Universidade de São Paulo
Instituto de Química
Departamento de Bioquímica

**Interação *Trypanosoma cruzi*-célula hospedeira:
estudo do “domínio FLY”, motivo carboxi-subterminal conservado na
superfamília das gp85/*trans*-sialidases.**

Melissa Regina Fessel

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Prof. Dra. Maria Júlia Manso Alves

SÃO PAULO

seis de outubro de 2006

Ao meu amado papito lindo, que me ensinou tudo o que consegui absorver (falta tanto ainda, pai...) com seu impecável exemplo de vida e de como ser pai e homem honrados, com seu carinho e amor, com os doídos, porém necessários, puxões de orelha e com tantas madrugadas de bate-papos regados a muito café, boa música e bocejos contagiosos. Eu te amo muito, pai querido, e dedico a você essa conquista tão importante pra mim, com todo meu carinho e admiração eternos!

À minha terceira mãe, querida tia-dinda Val, a quem devo grande, enorme!, parte da força que me impeliu a terminar de escrever a tese. Com tanto amor, carinho e apoio, ficava até difícil desanimar... Obrigada, você é parte muito importante disso tudo. Amo você!

Dedico, especialmente, esse trabalho ao meu muito amado filho, Henrique Fifo Bubú Precioso, que chegou há pouco já me trazendo alegrias incalculáveis, importantes lições de vida e uma força interior que, sem sua presença, acredito não teria encontrado. Teremos muito para aprender um com o outro, filhote, mas já devo muito a você, meu querido anjinho iluminado...

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Parasitas, do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof. Dra. Maria Júlia Manso Alves e contou com os auxílios financeiros das seguintes instituições de fomento à pesquisa:

CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através de 7 meses de bolsa de Doutorado.

FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através de bolsa de Doutorado Direto e de verba concedida ao projeto de pesquisa temático, coordenado pela Dra. M. J. M. Alves.

Agradecimentos

À **Prof. Dra. Maria Júlia Manso Alves**, por ter me orientado durante os anos do doutorado e por me proporcionar, ao me aceitar como aluna em seu laboratório, o acesso a uma infinidade de conhecimento científico, a diversas técnicas experimentais e a muitos profissionais extremamente competentes. Agradeço à **Maria Júlia Manso Alves**, com muito carinho, por ter demonstrado uma paciência quase maternal em muitas ocasiões, por ter me compreendido e ajudado muito nos meus não poucos momentos difíceis dessa vida maluca, por ter me aceitado como um ser com “horários alternativos”, “excessivamente crítica”, mas que ama o que faz e defende seus princípios com unhas e dentes (e, às vezes, morde por isso, hehe!). Obrigada, Júlia!

Ao **Prof. Dr. Walter Colli** que durante esses anos, mesmo meio à distância, me ensinou muito sobre ser cientista e, principalmente, sobre como ser um ensinador! Aprendi muito como sua monitora e agradeço a honra de ter sido escolhida como tal nas duas oportunidades em que participei do programa PAE.

Ao **Prof. Dr. Robert Ivan Schumacher**, dono de um incomensurável conhecimento sobre qualquer coisa (incrível isso!), que sempre extremamente prestativo e disponível me auxiliou sobremaneira com os experimentos de biologia celular (meu principal desafio de aprendizado nesse laboratório) e com valiosas discussões e sugestões. Ao querido **Mestre Ivan “Schu-schu”macher** por ter proporcionado momentos incrivelmente descontraídos e divertidos, com suas piadas ultra-inspiradas, sua coleção de revistas de cultura (in)útil – de extremo valor científico-cultural, diga-se de passagem – e seu inconfundível, inigualável e sensacional senso de humor (“ai, a gente não vence...!”). Obrigada por ter sido um grande amigo, com espetaculares sugestões de cervejas (oops!) e com ombros e ouvidos de ouro, que agüentaram (não sei como), ao longo desses anos, tantas horas de lamentos, reclamações e chatices do gênero. Obrigada por ter me mostrado como fazer ciência, por ter me ajudado a me manter firme (como gelatina, muitas vezes, porém firme!) em meu objetivo de ser doutora e “cientista de valor” (essa, só meu pai entende – risos). Ich bin sehr Danken, Meister Ivan (e se estiver escrito errado, a culpa é sua que não quis me ensinar alemão, tá?!).

Ao **Prof. Dr. Frederico Gueiros**, pelos bons momentos científicos, e, principalmente, sobre a incrível aula sobre acessórios para “pimpolhos” que ninguém, jamais, esquecerá (hehe)! Obrigada por tudo, Fredy!

Aos meus amigos muito especiais e queridos **Célia Braga Lúdio**, **Roberto Zangrandi** e **Marinêi Ferreira Gonçalves** por proporcionarem, além do excepcional e impecável auxílio técnico, no suprimento de, entre muitas outras coisas, parasitas, células e organização laboratorial, magestosos momentos, recheados de boas conversas (e gostosuras!) em inúmeros e inesquecíveis cafés-da-manhã coletivos. Vocês moram em meu coração! Obrigada por tudo. Sou eternamente grata a vocês por tanto carinho e apoio!

À **Prof. Dra. Carla Columbano Oliveira**, por me aceitar em seu laboratório para meu novo desafio (“aprender biologia molecular no pós-doc”), ainda no final do meu curso de doutorado e com a barriga gigante... À querida amiga **Carla**, pelas inúmeras caronas, pelas muitas conversas e por tanta paciência com essa reclamona e chorona oficial... Opa! Agora que será minha chefe, não posso me estender demais, sob pena de ser classificada como “puxa-saco” (he, he!), mas, independente de qualquer coisa, jamais esquecerei seu apoio pessoal, profissional e moral! Muito obrigada! E, principalmente, muito obrigada por ter se prontificado a me ensinar alemão, ao contrário de “certas pessoas”... Ih! Agora é oficial, hein?!

Ao **Prof. Dr. Sérgio Verjovski-Almeida** e à **Prof. Dra. Eveline Gomes Vasconcelos**, por terem visto em uma “mera aluna de um curso técnico em química” alguém com algum potencial para o trabalho científico e por terem me ensinado toda a base de meu conhecimento técnico. Por terem sabido me cobrar o que ensinaram, às vezes de forma dura, porém determinante para meu crescimento e amadurecimento como profissional. À querida, muito, muito querida amiga **Eveline**, por ter acreditado em mim desde os primórdios. Por ter me ensinado sobre viver, conviver, pesquisar... Pelas inúmeras e valiosas discussões científicas acaloradas. Pela convivência tão enriquecedora dentro e fora dos portões da USP. Por tanto apoio nos laboratórios e na vida que não teria como ser listado aqui. Eu nunca me esquecerei de tudo o que fez por mim! Muito obrigada, Mestra Eveline!

Ao **Prof. Dr. Rogério Meneghini** e à **Prof. Dra. Sonia Aparecida Gurgueira**, orientadores científicos e pessoais e queridos amigos, que confiaram e apostaram em mim e, principalmente, acreditaram em meu trabalho. Tenho imensas saudades dos nossos muito bons velhos tempos! Ao **Prof. Dr. Nilson Zanchin** que me acolheu, ainda bem antes da pós-graduação, tão carinhosa e prestosamente em seu laboratório no Centro de Biologia Molecular e Estrutural, no LNLS, e sempre prestativo me enriqueceu muito com seu conhecimento em tantas discussões sobre a existência (para alguns “ou não” – risos!) da ATPase de ferro. Obrigada por tudo, Nilson!

Ao querido (desculpe-me pelo excesso de intimidade, mas é querido de verdade!) e, infelizmente, anônimo assessor da FAPESP, por ter me brindado com preciosas doses anuais de ânimo e incentivo através de seus valorosos comentários, críticas construtivas e sugestões a respeito de um projeto complexo, porém apaixonante!

Aos novos amigos que fiz durante minha estadia no laboratório da Prof. Júlia, colegas queridos, com quem muitas vezes troquei informações científicas, protocolos, boas conversas e risadas, grandes conselhos e às vezes até algumas farpinhas, mas com quem aprendi muito sobre vida, ciência *et al.*: **Alessandra Roque Pancetti, Ana Cláudia Trocoli Torrecilhas, Ariel Silber, Celso Romero Ramos** e todo o “clã peruano”, **Débora Rose de Oliveira, Guilherme Louzada Silva Meira, José Roberto Tavares, Luiz Cláudio Miletto, Margaret Haiganouch Magdesian, Milton “Mauro-Moacir-Moisés-Messias-Marcelo-Nelson”, Miryam Marroquin Quelopana** y mis muy queridas bebitas, **Paula Signorini, Paulo Luiz de Sá Júnior, Renata Rosito Tonelli, Úrsula Urias Santos Pereira & Cláudio Alejandro Pereira, Viviana Barbosa Paes, Viviani Renata Anze.**

À querida turma da Secretaria de Pós Graduação do IQ, Cibele Rosani Carlos, Emiliano Rodrigo Ferreira Gomes Gonçalves, Marcelo de Alcântara Costa e Milton Cesar Santos Oliveira, pelo seu eficiente apoio, pela torcida e, principalmente, por seus incríveis e salvadores (e numerosos!) milagres concedidos a mim, sempre desesperada, pedindo tudo “pra ontem” (he, he!)...

À equipe de psiquiatria do HU, por ter me ajudado a reencontrar o eixo numa fase de crise existencial muito complexa...

À Telefônica agradeço alegre e profundamente por não ter acreditado ser possível uma pessoa reclamar da vida “queratínica” por 5 horas consecutivas em uma única ligação a cobrar de telefone celular para fixo e, portanto, nunca ter apresentado a salgadíssima conta desse inimaginável (risos!) telefonema (Você lembra, pai? Eles esqueceram, hehehe!).

À Trivial Pizzas, que ao longo desses muitos anos cercada pelos muros da USP, forneceu, a preço módico, o meu sustento em noites, feriados e finais de semana e, de quebra, muitas vezes ainda alimentou meu vício em nicotina, o que certamente foi muito benéfico às instalações físicas do instituto (hehe!)...

Ao CNPq e à FAPESP, que através das concessões de bolsa, financiaram, entre outras incríveis estripulias, toda essa inacreditável aventura que foi meu doutorado.

Agradecimentos ultra-especiais

Eu me considero uma pessoa de sorte... sempre estive cercada por pessoas queridas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram a prosseguir no objetivo acadêmico que persigo há tempos (uns onze anos...). Por essa razão, são muitos os nomes que gostaria de listar, apesar de saber que corro o sério risco de esquecer de mencionar alguma pessoa especial, pelo quê já me desculpo antecipadamente! A todos vocês, muito obrigada por tudo (e tudo é muito meeeesmo!!!)!

Alexandre Anti-Cristo (hehe); Anderson Marques (pelas baladas engraçadas e étlicas e pelo valoroso fornecimento de drogas... lícitas); Caroline Serafim (quem, com nome de anjo, me abençoou com uma amizade sincera e muito especial. Obrigada por tudo, irmã querida! Jamais terei como retribuir tanta ajuda carinhosa, tantos papos e desabafos e tantas risadas! Te amo muito!); César Manoglio; Claudemir Lúcio do Lago e toda a turma da FUVES, salvadora FUVES... (obrigada por tudo!); Cristiane Miranda França (onde quer que você esteja, nunca esquecerei de nossa amizade); Cristina Salvador Pool (por tantas caronas, pelos anos de faculdade e por ter sido um modelo que tentei, sem sucesso – risos!, seguir!); Família Mello-Morassutti, pelo estratégico “apoio logístico” em tempos de vacas magras (muito obrigada por tudo tio Bira, tia Laurita e Alessandra); Prof. Dra. Gláucia Santelli (pelo apoio quase espiritual durante minha tensa prova de qualificação); Gustavo Morari; Harumi Kobaiashi; Henrique Fessel Trench, milhares de vezes obrigada!; Heros Trench Neto (pelos bons momentos e por nosso filho tão amado) e família; Jeizon, Francesca e Laurinha Fonsêca (obrigada pelo apoio, queridos amigos!); José Alberto Fracassi da Silva e família; Leo Steinmann; Marcelo Belezma Fagundes (pelos papos altamente CVV e por dar, junto comigo, os fuvesteiros e gente da nossa “laia”, tanto lucro às cervejarias e aos botecos da vida); Marco Antônio Bueno Filho (por não ter me deixado desistir da graduação – risos – e por tudo o mais...); Martha Sepúlveda (pela amizade verdadeira e eterna e, especialmente, pelo exemplo de determinação, meiguice, feminilidade e inteligência! Quando eu crescer, quero ser como você, hermanita rica! Marthita, yo simplemente te áááámo!); Maurício Longo (por tudo e tanto que você sabe o quanto é! Jamais esquecerei você e o que fez por mim em todos os aspectos da minha vida. Acredite: você foi um divisor de águas, um novo parâmetro... Torço muito por você, mesmo que a distância física imposta na nossa amizade persista!); Mônica Tenaglia (querida Mô! Pela convivência, pela amizade eterna, por tudo! You’re so lovely! I love ya!); Nikolay Stanger; Noriberto Pradie; Paulo Fessel Papito Lindo: DAPIS!!!; Prof. Laércio (quem, indiretamente, me iniciou na vida científica! Jamais esquecerei você, sua ajuda e a confiança que depositou em mim ao me chamar para dar aulas no Oswaldo Cruz! Muitos beijos!!!); Ricardo Braga Campos; Ronaldo, Amanda e Iva Magoo (Queridos Magoos, obrigada por tuuudo!); Sílvia Alice Saraiva; tias Cristiane e Gisele Fessel (pela torcida, pelos bate-papos virtuais e, principalmente, por termos nos “encontrado” depois de tanto tempo!); Valdênia Rangel (Minha terceira mãe... jamais terei como agradecer tudo o que fez por mim e pelo nosso mascotinho querida, amada, tia! Você é uma pessoa iluminada, um verdadeiro anjo, merece absolutamente tudo o de melhor que essa e todas as vidas puderem ofertar!); Viviane Rangel (prima querida, obrigada por tudo – de mim e do Henriquinho! Que bom que nos reaproximamos! Estou muito feliz por isso!); Zé Geraldo (pelas FUVES, pelos étlicos papos sobre abobrinhas em geral, especialmente Frank Zappa – opa! Isso não é abobrinha! – e língua japonesa – sem comentários! Só o Belezma mesmo pra acompanhar o “raciocínio”, hehe...).

À minha mãe, à minha segunda mãe Vó Lindinha e a meu amado irmão Rogério.
Saudades...

Índice

Lista de Abreviações	pg 10
Resumo	pg 11
Abstract	pg 12
1. Introdução	pg 13
1.1. A Doença de Chagas	pg 13
1.2. O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	pg 13
1.3. Patologia da Doença de Chagas	pg 15
1.4. Interação entre parasita e hospedeiro mamífero	pg 17
1.5. <i>Trans</i> -sialidases e Tc85	pg 21
1.6. A molécula de adesão Tc85-11	pg 24
1.7. Motivos adesivos da porção amino-terminal de Tc85-11	pg 25
1.8. Motivo adesivo da porção carboxi-terminal de Tc85-11 e CK18	pg 25
2. Objetivos	pg 28
3. Materiais e Métodos	pg 29
3.1. Preparo de células competentes	pg 29
3.2. Purificação de DNA a partir de géis de agarose	pg 29
3.3. Purificação de DNA plasmidial	pg 29
3.4. Sequenciamento de DNA	pg 29
3.5. Sub-clonagem de CK18 e de seus fragmentos amino- e carboxi-terminais, a partir de cDNA de CK18 de humano	pg 29
3.6. Clonagem no vetor de expressão pET21a	pg 30
3.7. Expressão e purificação de CK18 e de suas porções amino- (NTCK18) e carboxi-(CTCK18) terminais	pg 31
3.8. Purificação das proteínas recombinantes por coluna de afinidade a níquel	pg 31
3.9. Determinação de ligação de fragmentos de CK18 a peptídeo J	pg 32
3.10. Cromatografia de afinidade de proteínas de superfície celular em peptídeo J imobilizado em matriz sólida	pg 33
3.11. Cultivo de células e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	pg 33
3.12. Marcação metabólica de células LLC-MK ₂ com ³⁵ S-metionina	pg 34
3.13. Coleta de meio condicionado por LLC-MK ₂ tratada por 1 hora com DMSO ou 100 µM de peptídeo J	pg 34
3.14. Quantificação de proteínas	pg 34
3.15. Biotinilação de proteínas de superfície celular	pg 35
3.16. Iodação de proteínas de membrana plasmática de LLC-MK ₂	pg 35
3.16.1. Método da cloramina	pg 35
3.16.2. Método da lactoperoxidase	pg 35
3.17. Imunoprecipitação	pg 36
3.18. SDS-PAGE	pg 37
3.19. <i>Western blot</i>	pg 37

3.20. Pré-adsorção de peptídeo J a partículas de látex	pg 38
3.21. Modificação covalente de <i>beads</i> carboxilados com peptídeos	pg 38
3.22. Avaliação da interação entre células e <i>beads</i> covalentemente modificados	pg 39
3.23. Avaliação da estrutura de peptídeo J por Dicroísmo Circular	pg 39
3.24. Avaliação por FACS da interação entre células e <i>beads</i> modificados	pg 40
3.25. Obtenção de matriz extracelular de LLC-MK ₂	pg 41
3.26. Produção de anticorpos	pg 41
3.27. Ensaios para detecção de anticorpos.....	pg 41
3.28. Síntese de peptídeos	pg 42
4. Resultados e Discussão	pg 43
4.1. A porção amino-terminal de CK18 contém o sítio de ligação de “domínio FLY”	pg 43
4.1.1. Peptídeo J, representante do “domínio FLY”, não liga em CK18 via resíduos de carboidrato.....	pg 43
4.1.2. Clonagem dos fragmentos amino- e carboxi-terminais de CK18	pg 45
4.1.3. Mapeamento do sítio de ligação de “domínio FLY” em CK18	pg 50
4.2. “Domínio FLY” como motivo adesivo de Tc85	pg 53
4.2.1. “Domínio FLY” adere em superfície de células de cultura	pg 53
4.2.2. Peptídeo J adere e induz adesão de <i>T. cruzi</i> na matriz extracelular	pg 64
4.4. “Domínio FLY” induz secreção de proteínas de células epiteliais LLC-MK ₂	pg 66
4.4. Análise de “domínio FLY” no contexto da glicoproteína Tc85-11	pg 78
5. Discussão Geral	pg 88
5.1. Mapeamento do sítio de ligação de “domínio FLY” em CK18	pg 88
5.2. Papel de “domínio FLY” na glicoproteína Tc85-11	pg 90
5.3. Considerações finais	pg 95
6. Conclusões	pg 98
7. Referências Bibliográficas	pg 99
<i>Curriculum vitae</i>	pg113

Lista de Abreviações

LB – meio de cultura Luria – Bertani
IPTG – β -D-tiogalactopiranosídeo de etila
DMSO – dimetilsulfóxido
BSA – albumina bovina sérica
IgG – imunoglobulina G
Tris – tris-hidroximetilaminoetano
CD – dicroísmo circular
cDNA – DNA complementar
CMP – citidina monofosfato
DNA – ácido desoxirribonucleico
DME – meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
EGF – *Epidermal Growth Factor*
ELISA – *Enzyme Lynked Immuno Assay*
GPI – glicosilfosfatidilinositol
kDa – kilo Dalton
LDL – *Low Density Lipoprotein*
pb – pares de base
CK – citoqueratina
PCR – reação em cadeia da polimerase
PBS – tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4 e cloreto de sódio 150 mM
rpm – rotações por minuto
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB – soro fetal bovino
FITC – isotiocianato de fluoresceína
TLCK – N-tosil-L-lisinaclorometilcetona
Peptídeo J – GKKPSVTVTNVFLYNRPLN
Peptídeo J-Ala – VTNVFAYNRPL
Peptídeo K – AVLGDTEPPYIMRLS
Peptídeo miniJ – VTNVFLYNRPL
Peptídeo PD – SRYPLFQLGV
PMSF – fenilmetilsulfonil fluoreto
OD – densidade óptica

Trypanosoma cruzi, agente causador da Doença de Chagas, é um protozoário intracelular obrigatório. Vários estudos foram realizados visando a caracterização de moléculas de 85-90 kDa, presentes na superfície do parasita bem como de seus possíveis receptores nas células do hospedeiro vertebrado. Um membro da superfamília das gp85/*trans*-sialidases (Tc85-11), expresso somente na superfície das formas infectivas tripomastigotas e que adere em laminina e em células, foi clonado e caracterizado em nosso laboratório.

Peptídeo J, fragmento de Tc85-11 não implicado em adesão a laminina, que contém o motivo conservado na superfamília, com sequência VTVXNVFLYNR, aqui denominado “domínio FLY”, foi identificado como sendo responsável pela adesão da porção carboxi-terminal da proteína em células epiteliais e, adicionado ao meio de cultura, promoveu aumento do número de células infectadas por *T. cruzi*. Seu receptor foi descrito como CK18 (Magdesian *et al.*, 2001). Dando continuidade a esse estudo, em nosso trabalho caracterizamos a porção amino-terminal de CK18 como a região da interação com “domínio FLY” e identificamos o provável sítio de ligação, localizado entre os 15 aminoácidos iniciais da proteína.

Adicionalmente, com o intuito de determinar a função do “domínio FLY”, caracterizamos o peptídeo J como molécula extremamente adesiva, interagindo com a superfície de células epiteliais, matriz extracelular e promovendo interação entre tripomastigotas e ECM, possivelmente por meio de interação hidrofóbicas não dependentes de sua estrutura tridimensional adotada na proteína nativa.

“Domínio FLY” foi caracterizado, ainda, como possível modulador da infecção por tripomastigotas já que, da mesma forma que estimula a invasão quando adicionado ao meio de cultura (Magdesian *et al.*, 2001), promove secreção de proteínas imunorelacionadas com CK18 e ligantes de proteína A para o sobrenadante celular. Esse sobrenadante é capaz de *in vitro* inibir o processo infectivo do parasita em cerca de 40%.

Abstract

Trypanosoma cruzi the agent causative of Chagas' disease is an obligatory intracellular parasite in the mammalian host. Although the mechanism of trypomastigotes invasion of host cells has been intensively studied, a final and integrate picture of the process remains elusive. Members of the gp85/*trans*-sialidase superfamily have been implicated in the parasite-host interaction, with Tc85 family (85 kDa glycoproteins) implicated in the adhesion step.

Our laboratory showed that Tc85-11, one member of Tc85 family, is a multi-adhesive molecule, with binding sites located at the amino- and carboxi-portions of the protein. The conserved "FLY domain" (peptide J) is present in all members of the family, binds to cytokeratin 18 (CK18) and enhances *T. cruzi* invasion (Magdesian *et al.*, 2001). Herein, we localized the binding site of "FLY domain" on the amino-portion of CK18 and demonstrated an increase of trypomastigotes to extracellular matrix upon FLY treatment.

The "FLY domain" can modulate *T. cruzi* infection *in vitro* and apparently is responsible for inducing the secretion of molecules by the host that inhibit trypomastigote invasion.

1. Introdução

1.1. A Doença de Chagas

A Tripanosomíase Americana ou Doença de Chagas é uma importante infecção parasitária, causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida a mamíferos por fezes de insetos Triatomíneos da família Reduviidae, ocorrente de forma endêmica em grande parte de regiões rurais da América Latina. Identificada e caracterizada por Carlos Chagas em 1909, a doença causa cerca de 13.000 mortes ao ano e estima-se que, desde o México até o sul da Argentina, exista entre 16 a 18 milhões de pessoas infectadas e que 120 milhões têm chances de adquiri-la (Moncayo *et al.*, 1999). O risco de morte de uma pessoa chagásica é duas vezes maior do que o de uma pessoa saudável (Brenner *et al.*, 2000), e como cerca de 30% da população infectada desenvolve manifestações clínicas, cerca de 5 milhões de pessoas podem ter alterações clínicas devidas à doença, o que torna a patologia bastante relevante em termos de saúde pública e impacto econômico.

1.2. O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida, que envolve hospedeiros invertebrados e diversas classes de mamíferos, incluindo o homem, e se apresenta em três principais estágios de desenvolvimento, distinguíveis morfologicamente: a forma infectante, tripomastigota metacíclico (eliminado pelo vetor invertebrado) ou sanguíneo (presente no hospedeiro vertebrado) e formas as replicativas, amastigota e epimastigota. Epimastigotas intracelulares, intermediários entre amastigotas e tripomastigotas, foram recentemente caracterizados (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999).

Em geral, o ciclo tem início quando vetores triatomíneos infectados praticam hematofagia em mamíferos e depositam fezes contendo tripomastigotas metacíclicos. A irritação produzida pela picada do inseto induz o indivíduo a coçar o local, o que permite que o parasita atravesse a epiderme através de descontinuidades na pele e invada as células hospedeiras.

O *T. cruzi* pode invadir potencialmente todos os tipos de células nucleadas, que apresentam, porém, diferentes graus de susceptibilidade à infecção (Dvorak & Howe, 1976). Após a entrada, a forma tripomastigota habita o interior de um vacúolo denominado vacúolo parasitóforo, de onde sai para o citosol após 1-2 horas devido à ação de proteína lítica, TcTOX, secretada pelo parasita

(Andrews *et al.*, 1990; Ley *et al.*, 1990), e se diferenciam para a forma amastigota que, após um período de dormência de aproximadamente 24 horas, que se replica por fissão binária, com uma duplicação a cada 12 horas. Após a multiplicação, os amastigotas se rediferenciam para tripomastigotas, que emergem da célula hospedeira rompida, à proporção de 500 parasitas para cada um internalizado (Dvorak, 1975), para infectar células adjacentes ou alcançar a corrente sanguínea (**Figura i**). O ciclo replicativo intracelular leva de 3 a 5 dias.

Os tripomastigotas não sobrevivem por muito tempo no sangue, pois não infectam hemácias nem se multiplicam (Zingales & Colli, 1985), então se disseminam atravessando a barreira endotelial do sistema circulatório do vertebrado e infectando células de outros órgãos ou, eventualmente, são ingeridos por insetos triatomíneos durante a alimentação sanguínea, dando continuidade ao ciclo de vida.

Tripomastigotas ingeridos pelo vetor invertebrado se diferenciam em epimastigotas que, por sua vez, se dividem por fissão binária no trato intestinal do inseto, no lúmen do intestino. No reto, os epimastigotas aderem ao epitélio e se transformam em tripomastigotas metacíclicos (**Figura i**), capazes de infectar células de mamíferos. O processo inteiro de desenvolvimento no triatomíneo leva de 10 a 15 dias.

Figura i – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Colli, 1993.

T. cruzi não é transmitido exclusivamente por contaminação com fezes infectadas de insetos. Há outras rotas de transmissão, apesar de menos relevantes. A transmissão por transfusão de sangue infectado é bem conhecida e de considerável importância epidemiológica, especialmente em países do hemisfério norte que recebem intensas correntes migratórias de pessoas de áreas endêmicas. A transmissão congênita também ocorre e é associada a nascimentos prematuros e freqüentemente é fatal ao feto. Transmissão por via oral é também conhecida, apesar de não muito comum; há relatos de casos de contaminação por aleitamento materno (Prata, 2001) ou ingestão de comida contaminada, o que, inclusive, foi recentemente confirmado pelo caso de contaminação de pessoas que ingeriram caldo de cana moída juntamente com triatomíneos contaminados no sul do Brasil.

1.3. Patologia da Doença de Chagas

A Doença de Chagas pode ser caracterizada fundamentalmente como uma condição de inflamação crônica caracterizada principalmente por cardiomiopatia e desordens digestivas. Há dois tipos básicos de lesões inflamatórias: um focal, relacionado ao parasita, que ocorre em qualquer tecido onde células parasitadas são rompidas e outro, difuso, que ocorre principalmente no miocárdio, esôfago e cólon, não relacionado à presença do *T. cruzi*.

A doença apresenta duas fases distintas: a aguda e a crônica.

A fase aguda é caracterizada por uma infecção generalizada por *T. cruzi*, cujas manifestações clínicas começam de 6 a 10 dias após a contaminação e duram de 1 a 2 meses. No sítio de invasão, observa-se inchaço que caracteriza os sinais típicos de contaminação. Quando a entrada dos tripomastigotas se deu pela mucosa conjuntiva, nota-se o sinal de Romana (Romana, 1935) nas pálpebras do olho infectado. Em qualquer região da pele, o inchaço característico é denominado chagoma.

