UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGÊNICOS

CAMILA GACHET DE CASTRO

**Estudos da dinâmica do núcleo da célula hospedeira durante a infecção por
*Trypanosoma cruzi***

RIBEIRÃO PRETO

2016

AGRADECIMENTOS:

À minha orientadora, Profa. Dra. Munira Muhammad Abdel Baqui, por se dedicar integralmente aos seus alunos. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório, pela paciência e por ter me ensinado tanto, sobre ciência e também sobre a vida. Foi com você que aprendi o verdadeiro significado da palavra “orientação”.

Ao meu marido Felipe, amor da minha vida, por ter me escolhido para trilhar os caminhos da vida ao seu lado. Obrigada por sempre me compreender e incentivar! Obrigada por toda a contribuição que deu para que esse trabalho fosse realizado! Sem você ao meu lado nada disso seria possível... Amo você!

Aos meus amados pais, Elisete e Carlos, por todo amor e dedicação que sempre tiveram comigo e com meu irmão a vida toda. Obrigada por terem me dado à oportunidade de estudar e por terem lutado por meus sonhos junto comigo. Ao meu irmão Leonardo, por todo o companheirismo e amizade durante nossa vida toda! Obrigada por todos os sacrifícios que fizeram para que eu chegasse até aqui! Amo muito vocês!

Aos meus familiares, por todo o carinho e compreensão da minha ausência em datas importantes.

Aos meus colegas de laboratório Bernardo, Lígia, Camila e Yasmin por todo o apoio e amizade. Em especial, agradeço a Msc. Carol Kobori da Fonseca pela ajuda e disponibilidade que sempre demonstra com nossas necessidades no laboratório.

A Msc. Elizabete Rosa Milani e a Dra. Roberta Costa Rosales por toda a ajuda com o uso dos microscópios para a aquisição das imagens. Muito obrigada também pela amizade e carinho que sempre demonstraram.

Aos meus amigos da BioCel por todos os momentos bons e cheios de descontração que passamos juntos na copinha ou fora do departamento.

A minha amiga querida e madrinha de casamento Denyse. Obrigada, por tudo: por estar sempre presente nos momentos bons e ruins, por participar de todas as datas importantes, por aguentar minhas reclamações e por sempre me ajudar tanto!

A minha amiga Mariana, minha amoreca, pela amizade, pelos conselhos e pelos bons momentos que passamos juntas.

Ao departamento de Biologia Celular e Molecular por todo o suporte e estrutura para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela estrutura disponibilizada para que as imagens fossem adquiridas.

A Dra. Carla Duque Lopes e ao Prof. Dr. João Santana da Silva por fornecerem as células de *T. cruzi* todas as vezes que foram necessárias.

A todos os professores que tive durante a minha vida, por ajudarem a edificasse meu conhecimento e por terem me dado às ferramentas necessárias para que eu construísse meu futuro como profissional.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo suporte financeiro para que essa pesquisa fosse realizada.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho. Muito obrigada!

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, é causada pelo agente *Trypanosoma cruzi*, protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae* (De Souza et al., 2010). É considerada uma doença tropical negligenciada, pois possui origem infecciosa e se agravam em clima tropical, sendo que a transmissão é mais propícia em condições precárias de moradia e higiene (Dotta, 2011).

Essa doença parasitária é de alta incidência, acometendo cerca oito milhões de indivíduos, sendo a maioria na América Latina. Além disso, é a causa de morte de mais de 10 mil pessoas por ano, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013). Também foi observado o aumento da incidência da doença nos Estados Unidos. O crescente número de casos se deve tanto a presença de insetos vetores nos estados mais quentes ao sul dos EUA quanto ao grande número de imigrantes latino-americanos que chegam ao país (Kirchhoff, 1989; Andrade e Andrews, 2005; Bern et al., 2011). Nesse último caso, a maior parte da transmissão da doença é devido a transfusões de sangue feitas por imigrantes assintomáticos chagásicos crônicos (Grant et al., 1989). Casos de transmissão semelhantes foram relatados por Nickerson e colaboradores no Canadá (1989).

Apesar dos esforços para contenção de vetores, a enfermidade causa grande apreensão, principalmente devido à falta de drogas efetivas para tratamento dos sintomas da fase crônica da infecção, o que gera também impacto econômico negativo (Andrade e Andrews, 2005, De Souza et al., 2010). A transmissão via oral da doença tem sido observada mediante ao consumo de suco de cana-de-açúcar e pasta de açaí, provavelmente devido ao esmagamento do inseto triatomíneo que utilizava a cana ou palma de açaí como moradia (Nóbrega et al., 2009; Bern et al., 2011). Além disso, existe o risco de transmissão vertical – de mãe para feto, agravando a situação já alarmante (Nickerson et al., 1989; Andrade e Andrews, 2005). A doença pode ser transmitida tanto durante a gestação, quanto durante o aleitamento materno. O risco de transmissão está relacionado com mamilos sangrando de mães que se encontram na fase aguda da doença (Bittencourt et al., 2011). Em alguns casos, não foi possível

avaliar se a transmissão do parasita foi congênita ou devido à amamentação (Rassi et al., 2014)

