# Introdução

# 1. Trypanosoma cruzi: da Doença de Chagas à biologia celular

## 1.1 *Trypanosoma cruzi*: parasita causador da Doença de Chagas.

O Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, identificado por Carlos Chagas como agente etiológico da Tripanosomíase americana, também conhecida como Doença de Chagas (Chagas, 1909). O número de pessoas infectadas estimado é de 12-14 milhões apenas na América Latina (Dias, 2007) e outros 80 milhões estariam sob risco de infecção. Programas para reduzir o risco de infecção nas Américas, sob a liderança da Organização Mundial de Saúde, foram implementados na década de 90, resultando em significativa redução em alguns países, da prevalência da doenca de Chagas. Entretanto, é surpreendente o número recente de microepidemias descritas em diferentes regiões, incluindo áreas urbanas, devido ao consumo de material contaminado com o inseto transmissor do parasita ou suas fezes, como açaí, caldo de cana (Coura et al, 2002; Coura, 2006; revisto em Yoshida, 2009), ou suco de goiaba, servido em uma escola pública, resultando na infecção de 103 crianças (de Noya et al, 2010). Outras formas de contaminação importantes ocorrem via transfusão sanguínea, transplacentária, transfusão de órgãos ou ainda via oral.

As manifestações clínicas da doença podem ser as mais diversas, variando de casos assintomáticos até severas complicações da forma cardíaca, digestiva ou de

ambas. No homem, a infecção pode se iniciar com uma fase aguda, que normalmente dura cerca de 2 meses. Os sinais mais característicos da fase aguda são o chagoma (inchaço na região da picada) e o sinal de Romaña, (inchaço das pálpebras, região comumente preferida para a picada). Esta fase é seguida por uma fase crônica, que na maioria dos casos ocorre de forma assintomática. Após alguns anos, cerca de 20 a 35% destes indivíduos desenvolvem lesões irreversíveis no coração, sistema digestório ou ainda no sistema nervoso periférico (Moncayo *et al*, 2009). Um resumo da história da doença é apresentado na **Figura 1**.



**Figura 1.** História natural da doença de Chagas no homem. (Adaptado de Rassi Jr, Rassi e Marin-Neto, 2009).

A espécie *Trypanosoma cruzi* não forma uma população homogênea; o isolamento de populações de diferentes origens e seu estudo aprofundado mostraram a presença de uma extensa variedade de cepas com características distintas. Essa variedade intraespecífica refere-se à morfologia das formas sanguíneas, às curvas de parasitemia, à virulência, à patogenicidade e à sensibilidade a drogas. A principal causa da variabilidade observada é atribuída a variações genéticas do parasita (Williams-Banglero *et al*, 2003). Ainda assim, o *background* genético do hospedeiro e a capacidade de seu sistema imune de resposta à presença do parasita também contribuem para a evolução da doença. Esta diversidade deve estar relacionada à grande variedade de manifestações clínicas observadas na Doença de Chagas, embora tal associação não tenha sido estabelecida de maneira clara. Mas é importante observar que as diferentes formas são encontradas em diferentes proporções dentre os países sul-americanos: enquanto no Brasil predomina a forma assintomática com 60-70% dos casos, no Chile predomina a forma digestiva.

O impacto econômico causado pela doença é grande, além do custo social, incluindo morte prematura de grande número de pessoas em idade produtiva; alto gasto com pacientes crônicos; e invalidez causada pelas seqüelas da doença. A busca, intensificada principalmente nos últimos anos, de drogas anti-*T. cruzi* poderá alterar o quadro atual, caracterizado pela ausência de tratamento efetivo para a doença de Chagas. As drogas disponíveis atuam sobre os parasitas extracelulares e sua ação está restrita a determinadas cepas.

Os hospedeiros definitivos do parasita são invertebrados hematófagos da família *Reduviidae*, subfamília dos triatomídeos, popularmente conhecidos como barbeiros, termo utilizado devido ao fato de geralmente picarem a face, área mais propensa a ficar descoberta. Em geral são insetos lentos, pouco agressivos e de pouca mobilidade, podendo viver tanto em ambiente silvestre, como em domicílios e áreas circundantes (peridomicílios). Vários fatores contribuem para a transmissão do *T. cruzi* aos seres humanos. A infecção está diretamente relacionada ao grau de associação entre os barbeiros e o parasita, à colonização dos domicílios, à capacidade de proliferação, à quantidade de protozoários eliminados e ao tempo que o barbeiro leva para defecar.

#### **1.2 Características morfológicas do parasita**

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, caracterizado por apresentar uma organela específica que contém DNA próprio – o cinetoplasto. O *T. cruzi* possui um ciclo de vida complexo, apresentando diversas formas tanto no hospedeiro vertebrado, como no invertebrado. São três as formas classicamente descritas, baseadas principalmente em critérios morfológicos: 1) amastigotas, formas intracelulares arredondadas com cerca de 2,4 – 6,5 µm de diâmetro, apresentam um flagelo incipiente, presentes no citoplasma de células de mamífero e com capacidade de divisão; 2) tripomastigotas, formas infectantes, alongadas, com cerca de 18 µm de comprimento, incluindo um flagelo e sem capacidade de divisão, presentes tanto nos hospedeiros vertebrados como invertebrados; 3) epimastigotas, formas extracelulares flageladas, com cerca de 20-40 µm de comprimento e 2-5 µm de largura, não-infectantes e capazes de se multiplicar. Formas epimastigotas, com as mesmas características gerais, exceto pelo tamanho

15

(cerca de 5 vezes menores) foram também descritas no citoplasma de células de mamífero e chamadas de epimastigotas intracelulares (Almeida-de-Faria *et al*, 1999).



**Figura 2.** As duas principais formas do *Trypanosoma cruzi* em vertebrados: (a) tripomastigotas sanguíneos aderidos a células musculares cardíacas, e (b) amastigotas, no citoplasma de células musculares cardíacas. Imagens: IOC/Fiocruz.

A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a posição do flagelo são critérios importantes na classificação das formas. Dessa maneira, a forma invasiva, tripomastigota, caracteriza-se por ser alongada, com o cinetoplasto arredondado localizado posteriormente ao núcleo e flagelo emergindo da bolsa flagelar, esta posicionada lateralmente na região posterior do parasita. No inseto vetor é chamada tripomastigota metacíclico e no hospedeiro vertebrado, tripomastigota sangüíneo.

#### 1.3 Ciclo de vida

O ciclo se inicia no inseto da família Reduviidae quando este se alimenta do sangue de um vertebrado infectado com formas tripomastigotas sangüíneas presentes na circulação. No sistema digestivo do barbeiro, parte destes tripomastigotas sofre lise; os restantes diferenciam-se em epimastigotas, que migram para o intestino, onde se multiplicam e aderem à membrana perimicrovilar, secretada por células intestinais. Nas regiões mais posteriores do intestino do invertebrado, muitos epimastigotas se desligam da superfície e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são liberados juntos com as fezes e urina do barbeiro. A infecção de um hospedeiro mamífero, incluindo o homem, pode se dar via mucosa ocular ou lesão causada pela picada do triatomídeo. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem diferentes tipos celulares no local do inóculo, como células macrofágicas, fibroblastos, e células epiteliais. Após a interiorização, o parasita, dentro do vacúolo parasitóforo inicia sua diferenciação em amastigota e lise do vacúolo por enzimas secretadas pelo parasita, alcancando o citoplasma. O ciclo procede com divisões das formas amastigotas, passando por uma forma epimastigota-símile, dependente de prolina (Almeida-de-Faria et al, 1999; Tonelli et al, 2004), até atingir a forma tripomastigota, que é liberada para novo ciclo de infecção após lise celular (Figura 3). A infecção de novas células do hospedeiro invertebrado também pode ocorrer por formas amastigotas, como mostrado por diferentes autores (revisto em Mortara et al, 2008). Interessantemente, tripomastigotas são capazes de passar por células do hospedeiro sem estabelecer a infecção, o que aumenta ainda mais a complexidade da biologia do processo de invasão deste parasita (Schenkman, 1991a).

O metabolismo característico da célula hospedeira também está relacionado com o mecanismo de sobrevivência do parasita neste ambiente; aminoácidos como leucina, isoleucina e valina, não são sintetizados pelo T. cruzi (Silber et al, 2005), levando à dependência, portanto, da disponibilidade dessas substâncias no citoplasma da célula hospedeira. A capacidade de transporte de metabólitos pelo parasita também é essencial para sua sobrevivência. No caso específico de prolina, descrita como importante fonte de energia e de carbono em tripomastigotas metacíclicos, a capacidade de transporte desse aminoácido em cada estágio, relaciona-se com a sua concentração intracelular, com exceção das formas amastigotas: esta apresenta os maiores níveis de prolina livre, apesar de ser apenas detectável algum nível de transporte deste aminoácido (Silber et al, 2009), sugerindo que as fontes deste aminoácido poderiam ser proteínas do próprio parasita. Ainda nesse contexto da interação célula hospedeira-parasita, é importante ressaltar que o núcleo celular parece não ser essencial para a invasão, desenvolvimento e diferenciação do T. cruzi (Coimbra et al, 2007), apesar de o número de tripomastigotas em células enucleadas ser menor em relação a células nucleadas. Ainda assim, fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas demonstram aumento da expressão gênica 24h após infecção por T. cruzi, incluindo genes relacionados ao metabolismo e à sinalização. Por outro lado, genes relacionados à divisão celular têm sua expressão diminuída nos estágios finais da infecção, sugerindo que o parasita pode retardar ou impedir a progressão do ciclo celular da célula hospedeira (Costales et al, 2009).



**Figura 3. Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi.** O vetor libera formas epimastigotas e tripomastigotas metacícilicas junto com suas fezes e urina durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. No caso de células não fagocíticas profissionais, após adesão à membrana celular e conseqüente invasão, o parasita escapa do vacúolo parasitóforo e se multiplica no citoplasma celular sob a forma de amastigotas. A diferenciação destas formas em tripomastigotas ocorre através de formas intermediárias, incluindo uma forma epimastigota-símile. Tripomastigotas que são liberados na corrente sanguínea infectam novas células ou são inoculados pelo inseto vetor durante sua alimentação. No trato digestivo, os tripomastigotas metacíclicos ao final do trato digestivo. Formas intermediárias também são encontradas no trato digestório. Retirado de Alves, M.J.M. e Colli, W., 2008.

#### 1.4 Interação parasita-hospedeiro: processos de invasão e vias de sinalização

No hospedeiro invertebrado, o processo de adesão das formas epimatigotas ao intestino posterior parece ser crucial para a infectividade dos tripomastigotas metacíclicos – este processo de adesão é mediado por uma variedade de glicoconjugados expostos na membrana perimicrovilar do hospedeiro, além de glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) expostos na superfície do parasita. (Alves *et al*, 2007; Nogueira *et al*, 2007).

No hospedeiro vertebrado, antes de atingir a célula-alvo em diferentes órgãos, o *T. cruzi* deve ser capaz de ultrapassar uma série de barreiras, da circulação sangüínea ao interior das células, como a matriz extracelular, através de múltiplas interações com seus componentes, além da lâmina basal. Podem ser distinguidas duas formas principais de matriz extracelular: a matriz intersticial e a membrana basal. A membrana basal é altamente específica, e está presente na interface mesenquimal/epitelial da maioria dos tecidos, envolvendo fibras nervosas periféricas, músculos e adipócitos. Estão entre estes principais componentes da membrana basal que interagem com *T. cruzi*, a laminina (Giordano *et al*, 1999; Giordano *et al*, 1994b; Marroquin-Quelopana *et al*, 2004), o colágeno IV (Velge *et al*, 1988; Calvet *et al*, 2004), proteoglicanas de heparan-sulfato (Herrera *et al*, 1994; Calvet et al, 2003), fibronectina (Ouaissi *et al*, 1984; Ouaissi *et al*, 1985) e trombospondina (Ulrich *et al*, 2002; Fernandez *et al*, 1993).

Após atravessar a matriz extracelular, para que a infecção se estabeleça, o parasita deve interagir com a superfície da célula hospedeira. A partir desse instante, uma série de eventos é desencadeada: adesão e sinalização, internalização, escape do vacúolo parasitóforo e finalmente o processo de diferenciação e multiplicação no interior

da célula hospedeira. A identificação dos receptores do hospedeiro e respectivos ligantes e a sinalização desencadeada tem sido objeto de extensa literatura (revisto em Alves & Colli, 2007; Yoshida, 2006; de Souza, 2010).

#### 1.4.1 Processos de invasão

Os processos de invasão de amastigotas extracelulares são distintos daqueles utilizados pelas formas tripomastigotas, conforme sugerem uma variedade de trabalhos (revisto em Mortara *et al*, 2008). Nesta Introdução, o foco será restrito aos processos e mecanismos de adesão e invasão utilizados pelos tripomastigotas.

É possível discernir dois mecanismos gerais de invasão do *T. cruzi*. O primeiro é lisossomo-dependente, desencadeado pelo influxo de cálcio e polimerização de actina, que levam ao recrutamento de lisossomos na superfície celular. O papel do cálcio no processo de invasão pelo *T. cruzi* é atualmente bastante aceito, encontrando suporte em experimentos e modelos de diversos grupos de pesquisa. Trata-se de uma resposta extremamente rápida, desencadeada em cerca de 200 segundos após o reconhecimento do parasita pela célula hospedeira, que leva a um influxo de cálcio livre no citoplasma, de ambas as células (Moreno *et al*, 1994). Este influxo de cálcio é crucial para o recrutamento e a fusão de lisossomos com a membrana celular. O rearranjo de actina e outros microfilamentos também é cálcio-dependente, processos que estão relacionados com outros mecanismos propostos de invasão do parasita (Andrade e Andrews, 2005; Moreno *et al*, 1994; Burleigh e Woolsey, 2002; Alves *et al*, 2007; Alves e Mortara, 2009; Villalta *et al*, 2009).