O sintoma mais comum no estágio inicial da infecção é febre, mas pode ocorrer inchaço de gânglios linfáticos e edema subcutâneo. Eletrocardiogramas já podem mostrar anormalidades cardíacas (Rassi *et al.*, 2000) e respostas autoimunes a muitos antígenos do hospedeiro têm sido identificadas, apesar da origem e papel desse fenômeno na patologia ainda serem controversos (Girones & Fresno, 2003).

Usualmente, a fase aguda passa despercebida, já que apresenta sintomas típicos de outras infecções genéricas. Entretanto, pode ocorrer morte durante esse estágio, em alguns casos, geralmente por miocardite ou meningoencefalite.

Durante a fase aguda, parasitas podem ser facilmente detectados no sangue periférico. Essa fase da doença termina quando o balanço imunológico entre o hospedeiro e o parasita reduz drasticamente o número de tripomastigotas circulantes, tornando o diagnóstico parasitológico direto impossível.

Depois da fase aguda, os indivíduos contaminados se tornam assintomáticos, apresentando, inclusive, padrões normais em eletrocardiogramas. Cerca de 70% das pessoas infectadas continuam nesse estágio, conhecido como forma indeterminada da Doença de Chagas crônica, pelo resto de suas vidas. Entretanto, 30% delas vão desenvolver manifestações clínicas de danos em órgãos, apresentando a forma cardíaca, digestiva ou nervosa da doença, cerca de 10 a 25 anos após a infecção inicial. Essa ocorrência é especialmente prevalente em homens de 20 a 45 anos. Dor nas costas, palpitações, arritmia e tromboembolismo são sintomas característicos; falência cardíaca e morte súbita também são freqüentes (Barrett *et al.*, 2003). Com pronunciadas diferenças geográficas, a doença também causa megavísceras, principalmente megaesôfago e megacólon.

Há outras formas de diagnóstico, além do sintomático. Anticorpos do tipo IgM e IgG aparecem nas fases aguda e crônica, respectivamente, e são explorados em diagnósticos sorológicos. Hemaglutinação e imunofluorescência indireta, técnicas de ELISA e de PCR (Marcon *et al.*, 2002) são também usadas. O xenodiagnóstico e hemocultura são métodos clássicos de detecção parasitológica indireta.

Ainda não há vacina para a Doença de Chagas ou qualquer droga profilática disponível. O tratamento é feito com benznidazol e, apesar de eficaz na fase aguda, apresenta muitos efeitos colaterais e não garante a eliminação do parasita na fase crônica (WHO, 2002).

Muitos esforços têm sido dispendidos, então, no controle da propagação da doença, que pode ser feito pela eliminação da população doméstica de vetores triatomíneos e pela avaliação sorológica de sangue e órgãos doados, por exemplo. Além disso, diversos grupos de pesquisa em todo o mundo estudam a interação entre *T. cruzi* e o hospedeiro vertebrado, visando à compreensão dos mecanismos de adesão e penetração do parasita à célula hospedeira e das vias metabólicas do parasita, para desenvolvimento de fármacos ou tratamento profilático eficaz e inócuo ao paciente.

1.4. Interação entre parasita e hospedeiro mamífero

Para sobreviver e estabelecer uma infecção estável no hospedeiro, após atravessarem a barreira imposta pela matriz extracelular, os tripomastigotas devem aderir e invadir as células alvo.

Os eventos de adesão e invasão podem ser experimentalmente desacoplados pelo uso de células fixadas com paraformaldeído e, com o emprego dessa estratégia, verificou-se que a adesão é um processo dependente de energia do parasita e de temperatura (Schenkman *et al.*, 1991).

Usando essa estratégia, verificou-se que os tripomastigotas não aderem à célula de mamífero tão bem a 4°C quanto a 37°C (Schenkman *et al.*, 1991), o que sugere que a interação parasita-célula hospedeira promovida pelas moléculas de superfície por si só não seja suficiente para promover forte adesão. Entretanto, é possível que um rearranjo ou *clustering* das moléculas de superfície dos tripomastigotas seja requerido para gerar o ligante ativo (Burleigh & Andrews, 1995), uma vez que a remoção de ligantes do parasita gera drástica redução na capacidade invasiva (Andrews *et al.*, 1984) e que anticorpos monoclonais dirigidos contra proteínas de superfície de tripomastigotas inibem a invasão (Alves *et al.*, 1986; Araguth *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1989; Ramirez *et al.*, 1993).

Todas as formas evolutivas de *T. cruzi* são capazes de aderir à célula hospedeira, entretanto o grau de adesão varia de acordo com a cepa do parasita, a forma evolutiva e o tipo celular do hospedeiro.

Estudos demonstram que tripomastigotas, assim como epimastigotas e amastigotas, são eficientemente internalizados por macrófagos não ativados e residem dentro de fagolisossomos (Milder & Kloetzel, 1980; Meirelles & de Souza, 1983; Carvalho & de Souza, 1989), entretanto, as formas epimastigotas são destruídas (Nogueira & Cohn, 1976; Milder & Kloetzel, 1980). Apesar de pouco infectiva para células não fagocíticas, a forma amastigota é ingerida por fagócitos profissionais, escapam do fagolisossomo e se replicam normalmente no citoplasma (Ley *et al.*, 1988), o que pode ser um modo alternativo de propagação, possivelmente essencial para a sobrevivência do parasita na presença de resposta citotóxica do hospedeiro (Burleigh & Andrews, 1995).

A infecção de células não fagocíticas por amastigotas também ocorre: a adesão se dá em microvilosidades da superfície e a entrada ocorre pela região dorsal da célula hospedeira (Mortara, 1991) e é bloqueada por citocalasina D, um inibidor da polimerização de actina. Este mecanismo

pode ser caracterizado como fagocitose, já que no sítio de adesão de amastigotas podem ser detectadas protrusões de filamentos de actina, cuja formação pode ser abolida por inibidores de proteína quinase (Procópio & Mortara, 1994).

O mecanismo de invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas, entretanto, é distinto. A entrada dessa forma evolutiva do parasita se dá, preferencialmente, pela região basolateral da célula hospedeira, próximo às margens celulares (Schenkman *et al.*, 1988) e, ainda, é facilitada na presença de citocalasina D (Tardieux *et al.*, 1992).

A invasão celular por tripomastigotas é acompanhada pela formação de um vacúolo membranar ao redor do parasita, denominado vacúolo parasitóforo. A membrana plasmática da célula hospedeira não sofre alteração como formação do *cup* fagocítico ou *zippering* durante a infecção (Schenkman *et al.*, 1988), o que seria esperado para um processo de fagocitose clássica.

Na investigação de organelas intracelulares como fornecedoras de membrana para o vacúolo parasitóforo, foram demonstrados agrupamentos de lisossomos próximos à membrana plasmática da célula hospedeira, em regiões de contato com tripomastigotas. Esses *clusters*, quando detectados imediatamente antes da internalização, estavam predominantemente associados com a região posterior dos parasitas, a extremidade que inicia a invasão. Ainda, marcadores lisossomais puderam ser detectados em vacúolos parcialmente formados, sugerindo que a fusão gradual de lisossomos provém a membrana necessária para sua formação (Tardieux *et al.*, 1992).

Ao contrário de muitos patógenos intracelulares (revisto em Sinai & Joiner, 1997), *T. cruzi* requer o meio ácido encontrado nos lisossomos para iniciar o egresso do vacúolo e alcançar o citoplasma (Ley *et al.*, 1990), onde se replica como amastigota. O baixo pH é requerido para a atividade da molécula formadora de poros, TcTox, que é secretada por *T. cruzi* e atua na ruptura do vacúolo (Andrews & Whitlow, 1989; Andrews *et al.*, 1990). Esse microambiente ácido é necessário, ainda, para dirigir a diferenciação dos tripomastigotas para amastigotas, processo iniciado no vacúolo e completado no citoplasma (Tomlinson *et al.*, 1995).

Após aderir à membrana, a forma tripomastigota ativa vias de sinalização na célula hospedeira e inicia o processo de formação e entrada gradual no vacúolo cuja membrana apresenta composição derivada da do hospedeiro (Rodriguez *et al.*, 1996). São conhecidas duas estratégias diferentes que tripomastigotas exploram na elaboração do vacúolo parasitóforo nascente em células não fagocíticas (Tardieux *et al.* 1992; Woolsey *et al.*, 2003)

No primeiro mecanismo, descrito há mais de uma década (Tardieux *et al.*, 1992), em resposta a estímulo imposto pelos tripomastigotas, lisossomos da célula hospedeira são recrutados ao sítio de adesão do parasita e fornecem membrana para a formação do vacúolo parasitóforo, migrando, de forma cinesina-dependente, ao longo dos microtúbulos (Rodriguez *et al.*, 1996), até se fundirem com a membrana plasmática, em processo dependente de Ca^{2+} (Rodriguez *et al.*, 1996).

No outro mecanismo, há pouco tempo caracterizado (Woolsey *et al.*, 2003), tripomastigotas promovem sinalização que induz invaginação da membrana plasmática do hospedeiro que inicia a formação do vacúolo que, de acordo com Wilkowsky (Wilkowsky *et al.*, 2002), sofre um processo de maturação, com aquisição gradual de endossomos e, finalmente, de lisossomos.

Dados mais recentes sugerem que as duas rotas de invasão de células não fagocíticas, a dependente e a não dependente de lisossomos, podem ser iniciadas por um passo comum que envolve, sinalização intracelular, desarranjo do citoesqueleto de actina e invaginação da membrana plasmática e que a divergência para um ou outro mecanismo ocorre em função de eventos moleculares ainda não caracterizados, após o parasita ser parcialmente internalizado (Woolsey & Burleigh, 2004).

Com respeito à sinalização na célula hospedeira promovida por *T. cruzi*, tripomastigotas, imediatamente antes de sua entrada, induzem pulsos assíncromos e repetitivos na concentração de cálcio livre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em mamíferos (Moreno *et al.*, 1994; Tardieux *et al.*, 1994; Caler *et al.*, 2000; Scharfstein *et al.*, 2000), o que ocasiona rearranjos transientes nos microfilamentos de actina (Rodriguez *et al.*, 1995) e fusão entre lisossomos e membrana plasmática (Rodriguez *et al.*, 1997). Os pulsos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ são iniciados após 1-2 minutos em resposta à adição de tripomastigotas vivos (Moreno *et al.*, 1994; Tardieux *et al.*, 1994; Caler *et al.*, 2000), o que sugere a necessidade de proximidade física entre o parasita e o hospedeiro nesse mecanismo de sinalização (Caler *et al.*, 2000; Scharfstein *et al.*, 2000).

Há relatos de dois mecanismos, aparentemente discretos, que explicam essa sinalização induzida por *T. cruzi* e envolvem peptidases de tripomastigotas que clivam um precursor inativo, gerando agonistas ativos de Ca^{2+} que se ligam em receptores acoplados à proteína G heterotrimérica e dirigem a mobilização mediada por inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) de estoques de Ca^{2+} intracelular. Uma delas, a oligopeptidase B (Opb), é uma serina protease de 80 kDa, citosólica, que possivelmente gera o agonista de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a partir de um peptídeo precursor (Burleigh *et al.*, 1997), que ativa a fosfolipase C (PLC) do hospedeiro, gerando IP3 e mobilização de Ca^{2+} de estoques

intracelulares taptigargina-sensíveis (Rodriguez *et al.*, 1995). A outra protease, cruzipaina (Scharfstein *et al.*, 2000), é secretada pelo parasita e seu substrato é de origem do hospedeiro, cininogênio, que, na presença dessa cisteína protease, libera cininas ativas, como bradicinina (Del Nery *et al.*, 1997) que, ao se ligar a seu receptor, inicia os pulsos de $[Ca^{2+}]_i$.

Outras vias de sinalização celular também estão envolvidas na modulação da invasão celular por *T. cruzi*, bem como na indução de mecanismos anti-apoptóticos e na modulação de resposta imune do hospedeiro.

T. cruzi ativa a via de sinalização da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-k) (Chuenkova *et al.*, 2001), o que pode ser responsável pela modulação da invasão dependente de lisossomos ou por regulação do mecanismo de entrada dependente de actina (Procopio *et al.*, 1999), já que PI3-k está envolvida em processos actina-dependentes (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997) e de exocitose (Yang *et al.*, 1996). Tripomastigotas ativam, ainda, a adenilato ciclase causando elevação da concentração de cAMP em mamíferos, facilitando a infecção (Rodriguez *et al.*, 1999), o que é atribuído à possível presença de duas vias distintas de recrutamento de lisossomos, uma Ca^{2+} - e outra cAMP-dependente (Caler *et al.*, 2000). Além disso, sinalização por meio do receptor de TGF- β (Ming *et al.*, 1995), aumento nos níveis de c-FLIP (Hashimoto *et al.*, 2005) e ativação da *extracellular regulated kinase* (ERK1/2) (Chuenkova & Pereira, 2001 e 2003; Mukherjee *et al.*, 2004) também são processos conhecidos como moduladores da entrada do patógeno em diversos tipos de células não fagocíticas.

O início da comunicação entre os tripomastigotas e as células de mamíferos, no entanto, requer o contato entre ligantes do parasita com seus respectivos receptores no hospedeiro.

Por parte do hospedeiro, o ácido siálico (Schenkman *et al.*, 1993), laminina (Alves, 1996; Giordano *et al.*, 1994, N. de *et al.*, 2006), integrinas (Fernandez *et al.*, 1993), fibronectina (Ouaisi *et al.*, 1984), colágeno (Santana *et al.*, 1997) e trombospondina (Simmons *et al.*, 2006) estão envolvidos no processo de invasão celular por tripomastigotas. Além disso, galectina-3, proteína de membrana plasmática e também secretada ao meio extracelular aumenta a adesão de tripomastigotas a ECM, processo este inibido por lactose (Moody *et al.*, 2000).

Por parte do parasita, resíduos de manose da superfície de amastigotas e tripomastigotas foram implicados no processo invasivo (Soeiro *et al.*, 1999). Ainda, diversas proteínas de superfície foram relacionadas com os processos de adesão e invasão. As mucinas (Schenkman *et al.*, 1993),

grupo de glicoproteínas O-glicosiladas, de 60 a 200 kDa, ricas em treonina, serina, e prolina (Frasch, 2000) são aceptores de ácido siálico na reação mediada pela *trans*-sialidase (item 1.5) e seu grau de sialilação está relacionado com a invasividade dos tripomastigotas (Schenkman *et al.*, 1993; Franchin *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1997). Mucinas ou suas âncoras de GPI foram também implicadas na adesão dos parasitas a macrófagos e na produção de óxido nítrico e citocinas (De Diego *et al.*, 1997; Camargo *et al.*, 1997a e 1997b).

Os tripomastigotas metacíclicos expressam em sua superfície diversos grupos de glicoconjugados implicados no reconhecimento e invasão da célula hospedeira, como gp82, gp90 e gp35/50 (Teixeira & Yoshida, 1986; Araguth *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1999). O grupo das gp82 foi relacionado com a indução de pulsos de $[Ca^{2+}]_i$ em células de mamíferos (Dorta *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1998) e também em tripomastigotas (Ruiz *et al.*, 1988). Já as gp90 e gp35/50 parecem modular negativamente a infecção de células não fagocíticas (Yoshida *et al.*, 1989; Ruiz *et al.*, 1998; Malaga & Yoshida, 2001).

Diversas glicoproteínas de massa molecular entre 85-90 kDa, pertencentes à superfamília gênica das gp85/*trans*-sialidases, foram implicadas em processos de adesão à célula hospedeira e à matriz extracelular (Alves *et al.*, 1986; Abuin *et al.*, 1989; Ouaisi *et al.*, 1986; Lima & Villalta, 1989; Ortega-Barria & Pereira, 1991 e 1992) e, de interesse especial em nosso estudo, tem-se as glicoproteínas da família das Tc85, expressas somente nas formas tripomastigotas (revisto em Alves, 1996).

1.5. *Trans*-sialidases e Tc85

Em análises imunoquímicas, resíduos de ácido siálico, carboidrato negativamente carregado, envolvido em muitos processos fisiológicos de células de mamíferos e glicoproteínas (Jeanlez & Codington, 1976; Schauer, 1981), inclusive na interação entre vírus, bactérias e protozoários patogênicos com seus hospedeiros, foram identificados na membrana plasmática de formas tripomastigotas e epimastigotas (Pereira *et al.*, 1980).

Entretanto, apesar dos resíduos sialilados serem rapidamente regenerados, os parasitas são incapazes de sintetizar ácido siálico (Schauer *et al.*, 1983): esse grupo de glicoconjugados é ativamente transferido de doadores exógenos a aceptores na superfície de *T. cruzi*, por uma

trans-glicosidase que não utiliza CMP-ácido siálico ou ácido siálico livre como substratos (Previato *et al.*, 1985).

A aquisição de ácido siálico pelos tripomastigotas na corrente sanguínea é crítica para a sobrevivência dos parasitas circulantes, já que tripomastigotas desialilados são lisados pela rota alternativa do complemento e rapidamente ingeridos por macrófagos (Kipnis *et al.*, 1981). Além disso, a atividade dessa enzima é maior no estágio infectivo tripomastigota (Zingales *et al.*, 1987) e a sialização de componentes de superfície de *T. cruzi* está envolvida na invasão do parasita à célula hospedeira (Piras *et al.*, 1987).

Trans-sialidases são as enzimas que catalisam a transferência de $\alpha(2-3)$ -ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro a proteínas altamente glicosiladas, ancoradas por GPI à superfície do parasita, as mucinas (Schenkman *et al.*, 1993; Acosta *et al.*, 1994).

Em tripomastigotas de *T. cruzi*, a *trans*-sialidase apresenta-se como um oligômero formado por subunidades heterogêneas com 120 a 240 kDa (Schenkman & Eichinger, 1993). Cada subunidade é composta por um domínio amino-terminal, que contém o sítio catalítico, e um domínio carboxi-terminal, que apresenta um número variado de unidades repetitivas de blocos de 12 aminoácidos, randomicamente dispostas, denominadas motivos SAPA (*Shed Acute Phase Antigen*, Pollevick *et al.*, 1991) por gerarem forte resposta imune em pacientes infectados na fase aguda. A enzima é ligada à membrana por uma âncora de GPI e sua clivagem pela PLC pode explicar sua secreção pelo parasita.

O genoma de *T. cruzi* contém centenas de genes que codificam para as *trans*-sialidases, bem como para proteínas homólogas, porém sem atividade enzimática (Egima *et al.*, 1996). Todas essas proteínas fazem parte da superfamília gênica das gp85/*trans*-sialidases e têm em comum a presença de pelo menos um motivo da sequência conservada em neuraminidases bacterianas, o motivo SXDXGXTW, denominado *ASP box* (Pereira *et al.*, 1991), o motivo altamente conservado VTVXNVFLYNR na extremidade carboxi-terminal, ainda sem função determinada (Frasch, 2000), e o motivo “FRIP”, típico das sialidases, no início da porção amino-terminal.

Os membros da superfamília foram classificados com base na estrutura e função de seus produtos nas famílias das *trans*-sialidases e *trans*-sialidases símile (Frasch, 2000).

A família das *trans*-sialidases é subdividida em três grupos: TS-e, TS e TS I. Membros do grupo TS-e são expressos por epimastigotas, possuem atividade enzimática, mas não possuem as

repetições SAPA. Os demais membros são expressos nas formas tripomastigotas, estão ligados à membrana por âncora de GPI e apresentam dois domínios: o amino-terminal que contém o sítio catalítico e o carboxi-terminal, com as repetições SAPA. Os membros dos grupos TS e TS I são diferenciados pela porção amino-terminal, uma vez que o grupo TS apresenta atividade enzimática e o grupo TS I não, em função da substituição de uma tirosina por uma histidina no sítio catalítico (Y432→H).

Figura ii – Esquema da estrutura primária dos membros da família das *trans*-sialidases. Peptídeo sinal está representado pelo *box* preto; seqüências FRIP, *ASP box* (SXXDXGXTW) e FLY (VTVXNVFLYNR) e repetições SAPA estão indicadas; âncora de GPI está representada pelo *box* cinza claro.

A família das *trans*-sialidases símile é composta por genes que correspondem a proteínas com estrutura similar à das *trans*-sialidases porém sem atividade *trans*-sialidásica. Nessa família, os membros podem apresentar de 1 a 4 cópias completas ou degeneradas da seqüência *ASP box*, contêm a seqüência conservada VTVNVFLYNR e apresentam identidade em nível de aminoácidos de cerca de 30 a 40% com *trans*-sialidases. Essa família foi subdividida em três grupos, de acordo, principalmente, com sua massa molecular e identidade de seqüência. São eles CRP, Tc13 e Tc85. No grupo das CRP (*Complement Regulatory Protein*), encontram-se proteínas que atuam nas vias clássica e alternativa do complemento. Tc13 pode ser representado por uma proteína com capacidade de ligação ao receptor $\beta 1$ adrenérgico. Finalmente, e de interesse maior para nosso estudo, o grupo das Tc85 compreende proteínas envolvidas na invasão e/ou adesão do parasita à célula hospedeira (Alves *et al.*, 1986; Ramirez *et al.*, 1993) ou à matriz extracelular (Alves *et al.*, 1986; Abuin *et al.*, 1989; Ouaisi *et al.*, 1986; Lima & Villalta, 1989; Ortega-Barria & Pereira, 1991; Giordano *et al.*, 1994 e 1999).

Em nosso laboratório, uma família de glicoproteínas de 85 kDa, componente do grupo das Tc85, foi isolada de lisado de tripomastigotas, estando ausente nos outros estágios de desenvolvimento do parasita (Katzin & Colli, 1983). Tc85 possui meia vida de 3,5 a 4 horas (Abuin

et al., 1996b), é N-glicosilada por uma complexa cadeia de sialooligosacarídeos (Couto *et al.*, 1987 e 1990) e é expressa exclusivamente na superfície de tripomastigotas, mas também pode ser secretada em vesículas pelo parasita (Abuin *et al.*, 1996).

Observou-se que um anticorpo monoclonal contra Tc85, denominado H1A10, reconhece tripomastigotas de diferentes cepas e é capaz de inibir *in vitro* a invasão de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK₂), sugerindo, e de acordo com sua classificação na superfamília, a interferência da Tc85 no mecanismo invasivo empregado por tripomastigotas (Alves *et al.*, 1986; Abuin *et al.*, 1989). Por análise em gel bidimensional, foi observado que Tc85 tem diferentes pontos isoelétricos variando de 5,5 a 9, sendo uma família heterogênea de glicoproteínas (Giordano *et al.*, 1994).

1.6. A molécula de adesão Tc85-11

A participação de membros desta família de glicoproteínas nas etapas de adesão e/ou internalização dos tripomastigotas às células hospedeiras foi evidenciada pelo fato do anticorpo H1A10 inibir parcialmente a invasão pelo parasita *in vitro* (Alves *et al.*, 1986).

Paralelamente, a participação de laminina, molécula componente da matriz extracelular, na infecção por *T. cruzi* foi aventada, já que anticorpos contra essa proteína inibem a invasão dos tripomastigotas em cerca de 75%. Por meio de purificação por cromatografia de afinidade a laminina, isolou-se um componente ácido (pI 5,6-6,7) da família das glicoproteínas Tc85, presente somente em lisados das formas tripomastigotas. A proteína foi denominada LBG (*Laminin Binding Glycoprotein*) e é reconhecida pelo monoclonal H1A10 (Giordano *et al.*, 1994).

Utilizando o anticorpo H1A10, foi possível clonar um fragmento do gene desse membro da família das Tc85 (Tc85-1), a partir do qual foi clonado o gene completo (Tc85-11) e caracterizado o epítipo do monoclonal. Além disso, observou-se que a proteína recombinante Tc85-1, correspondente à porção carboxi-terminal da Tc85-11, se liga em células LLC-MK₂ (Giordano *et al.*, 1999).

Partindo-se da hipótese de que Tc85-11 possui, pelo menos, dois sítios de adesão em células de mamíferos (matriz extracelular e membrana plasmática) e, visando a caracterização dessas regiões de ligação, foram sintetizados peptídeos com seqüências que mapeavam, em termos de

aminoácidos, os domínios carboxi- e amino-terminais da proteína (Magdesian *et al.*, 2001 e Marroquin-Quelopana *et al.*, 2004, respectivamente).

1.7. Motivos adesivos da porção amino-terminal de Tc85-11

O estabelecimento da infecção do hospedeiro vertebrado por *T. cruzi* ocorre após ter acesso a tecidos internos depois de sua entrada no organismo comumente via derme, o que implica que o contato inicial entre o parasita e o hospedeiro mamífero se dá ao nível da matriz extracelular, com seu denso arranjo de colágeno, glicoproteínas e proteoglicanas (Ortega-Barria & Pereira, 1992).

Consistente com a necessidade dos tripomastigotas transporem as barreiras compostas pela matriz extracelular e pela lâmina basal, a fim de aderirem e penetrarem na célula hospedeira, diversas moléculas componentes de ECM foram descritas como ligantes para o *T. cruzi*, tais como fibronectina, colágeno, heparan sulfato e laminina (Prioli *et al.*, 1990a e 1990b; Ouaisi *et al.*, 1986; Ortega-Barria & Pereira, 1991 e 1992; Fernandez *et al.*, 1993; Giordano *et al.*, 1994 e 1999).

Por meio da fragmentação da molécula alvo em peptídeos com 10-20 aminoácidos, o domínio amino-terminal da Tc85-11, via peptídeos N17 e N20, componentes de um *cluster* estrutural único (Marroquin-Quelopana *et al.*, 2004), foi caracterizado como sendo o sítio de ligação em laminina. O tratamento de células epiteliais com esses peptídeos inibe substancialmente (~ 85% e 30%, respectivamente) a infecção celular por tripomastigotas (Marroquin-Quelopana *et al.*, 2004), o que sugere que a ligação entre tripomastigotas, possivelmente via Tc85, e ECM, via laminina, é etapa essencial no processo de adesão e/ou invasão por *T. cruzi*.

1.8. Motivo adesivo da porção carboxi-terminal de Tc85-11 e CK18

Utilizando-se a estratégia citada anteriormente, foi possível identificar que um fragmento da região carboxi-terminal de Tc85-11, peptídeo J que contém o motivo conservado da superfamília das gp85/*trans*-sialidases VTVXNVFLYNR, aqui denominado “domínio FLY”, possui grande capacidade de adesão em células de mamíferos (Magdesian *et al.*, 2001).

O receptor do “domínio FLY” em células epiteliais foi caracterizado como sendo citoqueratina 18 (CK18) e os efeitos de J e das proteínas recombinantes Tc85-1 e Tc85-11 na invasão de células LLC-MK₂ por tripomastigotas foram estudados. O tratamento das células com

peptídeo J e com as proteínas Tc85-1 e Tc85-11 promoveu aumento do número de células infectadas em cerca de 40% (Magdesian *et al.*, 2001).

O filamento intermediário de células de eucariotos superiores é composto por um heteropolímero, cujos monômeros são compostos por polipeptídeos do tipo I, queratinas ácidas com 40-57 kDa, grupo do qual CK18 faz parte, e do tipo II, as queratinas básicas com 53-67 kDa (Fuchs & Weber, 1994). CK18 associa-se à CK8, queratina do tipo II, formando o polímero componente do citoesqueleto de células de epitélio simples e de muitos epitélios derivados de neoplasmas.

As queratinas apresentam três domínios estruturais, sendo um domínio central em α -hélice, o *rod domain*, composto por cerca de 300-350 aminoácidos, flanqueado por domínios globulares amino- e carboxi-terminais, que variam consideravelmente em tamanho e composição (Albers & Fuchs, 1992). Ao longo da α -hélice, há repetições de aminoácidos hidrofóbicos de tal forma que de cada sete aminoácidos, o primeiro e o quarto possuem essa característica, promovendo a exposição de resíduos hidrofóbicos à superfície da hélice, o que favorece a formação de uma super-hélice entre duas moléculas do filamento intermediário (Fuchs & Weber, 1994). Para a formação do filamento, os *rod domains* de queratinas do tipo I e II se associam para formar heterodímeros *coiled-coil* (Hatzfeld & Weber, 1990), que interagem de forma antiparalela para a constituição do heteropolímero constituinte da fibra (Coulombe, 1993; Stewart, 1993).

A principal função atribuída às citoqueratinas é a de proteção contra o *stress* mecânico. Diversos tipos celulares são mais sujeitos ao rompimento quando não apresentam intacta a rede de filamento intermediário de seus citoesqueletos (Takahashi *et al.*, 1999; Fuchs & Cleveland, 1998).