O parasita se multiplica na célula hospedeira por fissão binária e esse processo é responsável pelos sintomas apresentados na fase aguda da infecção, caracterizado pela alta parasitemia no sangue e acometimento de tecidos (Andrade e Andrews, 2005). Os sintomas cardíacos e de acometimento do encéfalo nessa fase geralmente são mais notáveis em pacientes imunossuprimidos, como crianças e idosos. Após esse período agudo de infecção, a quantidade de parasitas no sangue cai e sintomas são detectados principalmente depois da fase de latência, que dura geralmente entre 10 e 30 anos. Depois disso, os quadros clínicos mais observados são cardiomiopatias, insuficiência cardíaca e respiratória e problemas no trato digestivo (Zhang et al., 1998; Prata, 2001; Andrade e Andrews, 2005).

Figura 1 - Ilustração da distribuição de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, baseado em estimativas oficiais e condição de transmissão pelo vetor, entre os anos de 2006 e 2009. Número de casos encontrados em cada país é representado pelo tamanho dos círculos. As cores cinza, azul claro e azul escuro representam a condição de transmissão do vetor. Como observado, os países com maior incidência de casos e com maior condição de transmissão pelo vetor são os da América Latina. Mapa fornecido pela Organização Mundial da Saúde (<http://www.who.int/en/>).

1.2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* e seu pleomorfismo

Um dos aspectos importantes referentes aos tripanossomatídeos é seu pleomorfismo, ou seja, a capacidade de alterar sua forma no decorrer de seu ciclo de vida, de acordo como tipo de hospedeiro (Souza, 2002). Outra característica marcante é que esses organismos possuem um flagelo emergente de uma bolsa flagelar, que pode ou não se exteriorizar (Souza, 2002; Dotta, 2011). Eles apresentam uma única mitocôndria, que se estende por toda a célula, sendo que o DNA mitocondrial se concentra numa região denominada cinetoplasto (Souza, 2002; Dotta, 2011). A localização dessa estrutura é crucial para a identificação da fase do ciclo celular do parasito (Rey, 2001; Souza, 2002; Dotta, 2011).

O *Trypanosoma cruzi* possui três formas que variam de acordo com o tipo de hospedeiro: a epimastigota, tripomastigota e amastigota (Figura 2). A primeira se caracteriza por ser mais alongada, com o cinetoplasto localizado entre o núcleo e a extremidade anterior da célula. O flagelo se encontra livre na porção anterior celulado parasito (Figura 2 A). A forma replicativa intracelular é a amastigota, mais arredondada e possui o flagelo curto que não se exterioriza, ficando restrito a região do bolso flagelar (Figura 2 B). Já a forma infectiva do parasito é a tripomastigota, possui o cinetoplasto posterior ao núcleo e o flagelo se estende por todo o organismo, tornando-se livre na porção anterior, como mostrado na figura Figura 2 C (Dotta, 2011).

Figura 2 - Pleomorfismo do *Trypanosoma cruzi*. A) Forma epimastigota. B) Forma amastigota. C) Forma tipomastigota (Figura retirada de Dotta, 2011).

O parasito tem como seu hospedeiro invertebrado, o triatomíneo, inseto hematófago pertencente aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* e conhecido popularmente como barbeiro. Ambos os sexos do inseto necessitam de sangue para se desenvolverem do estágio larval para adultos e a fêmea precisa realizar o repasto sanguíneo para pôr seus ovos. É durante esse processo que o inseto acaba transmitindo a doença para o hospedeiro vertebrado (Mulen et al., 2009).

No intestino médio do inseto, onde ocorre a multiplicação do *Trypanosoma cruzi*, é predominante a forma epimastigota. O protozoário só alterará sua forma para tripomastigota metacíclica no intestino grosso do barbeiro (Souza et al., 2010). Esta última forma, com capacidade infectiva, é liberada nas fezes do inseto durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, sendo capaz de penetrar membranas mucosas e conjuntivas.

O parasita *T. cruzi* possui a capacidade de invadir e se replicar em diversos tipos celulares, não necessariamente é necessário que ele seja fagocitado pela célula (De Souza et al., 2010, Andrade e Andrews 2005). A forma amastigota é a que propicia o *T. cruzi* de se replicar em células nucleadas do hospedeiro vertebrado (Tyler et al., 2001). Após nove ciclos de fissões binárias nas células do hospedeiro vertebrado, o

parasito assume a forma tripomastigota, voltando a infectar outras células (Dvorak, 1973, Andrade e Andrews, 2005). Essas etapas acabam por se repetir até que outro inseto transmissor do parasita se alimente do indivíduo infectado e o ciclo se inicie novamente (De Souza et al., 2010).