O segundo mecanismo é lisossomo-independente, mediado pela membrana plasmática, com invaginação independente de polimerização de actina e dependente da sinalização via PI-3 quinase. (de Souza, 2002; Woolsey *et al*, 2003; Andrade e Andrews, 2005; Burleigh, 2005). Em ambos os processos a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos é crítica para o estabelecimento da infecção (Andrade e Andrews, 2004).

O estudo das vias de sinalização desencadeadas durante o processo de invasão por *T. cruzi* estava, até recentemente, restrito àquelas que se desenrolam na célula hospedeira (Burleigh *et al*, 1997; de Souza *et al*, 2010). Com o seqüenciamento do genoma (El-Sayed *et al*, 2005), entretanto, este cenário tem sofrido alteração, em particular com a descrição de 190 genes codificando quinases (sendo 19 atípicas) e 86 genes codificando fosfatases (Parsons *et al*, 2005; Brenchley *et al*, 2007). A maioria dessas fosfatases pertence à família serina/treonina; em relação aos genomas eucariotos, a proporção de tirosina-fosfatases é menor (Brenchley *et al*, 2007), o que é consistente com a ausência de tirosina-quinases.

Até o momento, todavia, pouco é conhecido sobre as vias de sinalização em *T. cruzi*, principalmente no processo de invasão.

# 1.4.2 A superfamília das gp85/Trans-sialidase e principais moléculas envolvidas na infecção de células por *T. cruzi*

Pelo menos 50% do genoma de *T. cruzi* consiste de grandes famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (EI-Sayed *et al*, 2005). As maiores famílias gênicas, incluindo aí pseudogenes, são a superfamília das

gp85/trans-sialidase com um total de 1430 membros, MASP, proteínas de superfície associadas a mucinas (MASPs, de mucin-associated surface proteins) com 1377 membros, as mucinas, num total de 863 membros, e as proteases de superfície gp63, que totalizam 425 membros.

A superfamília das gp85/TS, composta por aproximadamente por 700 genes, foi subdividida em diferentes grupos por diferentes autores (Colli, 1993; Schenkman *et al*, 1994; Cross e Takle, 1993). Frasch propõe dois grandes grupos (Frasch, 2000): o primeiro engloba glicoproteínas ancoradas via GPI com massa molecular variando de 120-200 kDa e que têm atividade de trans-sialidase (Schenkman *et al*, 1991b). O segundo grupo inclui as moléculas sem atividade de trans-sialidase, fazendo parte dela, portanto, a família gp85 (glicoproteínas de massa molecular variando de 80-90 kDa), uma proteína de cerca de 160 kDa envolvida na regulação do complemento e a Tc13 (de função atualmente desconhecida). Na família gp85 estão incluídas o grupo da Tc-85 (85 kDa, tripomastigota específica) (Katzin e Colli, 1983), gp82 (82 kDa, específica de tripomastigotas metacíclicos) (Ruiz *et al*, 1998), SA85-1 (antígeno de superfície, 85 kDa) (Kahn *et al*, 1999), TSA-1 (Fouts *et al*, 1991), gp90 e gp30 (Franco *et al*, 1993).

Os membros da superfamília gp85/TS apresentam, além de motivos de sialidase bacteriana, uma seqüência conservada de aminoácidos – VTVXNVFLYNR (motivo FLY ou VTV), próxima ao carboxi-terminal (**Figura 4**) e com propriedades adesivas às células hospedeiras. A citoqueratina 18 (CK18), possivelmente presente de forma transitória na superfície de células LLC-MK<sub>2</sub> (células epiteliais de rim de macaco), foi identificada como o receptor desta sequência (Magdesian *et al*, 2001). Um peptídeo sintético correspondente à sequência FLY é capaz de induzir um rearranjo do citoesqueleto na célula hospedeira, facilitando a invasão pelo *T. cruzi* (Magdesian *et al*,

2007) e de ativar a via de sinalização ERK1/2, como descrito para proteínas da superfamília Gp85/TS (Dias *et al*, 2008; Chuenkova e Pereira, 2000). Foi proposto recentemente que a interação com citoqueratina 18 seria importante para o estabelecimento da infecção intracelular do parasita, mas não para o processo de invasão propriamente dito (Claser *et al*, 2008).



**Figura 4.** Esquema da sequência dos genes da superfamília Gp85/TS. A superfamília Gp85/TS possui motivos conservados que a caracterizam: dois motivos de neuraminidase (Asp boxes) mais próximos da região N-terminal e uma sequência de aminoácidos VTVXNVFLYNR (conhecida por motivo FLY ou VTV), localizada mais próxima ao C-terminal.

Dos aproximadamente 140 genes que codificam proteínas do tipo trans-sialidase (TS), cerca de metade são compostas por formas inativas, devido a uma mutação em um resíduo de tirosina essencial à atividade enzimática, isto é, a transferência de ácido siálico de glicoconjugados para macromoléculas do parasita (revisto em Schenkman *et al*, 1994; De Lederkeremer e Augusti, 2009; Buscaglia *et al*, 2006), tais como as mucinas, moléculas de presença abundante na superfície do *T. cruzi*. A TS isolada de tripomastigotas contém uma repetição de 12 aminoácidos *in tandem* em sua região C-terminal, denominada SAPA, que se encontra ausente na TS isolada de epimastigotas. Tanto as formas ativa como a inativa da TS parecem estar envolvidas no processo de infecção. As TS inativas mantém a capacidade de ligação ao ácido siálico e à

galactose, o que implica essa região também na adesão (Todeschini *et al*, 2004), enquanto que as TS ativas catalisam a desialilação de algumas glicoproteínas de membrana lisossomal, evento importante para o mecanismo de escape do parasita do vacúolo parasitóforo, facilitando a formação de poros pela proteína Tc-Tox, secretada pelo *T. cruzi* (Andrews *et al*, 1990; Hall *et al*, 1992, Rubin-de-Cellis *et al*, 2006). A TS também está envolvida em uma variedade de processos de inibição do sistema imune do hospedeiro: a superfície sialilada permite ao parasita escapar do sistema complemento (Colli, 1993); compostos sialilados interagem com a proteína inibitória Siglec-E (*sialic acid-binding Ig-like lectin-E*), presente em células do sistema imune, inibindo a sua ativação (Jacobs *et al*, 2010) e por fim, a incorporação de ácido-siálico via TS também leva a apoptose de células do sistema imune (Mucci *et al*, 2006).

Além de participarem dos processos descritos, uma série de trabalhos descreveram envolvimento de regiões não-catalíticas da TS em eventos distintos, tais como a ativação de vias de sinalização relacionadas a sobrevida, como a sinalização via MAPK e PI3K/Akt em neurônios, células da glia, células dendríticas ou epiteliais (Chuenkova e Pereira, 2000 e 2005; Chuenkova *et al*, 2001; Melo-Jorge e Pereira, 2007), ativação de NF-KB, expressão de moléculas de adesão, aumento de invasão dos parasitas e bloqueio de apoptose em células endoteliais (Dias *et al*, 2008).

Nosso grupo demonstrou o envolvimento de uma família de glicoproteínas de cerca de 85 kDa de massa molecular, coletivamente chamadas de Tc-85, expressas em tripomastigotas e envolvidas na invasão de células hospedeiras (Abuin *et al*, 1989; Alves *et al*, 1986; Giordano *et al*, 1994a e 1999; Katzin e Colli, 1983). São glicoproteínas inseridas na membrana do tripomastigota via âncoras de GPI,

pertencentes à superfamília das gp85/trans-sialidase e sem atividade de trans-sialidase (Cross e Takle, 1993; El-Sayed *et al*, 2005). Uma forma equivalente, denominada gp82, está envolvida na invasão de células por tripomastigotas metacíclicos, além de ter papel na infecção por via oral do hospedeiro vertebrado (Yoshida, 2008). Na forma tripomastigota metacíclica, além da gp82, as glicoproteínas gp30 e gp90 têm papel no processo de infecção pelo *T. cruzi*, com a gp90 exercendo o papel de moduladora deste processo (Yoshida, 2006).

A expressão de Tc-85 e gp82, assim como a de outros genes em tripanosomatídeos (Palenchar e Bellofatto, 2006; Noé *et al*, 2008), é regulada por mecanismos pós-transcricionais (Abuin *et al*, 1999; Gentil *et al*, 2009).

#### 1.4.3 Interação de *T. cruzi* com a matriz extracelular do hospedeiro

Uma das primeiras interações descritas do parasita com elementos da matriz extracelular foi a interação de uma glicoproteína não caracterizada de 85 kDa com a sequência RGD da fibronectina (Ouaissi *et al*, 1984). Atualmente são conhecidas uma série de proteínas presentes na matriz extracelular com as quais o tripomastigota de *T. cruzi* interage, além da fibronectina: galectina-3 (Moody *et al*, 2000), colágeno IV (Velge *et al*, 1988), trombospondina-1 (Simmons *et al*, 2006), proteoglicanas do tipo heparam sulfato (Herrera *et al*, 1994; Calvet *et al*, 2003) e laminina (Giordano *et al*, 1999). Esta interação é apenas em parte mediada por mucinas e membros da superfamília gp85/TS. Em grande parte dos casos, o ligante específico não foi caracterizado (Ulrich *et al*, 2002; revisto em Alves e Colli, 2007). A participação de trombospondina e galectina-3, assim como de laminina, no processo de invasão, foi confirmada através da

técnica de silenciamento da expressão utilizando RNAi (Simmons *et al*, 2006; Moody *et al*, 2000; Nde *et al*, 2006).

A ligação de *T. cruzi* a proteoglicanos de heparam sulfato é mediada por uma proteína ligadora de heparina de massa molecular de 60 kDa, conhecida como penetrina ou gp60 (Herrera *et al*, 1994; Calvet *et al*, 2003). Cabe destacar que as conseqüentes alterações nos componentes da matriz extracelular levam não apenas à ligação do parasita, mas também à característica fibrose do tecido cardíaco que acompanha a Doença de Chagas (Vray *et al*, 2004; Andrade *et al*, 1989; Pinho *et al*, 2002).

O fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) tem sido implicado na formação de fibrose e no desenvolvimento da Doença de Chagas, assim como na supressão do sistema imune do hospedeiro (Araújo-Jorge *et al*, 2008). Os dados indicam que o parasita é capaz de obter TNF- $\beta$  do próprio hospedeiro, um passo que seria determinante para a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas (Waghabi *et al*, 2005). Um dos eventos que estaria contribuindo para a fibrose do coração seria a expressão induzida por estímulo de TNF- $\beta$  de genes codificando para fibronectina, trombospondina e colágeno I.

A glicoproteína gp83, liberada na matriz celular por meio da atividade da glicosilfosfatidilinositolfosfolipase C, ativada via MAP quinase e PKC e membros da superfamília da gp85/trans-sialidase, são algumas moléculas envolvidas no aumento da invasão de células hospedeiras. Interessantemente, proteínas da superfamília gp85/trans-sialidase podem ser liberadas de forma solúvel no meio extracelular ou

27

ligadas a membranas – vesículas (Gonçalves *et al*, 1991) – e podem estar envolvidas com o processo de infecção.



**Figura 5.** Moléculas envolvidas na infecção de células não-fagocíticas por *T. cruzi.* (adaptado de Colli e Alves, 2007). Uma variedade de moléculas de adesão, vias de sinalização desencadeadas por componentes do parasita e enzimas proteolíticas estão envolvidas no estabelecimento de uma infecção efetiva. O *T. cruzi* liga-se à matriz extracelular através de membros da Tc85 e outras moléculas, e à superfície celular através de múltiplas interações dependentes ou não de carboidrato.

Outra classe de moléculas presentes na superfície do parasita com participação no processo de adesão e internalização é a das mucinas (De Lederkeremer e Augusti, 2009; Villalta *et al*, 2009; Mendonça-Previato *et al*, 2005; Nogueira *et al*, 2007; Ruiz *et al*, 1998; Turner *et al*, 2002), que constituem a segunda maior família de genes. Mucinas são glicoproteínas ancoradas na membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI), e exercem importante papel na proteção do parasita durante seu estágio no sistema digestivo do inseto. O padrão de mucinas também varia entre as formas derivadas dos estágios percorridos no inseto (epimastigota e tripomastigota metacíclica – padrão característico homogêneo, com massa molecular de 30 e 50 kDa e as formas que se desenvolvem em tecidos de vertebrado, com massa molecular variando de 60 a 200kDa). Há ainda uma terceira classe de mucinas identificadas, conhecidas pelo termo "pequeno antígeno de superfície" (revisto em Buscaglia *et al*, 2006). A galectina-3 parece estar envolvida no processo de interação parasita-hospedeiro, mediando a ligação entre mucinas do parasita com a laminina e assim facilitando a interação deste com a matriz extracelular (Vray *et al*, 2004).