Recentemente, entretanto, alguns autores propuseram que citoqueratinas e outras proteínas intracelulares podem não ser componentes exclusivos do citoplasma sendo também encontradas na superfície celular e implicadas como receptores para diferentes ligantes plasmáticos. Como exemplos, pode-se citar CK8 como receptor de plasminogênio e de ativador tissular de plasminogênio (Hembrough *et al.*, 1995 e 1996a), e como ligante para Streptococci do grupo b e outros cocci gram positivos (Tamura *et al.*, 2000), CK1 como receptor para cininogênio de alto peso molecular (Hasan *et al.*, 1998) e CK13 como ligante de *Burkholderia cepacia* (Sajjan *et al.*, 2000). CK18, em particular, foi descrita como ligante para complexos de trombina-antitrombina III em hepatócitos de coelho (Hembrough *et al.*, 1996b).

Entretanto, CK18 não tem domínio transmembrânico. Por essa razão, foi sugerido que sua apresentação na superfície possa ocorrer em função de sua projeção através da membrana plasmática, como parte de um complexo protéico ou que, secretada pelas células, possa se associar com a porção externa da membrana plasmática (Hembrough *et al.*, 1995; Asch *et al.*, 1993).

Até o momento, possível envolvimento de citoqueratinas no processo de interação e/ou reconhecimento de patógenos e ligantes não teve seu mecanismo elucidado. Sabe-se, no entanto, que fosforilação de queratinas, incluindo CK18, é um processo dinâmico que possui papel importante na organização e função de seus filamentos (Coulombe & Omary, 2002) e pode promover alteração da arquitetura celular (Sánchez *et al.*, 1998). Além disso, outras modificações pós-traducionais são comuns às citoqueratinas e também responsáveis por sua regulação, como glicosilação e ubiquitinação, por exemplo.

Essas modalidades regulatórias podem agir isoladamente ou em conjunto, afetando a organização, distribuição, *turnover* e função dessas proteínas (Coulombe & Omary, 2002) e, eventualmente, serem determinantes dos mecanismos de atuação das citoqueratinas nos processos com os quais vêm sendo associadas.

A interação entre CK18 e “domínio FLY”, por exemplo, ainda não teve suas bases moleculares estabelecidas e pode ser afetada por e/ou influenciar modificações pós-traducionais na proteína em questão, facilitando a infecção celular por tripomastigotas.

Assim, para maior compreensão das funções dos membros da família da Tc85, e da superfamília das gp85/*trans*-sialidases em geral, na interação entre *Trypanosoma cruzi* e o hospedeiro vertebrado, é necessária a completa caracterização dos ligantes e receptores que medeiam a interação parasita-hospedeiro e qualificação dos efeitos que essa interação possa promover na célula hospedeira e/ou no parasita.

Nesse contexto, objetivamos o estudo do “domínio FLY”, descrito como ligante de CK18 de células epiteliais (Magdesian *et al.*, 2001), que apresenta homologia em nível de aminoácidos com o módulo tipo 3 da fibronectina (Pereira *et al.*, 1991), e que, apesar de ser um motivo carboxi-subterminal altamente conservado na superfamília das gp85/*trans*-sialidases, ainda não teve sua função no mecanismo de infecção por *T. cruzi* estabelecida.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo da função da sequência conservada na porção carboxi-subterminal das proteínas componentes da superfamília das gp85/*trans*-sialidases, denominada “domínio FLY”, responsável pelo estímulo da infecção celular por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Para tanto, foram almejados os seguintes objetivos específicos:

1 – Mapeamento do sítio de ligação de “domínio FLY” à CK18, previamente caracterizada como seu receptor em células epiteliais.

2 – Caracterização do “domínio FLY” como micro-motivo adesivo.

3 – Identificação de efeitos do tratamento de células epiteliais com peptídeo J, representante do “domínio FLY”.

4 – Análise preliminar da estrutura e localização espacial do “domínio FLY”, no contexto da glicoproteína Tc85-11.

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparo de células competentes

Bactérias competentes foram preparadas de acordo com o método de Hanahan (Hanahan, 1983). As cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas foram DH5 α (Novagen) e BL21-Codon Plus (DE3)-RIL (Stratagene).

3.2. Purificação de DNA a partir de géis de agarose

Na extração de DNA a partir de géis de agarose, após o fracionamento e coloração com brometo de etídio, a banda de interesse foi extraída e o material purificado empregando-se o sistema *Sephaglas Band Prep Kit* (Amersham Pharmacia Biotech), conforme instruções do fabricante.

3.3. Purificação de DNA plasmidial

Bactérias transformadas com o plasmídeo de interesse foram crescidas a 37°C, durante a noite, em meio seletivo (LB, contendo 100 μ g/mL de ampicilina) e coletadas por centrifugação. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o sistema *Concert Rapid Plasmid Miniprep System* (Gibco BRL Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante.

3.4. Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA foi realizado em equipamento automático (Perkin-Elmer), utilizando-se o kit *DNA Sequencing-Big Dye Terminator* (Perkin-Elmer), conforme instruções do fabricante.

3.5. Sub-clonagem de CK18 e de seus fragmentos amino- e carboxi-terminais

A construção LK442-K18, contendo o cDNA completo de CK18 de humano (Kulesh & Oshima, 1988), nos foi gentilmente cedida pelo Dr. R. G. Oshima, La Jolla Cancer Research Foundation, California, USA.

O plasmídeo foi utilizado para transformar células competentes (*E. coli*, cepa DH5 α) e o produto da transformação foi crescido em meio sólido (LB-ágar) contendo ampicilina, a 37°C, durante a noite, para extração do DNA plasmidial.

Quatro oligonucleotídeos, listados a seguir, foram sintetizados para amplificar por PCR as seqüências codificantes para CK18 completa (CK18, aa 1-430) e para fragmentos amino-, correspondente aos 144 primeiros aminoácidos (NTCK18, aa 1-154) e carboxi-, correspondente aos últimos 201 aminoácidos (CTCK18, aa 229-430), terminais e inserir sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI* (destacados em negrito):

Oligo 1: 5' CCG **CAT ATG** ATG AGC TTC ACC ACT CGC

Oligo 2: 5' CATT **CTC GAG** AG TAT TTG CGA AGA TCT GAG

Oligo 3: 5' GCC **CAT ATG** GCC AGC TCT GGG TTG ACC

Oligo 4: 5' CTG **CTC GAG** ATG CCT CAG AAC TTT GGT GTC

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR, empregando-se 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo (oligos 1 e 2, para NTCK18, oligos 3 e 4, para CTCK18 e oligos 1 e 4 para CK18) e 1 μ g do plasmídeo LK442-K18, previamente desnaturado, como molde, em 20 μ L de reação.

As reações foram incubadas a 94°C, por 4 min e depois amplificadas por 25 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C, 58°C ou 54°C (para CK18, NTCK18 ou CTCK18, respectivamente) por 1 min e 72°C por 3 min, num termociclador Perkin-Elmer.

Os produtos de PCR de tamanhos adequados foram purificados a partir de géis de agarose 1% e clonados no vetor pGEM-T *Easy* (Promega), conforme instruções do fabricante, empregando-se razão molar inserto:vetor equivalente a 3:1 e condições de ligação de 1 hora em temperatura ambiente.

Clones contendo fragmentos de DNA de tamanhos correspondentes aos insertos após a clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (cerca de 470 pb para NT-CK18, 610 pb para CT-CK18 e 1300 pb para CK18), foram submetidos a seqüenciamento, conforme descrito no item 3.4.

3.6. Clonagem no vetor de expressão pET21a

Clones que apresentaram insertos com a orientação correta foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, fracionados em gel de agarose e os fragmentos correspondentes aos

insertos foram purificados e sub-clonados no vetor de expressão, pET21a (Invitrogen), previamente linearizado (com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*) e desfosforilado, conforme instruções do fabricante.

Células competentes (*E.coli*, cepa DH5 α) foram transformadas com o produto da reação anterior e cultivadas em meio sólido, contendo ampicilina, durante a noite a 37°C.

As colônias positivas foram crescidas durante a noite, a 37°C, em meio seletivo (LB contendo ampicilina), na presença de 170 μ g/mL de cloranfenicol e o DNA plasmidial de cada um dos clones foi extraído e denominado NTCK18.pET21a, CTCK18.pET21a e CK18.pET21a.

3.7. Expressão e purificação de CK18 e de suas porções amino- (NTCK18) e carboxi- (CTCK18) terminais

O DNA plasmidial de cada um dos clones foi utilizado para transformar células competentes (*E. coli*, cepa BL21-*Codon Plus*-RIL), que foram semeadas em meio sólido (LB-ágar), contendo 100 μ g/mL de ampicilina e 170 μ g/mL de cloranfenicol, e crescidas a 37°C, durante a noite. Para a produção das proteínas de fusão, colônias isoladas foram inoculadas em meio LB com 100 μ g/mL de ampicilina, cultivadas durante a noite, a 37°C, e a síntese protéica foi induzida com 1 mM de IPTG por 3 h a 37°C, sob agitação de 250 rpm.

Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação (5.000xg, por 10 min a 4°C), lisadas pela adição de tampão A (125 mM NaH₂PO₄, 8 M uréia e 10 mM Tris-Cl pH 8) e incubação sob agitação, durante a noite. Sequencialmente, o material foi centrifugado a 20.000xg por 30 min a 4°C e o sobrenadante reservado para a purificação das proteínas.

3.8. Purificação das proteínas recombinantes por coluna de afinidade a níquel

A purificação das proteínas recombinantes se deu por cromatografia de afinidade, com o emprego de 5 mL de resina *Chelating Sepharose Fast Flow* 4B (Amersham Pharmacia) previamente carregada com íons Ni⁺², de acordo com instruções do fabricante, e equilibrada com 20 volumes de tampão A (descrito no item 3.7).

A solução contendo as proteínas foi adicionada à coluna em fluxo 0,1 mL/min e o material não ligado (*flow through*) foi coletado para análise. Sequencialmente, a coluna foi lavada, em fluxo

de 0,5 mL/min, com 10 volumes de tampão A, 10 volumes de 40 mM imidazol e, finalmente, o material foi eluído por adição de 1M de imidazol, todas em tampão A, em fluxo 0,2 mL/min, em temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 1 mL e aquelas contendo proteínas foram reunidas, quantificadas e conservadas a 4°C.

3.9. Determinação de ligação de fragmentos de CK18 a peptídeo J

Foi utilizada a metodologia de *dot blot* para essa determinação. Para tanto, foi empregado o equipamento *Bio Dot Apparatus* (Bio Rad), para imobilizar em membranas de nitrocelulose de 0,5 a 1,5 nmoles de peptídeo J ou de J-Ala, peptídeo análogo modificado e sem efeito biológico (Magdesian *et al.*, 2001), a partir de soluções 1 µg de peptídeo/µL de DMSO 10%.

Após secagem, as membranas foram bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com solução de 1% BSA em TBS-TT (50 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,03% Triton X-100 e 0,05% Tween-20).

Paralelamente, alíquotas das soluções de proteínas recombinantes, obtidas como descrito no item 3.8, foram diluídas em tampão A até a concentração de 1 mg/mL.

Em seguida, soluções de 1% BSA em TBS-TT, contendo 10 µg/mL de proteínas recombinantes foram adicionadas às membranas e incubadas por 15 horas em temperatura ambiente, sob agitação.

Após isso, as membranas foram lavadas por 3 vezes, de 15 min cada, sob agitação e em temperatura ambiente, com solução de TBS-TT.

Anticorpo contra a cauda de histidina adicionada à porção carboxi-terminal de cada uma das proteínas recombinantes (Anti-HisTag, da Invitrogen) foi diluído 1:4000 (conforme sugestão do fabricante) em 1% BSA em TBS-TT e incubado com as membranas por 2 horas, em temperatura ambiente, sob agitação.

Novamente, as membranas foram lavadas por 3 vezes, de 15 min cada, com TBS-TT e, finalmente, incubadas com anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo acoplado à peroxidase (Sigma) à diluição recomendada de 1:6000 em 1% BSA em TBS-TT, por 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação.

As membranas foram lavadas mais uma vez por 3 etapas de incubação, de 15 min cada, com TBS-TT e submetidas a revelação por quimioluminescência, utilizando o kit ECL *Western Blotting Detection* (Amersham Pharmacia) e exposição por períodos de tempo adequados a filmes de raios-X (Kodak), que foram revelados conforme instruções do fabricante.

3.10. Cromatografia de afinidade de proteínas de superfície celular em peptídeo J imobilizado em matriz sólida

Proteínas de superfície de células LLC-MK₂ foram biotiniladas, como descrito no item 3.15, extraídas com tampão de lise e cromatografadas em J-matriz, como descrito por Magdesian (Magdesian *et al.*, 2001).

Diferentes soluções foram testadas como eluentes das proteínas com afinidade ao peptídeo, em etapa anterior à eluição com solução de 8 M de uréia, conforme descrito nas legendas das figuras.

3.11. Cultivo de células e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As células LLC-MK₂ (epiteliais de rim de macaco Rhesus), CHO (*chinise hamster ovarian*) ou J774 foram mantidas e subcultivadas em meio DME (*Dulbecco's Modified Eagle's*, Life Technologies) ou RPMI (para CHO e J774), suplementado com 1,2 g/L de NaHCO₃, 5x10⁵ U/L de penicilina, 100 mg/L de estreptomicina e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) a 37°C em estufa umidificada sob atmosfera de 5% de CO₂, conforme metodologia descrita na literatura (Andrews & Colli, 1982). Os subcultivos foram realizados por tripsinização das células aderentes, seguido de contagem e redistribuição a novas garrafas e/ou lamínulas 48 h antes da realização do ensaio.

Foi utilizado *T. cruzi* de cepa Y, isolado de um caso agudo humano de Doença de Chagas (Silva & Nussenzweig, 1953). Tripomastigotas foram obtidos por infecção de culturas de células LLC-MK₂, conforme descrito (Andrews & Colli, 1982).

3.12. Marcação metabólica de células LLC-MK₂ com ³⁵S-metionina

Células LLC-MK₂ aderentes foram lavadas com PBS e incubadas com meio RPMI 1640 sem metionina contendo 5% SFB por 30 min, a 37°C. Após este período, foram adicionados 50 µCi de ³⁵S-metionina/10⁶ células em meio RPMI 1640 sem metionina contendo 5% SFB e a mistura foi incubada por ~ 18 horas, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. As células foram então lavadas 5 vezes com PBS e utilizadas para coleta de meios condicionados, conforme descrito no item 3.13.

3.13. Coleta de meio condicionado por LLC-MK₂ tratada por 1 hora com DMSO ou 100 µM peptídeo J

Garrafas de cultura com 25 cm² (cerca de 1 x 10⁶ células/garrafa) contendo LLC-MK₂ semiconfluentes foram marcadas metabolicamente com ³⁵S-metionina, como descrito no item 3.12. As células foram lavadas 3 vezes com 5 mL de PBS, 1 vez com 5 mL de meio de incubação e, então, foi adicionado 1 mL de meio de incubação, contendo 100 µM de peptídeo J (J) ou J-Ala (JA), o equivalente em volume de DMSO (D) ou nenhuma adição (C) e incubado por 1 hora, a 37°C, em estufa de cultura. O meio de incubação, a depender do ensaio, pode ser DME+10%SFB, DME+2%SFB, PBS+1mM glicose.

Após a incubação, o meio de cultura, denominado meio condicionado, foi coletado e guardado para ensaios de imunoprecipitação (item 3.17).

3.14. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976) e albumina bovina sérica foi utilizada como padrão. Nos casos em que a amostra continha detergente, este também estava presente na curva padrão.

3.15. Biotinilação de proteínas de superfície celular

Células LLC-MK₂ aderentes foram previamente tratadas com reagente de interesse e lavadas com PBS pH 8 gelado e então incubadas com EZ-Link-Sulfo-NHS-biotina (Pierce), reagente impermeável à membrana plasmática, na concentração de 150 µg/mL PBS pH 8, por 30 min, a 4°C.

Após a incubação, as células foram extensivamente lavadas com PBS gelado e extraídas com tampão de lise (1% NP40, 1 mM PMSF, 1 mM TLCK e 1 µg/mL de aprotinina, 40 mM NaF, 1 mM vanadato de sódio, 1 mM EDTA e 50 mM Tris-Cl pH 8). A suspensão foi centrifugada a 20.800xg, por 15 min, e o sobrenadante utilizado para os ensaios.

3.16. Iodação de proteínas de membrana plasmática de LLC-MK₂

3.16.1. Método da cloramina T

Uma garrafa de 25 cm² de células LLC-MK₂ semiconfluentes foi lavada com PBS e submetida a tripsinização. Sequencialmente, as células foram incubadas com DME+10% SFB por 1 h, a 37°C, conforme descrito por Magdesian (Magdesian, 2000), lavadas por centrifugação com PBS, transferidas para tubos forrados com Iodogen (Sigma), conforme instruções do fabricante, e submetidas a tratamento com 265 µCi Na¹²⁵I, por 5 min, a 0°C.

3.16.2. Método da lactoperoxidase

Foi utilizado o método da lactoperoxidase, conforme descrito por Fernandes (Fernandes *et al.*, 1998). Em suma, uma garrafa de 25 cm² de células LLC-MK₂ aderentes e em semiconfluência foram lavadas com PBS gelado e incubadas por 10 min em temperatura ambiente com 125 µCi Na¹²⁵I, 2 µg/mL lactoperoxidase e 0,03% H₂O₂, em PBS.

Após iodação das proteínas de membrana plasmática, por quaisquer dos métodos descritos, as células foram extensivamente lavadas com PBS gelado, lisadas com tampão de lise com 1% NP40 (descrito no item 3.15) e o material solúvel foi imunoprecipitado com anticorpo anti-CKPAN, submetido a SDS-PAGE e autoradiografia.

3.17. Imunoprecipitação

O anticorpo monoclonal TROMA2, desenvolvido em rato contra CK18 de camundongo (Boller *et al.*, 1987), nos foi gentilmente doado pelo Dr. R. Kemler, Max-Planck Institut für Immunbiologie, Alemanha.

Os sobrenadantes de lisados de células LLC-MK₂ previamente tratadas e biotiniladas foram quantificados e quantidades equivalentes (tipicamente 1 mg de proteína total) foram incubados sob agitação, durante a noite, a 4°C, com proteína G-Sepharose (Amersham) previamente lavada e tratada com TROMA2.

Após a incubação, o material imunoprecipitado adsorvido foi lavado 3 vezes com solução de Kessler (100 mM Tris-Cl pH 8,6, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl), contendo 0,05% NP-40 e BSA 1 mg/mL, 3 vezes com solução de Kessler contendo 0,5% NP-40 e mais 3 vezes com solução de 50 mM Tris-Cl pH 8.

Alternativamente, anticorpos anti CKPAN (C2562), mistura de monoclonais contra diversas CKs (incluindo CK8 e CK18), monoclonal anti CK8 clone M20, monoclonal anti CK18 clone KS-B17.2 e monoclonal anti- α -tubulina (todos da Sigma) foram utilizados em diluição 1:250 e imunoprecipitados com *beads* de proteína A-Sepharose.

Nos casos onde foi realizado o *pre-cleaning*, os sobrenadantes (~ 1 mL) de lisados celulares foram incubados com 30 μ L de proteína A-Sepharose (Sigma), por 30 min, em temperatura ambiente e sob agitação, para remoção de proteínas que, eventualmente, se ligassem à proteína A ou às partículas de Sepharose. O material foi, então, centrifugado por 15 min, a 14.000 rpm, a 4°C. Os *beads* de Sepharose (material pré adsorvido) foram guardados para posterior lavagem e o sobrenadante foi incubado com anticorpo de interesse, sob agitação, durante a noite, a 4°C. Após, foram adicionados 30 μ L de proteína A-Sepharose, o que foi seguido por incubação de 2 horas, sob agitação, em temperatura ambiente.

Após a incubação as soluções foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 min a 4°C, e os *beads* contendo o material imunoprecipitado adsorvido, bem como o material pré adsorvido, foram lavados 3 vezes com solução de Kessler contendo 0,05% NP40 e 1 mg/mL BSA, 3 vezes com solução de Kessler contendo 0,5% NP40 e mais 3 vezes com solução de 50 mM Tris-Cl pH 8.

Os complexos foram dissociados por tratamento com tampão de amostra para SDS-PAGE e fervura por 15 min, fracionados por SDS-PAGE (item 3.18), transferidos para membranas de nitrocelulose, conforme descrito no item 3.19, ou o gel foi seco e submetido a autoradiografia, no caso de amostras provenientes de células marcadas com material radioativo.

3.18. SDS-PAGE

O fracionamento eletroforético das proteínas foi realizado como descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), em géis de 9% ou 12,5% de poliacrilamida, conforme indicado nas legendas das figuras.

3.19. Western blot

Após fracionamento protéico por SDS-PAGE, os géis foram submetidos a transferência para membrana de nitrocelulose em equipamento de transferência semi-seca Multiphor II *Electrophoresis System* (Amersham Pharmacia) por 1 hora sob corrente constante de 1 mA/cm² em solução contendo 150 mM glicina, 20% metanol, 0,04% SDS e 25 mM Tris-base pH 8,3.

Após a transferência das proteínas para a membrana, esta foi bloqueada por 1 hora em temperatura ambiente com solução TBS-TT (150 mM NaCl, 0,03% Triton X-100, 0,05% Tween-20 e 50 mM Tris-Cl pH 7,6) contendo 1% BSA, seguido por 18 h de incubação a 4°C com o anticorpo de interesse diluído em TBS-TT + 1% BSA.

A membrana foi lavada com TBS-TT durante 15 min, sob agitação, por 3 vezes, e então incubada por mais 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) conjugado a peroxidase (Sigma), diluído em TBS-TT + 1% BSA.

Após, a membrana foi lavada com TBS-TT durante 15 min sob agitação por 3 vezes, e finalmente submetida a tratamento com o kit ECL (Amersham), conforme instruções do fabricante, para revelação em filmes de raios-X (Kodak).

Alternativamente, material biotilado foi fracionado por SDS-PAGE, transferido para membranas de nitrocelulose, bloqueado como descrito acima, incubado com solução de estreptavidina conjugada a peroxidase (Sigma) por 1 hora em temperatura ambiente, lavado com TBS-TT durante 15 min sob agitação por 3 vezes, tratado com o kit ECL e revelado.

3.20. Pré-adsorção de peptídeo J a partículas de látex

5 µL de suspensão 10% de partículas de látex de 1,24 µm de diâmetro (Polysciences, Inc.), foram lavados 3 vezes com PBS por centrifugação a 10.000 rpm durante 15 min.

As partículas de látex (*beads*) foram incubadas a 37°C, sob agitação durante a noite, com 21 µL de solução contendo 10 µg peptídeo J/µL DMSO 100% (como controle foi realizada em paralelo incubação com 21 µL DMSO 100%, sem adição de peptídeo).

Após incubação, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm, por 15 min, o sobrenadante desprezado e os *beads* lavados com PBS.

Finalmente, as partículas tratadas com J (*J-bead*) ou com DMSO (*D-bead*) foram ressuspensas em DME+10%SFB e conservadas a 4°C.

3.21. Modificação covalente de *beads* carboxilados com peptídeos

Foi utilizada adaptação da metodologia descrita por Dersch & Isberg (Dersch & Isberg, 1999). Em resumo, 30 µL de suspensão 2% de *beads* carboxilados e fluorescentes, com cerca de 2,4 µm de diâmetro (Molecular Probes), foram lavados com 1 mL de PBS e com 1 mL de tampão de acoplamento (500 mM NaCl e 200 mM Na₂CO₃ pH 8,5) por centrifugação a 10.000 rpm, durante 15 min.

As partículas foram, então, incubadas em 1 mL de tampão de acoplamento, a 37°C, sob agitação durante a noite, com 210 µg de peptídeo J, 210 µg de peptídeo miniJ, 210 µg de peptídeo J-Ala ou volume equivalente (21 µL) de DMSO 100% (para preparo de BSA-*beads*).

As seqüências de aminoácidos dos peptídeos imobilizados nas partículas, bem como seus respectivos diâmetros e cores, estão listadas abaixo:

J – GKKPSVTVTNVFLYNRPLN: *bead* vermelho escuro com 2,3 µm de diâmetro;

miniJ – VTNVFLYNRPL: *bead* esverdeado com 2,47 µm de diâmetro;

J-Ala – VTNVFAYNRPL: *bead* azul profundo com 2,47 µm de diâmetro.

Após incubação, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm, por 15 min, e o sobrenadante desprezado. Os *beads* foram sonicados em tampão de acoplamento, incubados sob agitação por

1 hora, a 37°C, com 10 mg/mL BSA em tampão de acoplamento, lavados com PBS + 10 mg/mL BSA e estocados, a 4°C, em PBS + 2 mg/mL BSA.

Alternativamente, para obtenção de *beads* biotinilados para uso em análises por FACS (descrito no item 3.24), após a incubação de 30 µL de suspensão 10% de *beads* de poliestireno modificados por carboxilação (Sigma) com 210 µg de peptídeo J ou com 1 mg/mL de BSA e remoção do sobrenadante, as partículas, nesse caso, não fluorescentes e de 0,885 µm de diâmetro, foram tratadas, sob agitação durante 1 h a 37°C, com 3 mg/mL de BSA-biotinilada em tampão de acoplamento, o que foi seguido pelo sonicamento e lavagens descritos anteriormente.

3.22. Avaliação da interação entre células e *beads* covalentemente modificados

Células LLC-MK₂, CHO ou J774 foram subcultivadas em placas de 8 poços sobre lamínulas de vidro de 5,76 cm², até semiconfluência, tipicamente 48 horas a 37°C, em estufa umidificada, contendo 5% CO₂, foram utilizadas como substrato.

BSA-*beads*, J-*beads*, miniJ-*beads* e JAla-*beads* foram preparados conforme descrito anteriormente e adicionados em razão *beads*/célula conhecida, em meio DME (para LLC-MK₂) ou RPMI (para CHO ou J774) suplementado por 2% SFB, e incubados por 1 hora ou tempos variados, a 37°C.

Após as incubações, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS, as células foram fixadas por 1 hora, em temperatura ambiente, ou por 18 horas a 4°C com 4% paraformaldeído em PBS, lavadas com PBS e invertidas sobre lâminas contendo PBS:glicerol (1:1) suplementado com 2 µg/mL Hoechst, corante fluorescente para DNA.

Foram capturadas aleatoriamente várias imagens de fluorescência de cada lamínula, observadas em microscópio acoplado a uma câmara digital. Um total de, no mínimo, 100 células foi contado e o mesmo foi feito para os *beads* aderidos e/ou internalizados.

3.23. Avaliação de estrutura de peptídeo J por Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular no UV distante foram obtidos no Espectropolarímetro Jaco J-810 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron com cubetas de 1 cm de caminho óptico, em

20°C. O peptídeo foi ressuspensionado em água desionizada em pH 4. Os espectros foram adquiridos na faixa de comprimento de onda entre 180 e 260 nm, com velocidade de 1 nm/s, com tempo de resposta de 1 s e resolução de 0,5 nm/s. Cinco espectros foram coletados para obter uma média para cada aferição. Como branco foi utilizada a solução de solubilização.

3.24. Avaliação por FACS da interação entre células e *beads* modificados

Garrafas de 75 cm² contendo células LLC-MK₂ em semiconfluência foram lavadas com PBS e com DME+2%SFB e incubadas por 1 h, a 4°C ou 37°C, com cerca de 10 BSA-*beads* ou J-*beads*/célula (obtidos como descrito no item 3.21) em DME+2%SFB e lavadas por 5 vezes com PBS e agitação ocasional.

Após isso, parte das células foi incubada durante mais 24 h com DME+10%SFB (*chase*) e outra parte foi submetida a incubação por 30 min, a 4°C, com avidina-AlexaFluor 488 – preparada por modificação de 1 mg de avidina (Pierce) com kit de marcação de proteínas AlexaFluor488 *Protein Labeling* (Molecular Probes) – diluída 1:100 em PBS+1%BSA, 2 lavagens com PBS gelado e, sequencialmente, ao tratamento com solução de Dvorak (1% Triton X-100, ácido cítrico pH 4,2) (conforme descrito por Dvorak *et al.*, 1982), a 4°C, sob agitação, durante 48 h. Esse tratamento propiciou a liberação para a solução dos núcleos íntegros e das partículas covalentemente modificadas internalizadas ou aderidas à superfície celular (opacas ou fluorescentes, respectivamente), conforme verificado por observação em microscópio. As células submetidas ao *chase* de 24 h, após esse período adicional de incubação, foram tratadas da mesma forma com avidina-AlexaFluor488 e todas foram conservadas a 4°C, no escuro, até aferição.