Figura 3 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas entram em contato com o hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo do inseto hematófago. As formas tripomastigotas infectam as células hospedeiras e após o escape do vacúolo parasitóforo, se multiplicam em sua forma replicativa amastigota. No final do ciclo replicativo, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, podendo infectar outras células do hospedeiro vertebrado ou são levadas novamente ao inseto quando ele pica o hospedeiro infectado (Figura modificada de Rassi et al., 2010).

1.3. Infecção por *Trypanosoma cruzi*

O tipo de interação entre *T. cruzi* e o hospedeiro vai depender da cepa do parasito, da forma que ele se encontra e do tipo de célula hospedeira (Yoshida et al., 2008). A forma tripomastigota metacíclica do parasita, que é a forma mais infectiva, pode adentrar diversos tipos celulares como macrófagos, músculos esqueléticos estriados e lisos e fibroblastos (Andrade e Andrews, 2005). Foi observado por Andrews e colaboradores (1987) que a forma tripomastigota pode sofrer alterações em seus antígenos de superfície quando presentes na corrente sanguínea do hospedeiro e que os mesmos podem se diferenciar em amastigotas mesmo fora das células.

A adesão do parasita na célula hospedeira depende de moléculas presentes em ambas às células. Como exemplo pode-se citar glicoproteínas ancoradas à GPI pertencentes à superfamília das Gp85/TS, encontradas na superfície do *T. cruzi* (De Sousa et al., 2010). Moléculas desta família são desprovidas de atividade de trans-sialidase e participam da adesão à matriz extracelular e à superfície da célula hospedeira. Por esse motivo, devem estar associadas às mesmas, para que o ácido siálico de glicoconjugados seja transferido para moléculas do parasita (Alves et al., 2007). Outra glicoproteína envolvida nesse processo invasivo é a Gp82, que juntamente com fosfolipase C e IP3, fazem parte de uma cascata de sinalização que induz a mobilização de cálcio necessário para a invasão (De Souza et al., 2010). Vale a pena ressaltar que as âncoras de GPI de *T. cruzi* possuem atividade imunoestimulatória, como a habilidade de estimular citocinas em células da imunidade inata (Previato et al., 2003; Cardoso et al., 2013).

A entrada do parasito na célula hospedeira também é associada à presença de mucinas, que representam a maior parte das glicoproteínas de superfície em *Trypanosoma cruzi*, sendo os seus resíduos de carboidratos que interagem com a membrana da célula hospedeira de mamífero (Souza et al., 2010; Schenkman et al., 1991; Villalta et al., 1984; Yoshida et al., 1989). Muitos outros compostos, como o ácido siálico, são incorporados à trans-sialidases principalmente em mucinas presentes nas membranas dos tripomastigotas, a fim de burlar o sistema complemento, evitando a resposta imune (Souza et al., 2010; Schenkman et al., 1991; Tomlinson et al., 1994, Cardoso et al., 2013).

Após o contato do parasita com a célula hospedeira, uma série de processos de sinalização celular acontece. No momento inicial de reconhecimento, há um aumento nos níveis de cálcio tanto na célula hospedeira quanto no parasito e há também uma elevação nos níveis de AMP cíclico nas células hospedeiras durante o curso da infecção (Caler et al., 2000; Souza et al., 2010). A elevação de cálcio é importante para que ocorra o recrutamento de lisossomos para a periferia da célula hospedeira (Docampo et al., 1995; Burleigh et al., 1998; Yoshida et al., 2006; Maeda et al., 2012 a). Os lisossomos mobilizados se fundem à membrana plasmática, possibilitando a formação do vacúolo parasitóforo e internalização do *T. cruzi* na célula alvo (Tardieux et al., 1992; Rodriguez et al., 1995; Martins et al., 2011; Maeda et al., 2012 a). Após a internalização, é importante que haja a formação e maturação dos vacúolos parasitóforos nos fagolisossomos, fator essencial para a sobrevivência do parasito na célula hospedeira, já que ele inibe mecanismos a fim de evitar que a célula hospedeira o encaminhe para a via de degradação por lisossomo (Walker et al., 2013).

Além de ser requerida a sinalização por cálcio intracelular das células - fibroblastos, células epiteliais e mioblastos - é necessária a atividade da oligopeptidase B (OPB) de *T. cruzi* para a invasão (Caler et al., 2000). Esta serino-peptidase é um agonista de cálcio, requerida para a geração de um fator solúvel que promove o aumento da concentração de cálcio livre no meio intracelular ao se ligar a um receptor, posteriormente ativa a fosfolipase C (Burleigh et al., 1995; Burleigh et al., 1997; Caler et al., 1998; Caler et al., 2000; Ferreira et al., 2006; Maeda et al., 2012 a, b). A cisteíno-protease mais abundante no parasito, a cruzipaina, também é necessária para a mobilização de cálcio intracelular. Ela atua sobre o cininogênio ligado à célula, ativando uma cascata que é o gatilho para o influxo de cálcio mediado por IP3 (Scharfstein et al., 2000; Maeda et al., 2012 a).