Nas formas tripomastigotas, proteínas mucina-símile, também ancoradas via GPI desencadeiam sinalização via MAPK e NF-κB através da ativação de receptores Tolllike (Moody et al, 2000, Nde et al, 2006), cuja resposta é responsável pelo reconhecimento de moléculas de origem bacteriana ou viral pelo hospedeiro. Formas tripomastigotas infectivas liberam um fator, de estrutura desconhecida até o momento e que tem participação na resposta ao Ca<sup>2+</sup> no hospedeiro, gerado pela ação de uma peptidase de 120 kDa (Burleigh e Andrews, 1995). A clonagem e o sequenciamento desta peptidase levou à caracterização da oligopeptidase B (Burleigh et al, 1997), assim chamada por ser uma enzima citosólica relacionada a serino-peptidases, membros da família de prolil oligopeptidases. Além destas, existem uma variedade de enzimas como a cruzipaina, a principal cisteíno proteinase de T. cruzi (Murta et al, 1990; Paiva et al, 1998; Scharfstein et al, 2000). а PPIso (peptidil-prolil-cis-trans-isomerase),

gp63/metaloproteases, proteinase POP Gp80, entre outras, envolvidas na infecção por *T. cruzi* (Moro *et al*, 1995; Cuevas *et al*, 2003; Santana *et al*, 1997).

Um resumo das principais moléculas envolvidas na infecção pelo T. cruzi encontra-se nas **Tabelas 1 e 2**.

**Tabela 1**. Proteínas de superfície de formas tripomastigotas derivados de cultura e tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* com ligação na matriz extracelular ou atividade proteolítica. Adaptada de Epting *et al*, 2010.

Proteína	Ligante/Alvo no hospedeiro	Função/Resposta		
Gp82	Mucina, ligante de superfície desconhecido.	Ligação, sinalização		
Gp63	Fibronectina, laminina.	Protease da matriz extracelular; ligação.		
Penetrina (gp60)	Heparan, heparan sulfato, colágeno.	Ligação.		
Tc-85/gp85/TS	Fibronenctina, laminina, citoqueratina 18.	Ligação, retenção.		
Gp90	Desconhecido.	Inibidor da invasão, sinalização.		
Mucinas/trans-sialidase	Glicoproteínas de superfície contendo o grupo 2,3-	Sialidase, imunógeno secretado		
	sialil (galectina 3).	(SAPA).		
Mucina p45	Desconhecido.	Ligação ao miócito cardíaco.		
Cruzipain	Bradicinina.	Cisteíno-proteases.		
POP Tc80 serino protease	Colágeno I e IV, fibronectina.	Protease da matriz extracelular.		

**Tabela 2**. Propriedades de sinalização de proteínas de superfície do *T. cruzi*. Adaptada de Epting *et al*, 2010.

Proteína	Sinalização
Gp82	Parasita: influxo de Ca <sup>2+</sup> , fosforilação de tirosina de Tc-p175 dependente de PLC.
Gp83	Parasita: influxo de Ca <sup>2+</sup> , hospedeiro: sinalização de MAPK.
Gp30	Parasita: influxo de Ca <sup>2+</sup>
Gp35/50	Parasita e hospedeiro: aumento de AMPc e cálcio.
Gp90	Fosfatase; potencialmente inibe a sinalização via gp82.
Cruzipain	Sinalização via bradicinina, influxo de Ca <sup>2+</sup> , formação de cinina.
Oligopeptidase B	Citosólica, clivagem de substrato de 120kDa, secretada, liberação direta de Ca <sup>2+</sup>

#### 1.4.4 Tc85 – proteína multi-adesiva

Tc85-11 e Tc85-45, membros da família Tc85 clonados em nosso laboratório, ligam-se pelo motivo FLY, região conservada nos membros das gp85/trans-sialidases a citoqueratina 18 (Magdesian *et al*, 2001), a vimentina e a outras citoqueratinas, como mostrado pela técnica de *phage display* (Tonelli *et al*, 2010). Ligam-se ainda a laminina pela sua porção N-terminal, sendo a ligação caracterizada para a Tc85-11 (Giordano *et al*, 1999; Marroquin-Quelopana *et al*, 2004). Além disso, havia evidências em nosso laboratório da existência de ligação da Tc85-11e Tc85-45 à superfície da célula hospedeira, na porção conhecida como H3.3 (**Figura 6**). H3.3 contém o epítopo do anticorpo monoclonal H1A10, anticorpo este que inibe parcialmente a invasão do *T.cruzi* e cuja presença definiu o grupo chamado Tc85 (Abuin *et al*, 1989).



Figura 6. Esquema da sequência H3.3 em relação à proteína recombinante Tc85-11.

Para identificar outros possíveis ligantes dos membros da Tc85, particularmente a adesão à célula, nosso laboratório utilizou a técnica de *phage display* (**Anexos**, **Figura A1**), que permitiu a identificação da sequência GGIALAG, presente no receptor de procineticina 2 (PKR2). Esse resultado permitiu formular a hipótese de que PKR2 seria um ligante da Tc85 (Renata Tonelli e Úrsula Urias, comunicação pessoal).

# 2. A via das Procineticinas e dos Receptores de Procineticinas

#### 2.1 As Procineticinas

As procineticinas (PKs) são peptídeos secretados que exercem funções em uma grande variedade de órgãos, como o trato gastrointestinal, e participam de diversos processos biológicos, como angiogênese (LeCouter *et al*, 2003; Guilini *et al*, 2009), hematopoiese (LeCouter *et al*, 2004), diferenciação de monócitos (Dorsch *et al*, 2005), ativação de macrófagos (Martucci *et al*, 2006), sobrevida neuronal (Melchiorri *et al*, 2001), ativação do bulbo olfatório (Ng *et al*, 2005; Matsumoto *et al*, 2006), motilidade gastrointestinal (Li *et al*, 2001), nocicepção (Negri *et al*, 2006; Hu *et al*, 2006), ritmo circadiano (Li e Hu *et al*, 2006; Cheng *et al*, 2002), coordenação do comportamento circadiano e sua fisiologia (Prosser *et al*, 2007) e função reprodutiva (revisto em Maldonado-Pérez *et al*, 2007).

As procineticinas foram inicialmente isoladas em 2001 pelo grupo de Zhou (Li *et al*, 2001), através de bibliotecas de cDNA, como potentes agentes mediadores de contração muscular no trato gastrointestinal. São membros da família AVIT de proteínas secretadas, homólogas à toxina intestinal de mamba 1 (MIT1 – mamba intestinal toxin 1) e Bv8 (isolada de *Bombina variegata*), peptídeos ricos em resíduos de cisteína. Foram identificados dois tipos de procineticinas: procineticina 1 e procineticina 2, que são excretadas, exercendo efeitos em diversos tecidos e órgãos. Ambas – de 86 e 81 aminoácidos respectivamente – conservam, assim como Bv8 e MIT1, um hexapeptídeo na região amino-terminal (localizado imediatamente antes do primeiro resíduo de

cisteína) e 10 resíduos de cisteína essenciais para as 5 ligações dissulfeto características dos peptídeos (Figura 7). PK1 foi também identificada na mesma época por outro grupo (LeCouter *et al*, 2001), e foi denominada "*endocrine gland vascular endothelial growth factor*".



**Figura 7.** Sequência primária das procineticinas. Em destaque, a sequência N-terminal AVITGA e as cisteínas conservadas. Retirado de Zhou, 2006.

Atualmente trabalhos apontam as procineticinas como sendo também potentes fatores mitógenos e de sobrevida em diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais (Kisliouk *et al*, 2005), neuronais (Ngan *et al*, 2007), linfócitos, células tronco hematopoiéticas e cardiomiócitos (Urayama *et al*, 2007).

As PKs estão amplamente expressas em tecidos de mamíferos (Bullock *et al*, 2003), além do trato gastrointestinal. Neste caso PK1 é mais abundante do que PK2 (**Tabela 3**).

Tecido	PK1	PK2
Ovário	Granulosa; corpo lúteo.	Não detectada.
Testículo	Células de Leydig.	Espermatócitos
Glândula adrenal	Células da glomerulosa; células	Células da glomerulosa; células
	fasciculadas.	fasciculadas; células endoteliais.
Placenta	Presente.	Presente.
Útero	Epitélio glandular; endotelial; células	Epitélio glandular; endotelial; células
	estromais; células musculares lisas.	estromais; células musculares lisas.
Cérebro	Baixa expressão.	Córtex cerebral; bulbo olfatório; células de
		Purkinje.
Trato intestinal	Plexo entérico; mucosa do intestino	Plexo entérico.
	embrionário.	
Coração	Tecido cardiovascular; células cardíacas.	Tecido cardiovascular; células cardíacas.
Medula óssea; sangue	Células B e T.	Células-tronco embrionárias; monócitos;
periférico		neutrófilos e células dendríticas.

**Tabela 3.** Distribuição das procineticinas. Adaptado de Ngan e Tam, 2008.

# 2.2 Os receptores de procineticina (PKRs)

A identificação dos dois receptores de procineticinas conhecidos veio logo em seguida à descoberta das PKs (Lin *et al*, 2002; Masuda *et al*, 2002) e os receptores foram denominados PKR (*prokineticin receptor*) 1 e 2, sendo que PKR1 liga-se tanto a PK1 como a PK2 e PKR2 liga-se preferencialmente a PK2. De fato, PK2 é o agonista mais potente para ambos os receptores sob condições fisiológicas (Soga *et al*, 2002; Lin *et al*, 2002), que apresentam 85% de sua sequência de aminoácidos idêntica (**Figura 8**).

PKR1	HUMAN	1	METTMGFMDDNATNTSTSFLSVLNPHGAHATSFPFNFSYS
PKR2	HUMAN	1	MAAQNGNTSFTPNFNPPQDHASSLSFNFSYG
PKR1	HUMAN	41	DYDMPLDEDEDVTNSRTFFAAKIV <mark>IGMALVGIMLVCGIGN</mark>
PKR2	HUMAN	32	DYDLPMDEDEDMTKTRTFFAAKIV <mark>IGIALAGI</mark> MLVCGIGN
PKR1	HUMAN	81	FIFIAALVRYKKLRNLTNLLIANLAISDFLVAIVCCPFEM
PKR2	HUMAN	72	FVFIAALTRYKKLRNLTNLLIANLAISDFLVAIICCPFEM
PKR1	HUMAN	121	DYYVVRQLSWEHGHVLCTSVNYLRTVSLYVSTNALLAIAI
PKR2	HUMAN	112	DYYVVRQLSWEHGHVLCASVNYLRTVSLYVSTNALLAIAI
PKR1	HUMAN	161	DRYLAIVHPLRPRMKCQTATGLIALVWTVSILIAIPSAYF
PKR2	HUMAN	152	DRYLAIVHPLKPRMNYQTASFLIALVWMVSILIAIPSAYF
PKR1	HUMAN	201	TTETVLVIVKSQEKIFCGQIWPVDQQLYYKSYFLFIFGIE
PKR2	HUMAN	192	ATETVLFIVKSQEKIFCGQIWPVDQQLYYKSYFLFIFGVE
PKR1	HUMAN	291	FVGPVVTMTLCYARMTRELWFKAVPGFQTEQIRKRLRCRR
PKR2	HUMAN	232	FVGPVVTMTLCYARISRELWFKAVPGFQTEQIRKRLRCRR
PKR1	HUMAN	281	KTVLVLMCILTAYVLCWAPFYGFTIVRDFFPTVFVKEKHY
PKR2	HUMAN	272	KTVLVLMCILTAYVLCWAPFYGFTIVRDFFPTVFVKEKHY
PKR1	HUMAN	321	LTAFYIVECIAMSNSMINTLCFVTVKNDTVKYFKKIMLLH
PKR2	HUMAN	312	LTAFYVVECIAMSNSMINTVCFVTVKNNTMKYFKKMMLLH
PKR1	HUMAN	361	WKASYNGGKSSADLDLKTIGMPATEEVDCIRLK
PKR2	HUMAN	351	WRPSQRGSKSSADLDLRTNGVPTTEEVDCIRLK

**Figura 8.** Alinhamento das sequências de aminoácidos dos receptores de procineticina 1 e 2, com as sequências GIALAG em PKR2 e GMALVG em PKR1 destacadas. Retirado de Maldonado-Pérez *et al*, 2007.

Os PKRs fazem parte da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). GPCRs são responsáveis pela maioria das respostas celulares a hormônios e neurotransmissores, assim como nos sentidos da visão, olfato e paladar (Bockaert e Pin, 1999). Estruturalmente, são receptores de membrana, com 7 domínios intramembrana, chamados domínios TM1 a TM7 (de *transmembrane*), e duas regiões terminais distintas: N-terminal extracelular e C-terminal intracelular (**Figura 9**). A transdução de sinal está associada a uma série de alterações na estrutura terciária do receptor, seguida de reconhecimento por outras proteínas intracelulares, em particular proteínas acopladas a G.



**Figura 9.** Esquema da estrutura de PKR2, mostrando os 7 domínios transmembranares e a provável localização da sequência GIALAG no início do primeiro destes domínios. Estão representados também possíveis sítios de formação de ligação dissulfeto e sítios putativos de fosforilação, com base na análise da sequência primária do receptor.

Ambos os receptores desencadeiam principalmente a via de sinalização G $\alpha_q$ , levando ao acúmulo de inositol fosfato e mobilização de Ca<sup>2+</sup>, e são expressos de maneira ubíqua em diversos tecidos (**Tabela 4**) (Negri *et al*, 2007; Ngan e Tam, 2008; Urayama *et al*, 2008). Os PKRs também foram implicados na ativação de MAPK (mitogen-activated protein kinase) via G $\alpha_o$ .

