). Expression of GP82 and GP90 surface glycoprotein genes of *Trypanosoma cruzi* during in vivo metacyclogenesis in the insect vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica.* 105, 87–91.

- Cortez C, Martins RM, Alves RM, Silva RC, Bilches LC, Macedo S, Atayde VD, Kawashita SY, Briones MR, Yoshida N. Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from Y strain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012. 6(10):e1804.
- Cortez C, Sobreira TJ, Maeda FY, Yoshida N. The gp82 surface molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Subcell Biochem*. 2014. 74:137-50.
- Cortez M, Atayde V, Yoshida N. Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbes Infect*. 2006. 8(6):1502-12.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007. 02 Suppl 1:113-22.
- Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012. 45(3):286-296.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 2010. 465(7301): S6–S7.
- Dawn A, Singh S, More KR, Siddiqui FA, Pachikara N, Ramdani G, Langsley G, Chitnis CE. The central role of cAMP in regulating *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of human erythrocytes. *PLoS Pathog*. 2014. 18;10(12):e1004520.
- De Castro Côrtes LM, de Souza Pereira MC, de Oliveira FO Jr, Corte-Real S, da Silva FS, Pereira BA, de Fátima Madeira M, de Moraes MT, Brazil RP, Alves CR. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: insights on subcellular distribution and biochemical properties of heparin-binding proteins. *Parasitology*. 2012a. 139(2):200-7.
- De Castro-Côrtes LM, Pereira MCS, Souza-Silva F., Pereira BA, Oliveira-Jr FO, Soares RA, Brazil RP, Toma L, Vicente CM, Nader HB, Madeira MF, Bello FJ e Alves CR. Participation of heparina binding proteins from the surface of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites

- to *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) *in vitro*. *Parasites & Vectors*. 2012b. 5: 142.
- De Francesco MA, Caruso A, Fallacara F, Canaris AD, Dima F, Poiesi C, Licenziati S, Corulli M, Martinelli F, Fiorentini S, Turano A. HIV p17 enhances lymphocyte proliferation and HIV-1 replication after binding to a human serum factor. *AIDS*. 1998.12: 245-252.
- De Melo-Jorge M, Pereira Perrin M. The Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi* exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts. *Cell Host Microbe*. 2007. 1:251–261.
- De Oliveira FL, Araújo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige JJ, et al. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2012. 6, e1696.
- Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*. 2009. 18;5(6):527-49. Review.
- Derrick K, Mathias, Rebecca Pastrana-Mena, Elisabetta Ranucci, Dingyin Tao, Paolo Ferruti, Corrie Ortega, Gregory O. Staples, Joseph Zaia, Eizo Takashima, Takafumi Tsuboi, Natalie A. Borg, Luisella Verotta, Rhoel R. Dinglasan. A Small Molecule Glycosaminoglycan Mimetic Blocks *Plasmodium* Invasion of the Mosquito Midgut. *PLoS Pathog*. 2013. 9(11): e1003757.
- de Souza SM, Vieira PM, Roatt BM, Reis LE, da Silva Fonseca K, Nogueira NC, Reis AB, Tafuri WL, Carneiro CM. Dogs infected with the blood trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* display an increase expression of cytokines and chemokines plus an intense cardiac parasitism during acute infection. *Mol Immunol*. 2014. 58(1):92-7.
- De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*. 2002. 8: 269-285.
- De Souza W. Electron microscopy of trypanosomes – A historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008. 103(4): 313-325.
- Dias GB, Gruending AP, Araújo SM, Gomes ML, Toledo MJ. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different

- developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Exp Parasitol*. 2013. 135(3):511-7.
- Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. *Fiocruz*. 1997. 486 p.
- Dias JCP, Coura JR, Shikanai-Yasuda MA. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014. 47(1):123-125.
- Diazgranados CA, Saavedra-Trujillo CH, Mantilla M, Valderrama SL, Alquichire C, Franco-Paredes C. Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association. *Lancet Infect Dis*. 2009. 9(5):324-30.
- Do Carmo MS, dos Santos MR, Cano MI, Araya JE, Yoshida N, da Silveira JF. Expression and genome-wide distribution of the gene family encoding a 90 kDa surface glycoprotein of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002.125(1-2):201-6.
- Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, Heffernan MJ, Jones K, Valenzuela JG, Kamhawi S, Ortega J, Rosales SP, Lee BY, Bacon KM, Fleischer B, Slingsby BT, Cravioto MB, Tapia-Conyer R, Hotez PJ. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev Vaccines*. 2012.11: 9.
- Duschak VG, Barboza M, García GA, Lammel EM, Couto AS, Isola EL. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitology*. 2006. 132(Pt 3):345-55.
- Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica*. 2002; 81:123–132.
- Fernandes MC, Andrews NW. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol Rev*. 2012. 36(3): 734–747.

- Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med*. 2011. 208(5):909-21.
- Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol*. 2007. 37(13):1431-41.
- Fernández MA, Muñoz-Fernández MA, Fresno M. Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *Eur J Immunol*. 1993. 23(2):552-7.
- Ferreira DM, Cortez M, Atayde VD, Yoshida N. Actin cytoskeleton dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect. Immun*. 2006. 74: 5522–5528.
- Ferreira AV, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, de Oliveira Andrade L, Nagajyothi F, Scherer PE, Teixeira MM, Tanowitz HB. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect*. 2011. 13:1002–1005.
- Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparin sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J. Exp. Med*. 1993. 177: 1287-98.
- Friedrich N, Santos JM, Liu Y, Palma AS, Leon E, Saouros S, Kiso M, Blackman MJ, Matthews S, Feizi T, et al. Members of a novel protein family containing microneme adhesive repeat domains act as sialic acid-binding lectins during host cell invasion by apicomplexan parasites. *J. Biol Chem*. 2010. 285:2064–2076.
- Gascon J, Vilasanjuan R, Lucas A. The need for global collaboration to tackle hidden public health crisis of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014.12(4): 393-5.
- Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJ. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma*



- cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol.* 1994. 65(1):85-94.
- Gonzalez MS, Souza MS, Garcia ES, Nogueira NFS, Mello CB, Cánepa GE, Bertotti S, Durante IM, Azambuja P, Buscaglia CA. *Trypanosoma cruzi* TcSMUG L-surface mucins promote development and infectivity in the triatomine vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 2013. 7, e2552.
- Gottdenker NL, Calzada JE, Saldana A, Carroll CR. Association of anthropogenic land use change and increased abundance of the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* in a rural landscape of Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 2011. 84: 70–77.
- Grijalva MJ, Terán D, Dangles O. Dynamics of Sylvatic Chagas Disease Vectors in Coastal Ecuador Is Driven by Changes in Land Cover. . *PLoS Negl.Trop.Dis.* 2014. 8, e2960.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med.* 2012.2012:705326.
- Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology.* 2009. 31: 673–685.
- Hall JE, Fu W, Schaller MD. Focal adhesion kinase: exploring FAK structure to gain insight into function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2011. 288, 185–225.
- Higuchi ML, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003.15;60(1):96-107. Review.
- Hissa B, Andrade LO. *Trypanosoma cruzi* uses a specific subset of host cell lysosomes for cell invasion. *Parasitol Int.* 2015. 64(2):135-8.
- Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, Gazzinelli-Guimarães PH, De Paula AM, Agero U, Mesquita ON, Guatimosin C, Chiari E, Andrade LO. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. 2012. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 6, e1583.

- Hoft DF. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996. 55(4):360-4.
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008. 2(9): e300.
- Ise H, Kobayashi S, Goto M, Sato T, Kawakubo M, Takahashi M, Ikeda U, Akaike T. Vimentin and desmin possess GlcNAc-binding lectin-like properties on cell surfaces. *Glycobiology.* 2010. 20(7):843-64.
- Johndrow C, Nelson R, Tanowitz H, Weiss LM, Nagajyothi F. *Trypanosoma cruzi* infection results in an increase in intracellular cholesterol. *Microbes Infect.* 2014 Apr;16(4):337-44.
- Kima PE, Burleigh B, Andrews NW. Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 2000. 2(6):477-86.
- Kleshchenko YY, Moody TN, Furtak VA, Ochieng J, Lima MF, Villalta F. Human Galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infection and Immunity. Infect Immun.* 2004. 72(11): 6717-21.
- Kobayashi K, Kato K, Sugi T, Takemae H, Pandey K, Gong H, Tohya Y, Akashi H. *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *J Biol Chem.* 2010. 15;285(3):1716-25.
- Lattes R, Lasala MB. Chagas disease in the immunosuppressed patient. *Clin Microbiol Infect.* 2014. 20(4):300-9.
- Lee BY, Bacon KM, Connor DL, Willig AM, Bailey RR. The Potential Economic Value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) Vaccine in Latin America. *PLoS Negl.Trop.Dis.*2010. 4, e916.
- Leeb-Lundberg F, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. Classification of the kinin receptor family: structure, function and regulation. *Pharmacol Ver.* 2005. (57): 27–77.