A infecção por *T. cruzi* também afeta profundamente o citoesqueleto da célula hospedeira em diferentes estágios do ciclo celular (Low et al., 1992; Mott et al., 2009), levando a modificações mecânicas no mesmo e a alterações em sua dinâmica (Mott et al., 2009). É provado também que a infecção por *T. cruzi* afeta a função do tecido adiposo, induzindo lipólise e necrose dos adipócitos, além de alterar as concentrações de colesterol dentro da célula hospedeira e no parasito (Combs et al., 2005; Gomes et al., 2005; Johndrow et al., 2014; Nagajyothi et al., 2012). Em células que realizam fagocitose, foi mostrado que filamentos de actina participam na internalização das

formas amastigotas extracelulares da *Trypanosoma cruzi* cepa G (tipo I) (Souza et al., 2010). Em contraste, isto não foi observado para formas amastigotas da cepa Y (Fernandes e Cols., 2013).

Foi observado pelo nosso grupo de pesquisa que assim que o parasita penetra na célula, após 4 horas de infecção, ele fica próximo ao núcleo da célula hospedeira ainda com a forma tripomastigota (Figura 3). Isso é mais uma evidência sobre a nossa hipótese de que o parasita pode alterar as estruturas nucleares a fim de favorecer sua sobrevivência.

Figura 4 - Microscopia confocal evidenciando o parasito ainda na forma tripomastigota próximo do núcleo após 4 horas de infecção. A Proteína Gigante de *T. cruzi*, (verde) foi marcada com anticorpo produzido no laboratório (dados não publicados). Em vermelho estão marcados com rodamina faloidina os filamentos de actina. Os núcleos das células hospedeiras, dos parasitas e os cinetoplastos, foram marcados com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas no microscópio confocal Leica SP5 (LMMC, FMRP-USP). Escala = 7.5 µm.

1.4. Alterações nucleares moduladas pela presença de parasitas em células hospedeiras

Muitas pesquisas estão focadas em encontrar novas evidências científicas sobre as incógnitas que ainda restam com relação à interação entre diversos tipos de patógenos com a célula hospedeira (Finlay et al., 1997; Nathan et al., 2000; Lemaire et al., 2013; Strang, 2014; Isnard et al., 2015; Sidik et al., 2015).

Durante a infecção, mudanças no perfil de mRNA nas células parasitadas podem ser um indício de um mecanismo de subversão da imunidade do hospedeiro desenvolvido pelo patógeno. Isso já foi observado em células infectadas por parasitas intracelulares como *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, vírus e bactérias (Lemaire et al., 2013).

Com relação à infecção por vírus, foi observado que células humanas infectadas por citomegalovírus (HCMV) apresentam um drástico remodelamento da arquitetura nuclear. Essa manipulação promovida pela maquinaria viral resulta principalmente na síntese de DNA e estruturas do capsídeo a favor da infecção (Strang, 2014). Algumas estruturas em que se podem observar essas alterações são os PML bodies, speckles e nucléolo, sendo que os corpos de Cajal e compartimentos perinucleares podem estar envolvidos (Strang, 2014).

Sidik e colaboradores (2015) mostraram que a presença de infecção por *Schigella ssp.* interfere na maquinaria nuclear, aumentando o número de PML bodies, além de prejudicar a SUMOilação de proteínas em células infectadas. Esse aumento de PML pode ser devido a respostas a danos ao DNA que a presença da bactéria causa (Bergonioux et al., 2012; Sidik et al., 2015). Já a SUMOilação, que é um processo de modificação pós-traducional, interfere na infecção bacteriana (Dunphy et al., 2014). O patógeno pode empregar esse processo para regular o destino de seus determinantes de virulência, a fim de facilitar sua sobrevivência dentro da célula do hospedeiro (Fritah et al., 2014; Sidik et al., 2015).

Já em *Toxoplasma gondii* foi observado que o parasita secreta, de maneira cepa específica, moléculas que funcionam como interruptores capazes de alterar a maquinaria regulatória de transcrição do hospedeiro (Saeij et al., 2007; Melo et al., 2013; Hakimi e Bougdour, 2015). Estudos mostraram que apesar do parasita estar

contido no vacúolo parasitóforo, ele interage ativamente com as vias de sinalização da célula hospedeira, modulando sua resposta à infecção (Hakimi e Bougdour, 2015).

É sabido que diversos vírus interrompem o tráfego de ribonucleoproteínas e proteínas através dos poros nucleares para estocar os suprimentos necessários no citoplasma a seu favor (Lloyde et al., 2015). Recentemente Isnard e colaboradores (2015) descreveram que em *Leishmania*, a modulação do poro nuclear é realizada pela protease GP63, que é um importante fator de virulência presente em *Leishmania*. A GP63 é capaz de afetar o transporte de proteínas para o interior e para fora do núcleo, além de alterar mecanismos associados a ácidos nucléicos e expressão gênica (Isnard et al., 2015).