Os efeitos desencadeados por PKR1 ou PKR2, todavia, são bastante específicos, o que explicaria um padrão de expressão tecido-específico. PKR1 é expresso predominantemente, além do trato gastrointestinal, no sistema neuroendócrino, em macrófagos e órgãos reprodutivos. PKR2, por sua vez, é expresso principalmente nas glândulas tireóide, pituitária, testículo e ovário, além de estar presente no cérebro (**Tabela 4**) (Lin *et al*, 2002; Ngan e Tam, 2008). Recentemente mostrou-se que PKR2 é altamente expresso em células endoteliais fenestradas, como

as encontradas em glândulas endócrinas (LeCouter *et al*, 2001) no corpo lúteo, no rim e no fígado. A inativação do gene que codifica para PKR1 leva a desordens estruturais e funcionais no coração e nos rins (Boulberdaa *et al*, 2011), enquanto que mutações no gene que codifica para o receptor de procineticina 2 são responsáveis pela síndrome de Kallmann, uma desordem do desenvolvimento que leva ao hipogonadismo hipogonadotrópico congênito com anosmia ou hiposmia (Abreu *et al*, 2008).

Tecido	PKR1	PKR2
Ovário	Presente.	Presente.
Testículo	Células endoteliais do interstício.	Células endoteliais do interstício.
Glândula adrenal	Célula da glomerulosa; células fasciculadas;	Célula da glomerulosa; células fasciculadas.
	células endoteliais.	
Placenta	Presente.	Não detectado.
Útero	Epitélio glandular; endotelial; células estromais;	Epitélio glandular; endotelial; células
	células musculares lisas.	estromais; células musculares lisas.
Cérebro	Zona subventricular; via de migração rostral;	Zona subventricular; via de migração rostral;
	bulbo olfatório; hipocampo.	bulbo olfatório; hipocampo.
Trato intestinal	Plexo entérico; células da crista neural entérica.	Plexo entérico do íleoceco.
Coração	Tecido cardiovascular; células cardíacas.	
Medula óssea; sangue	Células tronco hematopoiéticas; células	Células tronco hematopoiéticas; células
periférico	sanguíneas maduras, incluindo linfócitos.	sanguíneas maduras, incluindo linfócitos.

 Tabela 4. Distribuição dos receptores de procineticinas. Adaptado de Ngan e Tam, 2008.

Apesar da alta identidade de aminoácidos entre os receptores, o efeito da ativação de um ou de outro receptor é bastante diferente. A superexpressão de PKR1 em cardiomiócitos de camundongos transgênicos promove angiogênese coronária posnatal e vasculogênese regulada via parácrina (Urayama *et al*, 2008). Além disso, a expressão transiente de PKR1 diminui a mortalidade e preserva a função ventricular esquerda do coração, aumenta a sobrevida dos cardiomiócitos em modelo de infarto do miocárdio (Urayama *et al*, 2007). Por outro lado, camundongos transgênicos com cardiomiócitos superexpressando PKR2 apresentam hipertrofia excêntrica e extravasamento vascular sob regulação parácrina (Urayama *et al*, 2009).

O *knock down* de PKR1 ou  $G_{\alpha 11}$  em células H5V (células endoteliais coronárias), que expressam predominantemente PKR1, inibe processos de proliferação, migração e angiogênese, enquanto que a superexpressão de PKR2 altera completamente o fenótipo deste tipo celular, que passa a apresentar características de células endoteliais fenestradas (Guilini *et al*, 2009). Estes eventos levam ao aumento da permeabilidade transcelular e seriam mediados via ativação de  $G_{\alpha 12}$ . Este efeito divergente foi confirmado utilizando células endoteliais aórticas humanas (HAEC, *human aortic endotelial cells*), que expressam apenas PKR1, e células endoteliais hepato-sinusoidal humanas (HHSEC, *human hepatic sinusoidal endothelial cells*), que expressam apenas PKR2: PK2 induz a formação de estruturas símiles a vasos sanguíneos em HAEC, mas levou à desorganização das junções aderentes em HHSEC (Guillini *et al*, 2009).

Estes dados explicariam o fato de PKR1 ser altamente expresso nas células endoteliais de arteríolas e vasos sanguíneos, e PKR2 ser altamente expresso em células endoteliais de fenótipo fenestrado (Podlovni *et a*l, 2006). Alguns trabalhos indicam que a variação de aminoácidos básicos localizados nas regiões de interação de PKR1 e PKR2 com proteínas G poderia ser uma das razões da diferença de sinalização mediada por um ou por outro receptor (Keramidas *et al*, 2008).

# **Objetivo Geral**

Uma vez que resultados preliminares sugeriram o receptor de procineticina 2 (PKR2) como ligante de proteínas do grupo Tc85 e que os receptores de procineticina são expressos em alguns órgãos classicamente afetados pela doença de Chagas, propusemo-nos a verificar o papel de PKRs na infecção de células pelo *Trypanosoma cruzi*.

## **Objetivos específicos**

- Verificar o papel de PKR1 e PKR2 na infecção de células por tripomastigotas de *T. cruzi*.
- Verificar o papel da sequência GIALAG, presente no PKR2 na infecção de células por tripomastigotas de *T. cruzi*.
- Determinar se o peptídeo GGIALAG induz a ativação de vias de sinalização, com fosforilação de proteínas de tripomastigotas de *T. cruzi*.

# Material e Métodos

#### 1. Culturas celulares

#### 1.1 Manutenção de células

Células MCF10A (epitélio mamário humano, cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dra Nathalie Cella) foram mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio DMEM/F12 (Gibco) contendo 5% de soro de cavalo (Invitrogen), 20ng/mL EGF (fator de crescimento epidermal – <u>e</u>pidermal growth <u>f</u>actor, Invitrogen), 100ng/mL toxina colérica (Sigma), 100µg/mL insulina (Invitrogen), 500ng/mL hidrocortisona (Sigma) e Penicilina/estreptomicina (1x, Invitrogen). O repique da cultura foi feito após o tratamento com 0,05% de tripsina (Cultilab) por 20-30min de incubação em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e as células foram ressuspensas em DMEM/F12 contendo 20% de soro de cavalo.

Células LLCMK<sub>2</sub> (epitélio de rim de macaco), células HEK293T (células embrionárias de rim humano) e células N1321 (astroglioma humano), foram mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio DME (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As células foram removidas do substrato por tratamento com tripsina 0,5%. As células 293T (HEK293T, células embrionárias de rim humano) e N1321 (astroglioma humano) foram cedidas pelo Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich.

Células CHO (chinese hamster ovary), e COS-7 (células <u>C</u>V-1 em <u>O</u>rigem carregando o genoma do vírus <u>S</u>V40, ou seja, células de origem de rim de macaco verde da África (CV-1) com uma versão do genoma do vírus SV40) foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino.

Células CLPs (célula endotelial de aorta de coelho selvagem – EC – clone CLPs), gentilmentes cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dra Helena Bonciani Nader (Unifesp) foram mantidas em meio HAM-F12 (Cultilab) contendo 10% de soro fetal bovino, e repicadas utilizando solução de pancreatina, 25g/L (Invitrogen – solução contrifugada e utilizado o sobrenadante).

#### 1.2 Manutenção de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y foram mantidos em culturas de células LLCMK<sub>2</sub>, em meio DME contendo 2% de soro fetal bovino. Os parasitas utilizados em ensaios de infecção são obtidos após o 5° ou 6° dia de infecção, quando ocorre o pico de liberação das formas tripomastigotas (Andrews e Colli, 1982).

#### 2. Ensaios de invasão por *T. cruzi*

## 2.1 Ensaio de inibição da invasão utilizando anticorpos

Células MCF10A (4x10<sup>4</sup>) foram adicionadas a lamínulas de vidro em placas de 24 poços e cultivadas como descrito acima. Após 24-48h foram incubadas com diferentes anticorpos - anti-PKR2 e anti-PKR1 (Abcam, soro total de coelho), anti-PKR2 N18 (Santa Cruz, IgG de cabra purificado) ou anti-PKR2 H49 (Santa Cruz, IgG coelho purificado) em diferentes diluições em meio DMEM/F12 sem soro, por 30min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As culturas foram infectadas na proporção de 100 parasitas por célula, por 3h, em meio DMEM/F12 com 2% de soro de cavalo e sem antibiótico, lavadas 2x com PBS, incubadas por mais 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e processadas para a determinação da infecção (Andrews e Colli, 1982).

O controle do experimento foi feito seguindo-se o mesmo protocolo, exceto pela substituição do anticorpo por soro normal (animal não imunizado) de coelho ou de camundongo, de acordo com o experimento ou ainda com a respectiva IgG purificada. Como controle da inibição da infecção, foi utilizado um anticorpo de rotina no laboratório que inibe a infecção: anticorpo policional anti-tripomastigota (1:50) obtido em coelho ou um anticorpo monocional que reconhece a Tc85 (denominado anti-G1/G8).

#### 2.2 Ensaio de inibição da invasão utilizando o peptídeo GGIALAG

Tripomastigotas cepa Y foram incubados em presença do peptídeo sintético (sintetizado pela Professora Maria Juliano, Unifesp) com a sequência GGIALAG, dissolvido em DMSO (40mM, Sigma), nas concentrações de 0,05 a 0,2mM. Após 30min sob leve agitação a 37°C, os parasitas foram adicionados a culturas de MCF10A a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, incubados por 3h, as culturas lavadas 2x com PBS e incubadas novamente a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24h, como descrito acima para os anticorpos. O controle foi feito com uma única concentração de DMSO correspondente à quantidade máxima do peptídeo utilizado (Magdesian *et al*, 2001).

## 2.3 Marcação e contagem da infecção

As culturas foram lavadas 2x com PBS para remoção dos parasitas externos, antes de serem fixadas em 2% de paraformaldeído (Invitrogen) por 30min. Para contagem dos parasitas internalizados, já no estágio de amastigotas, as lamínulas foram montadas em PBS/glicerol contendo 20µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole

(DAPI, Molecular Probes) para a coloração do núcleo. No caso do parasita, tanto o núcleo, quanto o cinetoplasto são corados. Foram contadas 300 células por lamínula e a quantidade de parasitas por célula (parasitas no entorno do núcleo), em microscópio de fluorescência e aumento de 20x. Cada ponto experimental foi feito em triplicata.

#### 3. Métodos gerais de análise

#### 3.1 Extração de proteína total das culturas celulares

Culturas mantidas em garrafas de 75mm<sup>2</sup> ou placas de 10 cm de diâmetro foram, após lavagem com PBS (2x), tratadas com 1mL de tampão RIPA (Radioimmunoprecipitation assay - 50mM Tris-HCl pH 8,0, 150mM NaCl, 0,5% ácido desoxicólico, 0,1% SDS, 1% NP-40 e 1mM CaCl<sub>2</sub>) modificado, complementado com os inibidores de protease aprotinina (Sigma, 1µg/mL), leupeptina (Sigma, 1µg/mL) e TLCK (1mM). O material foi mantido em agitação a 4°C por 15min para completar a lise e centrifugado a 14000g (Centrifuge 5417R, Eppendorf) por 15min, 4°C e o sobrenadante, que contém o extrato total de proteínas solubilizadas, foi separado e a proteína quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para separação da fração membranar foi utilizado o método de fracionamento por velocidade de sedimentação diferenciada após lise das células com tampão de homogeneização – 20mM Tris-HCl pH 7,5, 2mM EDTA, 10mM EGTA (Invitrogen), 0,25mM de sucrose, com adição dos inibidores de protease conforme descrito, além de inibidores de fosfatase de serina e treonina (1:300, Sigma) e de tirosina (1:300, Sigma).

Após ultracentrifugação a 100000g por 40min, a fração solúvel foi separada e o *pellet* solubilizado com a ajuda de um sonicador (Branson Sonifier 250, pulso constante durante 30min a 4°C) em tampão contendo 20mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 12mM de β-mercaptoetanol (Sigma), 10% de glicerol e 1% Triton-X100, adicionados os mesmos inibidores de proteases. A fração membranar é obtida após nova ultracentrifugação nas mesmas condições iniciais.

#### 3.2 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se uma curva-padrão para a BSA (Bio-Rad), em leitor de ELISA (Synergy HT, BIO-TEK) com valores de absorbância obtidos em 595nm.

#### 3.3 SDS-PAGE

Os extratos de proteínas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10-12%), contendo SDS como descrito (Laemmli, 1970). O gel unidimensional foi corado com Coomassie blue (Sigma, 2,5mg/mL de Comassie em 10% Ácido Acético e metanol/água 1:1 v/v) e o gel bidimensional corado com Coomassie coloidal (solução estoque com 0,1% p/v de Coomassie, 2% p/v de ácido orto-fosofórico e 10% p/v de sulfato de amônia, diluída 4:5 v/v em metanol)/ solução destaining (10% ácido acético e metanol/água 1:1 v/v).

#### 3.4 Western Blot

Após separação das proteínas por SDS-*PAGE*, estas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) usando tampão de transferência (25mM de Tris 150mM de glicina e 20% de metanol (pH 8,3)), mantido a 8°C. A membrana foi bloqueada com TBS (10mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl) contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-Tween) e 5% de leite desnatado (Molico) por 16h a 4°C em agitação. O anticorpo específico foi incubado em TBS-Tween contendo de 1% leite desnatado por 1h em temperatura ambiente, nas diluições adequadas. Após lavagem com TBS-Tween, a membrana foi incubada com o correspondente anticorpo secundário conjugado à peroxidase, para ser revelada com o kit ECL Plus Western Blotting Detection System (G.E. Healthcare); revelador e fixador radiográficos (AGFA).