A análise por FACS foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BS *Immunocytometry Systems*), com *laser* de íons de argônio ajustado para 488 nm com 50 mW de potência para excitar AlexaFluor488 (Molecular Probes). Emissão de fluorescência foi coletada através de um filtro dicróico *short pass* de 550 nm e um filtro passa-banda de 525 nm. Para cada 1 mL de amostra, dados de 100.000 eventos foram adquiridos. Os sinais foram logarítmicos exceto para *forward angle light scatter* (FALS) e os dados foram transferidos para um computador e analisados usando *software* CellQuest (BD *Immunocytometry Systems*). Os *dot plots* foram construídos com base nos valores de “90° light scatter” (90LS) como medida de forma e granularidade e de FALS como medida de tamanho, plotados nos eixos y e x, respectivamente.

Populações isoladas (janelas) de núcleos e/ou *beads* foram analisadas para fluorescência verde (emissão em 488 nm) como histograma de parâmetro único.

3.25. Obtenção de matriz extracelular de LLC-MK₂

Células LLC-MK₂ foram subcultivadas em placas de 8 poços sobre lamínulas de vidro de 5,76 cm², até total confluência, tipicamente por 1 semana, a 37°C, em estufa umidificada, contendo 5% CO₂. As células foram lavadas 5 vezes com PBS e incubadas com tampão de isolamento de matriz (10 mM EDTA, 25 mM NH₄OH pH 10), durante 3 dias, a 4°C, com agitação esporádica. Após esse período, as lamínulas foram exaustivamente lavadas com PBS e observadas em microscópio, para garantir a ausência de núcleos celulares, e usadas nos ensaios.

3.26. Produção de anticorpos

A produção de anticorpos monoclonais contra peptídeo PD foi realizada de acordo com Alves (Alves *et al.*, 1986). Anticorpo policlonal anti-J foi obtido após sangria e extração de soro de camundongos previamente submetidos a 4 inóculos semanais de cerca 10 µg de peptídeo J covalentemente acoplado a BSA (de acordo com método descrito por Reichlin em 1980).

3.27. Ensaio para a detecção de anticorpo

Tripomastigotas de *T. cruzi* foram lavados com meio DME+2%SFB fresco, ressuspensos nesse meio para concentração de 0,5 x 10⁸ parasitas/mL e tratados com 1 µg/mL de tunicamicina (Sigma) por 6 horas, a 37°C, conforme descrito (Zingales *et al.*, 1985). Como controle, foi realizado um teste em paralelo no qual os tripomastigotas foram tratados somente com volume equivalente do solvente da droga (0,3 µL DMSO/mL). Após a incubação, os parasitas foram lavados por centrifugação com PBS gelado e fixados com 2% paraformaldeído, por 30 min, a 4°C, e novamente lavados com PBS gelado. Os tripomastigotas foram bloqueados por 30 min com PBS+1%BSA a 37°C, sequencialmente, incubados com anticorpo anti-J diluído (1:20) em PBS+1%BSA ou, no caso do teste com parasitas permeabilizados, em PBS+1%BSA mais 0,05% Triton X-100. Os parasitas foram, então, lavados com PBS e tratados com anti-IgG de camundongo acoplada a FITC por 30 min a 37°C, novamente lavados e ressuspensos em PBS+glicerol (1:1) pH 8,5 suplementado por 4

µg/mL do corante de DNA *Nuclear Yellow* (Molecular Probes). Alíquotas de 20 µL de cada suspensão foram adicionadas a poços de placa de ELISA para fluorescência e a fluorescência devida ao FITC foi avaliada em filtro 485nm/528nm (absorção/emissão) e a devida ao *Nuclear Yellow*, em filtro 360nm/428nm. Os valores de fluorescência devidos à ligação do anticorpo (FITC) foram normalizados em função da quantidade de DNA (*Nuclear Yellow*), gerando os dados de unidade arbitrária apresentados (U.A.).

3.28. Síntese de peptídeos

Peptídeos foram sintetizados pelo grupo dos Drs. Maria Aparecida Juliano e Luiz Juliano, na UNIFESP. A síntese foi realizada num sintetizador de mesa automático de fase sólida, pelo método Fmoc, conforme descrito por Magdesian (Magdesian *et al.*, 2001).

4. Resultados e Discussão

4.1. A porção amino-terminal de CK18 contém o sítio de ligação de “domínio FLY”.

4.1.1. Peptídeo J, contendo o “domínio FLY”, liga-se a CK18 de maneira independente de carboidrato

Apesar de haver dados que sugerem a presença de citoqueratinas, componentes do filamento intermediário de epitélios simples, na superfície de alguns tipos celulares (Hembrough *et al.*, 1995 e 1996, Hasan *et al.*, 1998, Sajjan *et al.*, 2000, Tamura *et al.*, 2000), ainda não se sabe como essa molécula está apresentada na superfície.

Entretanto, nosso laboratório relatou, recentemente, a interação direta entre CK18 de células LLC-MK₂, possivelmente apresentada na face externa da membrana plasmática, e peptídeo J, fragmento da proteína Tc85-11, que contém o “domínio FLY” (Magdesian *et al.*, 2001), sequência conservada nos membros da superfamília das gp85/*trans*-sialidases e ainda sem função estabelecida (Frasch, 2000).

Dando início a nosso estudo da função do “domínio FLY” nas *trans*-sialidases, e a fim de melhor caracterizar a interação entre *Trypanosoma cruzi* e CK18 da célula hospedeira, almejamos a identificação do sítio dessa proteína responsável pela ligação ao peptídeo J.

Sabe-se que citoqueratinas, incluindo CK18, podem sofrer algumas modificações pós-traducionais como fosforilação e glicosilação, principalmente, em sítios localizados em seus domínios globulares amino- e carboxi-terminais (Coulombe & Omary, 2002). Assim, uma possibilidade para a ligação do “domínio FLY” em CK18 é que essa ocorresse via resíduo de N-acetil-glicosamina, uma vez que essa proteína é O-glicosilada, possivelmente em múltiplos sítios, exclusivamente por resíduos desse açúcar (Chou *et al.*, 1992).

Para resolver essa questão, empregamos a técnica de cromatografia de afinidade com peptídeo J imobilizado, via uma cisteína amino-terminal adicional, em resina UltraLink Iodoacetil (J-matriz) e incubamos durante a noite, a 4°C, a fração solúvel em 1% NP-40 de extrato de células LLC-MK₂ com suas proteínas de membrana plasmática previamente biotiniladas.

A resina J-matriz foi lavada com PBS acrescido de 500 mM NaCl, 1 M NaCl e 4 M uréia e foi dividida em dois tubos. Em um deles, o material aderido foi eluído com 8 M uréia, como controle positivo, já que é nessas condições técnicas que CK18 é eluída (*cf.* Magdesian *et al.*, 2001). No outro tubo, o material aderido foi tratado com soluções de 200 mM e 500 mM de N-acetil-glicosamina e, em seguida, com solução de 8 M uréia.

Verificamos, com esse procedimento, que as soluções de N-acetil-glicosamina foram ineficazes na eluição de proteínas aderidas em J-matriz, que só foi obtida após tratamento seqüencial com solução de 8 M uréia (**Figura 1**). Esses resultados indicam que o peptídeo J, representante do “domínio FLY”, não se liga a proteínas de membrana plasmática de LLC-MK₂ nem a CK18 via resíduos de N-acetil-glicosamina.

Da mesma forma, solução contendo 50 mM ATP não foi eficaz na eluição de qualquer material protéico aderido à J-matriz, sugerindo a não participação de aminoácidos fosforilados na interação entre “domínio FLY” e proteínas de células epiteliais, incluindo CK18 (resultado não mostrado).

Figura 1 – Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ biotiniladas obtidas por cromatografia de afinidade em J-matriz. Proteínas de membrana de LLC-MK₂ foram biotiniladas e incubadas com J-matriz. A resina foi lavada com 1 M de NaCl (1) e 4 M de uréia (2) e dividida em dois tubos. No primeiro, o material foi eluído com 8 M de uréia (3) e no segundo, o material foi eluído com 0,2 M e 0,5 M de N-acetil-glicosamina (4 e 5, respectivamente) e, seqüencialmente, com 8M de uréia (6). Alíquotas das lavagens e os eluatos foram fracionados por SDS-PAGE 9%, transferidos para nitrocelulose e desenvolvidos com estreptavidina-peroxidase, como descrito em Materiais e Métodos. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Ao analisarmos o material que é eluído de J-matriz com solução 8 M uréia, após incubação com extrato de células LLC-MK₂, verificamos a presença de outras proteínas, além daquela com ~ 50 kDa, correspondente a CK18 (**Figura 1**). Uma vez que os filamentos de queratina,

componentes do filamento intermediário de células epiteliais, são heteropolímeros obrigatórios, cujos monômeros são compostos por polipeptídeos do tipo I, do qual CK18 faz parte (queratinas ácidas, de 40-57 kDa), e do tipo II (queratinas básicas, de 53-67 kDa) (Fuchs & Weber, 1994) e já que, em células de epitélios simples, CK18 associa-se à CK8 para a formação dos heteropolímeros constituintes do filamento intermediário (Moll *et al.*, 1982), avaliamos a possibilidade de CK8 estar envolvida no processo de interação entre CK18 e “domínio FLY”.

Por essa razão, biotinilamos a superfície das células e, após incubação com J-matriz e lavagens descritas em Materiais e Métodos, testamos a capacidade de CK18 e CK8 recombinantes comerciais (RDI), eluírem o material aderido à J-matriz (**Figura 2**).

Observamos que, apesar de CK8 ser capaz de eluir algum material protéico da coluna, essa eluição é extremamente mais eficiente quando se utiliza CK18 (**Figura 2**, canaletas CK8 e CK18, respectivamente). Em ambos os casos, a eluição não foi completa, já que mais proteína é eluída quando a coluna é tratada sequencialmente com solução 8M de uréia.

Figura 2 – CK8 não é capaz de eluir o receptor de J da coluna de afinidade. Proteínas de membrana de LLC-MK₂ foram biotiniladas e incubadas com J-matriz. A resina foi lavada com 1 M de NaCl e 4 M de uréia e dividida em dois tubos. Separadamente, o material de cada tubo foi eluído com 10 µg de CK8 comercial (CK8) ou 10 µg de CK18 comercial (CK18) e, sequencialmente, com 8 M de uréia (uréia). Os eluatos foram fracionados por SDS-PAGE 9%, transferidos para nitrocelulose e desenvolvidos com estreptavidina-peroxidase, como descrito em Materiais e Métodos. A seta indica a região de migração da CK18.

4.1.2. Clonagem dos fragmentos amino e carboxi-terminais de CK18

Com a finalidade de se determinar a região de ligação do “domínio FLY” em CK18, elegemos a clonagem, expressão e purificação de fragmentos dessa proteína para empregarmos como ferramentas na realização dos testes de adesão.

O vetor de expressão pET-21a (Invitrogen), que nos propiciou a adição de cauda de histidina à extremidade carboxi-terminal das proteínas recombinantes, foi escolhido para a clonagem dos fragmentos de CK18 e, uma vez que nos foi doado um plasmídeo com o cDNA completo de CK18 de humano, denominado LK442-K18 (Kulesh *et al.*, 1989), optamos por amplificar por PCR fragmentos de suas porções amino- e carboxi-terminais a partir desse molde.

No caso da região amino-terminal, o fragmento de DNA amplificado (406 pb) codificava para os 144 primeiros aminoácidos da proteína. Para a porção carboxi-terminal, o fragmento (com 600 pb) codificava para os últimos 201 aminoácidos de CK18. Amplificamos, ainda, o fragmento de DNA correspondente a CK18 completa (1300 pb).

Depois de estabelecidas as condições ideais para a amplificação por PCR dos fragmentos de interesse, obtivemos produtos com os pesos moleculares esperados (**Figura 3**) e os purificamos a partir dos géis de agarose.

Figura 3 – Amplificação de fragmentos de CK18 com sítios de restrição NdeI e XhoI, a partir de cDNA (plasmídeo LK442-K18). Produtos de PCR com cerca de 400 pb (NT), 600 pb (CT) ou 1300 pb (CK18), correspondentes às porções amino e carboxi-terminais e à CK18 completa, respectivamente, foram fracionados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídeo. À esquerda, padrão de peso molecular, em pares de base.

Clonamos, então, esses fragmentos no vetor para seqüenciamento pGEM-T Easy (Promega) e transformamos bactéria *E. coli* (DH5 α) competente com esse material. Extraímos o DNA plasmidial e o submetemos a tratamento com as enzimas de restrição NdeI e XhoI. Seqüenciamos os clones que apresentaram fragmentos de restrição com tamanhos correspondentes aos insertos e

todos apresentaram seqüências com alto grau de identidade com os fragmentos correspondentes de CK18 humana.

Selecionamos um clone de cada transformação e sub-clonamos o inserto purificado no vetor de expressão, pET-21a. Após transformação de *E.coli* (DH5 α) competente com os produtos das ligações no vetor, escolhemos um sub-clone de cada transformação e purificamos os plasmídeos, denominados 400.1pET21a, 600.5pET21a e 1300.4pET21a, correspondentes aos fragmentos amino- e carboxi-terminais e à CK18 completa, respectivamente.

Transformamos bactérias *E. coli* (BL21) competentes de cepas variadas para avaliação da expressão das proteínas recombinantes em cada uma delas e escolhemos a cepa BL21 Codon Plus-RIL para emprego em nosso estudo por promover expressão das três proteínas recombinantes em níveis apreciáveis (**Figura 4**).

Figura 4 – Indução da expressão de CK18 e fragmentos amino- (NTCK18) e carboxi-terminais (CTCK18) em *E. coli*, cepa BL21-Codon Plus-RIL. A síntese de proteínas foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG, a 37°C. Alíquotas da cultura foram removidas e fracionadas por SDS-PAGE 12,5% acrilamida. NI, extrato de bactérias com síntese de proteínas não induzida e 1h e 2h, extrato de bactérias com síntese de proteínas induzida por 1 ou 2 horas, respectivamente. Asteriscos indicam as proteínas de fusão de interesse. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Após determinação da cepa mais adequada à expressão das proteínas de fusão, realizamos um cultivo em larga escala das bactérias transformadas, visando à purificação das proteínas recombinantes. Previamente, verificamos que as três proteínas de fusão encontravam-se no corpo de inclusão.

Após indução da síntese protéica por 3 h com 1 mM IPTG, centrifugamos a suspensão de bactérias, tratamos as células com solução de lise (Materiais e Métodos) e o corpo de inclusão solubilizado foi purificado em coluna de afinidade a íons de níquel. Obtivemos, assim, proteínas de 16 kDa (144 aminoácidos iniciais de CK18), 29 kDa (201 aminoácidos finais de CK18) e 45 kDa (correspondente à CK18 completa) (**Figura 4**). O padrão de purificação obtido para cada uma das três proteínas de fusão está ilustrado na **Figura 5**.

Figura 5 – Purificação de CK18 e seus fragmentos amino- (NTCK18) e carboxi-terminais (CTCK18) por coluna de afinidade a Ni^{2+} . Corpos de inclusão contendo as proteínas de interesse foram solubilizados em solução 8 M de uréia (tampão de lise) e purificados em coluna de níquel, conforme descrito em Materiais e Métodos. FT, *flow through*; L1, lavagem com tampão de lise; L2, lavagem com 40 mM imidazol e fx, frações eluídas com 1 M imidazol. Na purificação de CK18, frações do pico protéico foram analisadas por SDS-PAGE 9% e, para NTCK18 e CTCK18, por SDS-PAGE 12,5%. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Caracterizamos alíquotas das proteínas purificadas frente à reatividade com anticorpos contra cauda de histidina (anti-HisTag) e contra mistura de citoqueratinas (anti-CKPAN) e, como esperado, as três proteínas de fusão reagiram positivamente com ambos (**Figura 6**).

Figura 6 – Caracterização de CK18 e de seus fragmentos amino-(NTCK18) e carboxi-terminais (CTCK18) frente à reatividade com anticorpos. As proteínas de fusão, CK18 e seus fragmentos amino-(NT) e carboxi-(CT) terminais, foram purificadas, fracionadas por SDS-PAGE 12,5%, transferidas para membranas de nitrocelulose, desenvolvidas com anti-HisTag, em diluição 1:4000 (Painel Anti-HisTag) e anti-CK PAN, diluído 1:1000 (Painel Anti-CK PAN) e reveladas por quimioluminescência, conforme descrito em Materiais e Métodos. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

A menor reatividade com anti-HisTag observada para CTCK18 (**Figura 6**, Painel Anti-HisTag) é provavelmente devida a diferenças no padrão de transferência desta proteína para a membrana de nitrocelulose, já que testes realizados por *dot blot*, onde a mesma concentração de cada uma das proteínas foi imobilizada, mostraram padrão de reatividade comum às três proteínas com esse anticorpo (resultado não mostrado).

4.1.3. Mapeamento do sítio de ligação de “domínio FLY” em CK18

De posse das proteínas recombinantes CK18 e seus fragmentos amino- (NTCK18) e carboxi- (CTCK18) terminais, iniciamos testes visando a caracterização do sítio de ligação do “domínio FLY”, aqui representado por peptídeo J, à proteína. Para tanto, imobilizamos J ou seu mini-análogo sem efeito biológico (Magdesian *et al.*, 2001), J-Ala, utilizado como controle negativo, em membranas de nitrocelulose e os submetemos a incubações com soluções contendo as proteínas de fusão derivadas de CK18. Realizamos a detecção da interação entre proteínas e peptídeos por quimioluminescência, após reação com anti-HisTag e anticorpo secundário acoplado à peroxidase. Como controle positivo, avaliamos também a ligação de CK18 completa aos

peptídeos. Como esperado, verificamos interação de CK18 somente com peptídeo J, de maneira dose-dependente (**Figura 7**, Painel CK18).

Com relação aos fragmentos de CK18, observamos interação dose-dependente somente entre a porção amino-terminal e peptídeo J (**Figura 7**, Painel NTCK18), dado que foi reproduzido em vários ensaios realizados.

Figura 7 – Ligação de fragmentos de CK18 a peptídeo J ou J-Ala. Alíquotas de 0,5 a 1,5 nmol de peptídeo J ou J-Ala (JA) foram imobilizadas em membranas de nitrocelulose. Soluções de CTCK18, NTCK18 ou CK18 foram incubadas com as membranas e a detecção das proteínas ligadas ao peptídeo foi feita por reação com anti-His Tag 1:4000, conforme descrito em Materiais e Métodos. CK18 foi utilizada como controle positivo e peptídeo J-Ala, como controle negativo.

Os dados apresentados sugerem, então, a porção amino-terminal de CK18, em quaisquer dos 144 aminoácidos iniciais da proteína, como sendo o sítio de ligação do “domínio FLY”.

Paralelamente, nosso laboratório selecionou um peptídeo ligante de J (peptídeo PD, com sequência SRYPLFQLGV) através da técnica de varredura de uma biblioteca de *phage display* (dados não publicados).

A análise da sequência de aminoácidos da molécula em ambos os sentidos utilizando a ferramenta BLAST 2.2.13 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, Altschul *et al.*, 1990) não revelou consenso quanto à identidade do peptídeo. No entanto, um anticorpo monoclonal desenvolvido contra a molécula em questão, denominado 4A5-5, foi capaz de imunoprecipitar uma única proteína de extrato total de LLC-MK₂, com massa molecular idêntica à da CK18 presente nessas células epiteliais (dados não publicados).

Por essa razão, testamos por imunoprecipitação a reatividade de 4A5-5 frente às proteínas recombinantes derivadas de CK18 e confirmamos a interação entre o anticorpo e CK18, assim

como entre o monoclonal em questão e a porção amino-terminal de CK18 (**Figura 8**), sugerindo que o peptídeo PD, contra o qual se produziu o anticorpo, mimetize a região amino-terminal de CK18 ligante de J.

Figura 8 – Anticorpo monoclonal contra peptídeo PD (4A5-5) imunoprecipita CK18 e sua porção amino-terminal. Alíquotas das proteínas recombinantes CK18 (1) e suas porções amino- (2) e carboxi- (3) terminais foram incubadas com 4A5-5, conforme descrito em Materiais e Métodos. Proteína A-Sepharose foi utilizada para isolar os imuno-complexos e, após lavagens, o material foi fracionado por SDS-PAGE 12,5% e o gel corado com Coomassie Blue (Painel 4A5-5). Um tubo sem proteínas recombinantes foi analisado como controle negativo (4). Em paralelo, a mesma quantidade de proteínas foi fracionada por SDS-PAGE 12,5% e corada com Coomassie Blue (Painel controle). À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Uma análise comparativa pontual entre a seqüência de aminoácidos do peptídeo PD e a porção amino-terminal de CK18, por meio de alinhamento das duas seqüências utilizando o programa ClustalW 1.82 (www.ebi.ac.uk/clustalw; Chenna *et al.*, 2003), revelou no extremo inicial da proteína, alguns aminoácidos similares, seguidos por um *gap* e por outros 3 aminoácidos idênticos (**Figura 9**). Uma vez que as extremidades amino- e carboxi-terminais de citoqueratinas apresentam estrutura globular, é possível que peptídeo PD mimetize uma seqüência de aminoácidos acessíveis de CK18 pós-enovelamento, que poderiam representar o epítopo do anticorpo e/ou o sítio de interação entre CK18 e “domínio FLY”, via J.

Conforme esperado para um agente que interfere no complexo CK18-“domínio FLY”, já descrito como importante no processo invasivo (Magdesian *et al.*, 2001), verificamos que a presença de 100 μ M de peptídeo PD, bem como de 4A5-5, anticorpo monoclonal contra sua sequência, inibem a infecção por tripomastigotas em cerca de 25% e 15%, respectivamente (**Figura 10**).

A adição de 100 μ M de peptídeo J, de acordo com dados anteriores (Magdesian *et al.*, 2001), causou significativo estímulo da infecção e, reforçando a idéia de que tanto J quando PD atuam no mesmo complexo receptor-ligante, a adição de anticorpo contra peptídeo PD inibe o efeito potencializador da infecção que J apresenta (**Figura 10** – comparar pontos J, 4A5-5 e 4A5-5+J).

Assim, a caracterização da porção amino-terminal de CK18 como ligante de peptídeo J, juntamente com o fato desta proteína ter sido identificada como receptor de J em superfície celular (Magdesian *et al.*, 2001), sugere a presença dessa região protéica apresentada à superfície da célula, viabilizando a interação com do “domínio FLY”, via peptídeo J e, por extensão, com Tc85 apresentada por tripomastigotas.

Adicionalmente, a identificação de peptídeo PD, molécula selecionada em meio a uma biblioteca de *phage display* como interatora com J, como sendo análoga da porção amino-terminal de CK18, permitiu a localização do provável sítio de ligação de J à proteína, o que determinamos pelo alinhamento entre as seqüências de aminoácidos de PD e NTCK18 e identificação de região com identidade de aminoácidos.

4.2. “Domínio FLY” como motivo adesivo de Tc85

4.2.1. “Domínio FLY” adere em superfície de células de cultura

Paralelamente ao mapeamento do sítio de ligação de CK18 ao peptídeo J, e visando caracterizar a função do “domínio FLY”, procuramos identificar seus efeitos em células de cultura, os quais pudessem ser responsáveis pelo aumento da infecção celular por tripomastigotas observado quando na presença de J (Magdesian *et al.*, 2001).

Ensaio iniciais com células tratadas com 100 μ M de peptídeo J, avaliando a possível entrada de reagentes impermeáveis, como iodeto de propídeo e homodímero de etídeo-2 (Molecular

Probes), demonstraram que o aumento da infecção não era devido à presença de poros ou aumento de permeabilidade da membrana plasmática induzidos pelo tratamento com J (resultados não mostrados).

Dessa forma, uma possível explicação para o estímulo da invasão por *T. cruzi*, seria que o tratamento das células epiteliais com o peptídeo fosse capaz de ativar alguma via de sinalização intracelular relacionada ao aumento da capacidade de endocitose mediada, ou não, por receptor.

Por essa razão, investigamos a possibilidade de “domínio FLY” promover alterações em vias de endocitose de células epiteliais e, para tanto, valemo-nos do emprego de partículas inertes adicionadas ao meio de cultura, recobertas com 100 μ M de peptídeo J (**Figura 11**).

Em testes preliminares, observamos um significativo aumento no número de partículas (*beads*) associadas às células, quando houve pré-tratamento dos *beads* com peptídeo J. Tal comportamento não foi reproduzido quando as partículas são adicionadas ao meio de cultura na presença do peptídeo em solução (**Figura 11**).

Figura 11 – Efeito de peptídeo J na interação entre partículas inertes e células epiteliais. *Beads* de látex de 1,24 μ m de diâmetro foram incubados com monocamadas de LLC-MK₂ à razão de 10 *beads*/célula em DME+10%SFB (C) contendo 2% DMSO (D) ou 100 μ M J (J) por 1 hora a 37°C. Alternativamente, *beads* foram pré-tratados com DME+10%SFB (C-bead), contendo 2% DMSO (D-bead) ou 100 μ M J (J-bead), como descrito em Materiais e Métodos, e incubados com as células da mesma forma. Após lavagens, as células foram fixadas, fotografadas e o número de *beads* por célula determinado por contagem manual.

Realizamos, então, o estudo temporal do efeito de peptídeo J adsorvido aos *beads* (J-*beads*) na interação com células epiteliais. Enquanto os *beads* controle não apresentam interação considerável em nenhum dos períodos de tempo avaliados, verificamos aumento no número de J-*beads* associados às células em função do tempo, que atingiu o ponto máximo em 45 minutos e, a partir de 1 hora, diminuiu substancialmente (**Figura 12**).

Figura 12 – Curva temporal de efeito de peptídeo J na interação entre partículas inertes e células epiteliais. *Beads* de látex de 1,24 μm de diâmetro foram pré incubados com 2% DMSO (triângulo vermelho) ou 100 μM J (círculos verdes), como descrito em Materiais e Métodos, e incubados com monocamadas de LLC-MK₂ à razão de 50 *beads*/célula em DME+10%SFB, por períodos de tempo indicados, a 37°C. Após lavagens, as células foram fixadas, fotografadas e o número de *beads* por célula determinado por contagem manual.

Em seu estudo de receptores de EGF, Wong sugeriu que o decréscimo na associação entre EGF e células, observado em curva temporal e, como em nosso sistema, após atingir um *plateau*, poderia ser a inibição da internalização do receptor envolvido no processo ou a uma aceleração do reciclamento do mesmo (Wong *et al.*, 2002).

Já que CK18 foi descrita como receptor de J (Magdesian *et al.*, 2001) e há relato de citoqueratinas modificadas presentes na superfície de carcinomas que possivelmente ciclam entre a superfície e compartimentos endocíticos (Ditzel *et al.*, 1997), realizamos testes visando determinar se J induziria um processo similar. Para isso, pré-incubamos células com J-*beads* ou D-*beads*, controle negativo, por tempos variados a 37°C, e sequencialmente com anticorpo contra CK18, por 2 horas a 4°C ou 37°C, condição para promover eventual adesão à superfície sem ou com

subseqüente internalização, respectivamente. Após lavagens, as células foram fixadas e avaliamos a distribuição do imunocomplexo na célula por imunofluorescência. A partir dessa série experimental, pudemos concluir que, ao menos nos períodos de tempo analisados, (0, 60, 90 e 120 min), não há alteração no perfil de distribuição de CK18, em células tratadas com *J-beads* com relação ao controle (resultado não mostrado), o que sugere o não envolvimento do reciclamento de receptor de J, no que diz respeito à CK18. Novamente, no entanto, observamos decréscimo no número de *J-beads* associados às células, em períodos superiores a 1 hora de tratamento, da ordem de grandeza de 50% (resultados não mostrados).

Para tentar identificar o mecanismo de ação de peptídeo J na promoção de interação de partículas inertes e células epiteliais, foram testadas algumas drogas que atuam em vias envolvidas em endocitose e/ou processos relacionados à invasão por *T. cruzi* (**Tabela 1**).