A expressão diferencial de genes foi observada em cardiomiócitos infectados por *Trypanosoma cruzi* durante os estágios de invasão e infecção pelo parasito (Manque et al., 2011). Isto pode estar relacionado com a resposta imune, inflamação, organização do citoesqueleto, interações celulares e com a matriz, apoptose, ciclo celular e estresse oxidativo, somando 353 genes ativados (Manque et al., 2011). Além disso, muitos trabalhos demonstraram que a presença da infecção pode prevenir a morte celular por apoptose iniciada por vias mitocondriais de estresse e por meio de receptor de morte celular (Chuenkova et al., 2000; Nakajima-Shimada et al., 2000; Aoki et al., 2004). Em adição, Petersen e colaboradores (2006) mostraram em seus estudos que *T. cruzi* tem a capacidade de proteger cardiomiócitos de desencadear apoptose, ativando o fator nuclear kappa B (NFkB) e que esse bloqueio apoptótico diminui a ativação de caspase 3.

Grande parte dos relatos científicos evidencia patógenos intracelulares infectando o hospedeiro e gerando mudanças na resposta celular, como a via de cascatas de sinalização, as alterações de vias citoplasmáticas, modificação do citoesqueleto, ativação de fatores de transcrição para garantir a sobrevivência e a multiplicação do parasita no hospedeiro vertebrado (Caler et al., 2000; Oliver et al., 2005; Petersen et al., 2006; Mott et al., 2009; Souza et al., 2010; Lemaire et al., 2013). Porém, ainda faltam relatos mais aprofundados sobre as alterações morfológicas e funcionais que o núcleo da célula hospedeira sofre quando a célula está infectada por *Trypanosoma cruzi*.

1.5. Compartimento nuclear

O núcleo das células de eucariotos é formado por duas membranas concêntricas penetradas pelo poro nuclear (Alberts et al, 2010). Os compartimentos presentes no núcleo são dinâmicos, desprovidos de membranas de acordo com a fase do ciclo celular, que formam um conjunto de ambientes bioquímicos distintos dentro do núcleo (Pontes et al., 2008; Machyna et al., 2014; Hutten et al., 2014). O nucléolo é a estrutura mais facilmente identificada e é a região responsável pelo processamento do RNA ribossomal (Alberts et al., 2010). No nucléolo se localizam RNA ribossomais e seus precursores - pequenas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP) e proteínas ribossomais – e isso torna possível que a presença do parasito possa alterar a função deste compartimento nuclear (Jones, 1965; Perry, 1967; Scherl et al., 2002; Alberts et al., 2010;).

Os corpos de Cajal estão intimamente relacionados ao nucléolo, pois são comumente localizados na periferia nucleolar, sendo também observados no nucleoplasma (Pontes et al., 2008). São organelas nucleares de aproximadamente 0,3-1µm de tamanho (Machyna et al., 2014; Hutten et al., 2014), que atuam como sítios de montagem de ribonucleoproteínas (RNPs) e são responsáveis por promover uma produção eficiente de snRNP envolvidas no processo de *splicing* (Machyna et al., 2014; Platani et al., 2000 a). Podem também variar de tamanho e número de acordo com o tipo, fase do ciclo e desenvolvimento celular (Hutten et al., 2014). A Coilina (p80) é a proteína majoritariamente encontrada nos CB e funciona como um marcador dessa organela (Machyna, 2014). São estruturas que sofrem rápidas montagens e desmontagens e que também estão envolvidas no tráfego de RNA Polimerase II (Pontes *et al.*, 2008). A RNA polimerase II de eucariotos é responsável por catalisar a transcrição de todos os genes codificadores de proteínas e também por gerar pequenos RNAs reguladores (Heidemann et al., 2013).

Na vizinhança dos locais em que ocorre a transcrição estão localizados os Speckles ou grânulos intercromatínicos e são locais responsáveis pela estocagem, reciclagem ou montagem de snRNPs e de outros fatores de *splicing* de pré-RNA mensageiro (Spector e Lamond, 2011; Lamond e Spector, 2003; Pontes et al., 2008).

Conhecidos também por domínios SC35 apresentam-se como estruturas irregulares organizadas desprovidas de membranas, que variam de tamanho e de forma quando vistos por microscopia (Lamond and Spector, 2003). Estes dois compartimentos podem ser diretamente afetados pela presença do parasito já que são sítios de processamento de snoRNAs e snRNAs (Vazquéz-Talavera et al.,2004; Alberts et al.,2010). Ademais, essas estruturas sofrem alterações drásticas à medida que a célula progride no ciclo celular e/ou respondem a alterações ambientais (Alberts et al.,2010). Toda essa maquinaria nuclear é extremamente dinâmica e os processos decorrentes das atividades dessas organelas estão interligados.

Já as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs) apresentam sítios de ligação ao RNA. Por esse motivo desempenham diversos papéis no metabolismo dos ácidos nucléicos, como por exemplo, *splicing* alternativo, empacotamento de recém-transcritos e regulação da tradução, (Han et al.,2010 b).