#### 3.5 Imunofluorescência indireta

As células foram lavadas e fixadas em 2% de paraformaldeído por 30min à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS (3X), as células foram incubadas com o anticorpo primário diluído em 1% de BSA ou 5% de leite desnatado por 1h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS 3x, as culturas foram incubadas com o anticorpo secundário adequado, marcados com fluoresceína (FITC, Sigma) ou Alexa Fluor 488 ou 594 (Molecular Probes) em presença de 1% BSA por 1h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS (3X), os núcleos celulares foram marcados com 20µg/mL de DAPI (Molecular Probes), e as lamínulas montadas com VectaShield (Fluorescent Mounting Media, Vector Labs) para observação ao microscópio de fluorescência convencional ou confocal. As imagens adquiridas em microscópio

convencional (Nikon, modeo Eclipse E600) foram deconvoluídas utilizando o software Huygens (Scientific Volume Imaging). As imagens obtidas em microscópio confocal foram obtidas com auxílio de Adriana Yamaguti Matsukuma, responsável pela manipulação do microscópio (Zeiss LSM 510, Zeiss, Jena, Alemanha).

#### **3.6 Anticorpos utilizados**

Para marcação da proteína recombinante H3.3p foi utilizado um anticorpo monoclonal (G1/G8) obtido no laboratório em camundongo ou anti-cauda de His comercial, (Invitrogen). Os anticorpos obtidos para cada um dos receptores anti-PKR1 e antiPKR2 (Abcam, diluição 1:50), H49 (soro purificado anti-PKR2, obtido em coelho, Santa Cruz) e N18, (anti-PKR2, IgG de cabra purificada, Santa Cruz) foram incubados em presença de 1% de BSA. Os anticorpos anti-fibronectina (1:50) produzido em coelho e obtido pelo laboratório, o anticorpo monoclonal anti-citoqueratina 18 produzido em camundongo (Invitrogen, 1:50), anti-his (obtido em camundongo, 1:1000, Invitrogen) e e-caderina (obtido em camundongo, 1:50, Invitrogen) foram incubados com as células em presença de 0,1% de saponina (Sigma). O anticorpo anti-*flag* (obtido em camundongo, 1:5000, Invitrogen) foi utilizado nos testes de expressão em células.

Os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo, de coelho ou de burro ligados a Alexa Fluor 488 ou 594 (Molecular Probes), foram utilizados na diluição 1:500 e o anticorpo ligado a fluoresceína (FITC, Sigma) foram utilizados na diluição de 1:400.
#### 4. Ligação de H3.3p em células MCF10A

## 4.1 Obtenção de H3.3p purificado

Bactérias da cepa BL21Ril preparadas em CaCl<sub>2</sub> foram transformadas por choque térmico com 10ng do plasmídeo pTrcHis-B (Invitrogen, mapa em Figura 30, Anexos) contendo H3.3p, seguindo o seguinte protocolo: manutenção por 30 segundos no gelo, 2min a 42°C e rápido retorno ao gelo por 2min. Após crescimento a 37°C por 1h, a cultura foi semeada em placas LB/Ágar (Invitrogen) contendo 34µg/mL de cloranfenicol (Sigma) e 100µL/mL de ampicilina (AMRESCO) para a seleção dos clones. Uma colônia foi selecionada para ser amplificada em meio LB líquido contendo cloranfenicol e ampicilina, para ser testada a indução da expressão de H3.3p por 1mM de IPTG (isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo, Invitrogen) (Figura 10). O crescimento da cultura foi monitorado por espectrofotometria (Hitashi, modelo U-2000), até atingir a densidade óptica DO<sub>600</sub> aproximada de 0,5-0,6. A cultura induzida foi centrifugada (Sorvall RC5C, rotor GSA) por 20min a 5000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado congelado a -20°C. Para análise, este foi ressuspendido em tampão de lise (10mM Tris base, e inibidores de proteases: 5µg/mL de lisozima (Sigma), 0,5mM de PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride, AMRESCO) e 0,1mM de TLCK (tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, Sigma), na proporção de 20mL para cada 100mL de cultivo (Laemmli, 1970), homogeneizado por 20min à temperatura ambiente e lisado por sonicação (Branson Sonifier 250) utilizando 4 pulsos de 30 segundos cada e potência constante. O material foi então centrifugado a 15000rpm por 15min e 4°C (Sorvall RC5C rotor SS-34) para separação das frações solúvel e insolúvel. O precipitado proveniente da indução foi ressuspendido em 5mL do tampão de eluição (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-Cl, 8M uréia, pH 8,0) por grama de precipitado e mantido por 1h em temperatura ambiente em agitação. O material foi centrifugado a 10.000g por 20min e o sobrenadante (lisado) reservado. A resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) foi empacotada numa coluna (1mL de resina para cada 4mL de lisado), lavada com H<sub>2</sub>O Milli-Q, seguida de 5 volumes da coluna de tampão de eluição pH 8,0. O lisado foi aplicado na coluna, e o eluato coletado; seguiu-se lavagem com o mesmo tampão até que a absorbância a 280nm (A<sub>280</sub>) fosse menor que 0,01. A absorbância foi monitorada no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). Seguiu-se lavagem com os tampões de eluição com pH 6,3, pH 5,8 e pH 4,5 até se observar A<sub>280</sub> próxima de 0,01. Após quantificação das proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), separação por SDS-PAGE e Western Blot, foram selecionadas e reunidas as frações que continham a proteína H3.3p (Figura 10). A diálise do material foi feita utilizando uma membrana "Spectrapor" (23mm x 100ft e cut off 6000-8000) previamente tratada em água milliQ fervente por 5', e mantida com o material eluído em meio PBS por 1-2 dias, trocado pelo menos uma vez.



**Figura 10. Indução da expressão e purificação do H3.3p. (a)** Gel de poliacrilamida 10% corado com Coomassie blue das frações não induzida (coluna 2) e induzida (coluna 3); coluna 1, padrão (*Prestained* SDS-PAGE Standards, *Broad Range*, Bio-Rad). **(b)** *Western Blot* das frações não induzida (colunas 1 e 3) e induzida (colunas 2 e 4), reveladas tanto com o anticorpo anti-his (colunas 1 e 2, 1:1000) como com o monoclonal anti-H3.3p (anti-G1/G8) apresentam padrões semelhantes de bandas: o H3.3p (aproximadamente 15 kDa) e suas formas dimérica (banda mais forte, aproximadamente 30 kDa), trimérica (aproximadamente 45 kDa) e possivelmente maiores formas agregadas. A seta indica o monômero e as cabeças de flecha o dímero e o trímero correspondente do H3.3p.

#### 4.2 Ligação de H3.3p purificado em culturas de MCF10A fixadas

Culturas de células MCF10A, cultivadas em lamínulas por 24-48h e mantidas em DMEM/F12 com 5% de soro de cavalo foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 2% por 30min. O material foi lavado 2x com PBS e mantido a 8°C em PBS para análise, quando necessário. As culturas foram incubadas com 50µg de H3.3p em presença de 1% de BSA (Sigma) ou com 50µg de BSA, em PBS, por 1h à temperatura ambiente e leve agitação. Seguiu-se a metodologia geral descrita no item

de imunofluorescência indireta, utilizando o anticorpo monoclonal G1/G8 (que reconhece H3.3p). Os núcleos celulares foram marcados com (DAPI), 20μg/mL (Molecular Probes), e as lamínulas montadas com VectaShield (Fluorescent Mounting Media, Vector Labs).

# 4.3 Ligação de H3.3p em extratos de células MCF10A

Extratos totais de células MCF10A, tratados conforme descrito, foram submetidos a *Western Blot* e a membrana de nitrocelulose foi tratada com leite desnatado, como descrito acima. A seguir, as membranas foram incubadas com a proteína H3.3p purificada (1µg/mL), na presença ou ausência do peptídeo sintético GGIALAG (4µg/mL). Seguiu-se o protocolo descrito para incubação dos anticorpos primários (monoclonal G1/G8) e secundários (anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase).

# 5. Obtenção de anticorpo contra o peptídeo sintético GGIALAG

# 5.1 Ligação do peptídeo a BSA

1mg do peptídeo foi ligado covalentemente a 1 mg de albumina bovina (BSA) em reação contendo 1% de glutaraldeído (Sigma) a 4°C por 16h. O material foi em seguida dialisado por 16h em PBS em membrana "Spectrapor" (23mm x 100ft e *cut off* 6000-8000) previamente tratada em água milliQ fervente por 5min.

# 5.2 Obtenção de anticorpo policional

Camundongos Balb/c de aproximadamente 1,5 meses de idade foram imunizados com 10µg do peptídeo ligado a BSA ou apenas com BSA em adjuvante de Freund (Sigma). O primeiro inóculo foi feito com adjuvante completo e os demais com adjuvante incompleto, com intervalo de 7-10 dias entre os inóculos. A obtenção dos anticorpos produzidos ao longo do tempo foi feita retirando-se uma amostra do sangue da veia da cauda. O material foi centrifugado a 10000g por 10min para separação do soro. Este foi testado em diferentes diluições em imunofluorescência indireta, em culturas de MCF10A pré-tratadas em paraformaldeído 2%, como descrito acima.

# 5.3 Co-localização de anti-PKR2 e anti-GGIALAG

Culturas de células MCF10A tratadas previamente com paraformaldeído 2% foram incubadas com o anticorpo anti-PKR2 (1:50) obtido em coelho e o anticorpo policional obtido em camundongos no IQUSP, anti-GGIALAG (1:25), em presença de 1% de BSA. As lavagens, incubação dos secundários e montagem das lamínulas foram feitas conforme já descrito. Como anticorpos secundários utilizou-se anticorpo conjugado a Alexa Fluor.

# 6. Análise da via de sinalização mediada pelo peptídeo GGIALAG em T. cruzi.

#### 6.1. Preparação dos extratos de proteína

Para obtenção dos extratos protéicos, os parasitas, incubados ou não com o peptídeo GGIALAG, foram rompidos pela adição de DeStreak Rehydration solution (GE Healthcare) adicionado de inibidores de fosfatases (5mM NaF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e 50µM β-Glicerofosfato de Sódio) e proteases (*Protease Inhibitor Cocktail* (SIGMA-ALDRICH) e 1mM PMSF), submetidos a sonicação (10min em pulso contínuo), seguido de centrifugação a 13000 rpm por 5min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes (Laemmli, 1970) para verificação da qualidade dos extratos, os quais foram posteriormente submetidos a 2D-PAGE.

# 6.2 Separação das proteínas em Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)

A análise das proteínas fosforiladas e totais foi realizada em gel bidimensional, utilizando-se o sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Para a primeira dimensão foram utilizadas fitas de IPG (immobilized pH) de 13cm com gradiente de pH linear de 4 a 7. Após esta separação, as fitas foram aplicadas em gel SDS-PAGE convencional. O gel foi corado com PRO-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen), para a visualização das proteínas fosforiladas, e posteriormente com Coomassie coloidal, para a visualização das proteínas totais.

A visualização das proteínas fosforiladas foi feita pelo scanner Typhoon Trio (GE Healthcare) e a visualização das proteínas totais pelo ImageScanner III (GE Healthcare). Futuramente, a análise da variação de fosforilação entre as proteínas do parasita, incubado ou não com o peptídeo, será realizada pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare).

# 7. Clonagem dos Receptores de Procineticina

#### 7.1 Obtenção dos receptores de procineticina humanos

Plasmídeos pCR2.1 (Invitrogen, **Figura A3** em **Anexos**) contendo o gene clonado para PKR 1 ou PKR2 humanos foram gentilmente cedidos pelo grupo de Shunichiro Matsumoto (Functional Genomics Molecular Medicine Research Labs – Japan). A confirmação da presença dos insertos foi feita através de digestão com a enzima de restrição Xbal (protocolo conforme o fabricante). Primers para os dois receptores, contendo sítios para as enzimas de restrição BamHI (primer foward) e Xhol (primer reverse) – concentração final de 10pmol – foram utilizados para a amplificação dos cDNAs através de uma PCR (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems). Os pares de primers constam da **Tabela A1 (Anexos**).

As condições utilizadas na PCR foram: 5min a 94°C, seguidos de 30 ciclos que constituíam 30 segundos a 94°C para desnaturação da dupla-fita do DNA molde, 30 segundos a 58-60°C para pareamento dos "*primers*" (temperatura de *melting*) e 1min a 72°C para polimerização do DNA pela Taq polimerase, seguidos de mais 10min a 72°C para terminar a reação.

Os produtos da PCR (PKR1 ou 2), de cerca de 1,2kp, foram isolados do gel através do kit de purificação Wizard SV Gel Clean-Up System (Promega) e as amostras

quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific) por absorbância a 260nm.

Extratos de RNA total (TRIzol, Invitrogen, protocolo conforme o fabricante) de culturas de linhagens celulares foram utilizados para se verificar a presença de PKRs utilizando RT-PCR (descrita no item seguinte).

#### 7.2 PCR Reversa (RT-PCR)

A reação (Super ScriptIII – Invitrogen) foi realizada com cerca de 1µg de RNA, em mistura contendo dinucleotídeos, *primers* (*primers específicos* (sequências em **Tabela A1**, em **Anexos**), *random hexamers* ou oligo dT) e previamente aquecida a 85°C por 3min (para desfazer as ligações entre o próprio RNA), seguida de 65°C por 5min antes da adição da enzima. A reação foi mantida a 50°C por 55min e inativada a 85°C por 5min.