A adição de quelante de íons Ca^{2+} , BAPTA-AM, permeável à membrana plasmática, inibiu de maneira dose-dependente, a associação de *beads* pré-incubados com J às células (**Tabela 1** – *J-beads*, BAPTA). Íons de cálcio são essenciais aos processos de endocitose por promoverem, atuando em proteínas do citoesqueleto, a migração de vesículas endossomais à superfície celular (Rodriguez *et al.*, 1999) e a diminuição da concentração intracelular de cálcio, com o emprego do quelante, pode ter interferido nesse processo, o que justificaria a inibição da associação entre *J-beads* e as células, sob essas condições.

Condição	D-beads (%)	J-beads (%)
Controle	9 ± 5	100 ± 10
BAPTA 1:2000	13 ± 3	81 ± 14
BAPTA 1:1000	15 ± 6	65 ± 26
BAPTA 1:500	12 ± 2	58 ± 12
Genisteína	16 ± 5	52 ± 7
Ácido okadáico	16 ± 5	41 ± 10
Vanadato	12 ± 9	73 ± 15

Tabela 1 – Efeitos de drogas na interação de partículas inertes e células epiteliais. *Beads* de látex de 1,24 μm de diâmetro foram pré tratados com 2% DMSO (*D-beads*) ou 100 μM J (*J-beads*) e incubados por 1 h a 37°C à razão de 5 *beads* por célula LLC-MK₂ pré-incubada por 30 min com diferentes reagentes em DME+10%SFB. As drogas utilizadas foram BAPTA-AM, 250 μM genisteína, 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ácido okadáico e 1 mM vanadato de sódio. Após lavagens, as células foram fixadas, fotografadas e o número de *beads* por célula determinado por contagem manual. 100% = 1,5 *beads*/célula, obtido da média das determinações do controle.

Genisteína, inibidor de tirosina quinase, e ácido okadáico, inibidor de serina/treonina fosfatase, inibem cerca de 50% e 60%, respectivamente, a associação de *J-beads* com as células (**Tabela 1**). O tratamento com vanadato de sódio, inibidor de tirosina fosfatase, não resultou em inibição significativa da interação, indicando a não participação dessa proteína no mecanismo de ação de J. Nenhuma das condições estudadas afetou de forma significativa a numericamente desprezível interação de *beads* pré-incubados com DMSO (**Tabela 1**, *D-beads*), utilizados nos ensaios como controle negativo.

Durante a realização desses experimentos iniciais, adquirimos partículas fluorescentes (de diferentes cores) com a superfície carboxilada, específicas para modificação covalente por peptídeos ou proteínas com grupamentos amina livres. Decidimos acoplar covalentemente peptídeos aos *beads* coloridos, seguindo procedimento descrito por Dersch & Isberg (1999), para facilitar a visualização e contagem das partículas.

Como J-Ala é um peptídeo análogo derivado de J sem o efeito biológico de promotor de adesão celular (Magdesian *et al.*, 2001), realizamos testes que o utilizavam como controle negativo em nossos ensaios de interação entre os *beads* e células epiteliais. A **Figura 13** mostra uma comparação entre as capacidades de ligação dos diferentes controles (DMSO-*beads* e JAla-*beads*) com relação aos *beads* modificados com J: como esperado, JAla-*beads*, assim como DMSO-*beads*, apresentam interação numericamente desprezível com células LLC-MK₂, em relação aos *J-beads*.

Figura 13 – Efeito dos peptídeos J e J-Ala e de DMSO na interação de partículas inertes com monocamadas de LLC-MK₂. *Beads* de látex (Polysciences Inc.) de 1,24 µm (DMSO) ou *beads* fluorescentes carboxilados (Molecular Probes) de 2,4 µm (J-Ala) de diâmetro foram pré-incubados com 2% DMSO ou covalentemente modificados com J-Ala, respectivamente (conforme Materiais e Métodos), e incubados com monocamadas de LLC-MK₂ à razão de 50 *beads*/célula em DME+2% SFB por 1 h a 37°C. Após lavagens, as células foram fixadas e os núcleos corados com Hoechst. Foram capturadas imagens de fluorescência e o número de *beads* por célula foi determinado por contagem manual. A barra J representa a média de aferições de *beads* de látex de 1,24 µm ou *beads* fluorescentes carboxilados de 2,4 µm de diâmetro pré-incubados com 100 µM de J ou covalentemente modificados com J, respectivamente, e 100% representa 17,4 *J-beads*/célula.

J-Ala, apesar de não promover adesão de células epiteliais (Magdesian *et al.*, 2001), é um mini-peptídeo derivado de J (Materiais e Métodos). Dentre os 8 aminoácidos presentes em J e não componentes de J-Ala, há dois (duas lisinas) com grupamentos amina livres nas cadeias laterais, o que gera duas importantes diferenças entre os peptídeos: J apresenta duas cargas positivas e dois potenciais sítios de ligação aos *beads* carboxilados a mais que J-Ala.

Figura 14 – Padrão de interação entre J-beads e JAla-beads com células epiteliais não difere em função de diferença de cargas ou de acoplamento dos peptídeos às partículas. *Beads* fluorescentes carboxilados foram covalentemente modificados com peptídeos J-Ala, miniJ ou J (conforme Materiais e Métodos), e incubados com monocamadas de LLC-MK₂ à razão de 50 *beads*/célula em DME+2%SFB por 1 h a 37°C. Após lavagens, as células foram fixadas e os núcleos corados com Hoechst. Foram capturadas imagens de fluorescência e o número de *beads* por célula foi determinado por contagem manual. **a.** Padrão de distribuição de *beads* covalentemente modificados em células epiteliais; **b.** Análise global de *beads*/célula, após contagem manual de células (núcleos azuis corados com Hoechst) e dos *beads* (partículas pequenas azuis – J-Ala, esverdeadas – miniJ, ou vermelhas – J) e **c.** Ampliação de algumas células de **a**, destacando perfil predominantemente pericelular de distribuição dos miniJ- e J-beads.

Por essa razão, para descartar a possibilidade que a diferença de interação entre *J-beads* ou *JAla-beads* e as monocamadas celulares se desse devido à diferença de cargas ou de acoplamento dos peptídeos nas partículas, testamos o peptídeo miniJ (**Figura 14**), com o mesmo número de aminoácidos que J-Ala, porém com a importante substituição L(leucina)→A(alanina), essencial para a diferença de comportamento dos peptídeos frente à promoção, ou não, de adesão celular (Magdesian, 2000).

Assim, realizamos o acoplamento covalente de miniJ aos *beads* (*miniJ-beads*), da mesma forma que fizemos com J-Ala e J, e os incubamos com monocamadas de células LLC-MK₂. Após contagem do total de *beads*/célula para cada peptídeo testado, verificamos que *miniJ-beads* interagem com as células tanto quanto *J-beads*, apresentando inclusive o mesmo perfil de distribuição predominantemente pericelular, ao passo que *JAla-beads* apresentam interação numericamente desprezível com relação a qualquer um dos dois outros peptídeos (**Figura 14**).

Pudemos concluir que a diferença de comportamento entre J e J-Ala, frente à interação com as células, realmente é devida à substituição da leucina em J pela alanina em J-Ala e não por diferença de cargas ou de acoplamento dos peptídeos às partículas, exatamente como visto no estímulo da infecção por tripomastigotas promovido por J (Magdesian *et al.*, 2001).

Avaliamos, também, o padrão de interação dos peptídeos imobilizados nos *beads* em outra linhagem celular, as células epiteliais CHO, e verificamos que *J-beads* interagem com essas células cerca de cinco vezes mais do que *JAla-beads* (**Figura 15**), reforçando os dados obtidos com as células epiteliais LLC-MK₂ (**Figuras 13 e 14**), com as quais a interação com *JAla-beads* é ínfima quando comparada com *J-beads*.

Até aqui, no entanto, devido às condições técnicas empregadas nos ensaios, não éramos capazes de diferenciar se o efeito promovido por J envolvia aumento de capacidade endocítica celular ou somente estímulo de adesão.

Para resolver essa questão, e por estarmos trabalhando com monocamadas de células epiteliais, aderidas ao substrato, foi necessária a implementação de um método que nos permitisse qualificar e, principalmente, quantificar as partículas aderidas bem como as internalizadas e relacioná-las ao número de células estudadas.

Figura 15 – Efeito de peptídeos J e J-Ala na interação de partículas inertes com monocamadas de células CHO. *Beads* fluorescentes carboxilados com ~ 2,4 µm de diâmetro foram covalentemente modificados com J ou J-Ala (conforme Materiais e Métodos), e incubados com monocamadas de CHO à razão de 10 *beads*/célula em DME+2%SFB por 1 h a 37°C. Após lavagens, as células foram fixadas e os núcleos corados com Hoechst. Foram capturadas imagens de fluorescência e o número de *beads* por célula foi determinado por contagem manual.

Há uma série de métodos descritos na literatura que propiciam esse tipo de diferenciação, entretanto, eles são focados preferencialmente no uso de células em suspensão e de partículas contendo DNA, como leveduras e/ou bactérias, ou fluoróforos susceptíveis a *quenching* (Burleson *et al.*, 1987 e Giaimis *et al.*, 1992, por exemplo).

A metodologia que empregamos para distinguir adesão de endocitose baseia-se em quantificação por citometria de fluxo (FACS) do número das partículas aderidas e internalizadas e dos núcleos celulares. Para contagem dos núcleos, empregamos um tampão contendo 1% de Triton X-100 (solução de Dvorak, vide Materiais e Métodos), capaz de solubilizar a membrana plasmática e o citoplasma para liberar eventuais partículas endocitadas sem, no entanto, solubilizar a carioteca ou alterar o comportamento dos *beads* frente aos reagentes de detecção ou frente às células (resultado não mostrado).

Para diferenciar as partículas aderidas das internalizadas, preparamos *beads* com peptídeo J covalentemente acoplado (*J-beads*) e os bloqueamos com albumina biotilada. Dessa forma, partículas aderidas à superfície celular seriam capazes de reagir com avidina-AlexaFluor488, tornando-se fluorescentes, enquanto as internalizadas, sem acesso ao reagente, permaneceriam opacas (**Figura 16**).

A **Figura 16** ilustra o padrão de fluorescência obtido para as partículas tratadas com o fluoróforo em comparação às não tratadas: há diferença de três ordens de grandeza entre os níveis

de autofluorescência das partículas negativas e os níveis de fluorescência das positivas. Já as janelas escolhidas para análise dos *beads* e dos núcleos (**Figura 17**) não sofrem interferência de eventuais *debris* celulares, o que torna o método viável.

Figura 16 – *Beads* covalentemente modificados com BSA (*BSA-bead*) ou J (*J-bead*), bloqueados com BSA-biotinilada e submetidos (+) ou não (-) a tratamento com avidina-AlexaFluor488. Análise por FACS de partículas controle. Notar a escala logartítmica no eixo de intensidade de fluorescência (eixo Empty).

Figura 17 – Análise por FACS dos padrões de dispersão de partículas e de fluorescência de células LLC-MK₂ controle. LLC-MK₂ aderentes foram submetidas à extração com solução de Dvorak e analisadas por FACS. Quadro A, *dot plot* relacionando tamanho (eixo x) e complexidade das partículas (eixo y). Quadro B, padrão de fluorescência da janela R2 (núcleos). Quadros C e D, janelas R2 e R1, ilustrando *dot plot* núcleos e *beads*, respectivamente.

De posse da nova metodologia, preparamos experimentos para saber se J promove aumento da capacidade endocítica da célula ou simplesmente adere em sua superfície. Finalmente, as monocamadas de células LLC-MK₂ foram incubadas por 1 hora, a 4°C ou a 37°C, com J-*beads* ou BSA-*beads*, preparados exclusivamente para análises por FACS, lavadas e submetidas ao tratamento com solução de Dvorak ou, para avaliar um possível efeito de J-*beads* a longo prazo, incubadas por 1 hora a 37°C, lavadas e submetidas a *chase* de 24 horas, previamente ao tratamento com solução de Dvorak.

Corroborando dados qualitativos obtidos por avaliação por microscopia de fluorescência de células incubadas com BSA-*beads* e J-*beads* com albumina biotinizada e tratadas com avidina-AlexaFluor488, as análises por FACS mostraram que o fenômeno que observamos trata-se de adesão e não endocitose das partículas (**Figura 18**).

Figura 18 – Análise por FACS de BSA-*beads* e J-*beads* internalizados ou aderidos a células LLC-MK₂. BSA-*beads* ou J-*beads*, à razão de 10 *beads* (0,885 µm de diâmetro) por célula, foram incubados com monocamadas de células epiteliais por 1 hora a 4°C ou 37°C, que foram lavadas e submetidas a extração com solução de Dvorak e análise por FACS. Alternativamente, os *beads* foram incubados por 1 hora a 37°C, as células foram lavadas e submetidas a incubação por 24 horas em meio de cultura (pontos *chase*), seguida por tratamento com solução de Dvorak e análise por FACS. O total de *beads* por célula foi determinado e os aderidos, fluorescentes, foram quantificados separadamente. *Beads* internalizados foram calculados pela diferença entre o total e os aderidos.

Após 1 h de incubação, cerca de 95% dos J-*beads* estão aderidos à superfície das células, o que ocorreu com incubações realizadas tanto a 4°C quanto a 37°C. Os cerca de 5% de J-*beads* internalizados em ambas as condições representam apenas uma pequena fração que é normalmente

endocitada, inclusive com *BSA-beads*, partículas controle sem adição de peptídeo, que aderem às células somente cerca de 10% do total de *J-beads* (**Figura 18**).

Mais uma vez, assim como mostrado na curva temporal de associação de *J-beads* (**Figura 12**), observamos substancial decréscimo no número de *J-beads* associados às células em período de incubação superior a 1 hora (**Figura 18**), enquanto na condição controle, novamente, verificamos aumento dessa associação.

É interessante notar que, ao passo que *beads* controle interagem com as células de maneira dependente de conformação das proteínas de membrana e do metabolismo celular (**Figura 19**), a adesão de *J-beads* à superfície celular (**Figura 19**), apesar de numericamente superior à de partículas controle (**Figura 11**, **Figuras 12 a 15** e **Figura 19**), parece ser pouco dependente de tais parâmetros: não observamos variação significativa no número de *J-beads* por célula quando as incubações foram realizadas a 4°C ou 37°C, com as células viáveis ou quando foram empregadas células pré-fixadas com paraformaldeído (**Figuras 18 e 19**).

Figura 19 – Interação de *J-beads* e *BSA-beads* com monocamadas de células LLC-MK₂ pré-fixadas com paraformaldeído ou vivas, a 4°C ou 37°C. *Beads* fluorescentes carboxilados com ~ 2,4 µm de diâmetro foram covalentemente modificados com J ou BSA (conforme Materiais e Métodos), e incubados à razão de 10 *beads*/célula em DME+2% SFB com monocamadas de LLC-MK₂ pré-fixadas, por 1 h a 37°C (pré-fix) ou vivas, por 1 h, a 4°C ou a 37°C. Após lavagens, as células foram fixadas e os núcleos corados com Hoechst. Foram capturadas imagens de fluorescência e o número de *beads* por célula foi determinado por contagem manual. *Inset* = escala ampliada de *BSA-beads*/célula.

Quando testamos a linhagem celular macrofágica J774, observamos que não há variação entre interação de *J-beads* e *JAla-beads* com as células (**Figura 20**). Nesse caso, ambas as partículas são fagocitadas e/ou aderem à superfície celular na mesma proporção, sugerindo que o mecanismo de ação de J seja específico para células não-fagocíticas.

Figura 20 – Efeito de peptídeos J e J-Ala na interação de partículas inertes com células J774. *Beads* fluorescentes carboxilados com 2,4 µm de diâmetro foram covalentemente modificados com J ou J-Ala (conforme Materiais e Métodos), e incubados com células J774 à razão de 10 *beads*/célula em RPMI+10%SFB por 1 h a 37°C. Após lavagens, as células foram fixadas e os núcleos corados com Hoechst. Foram capturadas imagens de fluorescência e o número de *beads* por célula foi determinado por contagem manual.

De fato, em concordância com esse dado, há relatos na literatura que sugerem que os tripomastigotas são internalizados através de mecanismos diferentes, dependentes da natureza fagocítica (profissional ou não) da célula hospedeira: enquanto o tratamento de células não fagocíticas com citocalasina D, potente promotor da despolimerização dos filamentos de actina, estimula a infecção, macrófagos pré-incubados com essa droga têm a infecção marcadamente diminuída (Caler *et al.*, 2000).

4.2.2. Peptídeo J adere e induz adesão de *T. cruzi* na matriz extracelular

Durante os estudos de mapeamento do sítio de ligação de Tc85-11 em laminina, verificou-se que somente seu domínio amino-terminal é ligante para essa proteína (Marroquin *et al.*, 2004).

Apesar de J não se ligar em laminina purificada (resultado não mostrado), avaliamos se as partículas modificadas com peptídeo J seriam capazes de interagir com a matriz extracelular de

células epiteliais e observamos que *J-bead*, e não *BSA-bead* ou *JAla-bead*, partículas controle, adere em ECM de LLC-MK₂ (**Figura 21**).

Figura 21 – *J-bead* adere em matriz extracelular de LLC-MK₂. Lamínulas contendo matriz extracelular de células epiteliais foram incubadas por 1 hora a 37°C com *BSA-bead*, *JAla-bead* ou *J-bead*, todos com 2,4 µm de diâmetro e azuis. Após lavagens, as lamínulas foram fixadas com 4% de paraformaldeído e montadas sobre lâminas que foram divididas em 12 campos e fotografadas com câmera digital acoplada a microscópio de fluorescência, sob excitação de luz ultra-violeta.

A possibilidade da presença de CK18 contaminante no ensaio foi afastada, uma vez que a reatividade entre ECM que isolamos e anticorpo anti-CK18, avaliada por imunofluorescência, foi idêntica à resposta observada no controle, sem anticorpo primário (resultado não mostrado).

Como diversas moléculas de ECM foram descritas como ligantes para tripomastigotas, avaliamos se o peptídeo J promovia alguma alteração no padrão de interação entre *T. cruzi* e ECM. Com efeito, na presença de 50 µM de peptídeo J notamos um aumento da ordem de 5 vezes com relação aos controles (sem peptídeo e na presença do solvente de J) da adesão dos tripomastigotas à matriz extracelular (**Figura 22**).

Figura 22 – Peptídeo J estimula adesão de tripomastigotas à matriz extracelular. Lamínulas contendo matriz extracelular de células epiteliais foram incubadas por 1 hora a 37°C com tripomastigotas de *T. cruzi* (ty) em DME+2%SFB ou na presença de DMSO ou 50 µM J. Após lavagens, as lamínulas foram fixadas e os parasitas incubados com anticorpo policlonal anti-CL, tratados com anti-IgG de coelho acoplada a AlexaFluor 546. As lâminas foram divididas em 12 campos, fotografadas com câmera digital acoplada a microscópio de fluorescência e o número de parasitas por foto determinado por contagem manual.

Os ensaios descritos nessa parte de nosso trabalho, nos quais empregamos peptídeo J, representante do “domínio FLY” acoplado a partículas inertes para avaliar sua interação com células, sugerem a participação desse fragmento conservado em etapas adesivas do processo de infecção por *T. cruzi*.

4.3. “Domínio FLY” induz secreção de proteínas de células epiteliais LLC-MK₂

Uma vez que nossos resultados depunham contra a hipótese inicial de promoção de endocitose, outra possibilidade para “domínio FLY” estimular a infecção por tripomastigotas, que investigamos, seria que o tratamento das células com peptídeo J induzisse o aumento do número de seus receptores na membrana plasmática.

Visando determinar se peptídeo J promove mobilização de CK18, proteína descrita como seu receptor, para a superfície de células epiteliais, realizamos ensaios de imunoprecipitação de células tratadas com o peptídeo e submetidas à biotilação de suas proteínas acessíveis ao reagente NHS-Sulfo-biotina, impermeável à membrana plasmática.

Para isso, incubamos as células com 100 µM de peptídeo J ou volume equivalente de seu solvente, DMSO, por 1 hora, em 37°C, condição descrita como estimuladora da invasão (Magdesian *et al.*, 2001), biotinilamos suas proteínas de superfície, como descrito para o isolamento do receptor

de J (Magdesian, 2000) e submetemos o extrato solúvel em 1% de NP-40 a imunoprecipitação com anticorpo monoclonal contra CK18 de camundongo, TROMA2.

Resultados preliminares indicaram sutil aumento na quantidade de proteína biotinilada com cerca de 50 kDa em material imunoprecipitado previamente tratado com peptídeo J. Outras proteínas acessíveis à biotina e possivelmente imunorelacionadas com CK18 também foram evidenciadas nesses ensaios, somente na condição onde houve tratamento das células com J (**Figura 23**, Painel biotina).

Figura 23 – Imunoprecipitação de proteínas de superfície de LLC-MK₂ com anticorpo anti CK18. Células controle (C) ou tratadas a 37°C por 1 hora com DMSO (D) ou 100 µM J foram biotiniladas como descrito (Magdesian, 2000) e imunoprecipitadas com TROMA2, anticorpo monoclonal contra CK18 de camundongo. O material imunoprecipitado foi fracionado por SDS-PAGE 9%, transferido para membrana de nitrocelulose e desenvolvido com estreptavidina-peroxidase, como descrito em Materiais e Métodos (painel biotina). Essa membrana foi recuperada e submetida a *western blot* com TROMA 2, na diluição 1:100 (Painel Anti-CK18), como descrito em Materiais e Métodos. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Após recuperação da membrana e revelação com TROMA 2, monoclonal contra CK18 de camundongo, observamos aumento na quantidade total da proteína de ~ 50 kDa, o que poderia sugerir que o tratamento com peptídeo J promoveu aumento na solubilidade de CK18 (**Figura 23**, Painel TROMA2).

Novos testes realizados com anti-CKPAN, mistura de monoclonais contra citoqueratinas, incluindo CK8 e CK18 (**Figura 24**), e com monoclonais anti-CK8 (M20) e anti-CK18 (KS-B17.2)

(resultados não mostrados), todos da Sigma, em células tratadas ou não com 100 μ M de peptídeo J, com superfície biotinizada enquanto aderidas ao substrato, sugeriram que não há exposição de CK18 à membrana plasmática em função da presença de J no meio de cultivo celular (**Figura 24**, Painel imunoprecipitado), nem alteração nos níveis de outras proteínas de superfície celular solúveis em 1% NP-40 (**Figura 24**, Painel imunodepletado). Novamente, entretanto, observamos a presença de proteína imunorelacionada com citoqueratinas (com 30-40 kDa), acessível à biotina, no ponto tratado com J (**Figura 24**, Painel imunoprecipitado, asterisco).

Figura 24 – Imunoprecipitação de proteínas de superfície de LLC-MK₂ com anticorpo anti CKPAN. Células LLC-MK₂ tratadas a 37°C por 1 hora com DME+10%SFB (C), suplementado com DMSO (D) ou 100 μ M J (J) foram biotinizadas e imunoprecipitadas com anti-CK PAN. O material imunoprecipitado e alíquota do imunodepletado foram fracionados por SDS-PAGE 9%, transferidos para membrana de nitrocelulose e desenvolvidos com estreptavidina-peroxidase, como descrito em Materiais e Métodos. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Também em análises por microscopia de imunofluorescência de células tratadas ou não com J, mesmo com uso de diferentes anticorpos contra CK18, não fomos capazes de observar mobilização desta proteína devida à incubação com o peptídeo ou, ainda, a marcação da superfície das células com anti-CK18 (resultados não mostrados).

Aventamos, então, a possibilidade de CK18 não estar apresentada na superfície de células epiteliais íntegras e sim de ter sido exposta em função da manipulação experimental e de sua abundância (Chou *et al.*, 1993), assim como foi descrito anteriormente (Riopel *et al.*, 1993).

Uma vez que o método empregado na identificação de CK18 como receptor para o peptídeo J envolvia a tripsinização das células LLC-MK₂ para posterior marcação das proteínas externas à membrana plasmática (Magdesian, 2000), avaliamos o efeito do tratamento com a protease, seguido pelo período de recuperação celular como descrito (Magdesian, 2000), em comparação com monocamadas celulares, na apresentação de CK18 à superfície (**Figura 25**).

Para tanto, utilizando os métodos da lactoperoxidase para monocamadas não tratadas e da cloramina T para células tripsinizadas (vide Materiais e Métodos), empregamos a técnica de iodação de resíduos de tirosina de proteínas de superfície, seguida por imunoprecipitação com anti-citoqueratina para, após fracionamento eletroforético e autoradiografia, detectarmos a presença e avaliarmos a quantidade relativa de CK18-¹²⁵I em células submetidas ou não à tripsinização prévia à marcação (**Figura 25**).

Figura 25 – Imunoprecipitação com anti-CKPAN de proteínas de LLC-MK₂ marcadas com ¹²⁵I na superfície de células submetidas ou não a tratamento com tripsina. Células LLC-MK₂ aderentes foram lavadas e submetidas (+) ou não (-) a tripsinização seguida por incubação com meio DME+10%SFB e iodadas com Na¹²⁵I pelos métodos da cloramina T (+) ou lactoperoxidase (-), lisadas e imunoprecipitadas com anti-CKPAN. O material imunoprecipitado foi fracionado por SDS-PAGE 9% poliacrilamida e o gel foi seco e exposto a filme de raios-X para autoradiografia. O asterisco indica lactoperoxidase (77,5 kDa) autoiodada e a seta, citoqueratina 18 (45 kDa). À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Notamos, então, que há grande concentração de CK18 exposta à iodinação somente no material celular previamente tratado com a enzima proteolítica (**Figura 25**) e o mesmo resultado foi obtido quando as monocamadas, com ou sem tratamento prévio com a protease, foram submetidas à biotinylation em grupamentos amina livres das proteínas de superfície (resultado não mostrado).

Assim, apesar da interação entre CK18 e J ter sido confirmada por meio de diversas técnicas (Magdesian *et al.*, 2001 e **Figura 7**), nossos dados não permitem afirmar que esta se dá à superfície celular.

Tubulina, proteína de cerca de 55 kDa, componente de citoesqueleto, monômero constituinte dos microtúbulos, também foi identificada como sendo interatora de J, apesar de não ter sido classificada como proteína de superfície (Magdesian, 2000). Por essa razão, avaliamos o efeito de J com respeito a essa proteína, mais uma vez, por meio de imunoprecipitação de extrato solúvel em 1% NP-40 de células tratadas ou não com 100 μ M J, com anticorpo anti-tubulina (**Figura 26**).

Figura 26 – Imunoprecipitação de proteínas de LLC-MK₂ com anticorpo anti- α -tubulina. Células LLC-MK₂ tratadas a 37°C por 1 hora com DME+10%SFB (C), suplementado com DMSO (D) ou 100 μ M J (J) foram solubilizadas em 1% NP-40 e imunoprecipitadas com anti- α -tubulina. O material imunoprecipitado foi fracionado por SDS-PAGE 9%, transferido para membrana de nitrocelulose e submetido a *western blot* com anti- α -tubulina 1:1000, como descrito em Materiais e Métodos. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Curiosamente, apesar de não haver variação na concentração total de tubulina, proteína com ~ 50 kDa, solúvel em NP-40 em função do tratamento, verificamos claramente a presença de outras proteínas imunorelacionadas nas células incubadas com J, especialmente de massa molecular na faixa dos 30-40 kDa(**Figura 26**), como visto anteriormente.

Esse resultado sugeria a possibilidade de “domínio FLY” promover o aumento de solubilidade de proteínas pertencentes ou associadas ao citoesqueleto, o que, de acordo com seu possível papel na desfosforilação de CK18 (Magdesian, M.H., comunicação pessoal), poderia facilitar a infecção por tripomastigotas.

Além disso, um eventual aumento na solubilidade de proteínas, induzido por J, poderia estar relacionado à secreção protéica para o meio extracelular, o que poderia explicar o substancial decréscimo de J-beads associados às células em períodos de tempo superiores a 1 hora de incubação (**Figuras 12 e 18**), por diminuição do número de moléculas interatoras, por exemplo.

Para testar essa hipótese, inicialmente biotinilamos as proteínas de superfície de monocamadas de LLC-MK₂, ainda aderidas ao substrato, e, depois de exaustivas lavagens, as submetemos a tratamento com o peptídeo J por 1 hora. Após, coletamos o sobrenadante das culturas, que denominamos meio condicionado, o submetemos à filtração em microfiltros Millipore de 0.22 µm e avaliamos alíquotas do filtrado por *western blot*, na busca de proteínas biotiniladas (**Figura 27**).