Atualmente, pouco se sabe na literatura sobre a organização nuclear da célula hospedeira quando infectada pelos tripanossomatídeos e neste trabalho estamos demonstrando pela primeira vez a organização do compartimento nuclear na presença de *Trypanosoma cruzi* durante a invasão e infecção.

Figura 5 - Distribuição dos compartimentos no núcleo interfásico. Representação esquemática do núcleo de uma célula interfásica, mostrando alguns compartimentos nucleares supracitados. É possível notar pela ilustração que os corpos nucleares estão em proximidade com o local da transcrição (fábrica transcricional). Esta figura foi adaptada de Pontes et al.,2008.

6. CONCLUSÃO

Durante a infecção, os corpos nucleares envolvidos na maquinaria de processamento de transcritos como corpos de Cajal e Speckles apresentam-se alterados com relação à distribuição e tamanho. Além disso, sugerimos que a presença do parasita afeta a atividade da RNA polimerase II e por consequência pode estar interferindo na quantidade de RNA total presente na célula hospedeira. Observamos também que o *T. cruzi* afeta a expressão de ribonucleoproteínas A1 e A2B1, importantes no processamento de RNA mensageiro. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem pela primeira vez que alterações na dinâmica nuclear são provocadas na célula hospedeira quando infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Tradução: Vanz et al. 5ª edição. Editora Artmed. Porto Alegre-RS, pp 241, 358, 363-364. 2010.

ANDERSEN, Jens S. et al. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. **Current biology**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2002.

ANDRADE, Luciana O.; ANDREWS, Norma W. The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819-823, 2005.

ANDREWS, NORMA W.; COLLI, WALTER. Adhesion and interiorization of Trypanosoma cruzi in mammalian cells. **The Journal of Protozoology**, v. 29, n. 2, p. 264-269, 1982.

ANDREWS, Norma W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi. **Experimental parasitology**, v. 64, n. 3, p. 474-484, 1987.

AOKI, Maria P. et al. Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 286, n. 2, p. C206-C212, 2004.

BAQUI, M. M. A., Milder, R., Mortara, R. A., Pudles, J. A. In vivo and in vitro phosphorylation and subcellular localization of *Trypanosomatid* cytoskeletal giant proteins. **Cell Motility Cytoskeleton**, v. 47, p. 25-37, 2000.

BERGOUNIOUX, Jean et al. Calpain activation by the Shigella flexneri effector VirA regulates key steps in the formation and life of the bacterium's epithelial niche. **Cell host & microbe**, v. 11, n. 3, p. 240-252, 2012.

BERN, Caryn et al. Trypanosoma cruzi and Chagas' disease in the United States. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.

BITTENCOURT, Achiléa L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 5, p. 403-408, 1992.

BOULON, Séverine et al. The nucleolus under stress. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 216-227, 2010.

BUGLER, Beatrix et al. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-KDa nucleolar protein. **European Journal of Biochemistry**, v. 128, n. 2-3, p. 475-480, 1982.

BURLEIGH, Barbara A.; ANDREWS, Norma W. A 120-kDa alkaline peptidase from Trypanosoma cruzi is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5172-5180, 1995.

BURLEIGH, Barbara A. et al. A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **The Journal of cell biology**, v. 136, n. 3, p. 609-620, 1997.

BURLEIGH, Barbara A.; ANDREWS, Norma W. Signaling and host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 4, p. 461-465, 1998.

CALER, Elisabet V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **The EMBO journal**, v. 17, n. 17, p. 4975-4986, 1998.

CALER, Elisabet V. et al. Dual Role of Signaling Pathways Leading to Ca²⁺ and Cyclic AMP Elevation in Host Cell Invasion by Trypanosoma cruzi. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6602-6610, 2000.

CARDOSO, Mariana S. et al. Identification and functional analysis of Trypanosoma cruzi genes that encode proteins of the glycosylphosphatidylinositol biosynthetic pathway. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2369, 2013.

CARMO-FONSECA, Maria; FERREIRA, João; LAMOND, Angus I. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. **The Journal of cell biology**, v. 120, n. 4, p. 841-852, 1993

CHUENKOVA, Marina V.; PEREIRA, Miercio A. A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 4, p. 1487-1498, 2000.

CIOCE, Mario; LAMOND, Angus I. Cajal bodies: a long history of discovery. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 105-131, 2005.

CRUZ, Mario C. et al. Trypanosoma cruzi: role of δ -amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51804, 2012.

DARZACQ, Xavier et al. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. **The EMBO journal**, v. 21, n. 11, p. 2746-2756, 2002.

DE AVALOS, Silvia Vaena et al. Immediate/early response to Trypanosoma cruzi infection involves minimal modulation of host cell transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 1, p. 639-644, 2002.

DE OLIVEIRA, Hipólito; TEIXEIRA, Vicente de Paula Antunes; DE OLIVEIRA, Armando Cruz Furtado. ALTERAÇÕES NUCLEARES EM CÉLULAS PARASITADAS PELO T. CRUZI. **Revista de Patologia Tropical**, v. 10, n. 1, 1981.