Após a reação, os produtos foram submetidos a uma PCR – utilizando primers contendo sítios para as enzimas de restrição HindIII/EcoRI ou BamHI/XhoI para PKR1 e HindIII/XhoI para PKR2. O produto obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 7.3 Clonagem de PKR1 ou PKR2 humanos no vetor pGEM®-T Easy

Os produtos de PCR correspondentes aos receptores foram inseridos no plasmídeo pGEM® (Promega, mapa em **Anexos**, **Figura A4**) utilizando DNA T4 ligase (Fermentas) em reação a 16°C por 16h, e transformados por eletroporação em bactérias *E. coli*, cepa DH5α eletrocompetentes, mantidas a -80°C em 20% de glicerol.

As culturas foram semeadas em placas de petri contendo LB 1,5% de ágar e ampicilina (100µg/mL), e mantidas por cerca de 18h em estufa a 37°C e temperatura ambiente. Dentre as colônias crescidas, uma série foi selecionada e analisada quanto à presença do inserto através de PCR. As colônias positivas foram cultivadas em meio LB líquido contendo o antibiótico de seleção para purificação do plasmídeo através de uma *miniprep* (Qiagen, protocolo conforme o fabricante).

#### 7.4 Obtenção do plasmídeo pCDNA3.0 5'F contendo os genes de PKRs

Os plasmídeos pCDNA3.0 5'F (Invitrogen, Mapa em **Anexos**, **Figura A5** – este plasmídeo contém uma sequência inserida no sítio de restrição HindIII que codifica para um flag – correspondente aos aminoácidos MDYKDDDDY), cedidos pelo laboratório da Prof<sup>a</sup> Dra. Bettina Malnic, foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e Xhol. Os insertos obtidos por digestão das construções no plasmídeo pGEM foram ligados ao pCDNA3.0 5'F respectivo com a enzima DNA T4 ligase, para serem transformados por eletroporação de cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Colônias crescidas foram testadas através de PCR e confirmadas para a presença do inserto após digestão do plasmídeo purificado (mini-prep).

# 7.5 Transfecção de células CHO com lipofectamina

Células de linhagem CHO (chinese hamster ovary), cultivadas em RPMI com 10% de soro fetal bovino, como descrito acima, foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.0 5'F/PKR1 ou PKR2 utilizando lipofectamina (Lipofectamine<sup>™</sup> 2000 Invitrogen), numa proporção de 2,5µL por µg de DNA, de acordo com o protocolo do fabricante. As células transfectadas foram selecionadas utilizando o antibiótico geneticina (400µg/mL).

# 7.6 Sequenciamento dos plasmídeos contendo as sequências de PKRs humanos

A reação foi feita utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e 100-200ng de material, de acordo com o fabricante. O programa do termociclador consistiu num pré-aquecimento a 96°C por 2min, seguido de 35 ciclos de 96°C por 45 segundos, 52°C por 30 segundos e 60°C por 4min, seguido de precipitação do material com glicogênio (concentração final de 0,01%). O sequenciamento foi feito no aparelho ABI PRISM<sup>®</sup> 3100GeneticAnalyzer/HITACHI pelo serviço de sequenciamento do IQUSP.

Para o seqüenciamento dos receptores, foram utilizados, além dos primers *forward* e *reverse*, 2 *primers* internos (sequência em **Tabela A1**, **Anexos**), a fim de que os fragmentos sequenciados pudessem ser alinhados sem dúvida da sequência.

# 7.7 Clonagem de PKR1 ou 2 no vetor de expressão pET28a<sup>(+)</sup>

O plasmídeo pGEM<sup>®</sup>/PKR1 ou 2 foi digerido duplamente utilizando as enzimas de restrição BamHI e XhoI (Fermentas, protocolo segundo o fabricante), a fim de liberar os insertos contendo os genes dos receptores de procineticina. A banda de interesse (com tamanho aproximado 1,2kb) foi isolada do gel através do kit de purificação Wizard (Promega) e quantificada em espectrofotômetro, com leitura em 230nm.

O plasmídeo pET28a<sup>(+)</sup> (Novagen, mapa em **Figura A6**, **Anexos**), específico para modelos de expressão *in vitro*, também foi digerido duplamente. Após purificação do material, insertos e plasmídeos digeridos foram ligados utilizando a enzima DNA T4 ligase, em reação a 16°C por 16h.

#### 7.8 Transformação de *E. coli* com os receptores PKR1 e PKR2 humanos

50μL de *E. coli* cepa BL21 Ril competentes pré-selecionadas, mantidas a -80°C em 20% de glicerol e resistentes a cloranfenicol, foram submetidas a choque térmico para transformação com 10ng dos plasmídeos pET28a<sup>(+)</sup>/PKR1 ou 2 humanos. A mistura foi mantida por 30min em gelo, 2min em banho a 42°C e rapidamente retornada ao gelo. As culturas foram plaqueadas em meio sólido contendo kanamicina (100µg/mL), e mantidas por 18h em estufa a 37°C. Após crescimento em meio líquido de uma colônia escolhida, para confirmação da transformação, o cultivo foi submetido a um teste de indução com IPTG, com concentrações variadas e temperaturas diferentes onde alíquotas retiradas em diferentes tempos de indução foram preparadas para corrida em gel de SDS-PAGE.

# Resultados e Discussão

# 1. *Panning* com biblioteca de *phage display*: possíveis novos ligantes da Tc85

A seleção por *panning* utilizando uma biblioteca de *phage display* resultou na obtenção do heptapeptídeo GGIALAG, ligante da proteína recombinante Tc85-45 (Renata Tonelli).

$\sum$	SEQ.AA.	TC85	BSA	SEQ. NUCL.
1	COMBRWRVC	3	3	TGIGGGIGGCACCGGIGGCGGGITIGI
2	CEGAFSDFC	1	0	TGIGGGGGGGGGGGTTTTCGGACITTTGT
3	CGGIALAGC	22	0	TGTGGTGGTATTGCTCTTGCTGGGTGT
4	CDERSAGKC	1	0	TGIGACGAGCGCICIGCGGGGAAGIGI
5	CKWPRPSAC	1	0	TGIAAGIGGCCCGICCIAGCGCITGI
6	CAGNMRGMC	1	0	TGIGCIGGCAATATGCGCGGGATGIGT
7	CVGGGYRVC	1	0	TGIGIIGGIGGGGGCIACCGCGIGIGI
8	CRLDSFNRC	0	3	TGICGGCITGACICCITCAATAGGIGI
9	CRWPALLIC	2	4	TGICGGIGGCCGCCITGCIGACITGI
10	COMESSIEC	0	1	TGITGGATGGGCAGCAGCACIGGATGT
11	CSGERVEAC	0	2	TGITCCGCITTAGGGIGGAGGCITGI
12	CREGSINGC	1	2	TGICGCITTGGIAGICIGGICGGGIGI
13	COPRAVEVC	1	0	TGICAGCCCGCCCGCGCIGICGAGGIGIGI
14	CLDLGVADC	2	0	TGITIGGATCICOGGGICOCCGATIGI
15	CLMRFQRSC	2	0	TGICIGAIGAGGIICCAGOGIICIIGI
16	CPAGMWGFC	1	0	TGICCIGCGGGCAIGIGGGGGITTIGI
17	COMPISIIC	1	0	TGIGGGIGGCCIATIAGCCICACGIGI
18	CVFFAAVIC	1	0	TEIGITITITITECCECIGIGACITEI
19	CLHALRERC	2	0	TGICICCACGCCCITCGGGGCAGGIGT
20	CSKVILFGC	1	1	TGITCGAAGGITACGCICITCGGITGT

**Tabela 5**. Seqüências obtidas após sucessivos ciclos de *panning* ressaltando o motivo GGIALAG (destacado em amarelo) com preferencial ligação (22%) da proteína de fusão selecionada. Estão representadas apenas 20 do total de 100 seqüências obtidas (U. Urias e R. Tonelli, dados não publicados).

Utilizando-se a sequência GGIALAG obtida, por análise de alinhamento no GenBank, esta mostrou identidade com o receptor de procineticina 2 (PKR2).

#### 2. Expressão de receptores de procineticinas em linhagens celulares

Para verificar a possível interação do receptor de procinetinas (PKRs) com tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, utilizamos como modelo uma linhagem de epitélio mamário humano (MCF10A) que expressa PKR1 e PKR2, como demonstrado tanto por reações de transcrição reversa (RT-PCR, **Figura 11a**), quanto por ensaios de imunofluorescência (**Figura 11, a-d**). A presença de PKR2 também foi confirmada na linhagem MCF10A por seqüenciamento (dados não mostrados). A **Figura 11b** mostra que, além da MCF10A, outros tipos celulares expressam PKR2, como a linhagem epitelial de rim de macaco, LLCMK<sub>2</sub>, utilizada frequentemente em nosso laboratório na determinação de ligantes do tripanossomo envolvidos na invasão (**Figura 11b**, canaletas 7-9 e **Figura 12, e-f**).



**Figura 11.** Expressão de PKRs em diferentes linhagens celulares verificada por RT-PCR de extratos de RNA total. (a) células MCF10A: PKR1 (canaleta 1) e PKR2 (canaleta 2), em reação utilizando *random hexamers* como primers para geração de biblioteca de cDNA (conforme descrito em Material e Métodos); (b) PKR2 em linhagens epiteliais: MCF10A (canaletas 1, 2 e 3), CHO (canaletas 4, 5 e 6), LLCMK<sub>2</sub> (canaletas 7, 8 e 9) e HEK293T (canaletas 10, 11 e 12), utilizando *primers* específicos (canaletas 1, 4, 7 e 10), oligo dT (canaletas 2, 5, 8 e 11) ou *random hexamers* (canaletas 3, 6, 9 e 12) para construção da biblioteca de cDNA.



Figura 12. Detecção por imunofluorescência indireta de PKR2 em células epiteliais. Células da linhagem MCF10A (a-d) ou LLCMK<sub>2</sub> (e-f) foram fixadas com 2% de p-formaldeido e incubadas com: (a) e (e) anti-PKR2 obtido em coelho (1:50); (b) e (f) soro normal de coelho (controle negativo); (c) PBS (controle negativo). (d) anti- e-caderina (camundongo, 1:50), evidenciando o padrão de marcação de membrana. As células foram incubadas com o correspondente anticorpo secundário (anti-IgG-Alexa Flúor 488) e DAPI e observadas ao microscópio de fluorescência.

A análise da expressão dos PKRs em diferentes linhagens celulares através da técnica do Western Blot revelou diferentes padrões de bandas protéicas, conforme os diferentes anticorpos comerciais testados. É interessante ressaltar que tal variabilidade foi observada não apenas com os diferentes anticorpos comerciais para uma mesma linhagem celular, mas também quando avaliados diferentes tipos celulares com o mesmo anticorpo (Figura 13b e c). Quando os extratos de proteína total foram incubados com o anticorpo anti-PKR2 (soro total, Abcam, Figura 13a) foram observadas diversas bandas de massa molecular abaixo do esperado e quando incubados com anticorpos purificados anti-PKR2 (H49, IgG de coelho purificada, (Figura 13b) e N18, IgG de cabra purificada (Figura 13c), foram observadas diversas bandas com massa molecular acima do esperado. As diferentes bandas encontradas poderiam ser resultado de diferentes processos, tais como agregação ou degradação dos receptores de procinetina ou de reatividade cruzada dos anticorpos utilizados com outras moléculas não relacionadas. Além disso, a hipótese de haver outras possíveis modificações pós-traducionais não deve ser descartada. É interessante ressaltar que a dimerização de PKR2 foi sugerida previamente, quando da expressão de PKR2 em levedo (Marsango et al, 2010). A reatividade do anticorpo anti-PKR2 (N18) com uma fração membranar obtida a partir de células MCF10A mostra um padrão bem mais simples quando comparada ao extrato total (Figura 13c, canaletas 1 e 2), com uma banda mais representativa, em torno de 45kDa massa molecular, como esperado. A tentativa de obter anticorpos com melhor especificidade levaram-nos às tentativas de clonagem e expressão de PKR2, tentativa essa não finalizada com sucesso (resultados apresentados em item abaixo). Extratos de proteína total células E14TG2a (célula

tronco embrionária murina) foram gentilmente cedidos por Nicole Garavello, estudante de mestrado da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deborah Schechtman.



**Figura 13. Expressão de PKR2 em diferentes tipos ou frações celulares avaliada por** *Western Blot.* (a) reatividade de anti-PKR2 (Abcam, anticorpo total obtido em coelho, 1:500) com extrato total de células MCF10A, CHO, LLCMK<sub>2</sub> e 293T; (b) reatividade de anti-PKR2 H49 (soro purificado, obtido em coelho Santa Cruz) com extratos de culturas de MCF10A, LLCMK<sub>2</sub>, HEK293T, CHO, CLPs e E14TG2a, célula tronco embrionária murina. (c) reatividade de Anti-PKR2 N18 (soro purificado, obtido em cabra), com extrato total e fração de membrana de cultura de MCF10A respectivamente e em extratos de diferentes tipos celulares: LLCMK<sub>2</sub>, 293T, CHO, CLPs e E14TG2a. A seta indica a região correspondente a ~45kDa. A massa aparente foi calculada com base em padrões comerciais (Rainbow *Full-Range*, Amersham ou Kaleidoscope, Bio-Rad).

#### 3. A proteína recombinante H3.3p liga-se à superfície de células MCF10A

Resultados iniciais do laboratório sugeriram que a proteína recombinante H3.3p, correspondente a uma sequência interna da Tc-85 de tripomastigotas de *T. cruzi*, era o ligante de PKR2 (resultados de Úrsula Urias). Foram então realizados ensaios de ligação da proteína recombinante com células MCF10A ou com extratos de proteína total separados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose ("*overlay*").