- Leon JS, Godsel LM, Wang K, Engman DM. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infect Immun*. 2001. 69(9):5643-9.
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*. 1988. 168(2):649-59.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004. 99(1):1-12.
- Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. *Cardiol Rev*. 2012. 20(2): 53–65.
- McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. 104 (1):263-9.
- Maddala R, Reddy VN, Epstein DL, Rao V. Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells. *Mol Vis*. 2003. 17;9:329-36.
- Maeda F, Cortez C, Yoshida N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*. 2012. Review.
- Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano MA, Juliano L, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J Biol Chem*. 2001. 1;276(22):19382-9.
- Magdesian MH, Tonelli RR, Fessel MR, Silveira MS, Schumacher RI, Linden R, Colli W, Alves MJ. A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Cell Res*. 2007. 313(1):210-8.

- Málaga S, Yoshida N: Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun.* 2001. 69(1): 353–359.
- Manque PM, Neira I, Atayde VD, Cordero E, Ferreira AT, Franco da Silveira J, Ramirez M, Yoshida N. Cell adhesion and Ca<sup>2+</sup> signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stagespecific surface molecule gp82. *Infect Immun.*2003. 71: 1561–1565.
- Maric D, Epting CL, Engman DM. Composition and sensory function of the trypanosome flagellar membrane. *Curr Opin Microbiol.* 2010.13(4):466-72. Review.
- Maric D, McGwire BS, Buchanan KT, Olson CL, Emmer BT, Epting CL, Engman DM. Molecular determinants of ciliary membrane localization of *Trypanosoma cruzi* flagellar calcium-binding protein. *J Biol Chem.* 2011. 23;286(38):33109-17.
- Martins RM, Alves RM, Macedo S, Yoshida N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. *Cell Microbiol.* 2011. 13(7):943-54.
- Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 2014.130:167-74.
- Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. 13(10):616-30.
- Mattos EC, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation. *PLoS One.* 2012;7(10):e46767.
- Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol.* 1978. 64(3):475-82.
- Melo TG, Tucci AR, Nogueira AR, Meirelles MN, Pereira MCS. The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2014. 139: 49-57.

- Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff, Brennan M, Loch C. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in Mycobacteria. *Experimental of Medicine*. 1996. 184: 993-1001.
- Morrot A, Strickland DK, Higuchi Mde L, Reis M, Pedrosa R, Scharfstein J. Human T cell responses against the major cysteine proteinase (cruzipain) of *Trypanosoma cruzi*: role of the multifunctional alpha 2-macroglobulin receptor in antigen presentation by monocytes. *Int Immunol*. 1997. 9(6):825-34.
- Matsuo I, Kimura-Yoshida C. Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparin sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev*. 2013. 23(4):399-407.
- Mattos EC, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation. *PLoS One*. 2012. 7(10):e46767.
- Meloni M, Caporali A, Graiani G, Lagrasta C, Katare R, Van Linthout S, Spillmann F, Campesi I, Madeddu P, Quaini F, Emanuelli C. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circ Res*. 2010. 106(7):1275-84.
- Mattos EC, Tonelli RR, Colli W, Alves MJ. The Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem*. 2014. 74:151-80.
- Ming M, Ewen ME, Pereira ME. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*. 1995. 82, 287–296.
- Mitchell FL, Neres J, Ramraj A, Raju RK, Hillier IH, Vincent MA, Bryce RA. Insights into the Activity and Specificity of *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase from Molecular Dynamics Simulations. *Biochemistry*. 2013. 52(21): 3740-51.
- Moody TN, Ochieng J, Villalta F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Lett*. 2000. 470(3):305.
- Monteiro WM, Magalhães LK, Oliveira JC, Guerra JA, Silveira H, Ferreira LC, Toledo MJ, Barbosa Md. Biological behavior of *Trypanosoma cruzi* stocks