DE SOUZA, Wanderley; DE CARVALHO, Tecia Maria Ulisses; BARRIAS, Emile Santos. Review on Trypanosoma cruzi: host cell interaction. **International journal of cell biology**, v. 2010, 2010.

DOCAMPO, Roberto et al. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi. **Biochemical Journal**, v. 310, n. 3, p. 1005-1012, 1995.

DUNPHY, Paige Selvy; LUO, Tian; MCBRIDE, Jere W. Ehrlichia chaffeensis exploits host SUMOylation pathways to mediate effector-host interactions and promote intracellular survival. **Infection and immunity**, v. 82, n. 10, p. 4154-4168, 2014.

DVORAK, James A.; HYDE, Thomas P. Trypanosoma cruzi: Interaction with vertebrate cells in vitro: I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental parasitology**, v. 34, n. 2, p. 268-283, 1973.

ENNIS, H. L.; LUBIN, M. Cycloheximide: aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. **Science**, v. 146, n. 3650, p. 1474-1476, 1964

FERNANDES, Maria Cecilia et al. Extracellular amastigotes of Trypanosoma cruzi are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 6, p. 977-991, 2013.

FERREIRA, Daniele et al. Actin cytoskeleton-dependent and-independent host cell invasion by Trypanosoma cruzi is mediated by distinct parasite surface molecules. **Infection and immunity**, v. 74, n. 10, p. 5522-5528, 2006.

FINLAY, B. Brett; COSSART, Pascale. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 718-725, 1997.

FONG, Ka-wing et al. Whole-genome screening identifies proteins localized to distinct nuclear bodies. **The Journal of cell biology**, v. 203, n. 1, p. 149-164, 2013.

FRITAH, Sabrina et al. Sumoylation controls host anti-bacterial response to the gut invasive pathogen Shigella flexneri. **EMBO reports**, v. 15, n. 9, p. 965-972, 2014.

GOMES, Thaís Cobellis et al. In vitro action of antiparasitic drugs, especially artesunate, against Toxoplasma gondii. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 485-490, 2012.

GRANT, Irene H. et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 10, p. 849-851, 1989.

HAKIMI, Mohamed-Ali; BOUGDOUR, Alexandre. Toxoplasma's ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. **Current opinion in microbiology**, v. 26, p. 24-31, 2015.

HAN, Siew Ping et al. Differential subcellular distributions and trafficking functions of hnRNP A2/B1 spliceoforms. **Traffic**, v. 11, n. 7, p. 886-898, 2010 (a).

HAN, Siew Ping; TANG, Yue Hang; SMITH, Ross. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. **Biochemical Journal**, v. 430, n. 3, p. 379-392, 2010 (b).

HEBERT, Michael D. Signals controlling Cajal body assembly and function. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 7, p. 1314-1317, 2013.

HEIDEMANN, Martin et al. Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 1, p. 55-62, 2013.

HOCK, Andreas; VOUSDEN, Karen H. Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 10, p. 1618-1621, 2010.

HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2 (NCTC-3196) and their utility in virus research. **The Journal of experimental medicine**, v. 115, n. 5, p. 903-918, 1962.

HUTTEN, Saskia et al. A role for the Cajal-body-associated SUMO isopeptidase USPL1 in snRNA transcription mediated by RNA polymerase II. **Journal of cell science**, v. 127, n. 5, p. 1065-1078, 2014.

ISNARD, Amandine et al. Impact of leishmania infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 3, p. e1004776, 2015.

JONES, K. W. The role of the nucleolus in the formation of ribosomes. **Journal of ultrastructure research**, v. 13, n. 3-4, p. 257-262, 1965.

KIRCHHOFF, Louis V. Is Trypanosoma cruzi a new threat to our blood supply?. **Annals of internal medicine**, v. 111, n. 10, p. 773-775, 1989.

LAMOND, Angus I.; SPECTOR, David L. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 8, p. 605-612, 2003.

LEE, J. T.; GU, W. The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 1, p. 86-92, 2010.

LEMAIRE, Julien et al. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to Leishmania major infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 10, p. e2478, 2013.

LLOYD, Richard E. Nuclear proteins hijacked by mammalian cytoplasmic plus strand RNA viruses. **Virology**, v. 479, p. 457-474, 2015.

MACHYNA, Martin et al. The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through Cajal bodies. **Molecular cell**, v. 56, n. 3, p. 389-399, 2014.

MANQUE, Patricio A. et al. Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1855-1862, 2011.

MCCLOY, Rachael A. et al. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**, v. 13, n. 9, p. 1400-1412, 2014.

MAEDA, Fernando Y.; CORTEZ, Cristian; YOSHIDA, Nobuko. Cell signaling during Trypanosoma cruzi invasion. **Front Immunol**, v. 3, p. 361, 2012 (a).