Com efeito, sustentando nossa hipótese de partida, observamos que o tratamento com J estimula a secreção de proteínas de membrana plasmática, principalmente algumas com cerca de 70, 50-55 e 30-40 kDa (**Figura 27**).

Figura 27 – Análise de material secretado por células LLC-MK₂ tratadas com peptídeo J. Monocamadas celulares (25 cm²) tiveram suas proteínas biotiniladas com reagente impermeável à membrana, foram lavadas e incubadas por 1 h, a 37°C, com 1mL de PBS + 1mM glicose (C) na presença de 2% DMSO (D) ou de 100 µM peptídeo J em 2% DMSO (J). O sobrenadante foi coletado e uma alíquota de cada ponto foi fracionada por SDS-PAGE 12,5%. O material foi transferido para membrana de nitrocelulose, bloqueado, desenvolvido com estreptavidina-peroxidase e revelado por quimioluminescência com o kit ECL (Amersham). As setas indicam algumas das proteínas cuja secreção é estimulada por J. À esquerda, padrão de peso molecular, em kDa.

Apesar de não termos demonstrado a presença de CK18 na superfície celular, essa proteína poderia estar sendo secretada em função do tratamento com peptídeo J, já que moléculas com sua faixa de peso molecular (~ 50 kDa) foram encontradas no meio condicionado por tratamento com J (**Figura 27**) e há diversos relatos de secreção de citoqueratinas modificadas em alguns sistemas celulares (Chan *et al.*, 1986; Silen *et al.*, 1995; Sheard *et al.*, 2002).

Para avaliar essa possibilidade, marcamos metabolicamente as células LLC-MK₂ com ³⁵S-metionina e, após lavagens com PBS, as tratamos com 100 µM de peptídeo J ou volume equivalente de DMSO em meio DME acrescido de 10% de SFB, durante 1 h. Após a incubação, coletamos o meio de cultura condicionado e o submetemos a imunoprecipitação com TROMA2 (monoclonal contra CK18), que foi seguida por SDS-PAGE e autoradiografia.

Observamos, então, que o tratamento com J induz secreção para o meio extracelular de, principalmente, três proteínas imunoprecipitáveis com TROMA2, com cerca de 30-40, 50 (possivelmente CK18) e 55-60 kDa (**Figura 28**).

Figura 28 – Imunoprecipitação de meio condicionado por LLC-MK₂ tratada com peptídeo J com anti-CK18. Células foram marcadas metabolicamente com ³⁵S-metionina, lavadas e incubadas com meio DME fresco (C) ou contendo DMSO (D) ou 100 µM J (J) por 1 hora, a 37°C. Após a incubação, os meios de cultura foram coletados e imunoprecipitados com TROMA2, monoclonal anti-CK18 de camundongo imobilizado em *beads* de proteínaG-Sepharose. O imunoprecipitado foi fracionado por SDS-PAGE 9% e o gel corado com Coomassie Blue (Painel Coomassie), seco e auto-radiografado em filmes de raios-X (Painel Autoradiografia). À esquerda, padrão de peso molecular em kDa.

A **Figura 29** ilustra a imunoprecipitação com anti-CKPAN de meios condicionados por células LLC-MK₂ metabolicamente marcadas com ³⁵S-metionina e tratadas com J, na presença de 10% de SFB. Apesar de verificarmos com esse anticorpo, uma mistura de monoclonais contra diversas CKs, um número muito maior de proteínas secretadas, inclusive nas condições controle (**Figura 29**, C e D), pudemos observar um aparente enriquecimento em proteína de ~ 50 kDa (CK18 ?), bem como a presença de proteína de 30-40 kDa no meio condicionado por J, assim como visto com a imunoprecipitação realizada com o anticorpo anti-CK18, TROMA2 (**Figura 28**, Painei Autoradiografia). Curiosamente, nesse caso, observamos algum enriquecimento de uma proteína de ~ 70 kDa, sem correspondente radioativo, secretada em função do tratamento das células com o peptídeo J (**Figura 29**, Painei Coomassie).

Figura 29 – Imunoprecipitação com anti-CKPAN de meio condicionado por LLC-MK₂ tratada com peptídeo J. Células LLC-MK₂ foram marcadas metabolicamente com ³⁵S-metionina, lavadas e incubadas com meio DME + 10% SFB (C) ou suplementado por DMSO (D) ou 100 μM J (J), por 1 hora, a 37°C. Após a incubação, os meios de cultura foram coletados, filtrados com Millipore e os sobrenadantes, imunoprecipitados com anti-CKPAN imobilizado em *beads* de proteína A-Sepharose. O material imunoprecipitado foi fracionado por SDS-PAGE 12,5% e o gel corado com Coomassie Blue (Painei Coomassie) foi seco e auto-radiografado em filme de raios-X (Painei Autoradiografia). À esquerda, padrão de peso molecular em kDa.

Há dados na literatura relacionando a invasão por tripomastigotas e a secreção de proteínas da célula hospedeira, tais como β-hexosaminidase (Kima *et al.*, 2000), e interleucina 6 (Saavedra *et al.*, 1999). Assim, visando determinar se os parasitas, assim como J, seriam capazes de estimular

secreção protéica, realizamos uma reprodução do ensaio anterior, mas com as incubações feitas na presença de meio DME com 2% SFB (**Figura 30**), condição descrita como adequada para estudo da invasão por tripomastigotas (Andrews & Colli, 1982).

Além disso, com o intuito de “limpar” o sistema protéico, realizamos o *pre-cleaning* dos meios condicionados através de tratamento com proteína A-Sepharose antes da etapa de imunoprecipitação. O material adsorvido aos *beads* também foi exaustivamente lavado e analisado por eletroforese seguida de autoradiografia.

Figura 30 – Imunoprecipitação com anti-CKPAN de meio condicionado por LLC-MK₂ tratada com peptídeo J em meio DME com 2% SFB. Células LLC-MK₂ foram marcadas metabolicamente com ³⁵S-metionina, lavadas e incubadas com meio DME + 2% SFB (C), suplementado por 100 μM J (J) ou 100 tripanossomas/célula (ty), por 1 hora, a 37°C. Após a incubação, os meios de cultura foram coletados, filtrados, pré-adsorvidos com proteína A-Sepharose e os sobrenadantes imunoprecipitados com anti-CKPAN. O material imunoprecipitado (Painel anti-CKPAN) e o pré-adsorvido em proteína A-Sepharose (Painel proteína A), bem como extrato de tripanossomas não internalizados (ext ty), foram fracionados por SDS-PAGE 12,5% e o gel corado com Coomassie Blue (Painel Coomassie) foi seco e auto-radiografado em filme de raios-X (Painel Autoradiografia). Asteriscos indicam proteínas secretadas. À esquerda, padrão de peso molecular em kDa.

Novamente, observamos secreção de proteínas imunoprecipitáveis com anti-CKPAN e, possivelmente CK18 (**Figura 30**, Painel Autoradiografia, anti-CK PAN), apesar da quantidade de

material ter sido muito diminuída e do padrão de secreção bastante alterado em relação ao ensaio anterior (**Figura 29**). Curiosamente, sob essas condições, muitas proteínas secretadas em função do tratamento com J, inclusive proteínas na faixa de 30-40 e ~ 50 kDa, não foram imunoprecipitadas com anti-CKPAN e, sim, aderidas à proteína A-Sepharose (**Figura 30**, Painei Autoradiografia, proteína A). Além disso, novamente foi possível visualizar uma proteína bastante abundante com ~ 70 kDa, relacionada ao tratamento com peptídeo, sem correspondente radioativo, ligada às partículas de proteína A-Sepharose (**Figura 30**, Painei Coomassie, proteína A).

Com relação aos tripomastigotas, os mesmos foram capazes de estimular secreção de proteínas de cerca de 50-55 kDa, apesar de em muito baixa concentração (**Figura 30**, Painei Autoradiografia, anti-CK PAN). A diferença entre o padrão de secreção estimulado por J e por parasitas pode ser devida à presença de concentração muito inferior a 100 µM de Tc85 (e, conseqüentemente, de J) na superfície de tripomastigotas; o uso de peptídeo J pode concentrar um efeito menos evidente promovido pelo parasita.

Uma observação interessante, entretanto, foi a marcação dos parasitas extracelulares com proteínas secretadas pela célula de mamífero (**Figura 30**, Painei Autoradiografia, ext ty). Nesse caso, o meio condicionado por tratamento com tripomastigotas foi coletado, centrifugado e os parasitas (não aderidos nem internalizados) foram separados do sobrenadante, lavados com PBS gelado, submetidos a fracionamento eletroforético e autoradiografia. Dentre as proteínas associadas aos tripanossomas extracelulares, podem ser destacadas as de 30-40 kDa e 50 kDa, também presentes no material secretado em função de J (**Figura 30**).

Diante do fato de que esses parasitas marcados não invadiram ou aderiram à célula hospedeira durante o período que interagiram, apesar de não sabermos se os tripomastigotas que invadiram as células também estavam marcados, tornou-se tentador especularmos que a secreção de proteínas pela célula hospedeira poderia ser resultado de algum mecanismo de defesa da célula e/ou regulação da invasão por *T. cruzi*.

De fato, a região carboxi-terminal de *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*, via *Tandem Repeat*, foi implicada como principal indutora da secreção de IL-6 independente de ativação do sistema imune em células infectadas por tripanossomas, o que foi relacionado com possíveis papéis em neuroproteção e imunidade naturalmente adquirida contra *T. cruzi* (Saavedra *et al.*, 1999).

Uma vez que a secreção induzida por J, assim como a invasão por tripomastigotas (Andrews & Colli, 1982), parece ser alterada em função da concentração de soro no meio de cultura e com o objetivo de eliminar proteínas adicionais ao sistema J-célula hospedeira, foram realizados ensaios na ausência de soro, em PBS+1 mM de glicose. A incubação com J em PBS+1 mM glicose, mais uma vez, promoveu secreção de proteínas e, em especial, da não radioativa de ~ 70 kDa, que se liga à proteína A-Sepharose (resultado não mostrado).

Apesar da molécula apresentar massa molecular semelhante à da albumina, que tem cerca de 60 kDa, é pequena a possibilidade de se tratar dessa proteína exógena ao sistema, já que o mesmo resultado foi obtido quando os *beads* contendo os imunocomplexos foram exaustivamente lavados com solução de Kessler (Materiais e Métodos) sem albumina (resultado não mostrado). Além disso, a interação da proteína de 70 kDa parece ser específica com proteína A, já que nos ensaios com anticorpo TROMA 2, monoclonal desenvolvido em rato, nos quais usamos proteína G-Sepharose, não se observa a banda não radioativa em questão (**Figura 28**, Painel Coomassie).

O fato da proteína secretada de cerca de 70 kDa não apresentar radioatividade detectável por autoradiografia pode ser devido a pequena quantidade ou ausência de metioninas em sua sequência de aminoácidos ou a um *turnover* tão baixo que não possibilite sua marcação durante as 18 horas de incubação com o aminoácido radioativo.

A interação entre proteínas secretadas em função de J com proteína A-Sepharose é interessante. Proteína A é ligante para imunoglobulinas, fator de von Willebrand (Sjödahl, 1977; Moks *et al.*, 1986; Hartlieb *et al.*, 2000) e, recentemente, foi caracterizada como ligante para receptor de transcobalamina II, sugerindo que essa molécula contém região *Fc-like* em sua estrutura (Vanamala *et al.*, 2003). Esse pode ser o caso, especialmente, da proteína de 70 kDa secretada por células epiteliais em função do tratamento com peptídeo J, devido à sua abundância relativa no sistema. Sustentando essa possibilidade, a interação entre células e *beads* modificados com J é marcadamente diminuída (cerca de 45%) quando na presença de IgG de diversas origens (resultado não mostrado), sugerindo a participação de molécula com domínio IgG-like no processo.

Além das proteínas constantes em todos as condições de ensaios de 30-40 kDa e da de 70 kDa, não radioativa, o tratamento das células epiteliais com peptídeo J também induz a secreção de outras proteínas imunorelacionadas ou associadas com citoqueratinas (**Figuras 28 a 30**), com padrão aparentemente dependente da concentração de soro presente no meio de cultura, a exemplo do que ocorre com a infecção celular por tripomastigotas (Andrews & Colli, 1982).

A secreção de citoqueratinas modificadas foi descrita em diversos sistemas celulares (Chan *et al.*, 1986; Silen *et al.*, 1995; Sheard *et al.*, 2002) e, inclusive, seus fragmentos são empregados como marcadores para diversos tipos de tumores (revisto em Barak *et al.*, 2004).

Como em nosso sistema de estudo, a secreção protéica induzida por J não está relacionada à morte das células, levantamos a possibilidade de estarmos lidando com uma resposta celular responsável pela inibição da infecção, o que estaria em concordância com a diminuição da associação de J às células após 1 hora de contato (**Figura 12**) e que poderia ser explicada, em primeira instância, pela presença de CK18, ligante de J, dentre as proteínas secretadas para o meio extracelular, bem como pela marcação de parasitas extracelulares com essas proteínas secretadas (**Figura 30**, Painel Autoradiografia, ext ty).

Assim, avaliamos o potencial infectivo de tripomastigotas ressuspensos em meio condicionado pelo tratamento das células com J, em relação aos parasitas em meio condicionado por células não tratadas com peptídeo (controle) ou em meio fresco (**Figura 31**).

Figura 31 – A infecção de células epiteliais por tripomastigotas é inibida por meio condicionado por células tratadas com J. Monocamadas de células LLC-MK₂ foram crescidas em lamínulas de placas de 8 poços, lavadas e infectadas com tripomastigotas ressuspensos em DME+2%SFB condicionado por LLC-MK₂ por 1 h a 37°C (mc), suplementado por DMSO (md) ou 100 μM J (mJ), na razão de 100 parasitas por célula, por 2 h, a 37°C. Os parasitas não aderidos foram removidos por exaustivas lavagens e as células foram fixadas e coradas com o marcador de ácidos nucleicos, Hoechst, conforme descrito em Materiais e Métodos. Para cada ponto, um mínimo de 100 células foram examinadas para contagem de parasitas.

E, reforçando a importância da secreção protéica induzida por J em um potencial mecanismo de regulação de adesão e/ou infecção por *T. cruzi*, observamos cerca de 40% de inibição da invasão celular por tripomastigotas em meio condicionado por células submetidas a tratamento com peptídeo J em relação aos parasitas ressuspensos em meio condicionado por células não tratadas (**Figura 31**).

Esse dado sugere a participação do “domínio FLY” como um agente modulador do processo de infecção por tripomastigotas já que, da mesma forma que estimula a invasão quando adicionado ao meio de cultura (Magdesian *et al.*, 2001), promove a secreção de proteínas imunorelacionadas com CK18 e ligantes de proteína A (**Figuras 28 a 30**) para o meio extracelular que, ressuspendendo o parasita, é capaz de inibir a infecção (**Figura 31**).

4.4. Análise de “domínio FLY” no contexto da glicoproteína Tc85-11

Em nossos estudos, demonstramos o envolvimento de peptídeo J, molécula que contém o “domínio FLY”, em processos de adesão à célula hospedeira (**Figs. 11 a 15 e Figuras 18 e 19**) e à matriz extracelular (**Figura 21**), no estímulo de adesão de formas tripomastigotas à ECM (**Figura 22**), que inibem a invasão de células epiteliais, na indução de secreção de agentes protéicos (**Figuras 28 a 31**), além do já descrito aumento da infecção celular por *T. cruzi*, caracterizado por Magdesian (Magdesian *et al.*, 2001), sugerindo um papel na modulação no processo de invasão.

Uma vez que essas informações foram obtidas pelo emprego do peptídeo em solução ou acoplado a partículas inertes, tornou-se interessante avaliar a relevância do comportamento de J frente à proteína que estudamos e da qual ele faz parte, Tc85-11.

Para realizar uma análise preliminar da localização espacial do peptídeo J, valemo-nos da estrutura tridimensional de Tc85-11, obtida através de modelagem por homologia (Marroquin-Quelopana *et al.*, 2004), que empregou como moldes as coordenadas atômicas da sialidase de *T. rangeli* (Buschiazzo *et al.*, 2000 e 2002) e da *trans*-sialidase de *T. cruzi* (Amaya *et al.*, 2003).

O modelo da glicoproteína Tc85-11 revela a presença de dois domínios estruturais definidos, conectados por uma longa α -hélice: o amino-terminal, com estrutura β -propeller, presente em proteínas com diversas funções, inclusive receptores e mediadores de interação proteína-proteína (Springer, 1998) como clatrina (ter Haar *et al.*, 2000), integrina (Takagi, 2000; Springer, 2000) e receptor de LDL (Rudenko *et al.*, 2002), por exemplo e, com especial interesse

para nosso estudo, o domínio carboxi-terminal, que contém o “domínio FLY” e apresenta topologia do tipo β -sandwich.

O domínio carboxi-terminal de Tc85-11 corresponde ao domínio da *trans*-sialidase denominado *lectin-like* (**Figura 32**) e está presente em outras moléculas de superfície celular capazes de participar de interações proteína-proteína, tais como, os módulos tipo III de fibronectina (Fn3) e os domínios LG das lamininas, que possuem sítios de ligação a integrinas (Hohenester & Engel, 2002).

Como peptídeo J encontra-se disposto, na Tc85-11, em um domínio estrutural potencialmente envolvido em interações protéicas, empregando o programa Deep View – Swiss-PdbViewer 3.7 (www.expasy.org/spdbv, Guex & Peitsch, 1997) e as coordenadas atômicas do modelo estrutural de Tc85-11 (Marroquin-Quelopana *et al.*, 2004), avaliamos a localização espacial de J no contexto do domínio *lectin-like*. Com essa análise, pudemos notar que J é componente de uma das folhas da estrutura secundária β -sheet presentes do domínio carboxi-terminal de Tc85-11 (**Figura 32**).

Figura 32 – Modelo estrutural de Tc85-11. No painel A está ilustrado o modelo estrutural de Tc85-11 e, em B, a ampliação do domínio carboxi-terminal. A fita da folha β da qual J faz parte está indicada pela seta.

Análises de dicroísmo circular de J dissolvido em H₂O em pH 4 ilustram que, em solução, o peptídeo adota preferencialmente uma estrutura secundária denominada *random coil* (**Figura 33**), portanto distinta daquela observada na proteína (β -sheet, conforme **Figura 32**).

Alguns dados, no entanto, nos sugerem que a estrutura espacial de J é menos relevante que a hidrofobicidade de seus resíduos de aminoácidos nas interações estudadas, o que vem em concordância com estudos de *Dictyostelium discoideum* na adesão e ingestão de partículas (Hellio & Ryter, 1985), bem como na análise da constituição da interface de contato em interações proteína-proteína, que revelam conteúdo relativamente alto de argininas, histidinas, asparaginas, triptofano, tirosina, serina e de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Archakoo *et al.*, 2003), como observado em J.

Com relação ao peptídeo J, a estrutura tridimensional em folha β que assume na modelagem de Tc85-11 (Marroquin, 2003) parece não ser absolutamente decisiva para os processos estudados, uma vez que a capacidade adesiva de J é observada quando ele está em solução, imobilizado em partículas inertes por adsorção ou por ligação covalente entre grupos carboxila dos *beads* e amina do peptídeo ou, ainda, quando apresentado na superfície de fagos em experimentos de *phage display* (Tonelli, R.R., comunicação pessoal).

Figura 33 – Espectro de dicroísmo circular de peptídeo J. Peptídeo J foi dissolvido em água, pH 4, nas concentrações indicadas e apresenta espectro característico de estrutura *random coil*, com banda negativa em 197 nm (Mulkerrin, 1996).

No painel 1 da **Figura 34**, ilustramos o domínio carboxi-terminal de Tc85-11 colorido em função da acessibilidade de seus resíduos de aminoácidos ao solvente. Aos resíduos de maior acessibilidade, o programa Deep View atribui cores com maior comprimento de onda no espectro visível.

A acessibilidade de cada resíduo ao solvente é calculada pela razão entre a área superficial exposta e a maior área exposta possível e o máximo para cada resíduo X é definido como sua área exposta no pentapeptídeo gly-gly-X-gly-gly em conformação totalmente estendida. Para fazer este cálculo o programa Deep View adiciona 1.4 Å (raio aproximado de uma molécula de água) ao raio de cada átomo, calcula sua superfície, elimina todas as superposições, determina a área da superfície exposta para cada resíduo, a razão desta superfície à máxima possível e atribui cores de acordo com a escala: 75% da exposição máxima = vermelho; 37,5% de exposição = verde; 0% exposto = violeta, com cores intermediárias para valores intermediários.

Visualizando a sequência do peptídeo J isoladamente (**Figura 34** – painéis 2 a 4), destaca-se o fato de que os aminoácidos classificados como relevantes para as interações de adesão (**Figura 14** e Magdesian, *et al.*, 2001) encontram-se entre os menos expostos.

Figura 34 – Modelo estrutural do domínio carboxi-terminal de Tc85-11 e peptídeo J. No painel 1 está ilustrado o domínio carboxi-terminal colorido em função da acessibilidade de seus resíduos de aminoácidos e no, painel 2, destaca-se a sequência de peptídeo J sob mesma vista. Nos painéis 3 e 4, a estrutura de J foi rotada em 90° para a direita e ampliada. Em 4, estão identificados alguns dos resíduos pertencentes a J.

Devido à importância de peptídeo J nos processos de invasão celular por tripomastigotas de *T. cruzi*, uma vez que, além da molécula conter o motivo conservado da família das gp85/trans-sialidases, ser implicada como potencializadora da infecção (Magdesian *et al.*, 2001) e dados apresentados neste trabalho sugerirem sua participação na modulação desta infecção, tornou-se interessante avaliar se essa seqüência adesiva apresenta algum nível de imunogenicidade, o que poderia indicar sua exposição em algum momento do processo de invasão por tripomastigotas.

Para isso, camundongos foram inoculados com tripomastigotas da cepa CL e seu soro foi utilizado como anticorpo contra o parasita (aqui denominado anti-CL). Peptídeos J e K (também constituinte da porção carboxi-terminal de Tc85-11 - Giordano *et al.*, 1999) foram imobilizados em membrana de nitrocelulose (1 nmol de cada) juntamente com proteínas correspondentes às porções amino- e carboxi-terminais de Tc85-11 (Tc85-N e Tc85-C, respectivamente), clonadas em fusão com cauda de histidina (Marroquin, 2004) e portanto reconhecidas pelo anticorpo contra o tag (anti-HisTag), e empregadas no ensaio como controles positivos, já que é sabido que esta proteína é imunogênica (**Figura 35**).

Figura 35 – Análise da reatividade entre anticorpo anti-CL e peptídeo J. Aliquotas de 1 nmol de Tc85-N e Tc85-C em fusão com cauda de histidina (Marroquin, 2004) e de peptídeo J ou K, outro fragmento da porção carboxi-terminal de Tc85-11, sem efeito biológico, foram imobilizadas em membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anti-CL em diluições 1:100 ou 1:500 ou com anti-His Tag (1:4000), lavadas e tratadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado a peroxidase. A detecção foi realizada por quimioluminescência, com kit ECL (Amersham).

Nota-se claramente a reatividade cruzada, dependente da concentração do anticorpo, entre o peptídeo J e o soro de camundongo infectado, ao passo que a mesma resposta não é observada com o peptídeo K (**Figura 35**), também presente na porção carboxi-terminal de Tc85-11, mas com seqüência de aminoácidos irrelevante para os processos de adesão e invasão (Magdesian *et al.*, 2001).

Da mesma maneira, observamos reação cruzada entre o peptídeo J e um *pool* de soros de pacientes chagásicos, gentilmente doado pela Dra. Torrecilhas, ao passo que, mais uma vez, o peptídeo K apresentou resposta negativa (**Figura 36**).

Figura 36 – Reação cruzada entre soro de paciente chagásico e peptídeo J. Alíquotas de 1 nmol de Tc85-N e Tc85-C em fusão com cauda de histidina (Marroquin, 2004) e de peptídeo J ou K, foram imobilizadas em membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anti-CL (1:500) ou com anti-His Tag (1:4000), lavadas e tratadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-CL) ou anti-IgG de humano (soro chagásico) acoplado a peroxidase. A detecção foi realizada por quimioluminescência, com kit ECL (Amersham).

Esses dados, apesar de preliminares, valorizam mais o estudo da seqüência representada pelo peptídeo J que, além de conservada na superfamília, é imunogênica. Tais informações abrem a interessante possibilidade de avaliar a reatividade do “domínio FLY” frente a soros de pacientes em diferentes estágios da doença de Chagas e, eventualmente, estabelecer uma correlação entre a positividade e o quadro clínico.

De imediato interesse para nosso estudo, a reatividade cruzada entre peptídeo J e soros de animais e humanos infectados com *T. cruzi* (**Figuras 35 e 36**) sugere que, a despeito da localização

de J em uma das folhas β do domínio β -sandwich da Tc85-11, há apresentação de seus aminoácidos à superfície da proteína.

Peptídeo J, composto predominantemente por aminoácidos hidrofóbicos, entretanto, é imunogênico, o que sugere sua acessibilidade durante o mecanismo de infecção. De fato, pequenos *clusters* de aminoácidos hidrofóbicos foram descritos na superfície de proteínas com topologia do tipo β -sandwich e, embora estabilizados pela porção apolar dos resíduos das cadeias laterais de aminoácidos vizinhos e implicados na manutenção da estrutura protéica, sua participação em mecanismos funcionais também foi sugerida (Tisi & Evans, 1995).

Tc85-11 pode sofrer alterações conformacionais, modulando a exposição de seus sítios adesivos, eventualmente. Embasando essa possibilidade, recentemente, o módulo 3 da fibronectina (Fn3), com o qual “domínio FLY” tem homologia (Pereira *et al.*, 1991), foi caracterizado como uma espécie de *switch* de reconhecimento molecular (Krammer *et al.*, 1999).

Em simulações de dinâmica molecular de estiramento (SMD, *Steered Molecular Dynamics*), demonstrou-se que Fn3 de fibronectina, molécula que, assim como Tc85-11, apresenta múltiplos sítios adesivos, submetida a uma força tensora, mimetizando o que possivelmente ocorre quando há adesão na superfície celular e na ECM simultaneamente, pode atuar como um “interruptor” mecano-sensitivo, alterando a acessibilidade de seus sítios de adesão. Nesse caso, o domínio RGD, responsável pela adesão da molécula a integrinas (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984) e, inclusive, importante na interação entre tripomastigotas e ECM (Ouaissi *et al.*, 1986), é modulado negativamente quando a molécula sofre o estiramento (Krammer *et al.*, 1999). Assim, tal relato mostra como a acessibilidade de um sítio de reconhecimento, especificamente do domínio Fn3, pode ser modulada por forças externas e depõe a favor da possibilidade da exposição modulada de “domínio FLY” de Tc85-11.

Outra possibilidade para a exposição de J poderia ser, por exemplo, a ocorrência de uma mudança conformacional devido à ligação do domínio amino-terminal da Tc85-11 à matriz extracelular, de forma coerente com a proposta de um mecanismo sequencial e ordenado para a ligação de açúcares à *trans*-sialidase de *T. cruzi* inativa (Todeschini *et al.*, 2004).

Dando prosseguimento à análise de J no contexto da glicoproteína Tc85-11, levando em consideração que os mapas de densidade eletrônica da sialidase de *T. rangeli* (TrSA) mostram resíduos de açúcar presentes em todos os 5 sítios de glicosilação preditos, inclusive na asparagina

614 do domínio *lectin-like*, correspondente ao último aminoácido da sequência de J (Buschiazzo *et al.*, 2000), e sabendo que uma complexa cadeia de N-glicana contendo ácido siálico, fucose e Gal(α 1-3)Gal está presente na Tc85 (Couto *et al.*, 1987 e 1990), realizamos a predição de sítios de N-glicosilação na sequência da proteína Tc85-11, utilizando o programa NetGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc, Gupta *et al.*, 2004).

A **Figura 37** ilustra os sítios de N-glicosilação presentes na sequência da Tc85-11 (**Fig.37a**), bem como indica aqueles preditos como sendo glicosilados *in vivo*, que apresentam potencial de glicosilação superior ao *threshold* de 0,5 (**Fig.37b**).

Figura 37 – Potenciais sítios de N-glicosilação de Tc85-11. Empregando a sequência de aminoácidos da Tc85-11, onde J está destacado (a), o programa NetNGlyc 1.0 avalia (b) os potenciais sítios de N-glicosilação (barras azuis) da proteína. Os sítios cujas barras cruzam o *threshold*, são preditos como glicosilados.