- obtained from the State of Amazonas, Western Brazilian Amazon, in mice. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012. 45(2):209-14.
- Mortara RA, da Silva S, Araguth MF, Blanco SA, Yoshida N. Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun.* 1992. 60(11):4673-8.
- Moustakas A, Heldin CH. Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2008.18;582(14):2051-65.
- Mukhopadhyay NK, Shome K, Saha AK, Hassell JR, Glew RH: Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation. *Biochem J.* 1989. 264:517–525.
- Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol.* 2012. 14(5): 634–643.
- Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, Herz J, Tanowitz HB. *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 2011. 5, e953.
- Nardy AF, Luiz da Silva Filho J, Pérez AR, de Meis J, Farias-de-Oliveira DA, Penha L, de Araújo Oliveira I, Dias WB, Todeschini AR, Freire-de-Lima CG, Bellio M, Caruso-Neves C, Pinheiro AA, Takiya CM, Bottasso O, Savino W, Morrot A. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* enhances the adhesion properties and fibronectin-driven migration of thymocytes. *Microbes Infect.* 2013. 15(5): 365-74.
- Ndao M, Beaulieu C, Black WC, Isabel E, Vasquez-Camargo F, Nath-Chowdhury M, Massé F, Mellon C, Methot N, Nicoll-Griffith DA. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. 58(2): 1167-78.
- Neira I, Ferreira AT, Yoshida N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int. J. Parasitol.* 2002. 32: 405–414.
- Nicoll-Griffith DA. Use of cysteine-reactive small molecules in drug discovery for trypanosomal disease. *Expert Opin Drug Discov.* 2012. 7(4):353-66.

- Nigam SK, Bush KT. Growth factor-heparan sulfate "switches" regulating stages of branching morphogenesis. *Pediatr Nephrol*. 2014. 29(4):727-35.
- Oliveira-Jr FOR, Alves CR, Calvet CM, Toma L, Bouças RI, Nader HB, Castro Côrtes LM, Krieger MA, Meirelles MD, Souza Pereira MC. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *MicrobPathog*. 2008. 44(4): 329-38.
- Oliveira-Jr FOR, Alves CR, Silva FS, Côrtes LMC, Toma L, Bouças RI, Aguilár T, Nader HB, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins present a flagellar membrane localization and serine proteinase activity. *Parasitology*. 2012b. 14: 1-10.
- Oliveira-Jr FOR, Alves CR, Souza-Silva F, Calvet CM, Côrtes LMC, Gonzalez MS, Toma L, Bouças RI, Nader HB, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins mediate the adherence of epimastigotes to the midgut epithelial cells of *Rhodnius prolixus*. *Parasitology* . 2012a. 139: 735-743.
- Organização Mundial da Saúde. Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 20/07/2014.
- Ortega-Barria E, Pereira EA. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*. 1991. 67: 411-421.
- Ouaisi MA. Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitol Today*. 1988. 4(6):169-73.
- Ouaisi MA, Afchain D, Capron A, Grimaud JA. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 1984. 308: 380–382.
- Pablos LM, Osuna A. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. *Infection and Immunity*. 2012. 80(7): 2258–2264.
- Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, Dallagiovanna B, Cayota A, Krieger M, Goldenberg S, Robello C. Proteomic

- analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom.* 2007. 42(11):1422-32.
- Parsi MK, Adams JR, Whitelock J, Gibson MA. LTBP-2 has multiple heparin/heparan sulfate binding sites. *Matrix Biol.* 2010. 29(5):393-401.
- Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* 2003. 16, 1409– 1416.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. *Journal of Food Protection.* 2009. 72(2):441-446.
- Pereira PCM, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 2013, 19:34. Review.
- Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RC. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends Parasitol.* 2014. 30(4): 176-82.
- Persson BP, Halldorsdottir H, Lindbom L, Rossi P, Herwald H, Weitzberg E, Oldner A. Heparin-binding protein (HBP/CAP37) - a link to endothelin-1 in endotoxemia-induced pulmonary oedema? *Acta Anaesthesiol Scand.* 2014. 58(5):549-59.
- Petherick A: Country by country. *Nature* 2010, 465: S10–S11.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984. 81(19):5985-8.
- Poiesi C, De Francesco MA, Baronio M, Manca N. HIV-1 p17 binds heparan sulfate proteoglycans to activated CD4(+) T cells. *Virus Res.* 2008. 132 (1-2): 25-32. Nov 26.
- Poli G, Fauci A. The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res. Hum.* 1992. *Retroviruses* 8: 191-197.
- Popoff MR. Bacterial factors exploit eukaryotic Rho GTPase signaling cascades to promote invasion and proliferation within their host. *Small GTPases.* 2014;5.