Após expressão e purificação bem-sucedidas da proteína recombinante H3.3 (H3.3p) (Figura 10, Material e Métodos), 50µg de proteína foram incubados com as células MCF10A previamente fixadas em 2% de paraformaldeído. Após lavagem e incubação com um anticorpo monoclonal obtido contra H3.3p (anti-G1/G8) foi possível observar pontos de reatividade isolados na membrana das células tratadas com H3.3p. indicando a ligação da proteína na célula (Figura 14a). Os grupos controle, incubados somente com o anticorpo secundário (Figura 14b), ou com BSA e anticorpo secundário (não mostrado) não apresentaram qualquer marcação. A ligação de H3.3p a células MCF10A também foi evidenciada por ensaios de "overlay". A incubação do H3.3p com o extrato protéico de MCF10A mostra que há polipeptídeos com a mesma migração de PKR no gel reativos com H3.3p (banda de cerca de 45 kDa) (Figura 14c, canaleta 2). Não se observou reatividade do anticorpo anti-H3.3p com o extrato de células MCF10A na região de 44 kDa quando não se adicionou a proteína H3.3p ao ensaio (Figura 14c, canaleta 1). A adição do peptídeo sintético GGIALAG leva a uma diminuição da ligação da proteína H3.3p ao extrato de células MCF10A (Figura 14c, canaleta 5), corroborando os dados iniciais de que PKR2 estaria de fato interagindo com a Tc85, na

região compreendida pelo H3.3p. Note-se que, como controle experimental, a proteína H3.3p foi utilizada em paralelo com o extrato de células MCF10A. Nesta figura, (**Figura 13c**) é possível observar apenas a forma trimérica da proteína H3.3p purificada (e não a dimérica e nem a monomérica), que apresenta massa se similar à dos PKRs.



**Figura 14. Ligação da proteína recombinante H3.3p com células MCF10A. (a)** Células MCF10A foram tratadas com 50µg de H3.3p, incubadas com o anticorpo anti H3.3p, anticorpo secundário fluorescente (Alexa Fluor 488), e DAPI para a marcação do núcleo; como controle do experimento, a incubação com ao anticorpo anti-H3.3p foi omitida (b). (c) Ligação de H3.3p a extrato protéico de células MCF10A ("*overlay*") e inibição da ligação pelo peptídeo sintético GGIALAG. Extratos de proteína total de células MCF10A ou H3.3p (controle) foram incubados com H3.3p em presença ou ausência do peptídeo sintético GGIALAG. Após lavagem, todos os extratos foram incubados com um anticorpo anti-H3.3p e revelados com o anticorpo secundário apropriado, como descrito em Material e Métodos. A seta indica a provável região de ligação do H3.3p ao PKR2.

Os anticorpos comerciais anti-PKRs foram utilizados para avaliar o papel dos receptores de procineticina na invasão de células MCF10A pelo T.cruzi. Para tanto, foram utilizados os três anticorpos anti-PKR2 comerciais empregados acima, além do anticorpo anti-PKR1 (Abcam). Todos os anticorpos anti-PKRs utilizados inibiram a infecção de células pelo parasita, como mostrado nas Figuras 15, 16 e 17, considerando-se a porcentagem de células infectadas ou o número de células infectadas/número de parasitas. Dos três anticorpos utilizados, o anticorpo policional H49 (Santa Cruz, IgG de coelho purificada) foi mais eficiente em inibir a infecção do parasita, quando comparado com o soro normal de coelho purificado, utilizado como controle. No entanto, as diferenças de inibição observadas entre os diferentes anticorpos, utilizados na mesma diluição, podem ser devidas tanto às concentrações do anticorpo original, em alguns casos não quantificado, quanto a diferenças de afinidade de cada um dos anticorpos comerciais pelos receptores de procineticinas. De qualquer forma, os resultados com os anticorpos comerciais sugerem que formas tripomastigotas de T. cruzi ligam-se a esses receptores. No entanto, esses resultados por si não permitem concluir pelo envolvimento de PKRs, uma vez que há a necessidade de se considerar o complexo padrão de reatividade desses anticorpos, mostrados na Figura 13. A inibição de invasão pelo T. cruzi observada quando anticorpos anti-PKR1 foram empregados indicam o envolvimento de PKR1 no processo, além de PKR2. No entanto, essa conclusão deve ser considerada com cautela, uma vez que PKR1 e PKR2 possuem 85% de sua sequência primária idêntica e o anticorpo policional anti-PKR1 comercial pode ter reatividade cruzada com PKR2, o que levaria à inibição observada. O emprego de anticorpos monoespecíficos ou monoclonais para PKR2 e PKR1

precisam ser obtidos para concluir, no ensaio empregado, pelo envolvimento ou não de PKR1 e PKR2.



**Figura 15.** Anticorpos anti-PKRs inibem a invasão de células MCF10A por *T. cruzi*. Os anticorpos anti-PKR2 ou anti-PKR1 (Abcam), assim como o soro normal de coelho, foram empregados na diluição 1:50. (a) Porcentagem de infecção de células MCF10A por tripomastigotas de *T. cruzi* após diferentes tratamentos. (b) Total de células infectadas em população de 300 células e número total de parasitas em 300 células. Dados consolidados de 2 (dois) experimentos independentes. As barras representam o erro-padrão amostral.



**Figura 16.** Anticorpo anti-PKR2 inibe a invasão de células MCF10A por *T. cruzi.* Tratamento com o anticorpo anti-PKR2 N18 (Santa Cruz) e seu respectivo controle (IgG purificada de cabra) utilizados na mesma concentração. (a) Porcentagem de infecção de células MCF10A por tripomastigotas de *T. cruzi* após diferentes tratamentos. (b) Total de células infectadas em população de 300 células e número total de parasitas em 300 células. As barras representam o erro-padrão. \* Dados apresentados de um experimento isolado.



**Figura 17.** Anticorpo anti-PKR2 inibe a invasão de células MCF10A por *T. cruzi.* Tratamento com anti-PKR2 H49 (Santa Cruz) e seu respectivo controle (IgG purificada de coelho), na mesma concentração. (a) Porcentagem de infecção de células MCF10A por tripomastigotas de *T. cruzi* após diferentes tratamentos. (b) Total de células infectadas em população de 300 células e número total de parasitas em 300 células. As barras representam o erro-padrão. \* Dados apresentados de um experimento isolado.

# 5. O peptídeo sintético GGIALAG inibe a invasão de culturas de MCF10A por T.

## cruzi

Para verificar se a sequência GGIALAG presente no receptor de PKR2 e identificada como ligante da proteína H3.3p, e consequentemente da glicoproteína Tc85, está envolvida na invasão, tripomastigotas de *T. cruzi* foram pré-incubados por 30min com o peptídeo sintético GGIALAG (dissolvido em DMSO), nas concentrações de 0,05 ou 0,2mM e utilizados para infectar células MCF10A. Como pode ser verificado, o peptídeo inibe parcialmente a infecção, quando comparado com os controles (somente meio de cultura ou com a adição de DMSO). Além disso, essa inibição aumenta com o aumento da concentração do peptídeo adicionado (**Figura 18**).



**Figura 18.** Inibição mediada pelo peptídeo GGIALAG na infecção pelo *T. cruzi.* Os parasitas foram incubados por 2h com o peptídeo GGIALAG nas concentrações de 0,05 ou 0,2mM ou com DMSO. Após lavagem, as células foram mantidas em meio de cultura por aproximadamente 24h, lavadas e fixadas com 2% de p-formaldeído. A contagem dos parasitas intracelulares foi feita após marcação dos núcleos com DAPI. (a) Porcentagem de infecção de células MCF10A por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* após diferentes tratamentos. (b) Total de células infectadas em população de 300 células, média de 2 experimentos independentes e triplicata em cada caso.

Estes dados, em conjunto com os resultados de inibição dos anticorpos anti-PKR2 apontam para o papel de PKR2 e, em particular, do peptídeo GGIALAG na infecção pelo *T. cruzi*. Novamente, o papel de PKR1 no processo não pode ser afastado, uma vez que a sequência correspondente no PKR1, GMALVG, com dois aminoácidos distintos em relação ao peptídeo GGIALAG, não foi testada.

# 6. Obtenção de anticorpo contra a sequência GGIALAG

Na tentativa de obter no laboratório anticorpos mais específicos, camundongos Balb/c foram inoculados com o peptídeo sintético GGIALAG conjugado a albumina. Após 5 inóculos, o soro de cada animal foi obtido e sua reatividade com células MCF10A fixadas em 2% de paraformaldeído foi avaliada por imunofluorescência indireta. É importante destacar que diferentes padrões de marcação foram encontrados com o soro dos diferentes animais, que foram, desde uma marcação homogênea da célula, semelhante ao padrão observado com o anticorpo anti-PKR2 (Abcam, soro de coelho), até uma marcação claramente localizada na superfície celular, como ilustrado na **Figura 19a**. O controle negativo, utilizando soro normal de camundongo (**Figura 19b**) ou soro normal de camundongo imunizado com BSA apenas, não apresentou reação. Devido à quantidade de material obtido, os demais experimentos foram feitos com uma mistura dos soros individuais de 3 camundongos. Note-se que nesse caso (dados não apresentados), o padrão de marcação de células MCF10A é bastante semelhante ao dos anticorpos mostrados na **Figura 12a**.



Figura 19. Anticorpo policional contra a sequência GGIALAG reconhece a superfície de células MCF10A. (a) Padrão de marcação observado com o anticorpo policional. Controles com (b) o anticorpo secundário anti IgG de camundongo, sem adição do anticorpo primário, e com (c) soro normal de camundongo, no lugar do anticorpo primário. Núcleos corados com DAPI. Anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).

# 7. Co-localização de antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-PKR2 e anti-GGIALAG em células MCF10A

Como mostrado na Figura 19, o anticorpo policional anti-GGIALAG obtido reconhece epítopos presentes na superfície de células MCF10A. Foi-se verificar portanto se havia co-localização de antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-GGIALAG e anti-PKR2 na superfície de células MCF10A. Assim, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta de dupla marcação, em culturas previamente fixadas em 2% de paraformaldeído. O padrão de marcação obtido com os dois anticorpos é bastante semelhante (Figura 20), e, para uma análise comparativa do padrão de marcação, é mostrada a reatividade das células MCF10A com anticorpos anti-fibronectina (Figura 20d) e anti-citoqueratina 18 (Figura 20f, Figura 21b), marcando uma proteína de matriz extracelular e de citoesqueleto, respectivamente. Os experimentos mostram a co-localização na superfície celular dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-GGIALAG e anti-PKR2 (Figura 20g, h, Figura 21a). É possível observar, todavia, regiões com predominância de marcação de um ou outro anticorpo, o que poderia ser atribuído à reatividade distinta de cada um dos anticorpos com outras moléculas, além do receptor de procineticina 2. No caso específico do anticorpo policional anti-GGIALAG, como comentado acima, foi utilizada uma mistura de soro de animais que apresentavam diferentes padrões de reatividade com as células, o que deve ter contribuído para a heterogeneidade observada na co-localização.



Figura 20. Co-localização de antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-PKR2 e anti-GGIALAG. Células MCF10A fixadas com paraformaldeído foram incubadas com diferentes anticorpos primários: (c) anti-PKR2 (coelho, Abcam, 1:50) e (e) anticorpo anti-GGIALAG (camundongo, 1:25) ou (d) Anticorpo anti-fibronectina (coelho, 1:25) e (f) monoclonal anticitoqueratina 18 (camundongo, 1:50), e a reatividade detectada com anticorpos secundários adequados conjugados a Alexa Fluor 488 ou 594 (Molecular Probes). Em azul, marcação dos núcleos com DAPI (a e b). As figuras (g) e (h) mostram o merge: anti-PKR2 e anti-GGIALAG co-localizam (em amarelo), mas o mesmo não ocorre com anti-fibronectina e anti-citoqueratina 18.



Figura 21. Co-localização parcial de antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-PKR2 e anti-GGIALAG. (a) Anti-PKR2 (Abcam, 1:50) em verde e anti-GGIALAG (1:25) em vermelho. (b) anti-PKR2 (Abcam, 1:50) em verde e anti-citoqueratina 18 (Invitrogen, 1:50) em vermelho. Microscopia confocal. Em amarelo observam-se os pontos de co-localização.

# 8. Análise da sinalização desencadeada pelo peptídeo GGIALAG no T. cruzi

Uma vez que a sequência de aminoácidos GGIALAG é um ligante para *Trypanosoma cruzi*, e esta interação leva a uma diminuição da invasão de culturas celulares, propusemo-nos a investigar essa interação do ponto de vista da sinalização que deveria ser desencadeada nas formas tripomastigotas do parasita. Com esse objetivo, os parasitas foram incubados por 5 ou 30min com o peptídeo GGIALAG ou DMSO (controle) e possíveis modificações de proteínas por fosforilação foram analisados após eletroforese em gel de poliacrilamida. Quando o padrão de fosforilação foi analisado por eletroforese unidimensional (**Figura 22a**), nenhuma proteína com variação significativa nos níveis de fosforilação foi detectada, provavelmente devido ao grande número de proteínas fosforiladas no parasita e à baixa capacidade de

separação das proteínas em eletroforese unidimensional. No entanto, quando o mesmo experimento foi analisado por eletroforese bidimensional, são detectáveis mudanças em algumas proteínas de tripomastigotas após a incubação do parasita com o peptídeo GGIALAG, quando comparado com o controle (DMSO) (**Figuras 23 e 24**). Essas mudanças são mais evidentes no tempo de incubação de 5min. Também é possível, nessa análise qualitativa, verificar a variação de proteínas fosforiladas, havendo aumento ou diminuição no nível de fosforilação com o tempo de incubação são devidas à quantidade de proteína submetida à eletroforese, como mostrado em cada caso pelo perfil de proteínas totais coradas com Coomassie coloidal (parte B das figuras) ou pelo nível de fosforilação de uma proteína do extrato (assinalada \*) que não apresenta modificação nas condições do experimento.