Observamos que, na sequência do peptídeo J na Tc85-11 há um sítio de N-glicosilação potencialmente glicosilado *in vivo* (**Figura 37** – asparagina 667). Como a estrutura tridimensional da Tc85-11 foi obtida por modelagem por homologia à sequência, inclusive, de TrSA, deduzida a partir de cristal da proteína purificada do parasita e, portanto, glicosilada (Buschiazzo, *et al.*, 2000), é possível que uma cadeia de açúcar presente em J na Tc85 não altere profundamente a posição de seus aminoácidos frente ao restante da proteína.

Uma glicosilação nesta posição, entretanto, poderia *in vivo* apresentar funções importantes tanto nas interações, quanto na eventual modulação da exposição de J ao meio. Sustentando essa possibilidade, foi sugerido que o domínio *lectin-like* de TrSA pode estar envolvido no reconhecimento de carboidratos (Buschiazzo, *et al.*, 2000).

Cabe salientar que estudos estruturais revelam aspectos funcionais importantes para os açúcares presentes em glicoproteínas, tais como na estabilização da proteína, na mediação de interações protéicas, no reconhecimento em processos de adesão celular e, de especial interesse para nosso estudo, na regulação de função proteica em função do processamento da cadeia de açúcar (Wyss & Wagner, 1996).

Apesar de a interação entre o domínio amino-terminal de Tc85-11 e laminina (Marroquin, 2003) não apresentar envolvimento das cadeias de glicosilação de nenhuma das duas proteínas (Giordano *et al.*, 1999 e Marroquin *et al.*, 2004), ainda não temos informação experimental sobre uma eventual participação de açúcares no processo de interação e adesão de peptídeo J a célula hospedeira.

No entanto, a avaliação da reatividade entre anticorpo policlonal desenvolvido em camundongos contra o peptídeo J acoplado à albumina e a superfície de tripomastigotas previamente tratados por 6 horas com tunicamicina, inibidor da N-glicosilação, revelou uma drástica alteração quando comparada àquela vista com tripomastigotas não tratados: a reação com anti-J é 5 vezes maior na superfície de parasitas não N-glicosilados (**Figura 38**, anti-J).

Figura 38 – Reatividade entre anticorpo contra peptídeo J e tripomastigotas tratados (+ tun) ou não (- tun) com tunicamicina. Tripomastigotas de *T. cruzi* foram (+ tun) ou não (- tun) tratados por 6 horas, a 37°C, com tunicamicina, lavados e fixados a 4°C, por 30 min, com 2% paraformaldeído e incubados por 30 min, a 37°C, com anti-J diluído em PBS+1%BSA para marcação de proteínas de superfície. Ctrl neg representa parasitas tratados sem o anticorpo primário. Após lavagens, os parasitas foram incubados com anticorpo secundário acoplado a FITC, lavados e ressuspensos em PBS+glicerol na presença de corante para DNA *nuclear yellow*. Alíquotas foram avaliadas quanto a fluorescência para FITC e *nuclear yellow*, em leitor de ELISA, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A glicosilação da proteína Tc85-11 no último aminoácido referente à sequência de J, fragmento extremamente adesivo, pode representar a possibilidade da modulação de sua exposição em função de algum estímulo exógeno. Evidentemente, com base nesse tipo de ensaio, não é possível descartar a possibilidade de que glicoconjugados de outras moléculas de superfície do parasita estejam envolvidos na facilitação ou não da acessibilidade de J e esse é um ponto que deve ser melhor investigado.

Sua exposição modulada, no entanto, poderia ajudar a explicar a profunda diferença no padrão de adesão às células hospedeiras das diferentes formas de desenvolvimento do *T. cruzi*, a despeito de todas possuírem moléculas de superfície que contêm a sequência conservada representada pelo “domínio FLY”: epimastigotas, assim como os tripomastigotas, apresentam *trans*-sialidases, apesar de menos ativas (Zingales *et al.*, 1987); já a forma amastigota, que não apresenta atividade *trans*-sialidásica (Briones *et al.*, 1995), possui as ASP (*amastigote surface protein*), classificada como membro da superfamília das *trans*-sialidades e que contém, como todos os demais membros, a sequência conservada carboxi-subterminal (Santos *et al.*, 1997).

5. Discussão Geral

Tripomastigotas de *T. cruzi* apresentam em sua superfície um grupo de glicoproteínas estágio-específicas (Tc85) envolvidas no processo de invasão, componente da superfamília das gp85/*trans*-sialidases. Um membro desse grupo, denominado Tc85-11, foi clonado em nosso laboratório e suas porções amino- e carboxi-terminais implicadas na interação com ECM e membrana plasmática de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK₂), respectivamente.

Com relação à porção carboxi-terminal de Tc85-11, o fragmento subterminal conservado na superfamília, aqui denominado “domínio FLY”, foi caracterizado como ligante de células epiteliais, especificamente via CK18. O objetivo dessa tese foi elucidar a natureza dessa interação, bem como estudar a função de “domínio FLY” no mecanismo de invasão no contexto de Tc85-11.

5.1. Mapeamento do sítio de ligação de “domínio FLY” em CK18

Recentemente, nosso laboratório relatou a interação direta entre CK18 de células LLC-MK₂, e peptídeo J, fragmento da proteína Tc85-11, que contém o “domínio FLY” (Magdesian *et al.*, 2001), sequência conservada nos membros da superfamília das gp85/*trans*-sialidases e ainda sem função estabelecida (Frasch, 2000).

Dando início à caracterização molecular dessa interação, verificamos que J não se liga a proteínas de membrana plasmática de LLC-MK₂ nem a CK18 via resíduos de N-acetil-glicosamina. Excluímos também a participação de aminoácidos fosforilados no processo.

Dessa forma, valem-nos do uso das proteínas recombinantes CK18 e seus fragmentos amino- (NTCK18, com os 144 aminoácidos iniciais) e carboxi- (CTCK18, com os 201 aminoácidos finais) terminais, visando a caracterização do sítio de ligação do “domínio FLY” à proteína e observamos interação dose-dependente somente entre a porção amino-terminal e peptídeo J, o que sugere quaisquer dos 144 aminoácidos iniciais da proteína como sendo a região de ligação do “domínio FLY”.

A identificação de peptídeo PD, molécula selecionada em meio a uma biblioteca de *phage display* como interator de J, como análoga da porção amino-terminal de CK18, permitiu a localização do provável sítio de ligação de J à proteína pelo alinhamento entre as sequências de

aminoácidos de PD e NTCK18 e identificação de região com identidade localizada nos 15 primeiros aminoácidos de CK18.

Essa informação abre campo para a busca de moléculas inócuas à célula hospedeira, como por exemplo, o anticorpo monoclonal contra peptídeo PD, 4A5-5, e que possam bloquear, de forma sítio-dirigida, a interação entre tripomastigotas e células que se dá via “domínio FLY”, com potencial aplicação clínica na inibição da invasividade de tripomastigotas de *T. cruzi*.

A caracterização da porção amino-terminal de CK18 como ligante de peptídeo J, juntamente com o fato desta proteína ter sido identificada como receptor de J em superfície celular (Magdesian *et al.*, 2001), sugere a presença dessa região protéica apresentada de alguma forma à superfície da célula, viabilizando a interação com o “domínio FLY” e, por extensão, com Tc85 da superfície de tripomastigotas.

O fato da porção carboxi-terminal de CK8 ter sido descrita na superfície de células de carcinoma mamário (Hembrough *et al.*, 1996) corrobora esse achado, uma vez que CK8 e CK18 associam-se de forma anti-paralela e esse complexo dimeriza, formando tetrâmeros que compõem a unidade repetitiva do filamento intermediário de citoqueratina (Coulombe, 1993 e Stewart, 1993).

Além disso, recentemente foi caracterizada a participação de CK8/CK18 na modulação da sinalização anti-apoptótica da via de ERK1/2 (Gilbert *et al.*, 2004), que também está envolvida na invasão de tripomastigotas às células hospedeiras (Chuenkova & Pereira, 2001 e 2003; Mukherjee, 2004), o que reforça a hipótese sobre a importância da interação entre CK18 e “domínio FLY”.

Há, na literatura, uma série de relatos de algumas citoqueratinas apresentadas à superfície celular (Hembrough *et al.*, 1995; Hasan *et al.*, 1998; Sajjan *et al.*, 2000 e Tamura *et al.*, 2000, por exemplo). Nesses casos, a proteína, classicamente tida como componente do citoesqueleto e, portanto, citoplasmática, atua como receptor de diversos tipos de ligantes e geralmente está associada a mecanismos proteolíticos, como CK8 como receptor de plasminogênio, CK1 como receptor de cininogênio e CK18 como ligante de complexos trombina-antitrombinaIII, ou na interação com patógenos, como CK13 com *Burkholderia cepacia* e CK8 com *Streptococci* b.

Com base nos dados apresentados neste trabalho, entretanto, não é possível estabelecer a localização subcelular de CK18 em células epiteliais. Ao passo que determinamos o sítio de interação da proteína com “domínio FLY”, ligante de tripomastigotas, apresentamos dados que concordam com informações que dão conta que essa proteína é apresentada à superfície da

membrana plasmática em função da manipulação experimental, como tratamento prévio das células com proteases, por exemplo (Riopel *et al.*, 1993).

A despeito da localização celular de CK18, sua interação com “domínio FLY” é de extrema relevância no sistema *T. cruzi*-célula hospedeira. Se presente na membrana plasmática, ao interagir com tripomastigotas, ligando o “domínio FLY”, pode atuar como âncora, promovendo íntimo contato entre os parasitas e a célula alvo.

Caso, como acredita essa autora, entretanto, CK18 seja de fato uma proteína intracelular, sua interação com “domínio FLY” pode se dar após sua exposição ao meio extracelular, em função de estímulo secretório, como sugerem alguns de nossos dados, ou devido a ação de agente que permeie a membrana plasmática. Embasando essa hipótese, é sabido que os tripomastigotas secretam proteases e proteínas formadoras de poros em membranas (Burleigh *et al.*, 1997; Scharfstein *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 1990). Na presença desses fatores, CK18 poderia ser exposta e, finalmente, interagir com “domínio FLY”.

Outra possibilidade seria o papel de CK18 na interação com tripomastigotas emergentes da ruptura do vacúolo parasitóforo. Recentemente, a formação de filamentos de queratinas foi acompanhada *in vivo* por uso de células transfectadas com cDNA codificando para CK18 fluorescente e, apesar da formação se iniciar muito próximo às margens celulares, nenhuma fluorescência foi detectada a menos de 1 µm da membrana, em vários tipos celulares testados (Windoffer *et al.*, 2004). Assim, é possível que a interação entre tripomastigotas, via “domínio FLY” e CK18 se dê no citoplasma da célula hospedeira. Nesse caso, os parasitas podem, ao sair do vacúolo, interagir com CK18 que, em movimento centrípeto se dirige da periferia ao centro da célula (Windoffer & Leube, 1999).

5.2. Papel de “domínio FLY” na glicoproteína Tc85-11

Visando a caracterização do mecanismo de ação do “domínio FLY” na promoção da infecção por tripomastigotas, inicialmente, realizamos ensaios com peptídeo J acoplado a *beads* frente a células.

Com essa estratégia, verificamos que, ao contrário da hipótese de trabalho inicial, J não promove endocitose mas adere em células epiteliais, num processo de interação dependente de

tempo, cujo ponto máximo é atingido em 45 minutos seguido por substancial decréscimo (cerca de 50%) em períodos superiores a 1 hora de contato.

É sabido que os tripomastigotas são capazes de infectar *in vitro* uma grande variedade de células, usando um processo que envolve dois passos distintos (De Souza, 2002). Inicialmente, os parasitas aderem à superfície da célula alvo num processo mediado fundamentalmente pelo parasita e por glicoconjugados da superfície da célula hospedeira, o que é seguido pela etapa de internalização.

De acordo com esse mecanismo, observamos substancial interação de J com células em condições que não envolvem metabolismo celular, como em incubações a 4°C e com células pré-fixadas, condições utilizadas no estudo da etapa de adesão dos tripomastigotas às células hospedeiras (Andrews & Colli, 1982; Lima & Villalta, 1988).

A inibição dessa interação, observada em células pré-tratadas com quelante de íons Ca^{2+} permeável à membrana e com genisteína e ácido okadáico, inibidores de quinases de tirosina e serina/treonina, respectivamente, apesar de não ter sido total, sugere a participação adicional do “domínio FLY” em outras etapas do processo de invasão dos tripomastigotas. De fato, o tratamento de células epiteliais com *J-beads* por curtos períodos de tempo parece induzir a desfosforilação de resíduos de serina/treonina em CK18 (Magdesian, M.H., comunicação pessoal).

Corroborando dados anteriores de nosso laboratório (Magdesian, 2000), a interação entre “domínio FLY” e células epiteliais é absolutamente dependente da presença da leucina na sequência de J, uma vez que sua substituição por alanina, como visto em ensaios com peptídeo J-Ala acoplado a *beads*, aborta a adesão.

A presença de um único aminoácido (tirosina) crítico para a função protéica também é vista em motivos que medeiam endocitose independente de clatrina e *sorting* basolateral de receptores Fc em células polarizadas. Ainda nesses casos, há a presença de outro motivo, dileucina, essencial para esses processos (Hunziker *et al.*, 1994).

Apesar de termos demonstrado o não envolvimento de “domínio FLY” em processos endocíticos, resíduos de tirosina e leucina em sua sequência foram classificados como essenciais para sua função de adesão à célula (Magdesian, 2000).

Assim como visto na invasão de tripomastigotas a células não fagocíticas, que se dá preferencialmente pela região basolateral (Schenkman *et al.*, 1994), verificamos que o perfil de

distribuição de J-beads é predominantemente pericelular. Essa informação, somada ao fato de que a interação de “domínio FLY” com células, bem como com matriz extracelular, juntamente com seu efeito de induzir adesão de tripomastigotas à ECM, sugere a participação do “domínio FLY” também nas etapas de transposição das barreiras compostas pela lâmina basal e ECM, necessárias para o processo infectivo.

Esses dados indicam, ainda, que apesar de CK18 ter sido identificada como receptor de J, há uma certa promiscuidade no processo de adesão desempenhado por J, o que é corroborado, adicionalmente, pelo fato da porção extracelular da subunidade $\beta 3$ de Na^+, K^+ -ATPase, sem homologia em nível de aminoácidos com CK18, ter sido identificada como receptor para J em cardiomiócitos de rato (Sá-Júnior, P.L., 2005).

Uma vez que a estrutura tridimensional em folha β assumida por “domínio FLY” em Tc85-11 não parece ser relevante para sua função, já que peptídeo J em solução, onde adota estrutura *random coil*, ou apresentado na superfície de fagos, mantém sua capacidade adesiva. É possível que J participe de processos que envolvam interações hidrofóbicas, o que acarretaria polivalência em termos de ligantes e a necessidade da presença de leucina, ao invés de alanina, para manutenção da característica adesiva. Não temos, entretanto, indícios experimentais que corroborem essa hipótese.

Na busca do mecanismo de ação de “domínio FLY” em células epiteliais, investigamos eventuais alterações em CK18, seu receptor, que pudessem justificar a promoção da infecção. Em nossas condições de estudo, não verificamos alterações no perfil de distribuição subcelular clássico da proteína e não verificamos mudanças em seus níveis de fosforilação, glicosilação ou ubiquitinação (resultados não mostrados).

Ensaio de imunoprecipitação de células tratadas com o peptídeo com anticorpos contra CK18 e contra tubulina, proteína componente dos microtúbulos e também implicada como interatora de J (Magdesian, 2000), no entanto, nos indicaram que a presença de “domínio FLY” promove solubilização de proteínas do e/ou associadas ao citoesqueleto.

Apesar de, isoladamente, mudanças nos níveis de fosforilação ou glicosilação parecerem não alterar a solubilidade dos filamentos de CK8/18 (Chou *et al.*, 1993), há outros fatores que podem contribuir para o aumento da concentração de proteínas do citoesqueleto na forma solúvel.

Alterações em concentrações iônicas podem induzir o desarranjo de filamentos (Tölle *et al.*, 1987). Além disso, há relatos de proteínas e outros mediadores não protéicos que atuam como fatores de solubilização, ao se ligarem a componentes do citoesqueleto, como a proteína 14-3-3, com filamento intermediário de citoqueratinas (Liao & Omary, 1996), um peptídeo de 5 kDa, com filamento de actina (Safer *et al.*, 1990), e diacilglicerol, envolvido na nucleação de actina em sítios da membrana plasmática (Shariff & Luna, 1992), por exemplo. Com relação aos microtúbulos, um mecanismo de tirosinação-destirosinação de α -tubulina é implicado na estabilização do filamento (Gundersen *et al.*, 1984).

Assim, há diversas possibilidades de mecanismo de atuação de “domínio FLY” no que diz respeito à promoção da solubilidade das proteínas de citoesqueleto, porém esse efeito pode ocasionar aumento da plasticidade celular, o que pode estar relacionado com a facilitação da entrada de *T. cruzi* à célula hospedeira.

Além de aderir à célula e promover solubilização, “domínio FLY” parece modular a infecção por tripomastigotas, já que estimula o processo (Magdesian *et al.*, 2001) mas também induz secreção ao meio extracelular de material que inibe a invasão em cerca de 40%.

Nesse contexto, identificamos componentes protéicos que podem estar relacionados ao mecanismo de inibição da infectividade de tripomastigotas: a imunoprecipitação de meios condicionados por células tratadas com J com anticorpos contra citoqueratinas revela a presença, de proteínas ligantes de proteína A, com cerca de 70 kDa e outra com 30-40 kDa, além de, em bem menor quantidade, proteína de ~ 50 kDa (provavelmente CK18).

A presença de CK18, caracterizada como receptor de “domínio FLY” (Magdesian *et al.*, 2001), no meio extracelular poderia justificar a inibição observada quando tripomastigotas são ressuspensos em meio condicionado por LLC-MK₂ tratadas. Apesar de CK18 não possuir domínios transmembrânicos, especula-se que ela possa ser, de fato, secretada durante o *shedding* normal celular (Hembrough *et al.*, 1995). J poderia estar, então, estimulando esse processo “secretório” natural das células. Além disso, secreção de vimentina, proteína também componente de filamento intermediário, já foi descrita em outros sistemas celulares (Mor-Vaknin *et al.*, 2002), o que corrobora nosso achado.

Já a presença de proteínas, secretadas em função do tratamento celular com J, ligantes de proteína A é interessante. Proteína A é classicamente descrita como ligante de imunoglobulinas

(Sjödahl, 1977; Moks *et al.*, 1986) e uma vez que a presença de IgGs de diversas origens inibiu em cerca de 45% a adesão de *J-beads* às células (resultado não mostrado), é possível que molécula contendo motivo IgG-like esteja envolvida no mecanismo de atuação de “domínio FLY”.

Embasando nossa hipótese, a presença de IgGs ou de moléculas IgG-like parece estar relacionada à virulência e/ou sobrevivência de *T. cruzi*, já que tripomastigotas opsonizados com anticorpos de classe IgG são interiorizados por fagócitos, porém, sua destruição por macrófagos ativados é aumentada (Nogueira, 1983) e parasitas opsonizados por soro de camundongo infectado são menos infectivos (Scott & Moyes, 1982).

Apesar de não termos comprovado diretamente a participação das proteínas secretadas no mecanismo de inibição da infecção celular, e não podermos descartar uma eventual participação de outros fatores nesse processo, a modulação da invasão por tripomastigotas mediada por “domínio FLY” pode ser sugerida com base nessa estratégia experimental.

Em nossos ensaios, demonstramos a importância de íons de cálcio no processo de adesão desempenhado por “domínio FLY”: a inibição da concentração de Ca^{2+} livre intracelular diminui a interação entre *J-beads* e as células epiteliais de forma dose-dependente. Mostramos, ainda, que a presença de “domínio FLY” estimula a secreção de proteínas, inclusive, de membrana plasmática, para o meio extracelular e que esse meio condicionado inibe a infecção. Apesar de não ter sido estabelecida a conexão direta entre essas informações, é possível especular que alterações nos níveis de Ca^{2+} possam estimular o processo de secreção mediado por J, justificando a diminuição da sua adesão às células epiteliais. Deve-se enfatizar que tripomastigotas de *T. cruzi* utilizam como estratégia de invasão e sobrevivência um mecanismo natural das células de reparo da membrana plasmática com base na exocitose regulada por Ca^{2+} (Andrews, 2002).

A adesão de “domínio FLY” à célula hospedeira é suficientemente forte para se dar, inclusive, a 4°C, ao contrário do que é visto com os tripomastigotas (Schenkman *et al.*, 1991). *In vivo*, então, é possível que a exposição desse ligante seja modulada por processo dependente de energia. Rearranjo de moléculas da superfície de tripomastigotas é uma das possibilidades exploradas na literatura para justificar a dependência de temperatura nos processos de reconhecimento parasita-hospedeiro (Burleigh & Andrews, 1995), tido como mediado por interação receptor-ligante (Andrews *et al.*, 1984).

Nesse contexto, verificamos a presença de sítio de modificação pós-traducional por glicosilação em Tc85-11, no último aminoácido pertencente à sequência de J. Cabe ressaltar que, de acordo com nossas análises computacionais, embora a proteína apresente 8 sítios de N-glicosilação potencialmente glicosilados *in vivo*, apenas 3 deles se encontram no domínio carboxi-terminal, e um, está exatamente justaposto ao “domínio FLY”.

Já a reatividade de “domínio FLY” com o anticorpo contra peptídeo J é aumentada em 5 vezes quando os tripomastigotas são previamente tratados com tunicamicina, em condição que promove a não glicosilação, inclusive, de Tc85-11, que possui meia vida curta e é N-glicosilada. Assim, com base nessas informações, apesar de não podermos atribuir a alteração da exposição de J em função de desglucosilação especificamente em Tc85-11, já que a possibilidade de glicoconjugados de outras moléculas participarem do processo não foi afastada, é tentador sugerir a participação de des/glicosilação em J como moduladora da exposição do “domínio FLY”, presente na superfície dos tripomastigotas na Tc85, à célula hospedeira.

A apresentação diferenciada de “domínio FLY” às células pode ajudar a explicar a pronunciada diferença no perfil adesivo das diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*, embora todas apresentem essa sequência em moléculas de superfície (Zingales *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1997), bem como justificar o envolvimento de Tc85-11 em diversas fases do mecanismo de infecção dos tripomastigotas, como na etapa de transposição da ECM, representada pela adesão à laminina, via domínio amino-terminal (Marroquin-Quelopana *et al.*, 2004), na adesão e promoção da infecção (Magdesian *et al.*, 2001) e na modulação negativa da entrada de tripomastigotas em células epiteliais.

5.3. Considerações finais

Tc85 é, definitivamente, uma molécula intrigante, o que não poderia deixar de ser, já que é componente de um organismo inusitado, o *Trypanosoma cruzi*! Estudada há décadas, apesar de pertencer a uma superfamília protéica extensivamente pesquisada, a das gp85/*trans*-sialidases, ainda guarda muitas surpresas...

Neste trabalho, estudamos o “domínio FLY”, pequena parte da proteína, porém com sequência conservada na superfamília e sem função previamente determinada, e pudemos inferir sua participação no processo adesivo de tripomastigotas a ECM e, via porção amino-terminal de

CK18, às células hospedeiras, bem como na regulação da infecção, ao estimular, nas células epiteliais, secreção ao meio extracelular de material inibitório da invasão do parasita. Além disso, sugerimos a possibilidade da exposição do hidrofóbico “domínio FLY”, quando na superfície dos tripomastigotas, ser regulada por glicosilação de Tc85.

Há muito, ainda, por ser descoberto.

A precisa identificação da localização subcelular de CK18 em células epiteliais, indubitavelmente, fornecerá valiosa informação sobre, inicialmente, o momento de interação entre “domínio FLY” e a proteína: na entrada dos tripomastigotas na célula ou após sua saída do vacúolo parasitóforo? Nossos esforços nesse sentido foram infrutíferos, já que não foi possível a obtenção de uma boa imagem em nossos ensaios de imuno-microscopia eletrônica. Acreditamos, no entanto, que essa seja a melhor estratégia para dirimir essa dúvida: CK18 está na superfície de células LLC-MK₂ íntegras?

Quanto à secreção de material inibitório da infecção por tripomastigotas, observada em células epiteliais tratadas com “domínio FLY”, o sequenciamento das proteínas envolvidas é o primeiro passo para elucidar os mecanismos e funções desse processo. Lamentavelmente, em nossas tentativas, albumina bovina de soro fetal era contaminante constante e impossibilitou a caracterização protéica do material secretado. Estratégias de concentração e purificação do material previamente ao microsequenciamento, além do já testado fracionamento por eletroforese (resultado não mostrado), podem ser implementadas a fim de caracterizar a rota de secreção, na célula hospedeira, e o mecanismo de inibição da invasividade, nos tripomastigotas.

Finalmente, a possibilidade da modulação da exposição de “domínio FLY” por alteração nos níveis de glicosilação especificamente em Tc85 merece ser investigada. Uma vez que se trata de uma família heterogênea de proteínas, com vários membros, provavelmente com diferentes graus de glicosilação, simultaneamente expressos na superfície dos tripomastigotas, as técnicas tradicionais de purificação de proteínas por afinidade a lectinas utilizadas, não forneceram material suficiente para provar experimentalmente a existência da glicosilação em Tc85-11 na região do “domínio FLY”.

Apesar de não ser a única estratégia possível, a clonagem do gene da Tc85-11 em vetor adequado, que propicie a expressão da proteína com *tags* para sua purificação exclusiva, poderia facilitar a transfecção da proteína em tripomastigotas, ainda que de forma transiente, já que a meia

vida de Tc85-11 é curta. Assim, além de se obter ferramenta para estudar outros aspectos da função da proteína, seria possível o fácil isolamento da Tc85-11, devidamente processada pelo organismo e, portanto, submetida às modificações pós-traducionais necessárias. Valendo-se de estratégicos sítios proteolíticos presentes na proteína, poder-se-ia fragmentá-la, isolar a porção carboxi-terminal adjacente ao “domínio FLY” e determinar a composição de açúcares do fragmento, provando inequivocadamente e de forma alternativa à cristalografia, a presença da glicosilação em J.

Com tripomastigotas transfectados, poderia-se, ainda, avaliar a alteração no perfil de glicosilação de Tc85-11, por mutação de seus potenciais sítios, e a acessibilidade do “domínio FLY”, por exemplo, estudando a possibilidade de sua exposição modulada.

Após a obtenção das respostas de tais questões, juntamente com novos excitantes projetos de pesquisa, mais algumas peças, além das que adicionamos hoje com essa tese, serão montadas no quebra-cabeças complexo e apaixonante que *T. cruzi*, com sua Tc85 *et al.*, representa.

Conclusões

Com base em nossos estudos, que descrevemos nesse trabalho de doutorado, pudemos concluir que:

- O sítio de ligação do “domínio FLY” a CK18, previamente caracterizada como seu receptor (Magdesian *et al.*, 2001), localiza-se na extremidade amino-terminal da proteína, possivelmente entre seus primeiros 15 aminoácidos.
- O “domínio FLY” representa um fragmento das *trans*-sialidases extremamente adesivo, que interage com superfície de células não fagocíticas e ECM, provavelmente por meio de interações hidrofóbicas.
- A exposição do “domínio FLY” nas *trans*-sialidases pode ser regulada por glicosilação, já que a N-desglicosilação de tripomastigotas aumenta em cerca de 5 vezes a reatividade da superfície do parasita com anticorpo policlonal contra peptídeo J.
- “Domínio FLY” pode atuar como modulador da infecção por tripomastigotas, uma vez que estimula esse processo (Magdesian *et al.*, 2001) e promove secreção de proteínas ao sobrenadante extracelular, que inibe a invasão em ~ 40%.