- Previato JO, Wait R, Jones C, DosReis GA, Todeschini AR, Heise N, Previato LM. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Adv Parasitol.* 2004.56:1-41.
- Prioli RP, Rosenberg I, Pereira ME. High- and low-density lipoproteins enhance infection of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* 1990. 38(2):191-8.
- Ramos-Mondragón R, Galindo CA, Avila G. Role of TGF-beta on cardiac structural and electrical remodeling. *Vasc Health Risk Manag.* 2008. 4(6):1289-300.
- Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol.* 2000. 23(12): 883-9.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012. 26(2):275-91.
- Rathore D, McCutchan TF. Heparin can regulate the binding of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Mol Bioch Parasitol.* 2000. 108: 253-256.
- Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamon MS. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis.* 2004. 15;189(12):2250-9.
- Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell Biochem.* 2014. 74:1-42.
- Romaña C, Meyer H. Estudo do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1942. 37, 19–27.
- Romano PS, Arboit MA, Vázquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* in to the host cell. 2009. *Autophagy* 5, 6–18.
- Rosestolato CT, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct. Funct.* 2002. 27, 91–98.

- Rubin-de-Celis SS, Uemura H, Yoshida N, Schenkman S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol.* 2006. 8(12):1888-98.
- Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Mangué PM, Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity. *Biochem J.* 1998. 15;330 ( Pt 1): 505-11.
- Sanches TLM, Cunha LD, Silva GK, Guedes PMM, Silva JS, Zamboni DS. The Use of a Heterogeneously Controlled Mouse Population Reveals a Significant Correlation of Acute Phase Parasitemia with Mortality in Chagas Disease. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 2014. 9, e91640.
- Santamaria C, Chatelain E., Jackson Y, Miao Q, Ward BJ, Chappuis F, Ndao M. Serum biomarkers predictive of cure in Chagas disease patients after nifurtimox treatment. *Infectious Diseases.* 2014, 14:302.
- Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J.* 1997. 325 (Pt 1): 129-37.
- Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, Prestes SR, Maciel MG, da Silva GV, Monteiro WM, Brito FR, Coelho LIARC, Barbosa-Ferreira JM, Guerra JAO, Silveira H and Barbosa MG. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasites & Vectors.* 2014. 7:267.
- Santos-Mallet JR, Silva CS, Gomes SÃO, Oliveira DL, Santos CL, Sousa DM, Pinheiro NL, Junqueira ACV, Gonçalves TCG. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* sylvatic isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res.* 2008. 103:1041–1045
- Saraiva RM, Waghbi MC, Vilela MF, Madeira FS, Sperandio da Silva GM, Xavier SS, Feige JJ, Hasslocher-Moreno AM, Araujo-Jorge TC. Predictive value of transforming growth factor- $\beta$ 1 in Chagas disease: towards a biomarker surrogate of clinical outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013. 107(8):518-25.

- Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J. Cell Sci.* 2010. 123, 1007–1013.
- Scharfstein J, Andrade D, Svensjö E, Oliveira AC, Nascimento CR. The kallikrein-kinin system in experimental Chagas disease: a paradigm to investigate the impact of inflammatory edema on GPCR-mediated pathways of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol.* 2013. 25;3:396.
- Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, Juliano L, Müller-Esterl W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. *J. Exp. Med.* 2000. 6: 1289–1300.
- Schenkman S, Eichinger D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today.* 1993. 9(6):218-22.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology.* 2006. 22(12), 583–588
- Serna C, Lara JA, Rodrigues SP, Marques AF, Almeida IC, Maldonado RA. A synthetic peptide from *Trypanosoma cruzi* mucin-like associated surface protein as candidate for a vaccine against Chagas disease. *Elsevier Vaccine.* 2014. 32: 3525-3532.
- Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, Rodrigues LS, Oliveira AV, Bermudez LE, Pessolani MC. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* 2013. 81(7): 2645-59.
- Smith MF Jr, Gautam JK, Black SG, Ernst PB. Microbial-induced regulation of syndecan expression: important host defense mechanism or an opportunity for pathogens? *Scientific World Journal.* 2006. 4 (6): 442-5.
- Souto-Padrón T, Campetella OE, Cazzulo JJ, de Souza W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci.* 1990. 96 (Pt 3): 485-90.
- Souza RC, Soares AC, Alves CL, Lorosa ES, Pereira MH, Diotaiuti L. Feeding behavior of *Triatoma vitticeps* (Reduviidae: Triatominae) in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Feb;106(1):16-22.

- Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients. *J. Exp. Med.* 1994. 179:1017–1022.
- Tarleton, RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 2001. 31: 550–554.
- Tarleton RL, Gürtler RE, Urbina JA, Ramsey J, Viotti R. Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014. 8, e3219.
- Teixeira MMG, Yoshida N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1986. 18, 271–282.
- Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demetree E, Séveno M, Barnabé C, Ayala FJ, Tibayrenc M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. 23;107(47):20411-6.
- Todorov AG, Andrade D, Pesquero JB, Araujo RC, Bader M, Stewart J, et al. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *FASEB J.* 2003. 17, 73–75.
- Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Biol. Chem.* 2000. 275, 32182– 32186.
- Tonelli RR, Giordano RJ, Barbu EM, Torrecilhas AC, Kobayashi GS, Langley RR, Arap W, Pasqualini R, Colli W, Alves MJ. Role of the gp85/transsialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010. 4(11):e864.
- Trocoli Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, da Silva JS, Schumacher RI, de Souza W, E Silva NC, de Almeida Abrahamsohn I, Colli W, Manso Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart

- parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect.* 2009. 11(1):29-39.
- Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA, Britto C, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Cruzipain promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS Negl.Trop.Dis.* 2012. 6, e1958.
- Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJ, Colli W. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem.* 2002. 277(23):20756-62.
- Urban I, Santurio LB, Chidichimo A, Yu H, Chen X, Mucci J, Agüero F, Buscaglia CA. Molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* TcSMUG family of mucin genes and proteins. *Biochem. J.* 2011. 438: 303–313.
- Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernandes O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009.103(3):291-7.
- Vieira M, Dutra JMF, Carvalho TMU, Cunha-e-Silva NL, Souto-Padron T, Souza W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell Biol.* 2002. 118: 491–499.
- Vieira PM, Francisco AF, de Souza SM, Malaquias LC, Reis AB, Giunchetti RC, Veloso VM, de Lana M, Tafuri WL, Carneiro CM. *Trypanosoma cruzi*: Serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in myocardium and spleen of dogs in the acute stage of infection with metacyclic or blood trypomastigotes. *Exp Parasitol.* 2009. 21(1):76-82.
- Vieira PM, Francisco AF, Machado EM, Nogueira NC, Fonseca Kda S, Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Tafuri WL, Carneiro CM. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. *PLoS One.* 2012. 7(3):e32912.
- Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S, Lima MF, Alvarez S, Weiss LM, Huang H, Machado FS, Tanowitz HB. Perspectives

- on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol Res.* 2009. 104(6):1251-60.
- Waghabi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro MN, Meirelles MN, Paciornik S, Araújo-Jorge TC, Feige JJ. Uptake of host cell transforming growth factor- beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am.J. Pathol.* 2005. 167, 993–1003.
- Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, Soeiro MN, Mendonça-Lima L, Araújo-Jorge TC, Feige J, Billy S. SB- 431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. 51: 2905– 2910.
- Weinkauff C, Salvador R, Pereiraperrin M. Neurotrophin receptor TrkC is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* in neural, glial, and epithelial cells. *Infect Immun.* 2011. 79(10):4081-7.
- WHO. World Health Organisation. Third WHO report on neglected tropical diseases 2015: investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2015.1; 2015
- Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res.* 2001. 264(2):211-8.
- Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel IP3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell Sci.* 2003. 116: 3611–3622.
- Yokoyama-Yasunaka JK, Pral EM, Oliveira Júnior OC, Alfieri SC, Stolf AM. *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. *Acta Trop.* 1994. 57(4):307-15.
- Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2006. 78: 87–111.
- Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009.104 (Suppl. I): 101-107.

- Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int.* 2008. 57(2):105-9.
- Yoshida N, Cortez M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell. Biochem.* 2008. 47: 82–91.
- Zhang Y, Jiang N, Jia B, Chang Z, Zhang Y, Wei X, Zhou J, Wang H, Zhao X, Yu S, Song M, Tu Z, Lu H, Yin J, Wahlgren M, Chen Q. A comparative study on the heparin-binding proteomes of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proteomics.* 2014. 00, 1–9.
- Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 1999. 180, 480–486.
- Zingales B, Andrade SG, Brione MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009. 104(7): 1051-1054.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012. 12: 240-253.
- Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, Ribeiro I. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014. 1-6.
- Zhao B, Chen YG. Regulation of TGF- $\beta$  Signal Transduction. *Scientifica (Cairo).* 2014. 2014:874065.