MAEDA, Fernando Yukio et al. Mammalian cell invasion by closely related Trypanosoma species T. dionisii and T. cruzi. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, p. 141-147, 2012 (b).

MAIGUEL, Dony A. et al. Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 9, p. 3703-3711, 2004.

- MANIATIS, Tom et al. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- MANQUE, Patricio A. et al. Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. **Infection and immunity**, v. 79, n. 5, p. 1855-1862, 2011.
- MARTINS, Rafael Miyazawa et al. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by Trypanosoma cruzi metacyclic forms. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 7, p. 943-954, 2011.
- MELO, Mariane B. et al. Transcriptional analysis of murine macrophages infected with different Toxoplasma strains identifies novel regulation of host signaling pathways. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 12, p. e1003779, 2013.
- MULLEN, Gary R.; DURDEN, Lance A. (Ed.). **Medical and veterinary entomology**. Academic Press, 2009.
- NAKAJIMA-SHIMADA, Junko et al. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by Trypanosoma cruzi infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1475, n. 2, p. 175-183, 2000.
- NATHAN, Carl; SHILOH, Michael U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 8841-8848, 2000.
- NICKERSON, Peter et al. Transfusion-associated Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic area. **Annals of internal medicine**, v. 111, n. 10, p. 851-853, 1989.
- NÓBREGA, Aglaêr A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. **Headache**, v. 10, p. 91, 2009.
- NOVOTNÝ, Ivan et al. In vivo kinetics of U4/U6- U5 tri-snRNP formation in Cajal bodies. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 4, p. 513-523, 2011.
- OLIVIER, Martin; GREGORY, David J.; FORGET, Geneviève. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.
- PERRY, Robert P. The nucleolus and the synthesis of ribosomes. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 6, p. 219-257, 1967.
- PETERSEN, Christine A. et al. Trypanosoma cruzi infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. **Infection and immunity**, v. 74, n. 3, p. 1580-1587, 2006.
- PLATANI, Melpomeni et al. In vivo analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. **The Journal of cell biology**, v. 151, n. 7, p. 1561-1574, 2000 (a).
- PLATANI, Melpomeni et al. Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. **Nature cell biology**, v. 4, n. 7, p. 502-508, 2002 (b).
- PONTES, Olga; PIKAARD, Craig S. siRNA and miRNA processing: new functions for Cajal bodies. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 2, p. 197-203, 2008.
- PRATA, Aluizio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.
- PREVIATO, Jose O. et al. Glycoinositolphospholipid from Trypanosoma cruzi: structure, biosynthesis and immunobiology. **Advances in parasitology**, v. 56, p. 1-41, 2003.
- REBELO, L. et al. The dynamics of coiled bodies in the nucleus of adenovirus-infected cells. **Molecular biology of the cell**, v. 7, n. 7, p. 1137-1151, 1996.
- RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

REY, Luis. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUES, Sílvia H. et al. The behavior of the coiled body in cells infected with adenovirus in vitro. *Molecular biology reports*, v. 23, n. 3, p. 183-189, 1996.

RODRIGUEZ, Ana et al. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **The Journal of cell biology**, v. 129, n. 5, p. 1263-1273, 1995.

ROUSSEL, Pascal; HERNANDEZ-VERDUN, Danièle. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. **Experimental cell research**, v. 214, n. 2, p. 465-472, 1994.

SAEIJ, J. P. J. et al. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 324-327, 2007.

SCHARFSTEIN, Julio et al. Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 9, p. 1289-1300, 2000.

SHAV-TAL, Yaron et al. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 5, p. 2395-2413, 2005.

SIDIK, Saima M. et al. Shigella Infection Interferes with SUMOylation and Increases PML-NB Number. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122585, 2015.

SINGH, Alok Kumar et al. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to Leishmania donovani over an early temporal window. **Infection and immunity**, v. 83, n. 5, p. 1853-1868, 2015.

SOUZA, W. Basic cell biology of Trypanosoma cruzi. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

SPECTOR, David L.; LAMOND, Angus I. Nuclear speckles. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 2, p. a000646, 2011.

STECCONI-SILVA, R. B.; ANDREOLI, Walter K.; MORTARA, R. A. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of Trypanosoma cruzi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 953-958, 2003.

STRZELECKA, Magdalena et al. Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 4, p. 403-409, 2010.

TARDIEUX, Isabelle et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117-1130, 1992.

TAZI, Jamal; BAKKOUR, Nadia; STAMM, Stefan. Alternative splicing and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 1, p. 14-26, 2009.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5, p. 472-481, 2001.

VÁZQUEZ-TALAVERA, José et al. Autoantibodies against Cajal bodies in systemic lupus erythematosus. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 10, n. 5, p. BR130-BR134, 2004.

YE, Keqiang. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 9, p. 918-923, 2005.

YOUNG, Philip J. et al. A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 4, p. 2852-2859, 2002.

YOSHIDA, Nobuko et al. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 57, n. 6, p. 1663-1667, 1989.

YOSHIDA, Nobuko. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 2, p. 480-486, 1999.