Referências Bibliográficas

- Abuin, G., Colli, W., Souza, W. & Alves, M.J.M. (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, 229-238.
- Abuin, G., Couto, A. S., de Lederkremer, R. M., Casal, O. L., Galli, C., Colli, W., Alves, M.J.M. (1996) *Trypanosoma cruzi*: The Tc-85 surface glycoprotein shed by trypomastigotes bears a modified glycosylphosphatidylinositol anchor. *Exp. Parasitology* 82, 290-297.
- Abuin, G., Colli, W., Alves, M.J.M. (1996b) Turnover and shedding of the Tc85 surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 335-341.
- Acosta, A. Schenkman, R.P., Schenkman, S. (1994) Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucin-like glycoproteins linked to the parasite membrane by GPI anchors. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 27, 439-442.
- Albers, K. & Fuchs, E. (1992) The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int. Rev. Cytol.* 134, 243-279.
- Almeida-de-Faria, M., Freymuller, E., Colli, W., Alves, M.J.M. (1999) *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp. Parasitol.* 92, 263-274.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Alves, M.J.M. (1996) Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 831-833.
- Alves, M.J.M., Abuin, G., Kuwijima, V.J., Colli, W. (1986) Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 75-82.
- Amaya, M.F., Buschiazzi, A., Nguyen, T., Alzari, P.M. (2003) The high resolution structures of free and inhibitor-bound *Trypanosoma rangeli* sialidase and its comparison with *T. cruzi* trans-sialidase. *J. Mol. Biol.* 325, 773-784.
- Andrews, N.W. (2002) Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J. Cell Biol.* 158, 389-394.
- Andrews, N.W., Abrams, C.K., Slatin, S.L., Griffiths, F. (1990) A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61, 1277-1287.
- Andrews, N.W. & Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* 14, 447-451.
- Andrews, N.W., Katzin, A.M., Colli, W. (1984) Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Biochem.* 140, 599-604.
- Andrews, N.W. & Whitlow, M. B. (1989) Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 249-256.

Araguth, M.F., Rodrigues, M.M., Yoshida, N. (1988) *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypanosomes: neutralization by the stage-specific monoclonal antibody 1G7 and immunogenicity of 90 kDa surface antigen. *Parasitol. Immunol.* 10, 707-717.

Archakoo, A.I., Govorun, V.M., Dubanov, A.V., Ivanov, Y.D., Veselovsky, A.V., Lewl, P., Janssen, P. (2003) Protein-protein interactions as a target for drugs in proteomics. *Proteomics* 3, 380-391.

Asch, H.L., Mayhew, E., Lazo, R.O., Asch, B.B. (1993) Lipids covalently bound to keratins of mouse mammary epithelial cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 29, 1161-1169.

Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K.W., Einarsson, R. (2004) Clinical utility of cytokeratins as tumor makers. *Clin. Biochem.* 37, 529-540.

Barrett, M.P., Burchmore, R.J.S., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S. (2003) The trypanosomiasis. *The Lancet* 362, 1469-1475.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Netto, M. (2000) *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

Briones, M.R.S., Egima, C.M., Acosta, A., Schenkman, S. (1995) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase gene lacking C-terminal repeats and expressed in epimastigote forms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 9-17.

Boller, K., Kemler, R., Baribault, H., Doetschman, T. (1987) Differential distribution of cytokeratins after microinjection of anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *Eur. J. Cell. Biol.* 43, 459-468.

Burleigh, B.A. (2005) Host cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci. STKE* 293, pe36.

Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 175-200.

Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P., Andrews, N.W. (1997) A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 136, 609-620.

Burleson, G.R., Fuller, L.B., Menache, M.G., Graham, J.A. (1987) Poly(I):poly(C)-enhanced alveolar and peritoneal macrophage phagocytosis: quantification by a new method utilizing fluorescent beads. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 184, 468-476.

Buschiazzi, A., Tavares, G.A., Campetella, O., Spinelli, S., Cremona, M.L., Paris, G., Amaya, M. F., Frasch, A.C.C., Alzari, P.M. (2000) Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. *The EMBO Journal* 1, 16-24.

Buschiazzi, A., Amaya, M.F., Cremona, M.L., Frasch, A.C., Alzari, P.M. (2002) The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. *Mol. Cell* 10, 757-768.

Caler, E.V., Morty, R.E., Burleigh, B.A., Andrews, N.W. (2000) Dual role of signaling pathways leading to Ca^{2+} and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 68, 6602-6610.

Camargo, M.M., Almeida, I.C., Pereira, M.E., Ferguson, M.A., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T. (1997a) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. J. Immunol. 158, 5890-5901.

Camargo, M.M., Andrade, A.C., Almeida, I.C., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T. (1997b) Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well microbicidal activity in IFN- γ -primed macrophages. J. Immunol. 159, 6131-6139.

Carvalho, T.M.V. & de Souza, W. (1989) Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. Cell Struct. Funct. 14, 383-392.

Chan, R., Rossitto, P.v., Edwards, B.F., Cardiff, R.D. (1986) Presence of proteolytically processed keratins in the culture medium of MCF-7 cells. Cancer Res. 46, 6353-6359.

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acids Res. 31, 3497-3500.

Chou, C.F., Smith, A.J., Omary, M.B. (1992) Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. J. Biol. Chem. 267, 3901-3906.

Chou, C.F., Riopel, C.L., Rott, L.S., Omary, M.B. (1993) A significant soluble keratin fraction in "simple" epithelial cells: lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. J. Cell Sci. 105, 433-445.

Chuenkova, M.V., Furnari, F.B., Cavenee, W.K., Pereira, M.A. (2001) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9936-9941.

Chuenkova, M.V. & Pereira, M.A. (2003) PDNF, a human parasite-derived mimic of neurotrophic factors, prevents caspase activation, free radical formation, and death of dopaminergic cells exposed to the Parkinsonism-inducing neurotoxin MPP⁺. Brain Res. Mol. Brain Res. 119, 50-61.

Chuenkova, M.V. & Pereira, M.A. (2001) The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. Neuroreport 12, 3715-3718.

Colli, W. (1993) Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. FASEB J. 13, 1257-1264.

Coulombe, P.A. (1993) The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. Curr. Opin. Cell Biol. 5, 17-29.

Coulombe, P.A. & Omary, M.B. (2002) "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. Curr. Opin. Cell Biol. 14, 110-122.

Couto, A.S., Katzin, A.M., Colli, W., Lederkremer, R.M. (1987) Sialic acid in a complex oligosaccharide chain of the Tc-85 surface glycoprotein from the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 26, 145-154.

Couto, A.S., Gonçalves, M.F., Colli, W., Lederkremer, R.M. (1990) The N-linked carbohydrate chain of the 85-kilodalton glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* contains sialyl, fucosyl and galactosyl (α 1-3)galactose units. Mol. Biochem. Parasitol. 39, 101-108.

De Diego, J., Punzon, C., Duarte, M., Fresno, M. (1997) Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. J. Immunol. 159, 4983-4989.

Del Nery, E., Juliano, M.A., Lima, A.P., Scharfstein, J., Juliano, L. (1997) Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 272, 25713-25718.

Dersch, P. & Isberg, R.R. (1999) A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. EMBO J. 18, 1199-1213.

De Souza, W. (2002) Basic biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr. Pharm. Drugs Des. 8, 211-231.

Ditzel, H.J., Garrigues, U., Andersen, C.B., Larsen, M.K., Garrigues, H.J., Svejagaard, A., Hellström, I., Hellström, K.E., Jensenius, J.C. (1997) Modified cytokeratins expressed on the surface of carcinoma cells undergo endocytosis upon binding of human monoclonal antibody and its recombinant Fab fragment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 8110-8115.

Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro, M.E.M., Yoshida, N. (1995) Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. Mol. Biochem. Parasitol. 73, 285-289.

Dvorak, J.A. (1975) New *in vitro* approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. New Approaches Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub. 318, 109-120.

Dvorak, J.A. & Howe, C.L. (1976) The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells *in vitro*. J. Protozool. 23, 534-537.

Dvorak, A.M., Galli, S.J., Morgan, E., Galli, A.S., Hammond, M.E., Dvorak, H.F. (1982) Anaphylactic degranulation of guinea pig basophilic leukocytes. II. Evidence for regranulation of mature basophils during recovery from degranulation *in vitro*. Lab Invest. 46, 461-475.

Egima, C.M., Briones, M.R., Freitas Junior, L.H., Schenkman, R.P., Uemura, H., Schenkman, S. (1996) Organization of *trans*-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 77, 115-125.

Fernandez, M.A., Munoz-Fernandez, M.A. & Fresno, M. (1993) Involvement of *beta* 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. Eur J Immunol. 23, 552-557.

Fernandez, V., Treutiger, C.J., Nash, G.B., Wahlgren, M. (1998) Multiple adhesive phenotypes linked to resetting binding of erythrocytes in *Plasmodium falciparum* malaria. Infect. Immun. 66, 2969-2975.

Franchin, F., Pereira-Chiocola, V.L., Schenkman, S., Rodrigues, M.M. (1997) Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infect. Immun.* 65, 2548, 2554.

Frasch, A.C. (2000) Functional diversity in the *trans*-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 16, 282-286.

Giaimis, J., Lombard, Y., Makaya-Kumba, M., Fonteneau, P., Poindron, P. (1992) A new simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *J. Immunol. Meth.* 154, 185-193.

Giordano, R., Chammas, R., Veiga, S.S., Colli, W. & Alves, M.J.M. (1994) An acidic component of the heterogeneous Tc85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 85-94.

Giordano, R., Fouts, D., Tewari, D., Colli, W., Manning, J. & Alves, M.J.M. (1999) Cloning a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J. Biol. Chem.* 274, 3461-3468.

Girones, N. & Fresno, M. (2003) Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.* 19, 19-22.

Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997) Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.

Gundersen, G.G., Kalnoski, M.H., Bulinski, J.C. (1984) Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently *in vivo*. *Cell* 38, 779-789.

Gupta, R., Jung, E., Brunak, S. (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*.

Fuchs, E. & Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 345-382.

Fuchs, E. & Cleveland, D.W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Hartlieb, J., Koehler, N., Dickinson, R.S., Chhatwal, S., Sixma, J.J., Hartford, O. (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96, 2149-2156.

Hasan, A.A.K., Zisman, T., Schmaier, A.H. (1998) Identification of cytokeratin 1 as binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3615-3620.

Hashimoto, M., Nakajima-Shimada, J., Aoki, T. (2005) *Trypanosoma cruzi* posttranscriptionally up-regulates and exploits cellular FLIP for inhibition of death-inducing signal. *Mol. Biol. Cell.* 16, 3521-3528.

Hatzfeld, M. & Franke, W.W. (1985) Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J. Cell Biol.* 101, 1826-1841.

Hatzfeld, M. & Weber, K. (1990) The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J. Cell Biol.* 110, 1199-1210.

Hellio, R. & Ryter, A. (1985) Role of particle electrostatic in adhesion and ingestion in *Dictyostelium discoideum* amoeboid cells. *J. Cell Sci.* 79, 327-342.

Hembrough, T.A., Vasudevan, J., Allietta, M.M., Glass II, W.F., Gonias, S.L.A. (1995) Cytokeratin 8-like protein with plasminogen-binding activity is present on the external surfaces of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. *J. Cell Sci.* 108, 1071-1082.

Hembrough, T.A., Li, L., Gonias, S.L. (1996a) Cell surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 271, 25684-25691.

Hembrough, T.A., Kralovich, K.R., Li, L., Gonias, S.L. (1996b) Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochem. J.* 317, 763-769.

Hohenester, E. & Engel, J. (2002) Domains structure and organization in extracellular matrix proteins. *Matrix Biology* 21, 115-128.

Hunziker, W., Fumey, C., Höning, S., Kamel, L.C. (1994) Trafficking of immunoglobulin receptors in epithelial cells: signals and cellular factors. *Cell Biol. Intern.* 18, 321-325.

Jeanlez, R.W. & Codington, J.F. (1976) The biological role of sialic acid at the surface of the cell. In: Rosenberg A. & Scheggrund C.L. eds. *The biological role of sialic acid*. New York Plenum Press, 201-238.

Katzin, A.M. & Colli, W. (1983) Lectin receptors in *T. cruzi* an N-acetyl-D-glucosamine-containing glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochem. Biophys. Acta* 727, 403-411.

Kima, P.E., Burleigh, B., Andrews, N.W. (2000) Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 2, 477-486.

Kipnis, T.L., David, J.R., Alper, C.A. Sher, A., Dias da Silva, W. (1981) Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activation of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 602-605.

Krammer, A., Lu, H., Isralewitz, B., Schulten, K., Vogel, V. (1999) Forced unfolding of the fibronectin type III module reveals a tensile molecular recognition switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 1351-1356.

Kulesh, D.A., Ceceña, G., Darmon, Y.M., Vasseur, M., Oshima, R.G. (1989) Posttranslational regulation of keratins: degradation of mouse and human keratins 18 and 8. *Molecular and Cellular Biology* 9, 1553-1565.

Kulesh, D.A. & Oshima, R.G. (1988) Cloning of the human keratin 18 gene and its expression in nonepithelial mouse cells. *Mol. Cell Biol.* 8, 1540-1550.

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

Ley, V., Andrews, N.W., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 168, 649-659.

Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V., Andrews, N.W. (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* 171, 401-413.

Liao, J. & Omary, M.B. (1996) 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J. Cell Biol.* 133, 345-357.

Lima, M.F. & Villalta, F. (1989) *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 159-170.

Lopez, M., Huynh, C., Andrade, L.O., Pypaert, M. Andrews, N.W. (2002) Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 141-145.

Magdesian, M.H. (2000) Identificação do(s) receptor(es) da célula hospedeira para a família de glicoproteínas Tc85 presente na superfície do *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química – USP.

Magdesian, M.H., Giordano, R., Ulrich, H., Juliano, M.A., Juliano, L., Schumacher, R.I., Colli, W. & Alves, M.J.M. (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*: identification of a parasite ligand and its host-cell receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 19382-19389.

Malaga, S. & Yoshida, N. (2001) Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect. Immun.* 69, 353-359.

Marcon, G.E., Andrade, P.D., de Albuquerque, D.M., Wanderley, J. da S., de Almeida, E.A., Guariento, M.E., Costa, S.C. (2002) Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful sorologies. *Diagn. Microbiol. Infect.* 43, 39-43.

Marroquin, M.Q. (2003) *Trypanosoma cruzi* e a interação com a matriz extracelular: modelagem da proteína Tc85-11 e determinação do sítio de ligação a lamimina. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química – USP.

Marroquin-Quelopana, M., Oyama, S. Jr, Aguiar-Pertinhez, T., Spisni, A., Aparecida Juliano, M., Juliano, L., Colli, W., Alves, M.J. (2004) Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein and mapping the laminin-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 612-618.

Meirelles, M.N.L. & de Souza, W. (1983) Interaction of lysosomes with endocytic vacuoles in macrophages simultaneously infected with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 17, 327-334.

Ming, M., Ewen, M.E., Pereira, M.E.A. (1995) Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. *Cell* 82, 287-296.

- Milder, R. & Kloetzel, J. (1980) The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with host cell lysosomes and host cell fate. *Parasitology* 80, 139-145.
- Moks, T., Abrahamsen, L. Nillson, B., Heilman, U., Sjoquist, J. Uhlen, M. (1986) Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem.* 156, 637-643.
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.
- Moncayo, A. (1999) Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94, 401-404.
- Moody, T.N., Ochieng, J., Villalta, F. (2000) Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Lett.* 470, 305-308.
- Moreno, S.N., Silva, J., Vercesi, A.E., DoCampo, R. (1994) Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* 180, 1535-1540.
- Mortara, R.A. (1991) *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol.* 73, 1-14.
- Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K., Markovitz, D.M. (2002) Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nature Cell Biol.* 5, 59-63.
- Mukherjee, S., Huang, H., Petkova, S.B., Albanese, C., Pestell, R.G., Braunstein, V.L., Christ, G.J., Wittner, M., Lisanti, M.P., Berman, J.W., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B. (2004) *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Infect. Immun.* 72, 5274-5282.
- Nde, P.N., Simmons, K.J., Kleshchenko, Y.Y., Prata, P.S., Lima, M.F., Villalta, F. (2006) Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immunol.* 74, 1643-1648.
- Nogueira, N. (1983) Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Ciba Found Symp.* 99, 52-73.
- Nogueira, N. & Cohn, Z. (1976) *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 143, 1402-1420.
- Ortega-Barria, E. & Pereira, M.E.A. (1991) A novel *Trypanosoma cruzi* heparin binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* 67, 411-421.
- Ortega-Barria, E. & Pereira, M.E.A. (1992) Entry of *Trypanosoma cruzi* into eucaryotic cells. *Infect. Agents Dis.* 1, 136-145.
- Osuna, A., Rodríguez-Cabezas, M.N., Castanys, S., Mesa-Valles, M.C. (1995) A protein secreted by *Trypanosoma cruzi* capable of inducing the entry of inert particles into HeLa cells. *Int. J. Parasitol.* 25, 1213-1225.
- Ouaissi, M.A., Afchain, D., Capron, A., Grimaud, J.A. (1984) Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 308, 380-382.

Ouaissi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Grass-Masse, H., Tartar, A. (1986) *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. Science 234, 603-607.

Pereira, M.E.A., Loures, M.A., Villalta, F., Andrade, A.F.B. (1980) Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. J. Exp. Med. 152, 1375-1392.

Pereira, M.E.A., Santiago-Mejia, J., Frasch, A.C.C., Sanchez, D.O. (1991) The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, to YWTD repeats of the LDL receptor and to type III modules of fibronectin. J. Exp. Med. 174, 179-192.

Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature (London) 309, 30-33.

Piras, M.M., Henriquez, D., Piras, R. (1987) The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the *in vitro* penetration of *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes into fibroblastic cells. Mol. Biochem. Parasitol. 22, 135-13.

Pollevick, G.D., Affranchino, J.L., Frasch, A.C.C., Sanchez, D.O. (1991) The complete sequence of SAPA, a shed acute phase-antigen of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 47, 247-250.

Prata, A. (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis 1, 92-100.

Previato, J.O., Andrade, A.F.B., Pessolani, M.C.V., Mendonça-Previato, L. (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. Mol. Biochem. Parasitol. 16, 85-96.

Prioli, R.P., Mejia, J.S., Pereira, M.E.A. (1990a) Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of tripomastigotes, and enhance infection in vitro. J. Immunol. 144, 4384-4391.

Prioli, R.P., Rosenberg, I., Pereira, M.E.A. (1990b) High and low density lipoproteins enhance infection of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Mol. Biochem. Parasitol. 38, 191-198.

Procópio, D.O. & Mortara, R.A. (1994) The mechanisms used by two developmental stages of *Trypanosoma cruzi* to invade mammalian cells are different and may be dependent on the host cells. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89, 61

Procópio, D.O., Barros, H.C., Mortara, R.A. (1999) Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Cell. Biol. 78, 911-924.

Ramirez, M.I., Ruiz, R.C., Araya, J.E., Franco da Silveira, J., Yoshida, N. (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. Infect. Immun. 61, 3636-3641.

Rassi, A. Jr, Rassi, A., Little, W.C. (2000) Chagas heart disease. Clin. Cardiol. 23, 883-889.

Reichlin, M. (1980) Use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides. Methods Enzymol. 70, 159-165.

Riopel, C.L., Butt, I., Omary, M.B. (1993) Method of cell handling affects leakiness of cell surface labeling and detection of intracellular keratins. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 26, 77-87.

Rodríguez, A., Rioult, M.G., Ora, A., Anrews, N.W. (1995) A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell. Biol.* 129, 1263-1273.

Rodríguez, A., Samoff, E., Rioult, M.G., Chung, A., Andrews, N.W. (1996) Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell. Biol.* 134, 349-362.

Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J., Andrews, N.W. (1997) Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 137, 93-104.

Rodríguez, A., Martinez, I., Chung, A., Berlot, C.H., Andrews, N.W. (1999) cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 274, 16754-16759.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., Downward, J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89, 457-467.

Romaña, C. (1935) Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnostico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquistripanósica unilateral. (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad.) *Public MEPR* 22, 16-28.

Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Deisenhofer, J. (2002) Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* 298, 2353-2358.

Ruiz, R.C., Favoreto, S., Dorta, M.L., Oshiro, M.E.M., Ferreira, A.T., Manque, P.M. (1988) Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signaling activity. *Biochem. J.* 330, 505-511.

Saavedra, E., Herrera, M., Gao, W., Uemura, H., Pereira, M.A. (1999) The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulates interleukin 6 secretion in normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 190, 1825-1836.

Safer, D., Golla, R., Nachmias, V.T. (1990) Isolation of a 5-kilodalton actin-sequestering peptide from human blood platelets. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 2536-2540.

Sá-Júnior, P.L. (2005) Ligantes de miócitos cardíacos para a glicoproteína de 85kDa (Tc-85) de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas - Universidade de São Paulo.

Sajjan, U.S., Sylvester, F.A., Forstner, J.F. (2000) Cable-piliated *Burkholderia cepacia* binds to cytokeratin 13 of epithelial cells. *Infect. Immun.* 68, 1787-1795.

Sánchez, A., Pagan, R., Alvarez, A.M., Roncero, C., Vilaro, S., Benito, M., Fabregat, I. (1998) Transforming growth factor- β (TGF- β) and EGF promote cord-like structures that indicate terminal differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.* 242, 27-37.

- Santana, J.M., Grellier, P., Schrevel, J., Teixeira, A.R. (1997) A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem. J.* 325, 129-137.
- Santos, M.A.M., Garg, N., Tarleton, R.L. (1997) The identification and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* amastigote surface protein-1, a member of the *trans*-sialidase gene super-family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 1-11.
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M.M., Lima, A.P., Morrot, A., *et al* (2000) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. *J. Exp. Med.* 192, 1289-1300.
- Schariff, A. & Luna, E.J. (1992) Diacylglycerol-stimulated formation of actin nucleation sites at plasma membranes. *Science* 256, 245-247.
- Schauer, R. (1981) Chemistry, metabolism, and biologic functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40, 131-234.
- Schauer, R., Reuter, O., Mühlpfordt, H., Andrade, A.F.B., Pereira, M.E.A. (1983) The occurrence of N-acetyl- and N-glycolyl-neuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 364, 1053-1057.
- Schenkman, S. & Eichinger, D. (1993) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol. Today* 9, 218-225.
- Schenkman, R.P.S., Vandekerckhove, F., Schenkman, S. (1993) Mammalian cell sialic acid enhances *Trypanosoma cruzi* invasion. *Infect. Immun.* 61, 898-902.
- Schenkman, S., Andrews, N.W., Nussenzweig, V., Robbins, E.S. (1988) *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell* 55, 157-165.
- Schenkman, S., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. (1991) Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect. Immun.* 59, 645-654.
- Schenkman, S., Ferguson, M.A.J., Heise, N., Cardoso de Almeida, M.L., Mortara, R.A., Yoshida, N. (1993) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptor of sialic acid in a reaction catalyzed by a *trans*-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 293-304.
- Scott, M.T. & Moyes, L. (1982) ⁷⁵Se-methionine labeled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver.
- Sheard, M.A., Vojtesek, B., Simickova, M., Valik, D. (2002) Release of cytokeratin-18 and -19 fragments (TPS and CYFRA 21-1) into the extracellular space during apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 85, 670-677.
- Silen, A., Wiklund, B., Andersson, E.L., Nilsson, S. (1995) A novel IRMA and ELISA for quantifying cytokeratin 8 and 18 fragments in the sera of healthy individuals and cancer patients. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 55, 153-161.
- Silva, L.H.P. & Nussenzweig, V. (1953) Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20, 191-207.

Simmons, K.J., Nde, P.N., Kleshchenko, Y.Y., Lima, M.F., Villalta, F. (2006) Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks trypanosoma infection. FEBS Lett. 580, 2365-2370.

Sinai, A.P. & Joiner, K.A. (1997) Safe haven: The cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. Annu. Rev. Microbiol. 51, 415-462.

Sjödahl, J. (1977) Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*-arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. Eur. J. Biochem. 73, 343-351.

Soeiro, MdeN, Paiva, M.M., Barbosa, H.S., Meirelles, MdeN, Araujo-Jorge, T.C. (1999) Cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection. Cell. Struct. Funct. 24, 39-49.

Springer, T.A. (1998) An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. J. Mol. Biol. 283, 837-862.

Stewart, M. (1993) Intermediate filament structure and assembly. Curr. Opin. Cell Biol. 5, 3-11.

Takagi, J., Yang, Y., Liu, J.H., Wang, J.H., Springer, T.A. (2003) Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic beta-propeller interface. Nature 424, 969-974.

Tamura, G.S. & Nittayajarn, A. (2000) Group B Streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. Infect. Immun. 68, 2129-2134.

Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E., Andrews, N.W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. Cell 71, 1117-1130.

Tardieux, I., Nathanson, M.H., Andrews, N.W. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free Ca²⁺-transients. J. Exp. Med. 179, 1017-1022.

Teixeira, M.M.G. & Yoshida, N. (1986) Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 18, 271-282.

ter Haar, E., Harrison, S.C., Kirchhausen, T. (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1096-1100.

Tisi, L.C. & Evans, P.A. (1995) Conserved structural features on protein surfaces: small exterior hydrophobic clusters. J. Mol. Biol. 249, 251-258.

Todeschini, A.R., Dias, W.B., Girard, M.F., Wieruszeski, J-M., Mendonça-Previato, L., Previato, J.O. (2004) Enzymatically inactive *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds sialyl and β -galactopyranosyl residues in a sequential ordered mechanism. J. Biol. Chem. 279, 5323-5328.

Tölle, H.-G., Weber, K., Osborn, M. (1987) Keratin filament disruption in interphase and mitotic cells – how is it induced? Eur. J. Cell Biol. 43, 35-47.

Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U., Nussenzweig, V. (1995) The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology* 110, 547-554.

Vanamala, S.K., Seetharam, S., Yammani, R.R., Seetharam, B. (2003) Human transcobalamin II receptor binds to *Staphylococcus aureus* protein A: implications as to its structure and function. *Arch. Biochem. Biophys.* 411, 204-214.

WHO (2002) Control of Chagas disease. Second Edition. WHO: Technical Report. Series 905. Geneva.

Wilkovsky, S.E., Barbieri, M.A., Stahl, P.D., Isola, E.L. (2002) Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. *BBRC* 291, 516-521.

Windoffer, R., Wöll, S., Strnad, P., Leube, R.E. (2004) Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 2436-2448.

Woolfson, D.N., Evans, P.A., Hutchinson, E. G., Thornton, J. (1993) Topological and stereochemical restrictions in β -sandwich protein structures. *Protein Eng.* 6, 461-470.

Wong, E.S., Fong, C.W., Lim, J., Yusoff, P., Low, B.C., Langdon, W.Y., Guy, G.R. (2002) Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J.* 21, 4796-4808.

Woolsey, A.M., Sunwoo, L., Petersen, C.A., Brachmann, S.M., Cantley, L.C., Burleigh, B.A. (2003) Novel PI3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome and vacuole maturation. *J. Cell Sci.* 116, 3611-3622.

Woolsey, A.M. & Burleigh, B.A. (2004) Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell. Microb.* 6, 829-838.

Wyss, D.F. & Wagner, G. (1996) The structural role of sugars in glycoproteins. *Curr. Opinion Biotech.* 7, 409-416.

Yang, J., Clarke, J.F., Ester, C.J., Young, P.W., Kasuga, M., Holman, G.D. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase acts at an intracellular membrane site to enhance GLUT4 exocytosis in 3T3-L1 cells. *Biochem. J.* 313, 125-131.

Yoshida, N., Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro, M.E., Mortara, R.A., Acosta-Serrano, A., Favoreto Junior, S. (1997) Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 57-67.

Yoshida, N., Mortara, R.N., Araguth, M.F., Gonzalez, J.C., Russo, M. (1989) Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to de 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 57, 1663-1667.

Zingales, B., Katzin, A.M., Arruda, M.V., Colli, W. (1985) Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 21-34.

Zingales, B., Carniol, C., Lederkremer, R.M., Colli, W. (1987) Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 26, 135-144

Zingales, B. & Colli, W. (1995) *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. In: The Biology of Trypanosomes (Hudson, L., ed.). Springer Verlag, Berlin.

Curriculum vitae

Nome: Melissa Regina Fessel

Local e data de nascimento: São Paulo, SP – 23/01/1976

Educação:

Escola Técnica Oswaldo Cruz, São Paulo, SP – Técnico em Química (1991-1994).

Instituto de Química, Universidade de São Paulo – Bacharelado em Química (1996-1999).

Instituto de Química, Universidade de São Paulo – Pós Graduação em Bioquímica, Doutorado Direto (2001-2006).

Ocupação: Bolsista da FAPESP, DDIIV (processo nº 01/06936-0) até março/2006.

Publicações:

Fessel, M.R., Magdesian, M.H., Schumacher, R.I., Colli, W., Alves, M.J.M. Identification of CK18 binding site to the conserved *trans*-sialidase "FLY domain": implication on *Trypanosoma cruzi* infection of epithelial cells. Em preparação.