**Figura 22. Perfil de proteínas totais e fosforiladas de** *T. cruzi* incubado com o peptídeo **GGIALAG.** Os parasitas foram incubados com GGIALAG ou DMSO (controle) por 5 ou 30min a 37°C e o padrão total de proteínas (a) e de proteínas fosforiladas (b) foram analisadas por SDS-PAGE. 1) Incubação com DMSO durante 5min; 2) Incubação com GGIALAG durante 5min; 3) Incubação com DMSO durante 30min; 4) Incubação com GGIALAG durante 30min; 5) controle: extrato de células LLCMK<sub>2</sub>.



**Figura 23. Perfil de proteínas fosforiladas de** *T. cruzi* incubado com o peptídeo GGIALAG. O parasita foi incubado com GGIALAG ou DMSO (controle) por 5min e submetido a eletroforese bidimensional. Em (a) perfil de proteínas fosforiladas de *T. cruzi*; em (b) perfil de proteínas totais. As setas e a região destacada indicam possíveis spots com variação nos níveis de fosforilação na presença do peptídeo GGIALAG. Destacado com asterisco um *spot* que não sofreu modificação de fosforilação aparente durante os diferentes tempos de incubação com DMSO ou GGIALAG.



**Figura 24. Perfil de proteínas fosforiladas de** *T. cruzi* **incubado com o peptídeo GGIALAG.** O parasita foi incubado com GGIALAG ou DMSO (controle) por 30min e submetido a eletroforese bidimensional. Em (a) perfil de proteínas fosforiladas de *T. cruzi*; em (b) perfil de proteínas totais. As setas e a região destacada indicam possíveis spots com variação de fosforilação na presença do peptídeo GGIALAG. Destacado com asterisco o *spot* que não sofreu modificação de fosforilação aparente durante os diferentes tempos de incubação com DMSO ou GGIALAG.

As mudanças de fosforilação observadas em proteínas de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, já nos primeiros 5min de incubação, reforçam a hipótese de que o parasita interage com uma proteína que contenha a sequência GGIALAG (ou

parte dela) presente na superfície da célula hospedeira e que, em conseqüência, desencadeia uma resposta intracelular, com fosforilação de proteínas. As vias de sinalização envolvidas, no entanto, não foram ainda exploradas. A análise quantitativa das mudanças de fosforilação observadas, assim como a confirmação da modificação por outra metodologia (por exemplo com anticorpos anti-fosfoserina, anti-fosfotreonina, anti-fosfotirosina) e a identificação das proteínas modificadas estão sendo feitas por Eliciane Mattos, estudante de doutorado do laboratório.

#### 9. Clonagem dos receptores de procineticina 1 e 2

A clonagem e expressão dos receptores de procineticina foi perseguida desde o começo deste projeto, com dois objetivos principais – obter a proteína recombinante para demonstrar seu envolvimento na ligação de *T. cruzi* à célula e para verificar o efeito da superexpressão da proteína na invasão do parasita em célula de mamífero.

A digestão dos plasmídeos pCR2.1/PKRs humanos com Xbal confirmou a presença dos insertos (**Figura 25a**). A partir destes plasmídeos, produtos contendo sítio de restrição para BamHI (5') e XhoI (3') foram obtidos através de PCR, tanto para PKR1 quanto para PKR2 (**Figura 25b**).



**Figura 25. Clonagem de PKR1 e PKR2. (a)** Digestão dos plasmídeos pCR2.1/PKR1 (coluna 1) e pCR2.1/PKR2 (coluna 2) com Xbal libera fragmentos de aproximadamente 1,2kpb. **(b)** Produtos de PKR1 (coluna 1) e PKR2 (coluna 2) humanos, com cerca de 1,2 kpb obtidos por PCR dos plasmídeos pCR2.1.

Ambos os insertos foram clonados com sucesso no plasmídeo pGEM T-Easy, e os clones DH5α foram congelados em glicerol a -80°C, para estoque. O plasmídeo foi digerido com BamHI e Xhol, liberando o fragmento correspondente aos receptores de procineticina. (**Figura 26a**). Estes fragmentos foram, por fim, ligados a outros dois plasmídeos: pET28a<sup>(+)</sup> e pCDNA3.0 5'F, para expressão em bactérias e purificação dos receptores, e para expressão em células de mamífero, respectivamente. Os clones foram confirmados por PCR e digestão enzimática para as construções dos dois receptores no pET28a<sup>(+)</sup> e no pCDNA3.0 5'F. (**Figura 26b**).



**Figura 26. Clonagem de PKR1 e PKR2. (a)** pGEM contendo PKR1 (coluna 1) ou PKR2 (coluna 2) digerido com BamhHI/XhoI. **(b)** Digestão dos plasmídeos pET28a<sup>(+)</sup> contendo PKR1 (coluna 1) ou PKR2 (coluna 2) e de pCDNA3.0 5'F contendo PKR1 (coluna 3) ou PKR2 (coluna 4), respectivamente, com as enzimas BamHI/XhoI. A banda correspondente aos receptores, com cerca de 1,2 kbp, é visível em cada uma das construções. A banda maior representa os plasmídeos digeridos.

As reações de seqüenciamento dos receptores de procineticina humanos apresentaram resultados pouco confiáveis no caso de PKR1. A sequência de PKR2, todavia, foi confirmada por alinhamento com a sequência de PKR2 (BLAST), com 99% de identidade. A **Figura 27** ilustra o gráfico do seqüenciamento das 100 primeiras bases de PKR2.



**Figura 27. Sequenciamento de PKR2.** Gráfico do seqüenciamento dos 100 primeiros pares de base de PKR2 clonado no plasmídeo pET28a(+). A sequência completa dos 4 fragmentos obtidos foi alinhada para obter o inserto completo, que foi comparado com a sequência completa de PKR2 através da ferramenta BLAST.

Em diferentes tentativas de expressão com os plasmídeos pET28a<sup>(+)</sup> contendo PKR1 ou 2, utilizados para transformar cepas BL21Ril, e em condições diferentes de indução com IPTG, não se obteve expressão da proteína. Também não houve sucesso na tentativa de expressão utilizando extrato de inseto (EasyXpress Insect kit II, Qiagen).

# Transfecção de células com PKRs humanos

Culturas de células CHO foram transfectadas com o plasmídeo pCDNA3.0 5'F contendo PKR1 ou 2 e foram mantidas em meio contendo geneticina (400µg/mL). Apesar de estarem crescendo na presença do antibiótico, não foi possível, através de imunofluorescência ou Western Blot, confirmar a superexpressão do receptor, utilizando o anticorpo anti-PKR ou o anticorpo anti-flag (dados não apresentados). Note-se que culturas de células CHO não transfectadas não são viáveis após tratamento de uma semana com a mesma concentração de geneticina utilizada.

Uma vez que não foi possível obter culturas superexpressando os PKRs, iniciamos a tentativa de extrair o RNA codificante para os receptores diretamente de

culturas de células de linhagem humana (MCF10A ou N1321), através de reação de transcrição reversa (RT-PCR) utilizando "*random hexamers*" (**Figura 28a e b**).



**Figura 28. Clonagem de PKR1 e PKR2.** PCR para obter as sequências correspondentes aos PKRs das linhagens MCF10A (a) ou N1321 (b) utilizando cDNA obtido com primers específicos (colunas 1 e 2) ou *random hexamers* (colunas 3 e 4). Em 1 e 3 são os produtos da reação para PKR1 e em 2 e 4 os produtos para PKR2.

Uma vez que não foi possível obter células transfectadas superexpressando os receptores humanos de PKR1 e PKR2 para confirmar seu papel na invasão do *T. cruzi*, a abordagem de bloquear a expressão de PKR1 e PKR2 nas células por RNA de interferência e verificar o efeito do bloqueio de cada receptor, assim como do bloqueio de ambos, está em andamento. Essa confirmação é necessária, não só para se determinar o papel relativo de cada um dos dois receptores como ligantes de *T. cruzi*, mas fundamentalmente para confirmar se PKR1 e PKR2 são importantes na invasão, uma vez que nossos resultados estão baseados em boa parte em experimentos de inibição utilizando anticorpos que apresentam um padrão de reconhecimento de antígenos celulares complexo.

Os resultados de inibição de invasão do parasita na presença de anticorpos anti-PKR1 e anti-PKR2 ou mesmo anti-GGIALAG apontam para um papel proeminente desses receptores na infecção. Não é possível estabelecer ainda, a importância relativa de PKR2 frente a outros ligantes para *T. cruzi* descritos na literatura, se PKR2 seria o principal ligante da Tc85 na superfície da célula hospedeira ou se a sequência GGIALAG é o único ligante de formas tripomastigotas de *T.cruzi* em PKR2. Também o papel de PKR1 como um ligante de *T. cruzi* precisa ser melhor explorado. É importante ressaltar que na região considerada, em PKR1 encontra-se a sequência GMALVG, no lugar de GGIALAG presente em PKR2, sendo comum aos dois receptores os aminoácidos **G--AL-G** (**Figura 8**) e que poderiam ser os aminoácidos envolvidos na ligação das formas tripomastigotas aos receptores de procineticinas.

Um dos resultados que nos parece interessante para entendimento do processo de invasão pelo *T. cruzi* é a sinalização desencadeada no parasita após o tratamento com o peptídeo GGIALAG e identificada neste trabalho por mudanças no nível de fosforilação de proteínas já nos primeiros 5min de interação. O emprego de moléculas pequenas, como é o caso do peptídeo, deverá facilitar a determinação da(s) via(s) de sinalização, com a identificação das proteínas modificadas. Embora essa identificação possa parecer simples, é importante salientar que uma porcentagem muito grande de proteínas fosforiladas e sequenciadas em diferentes tripanosomatídeos é desconhecida (Sodré *et al*, 2009, Nakayasu *et al*, 2009, Nett *et al*, 2009, Hem *et al*, 2010; Eliciane Mattos, comunicação pessoal) e o número de proteínas modificadas após a incubação com o peptídeo GGIALAG é reduzido, podendo dificultar a identificação das vias de sinalização envolvidas.
A sinalização desencadeada no parasita no processo de adesão/penetração é pouco conhecida, ao contrário do que ocorre na célula hospedeira, uma vez que nas células de mamífero as vias de sinalização são bastante exploradas. No caso dos tripanossomatídeos, o seqüenciamento relativamente recente do genoma (EI-Sayed *et al*, 2005) mostrou a existência de um número bastante grande de quinases (Parsons *et al*, 2005) e fosfatases (Brenchley *et al*, 2007), com várias peculiaridades, como por exemplo a ausência de tirosina quinases típicas (Brenchley *et al*, 2007). Como era de se esperar, o sequenciamento do genoma possibilitou que diferentes grupos se dedicassem ao estudo do proteoma/fosfoproteoma dos tripanosomatídios. Nosso laboratório em particular, estabeleceu como meta determinar as vias de sinalização em *Trypanosoma cruzi* desencadeadas na etapa de adesão a elementos do hospedeiro vertebrado e o trabalho desta dissertação está inserido nessa linha, na medida em que investiga ligantes que levam a modificações pós-traducionais de proteínas.

## Conclusões

O modelo utilizado para o estudo do receptor de procineticina 2 e sua possível participação na invasão por *Trypanosoma cruzi*, as células MCF10A, epitélio mamário humano, provou ser bastante adequado para seu propósito. A caracterização inicial da linhagem demonstrou que ela expressa PKR2, observado tanto por RT-PCR como imunofluorescência e *Western Blot*. Adicionalmente, foi mostrado que a proteína recombinante H3.3p (um segmento da Tc85, clonado e cuja proteína foi expressa e purificada no laboratório) liga-se a regiões localizadas aparentemente na membrana de células em cultura pré-fixadas em paraformaldeído 2%, utilizando um anticorpo monoclonal contra o H3.3p recombinante. Esta proteína recombinante também se liga a extratos de proteína total de MCF10A (metodologia de "*overlay*") na região de 45 kDa, massa molecular aproximada do receptor de procineticina, e a ligação é inibida na presença do peptídeo sintético GGIALAG, sequência que esta presente no receptor de procineticina 2 e que foi inicialmente identificada pelo grupo através de ensaios de *phage display*.

Os ensaios de inibição da invasão de *T. cruzi* em células MCF10A por incubação das células com o anticorpo anti-PKR2, ou por incubação dos parasitas com o peptídeo sintético GGIALAG, sugerem que o receptor de procineticina estaria envolvido na entrada do parasita em células hospedeiras, através do motivo GGIALAG. Este dado é sustentado pela informação de que o receptor está expresso em grande variedade de tecidos, incluindo células epiteliais e endoteliais, alvos importantes do parasita no hospedeiro vertebrado. Paralelamente, os dados de co-localização indicam que a

sequência GGIALAG, presente no receptor de procineticina 2, estaria exposta na superfície da membrana celular, o que corrobora os resultados obtidos com os ensaios de inibição da invasão.

A análise do perfil de proteínas fosforiladas de *T. cruzi*, obtidas com incubação de formas tripomastigotas com o peptídeo GGIALAG mostrou que a interação com este peptídeo leva à fosforilação diferencial de algumas proteínas do parasita, que deverão ser identificadas em futuro próximo.

Em conjunto, os resultados apresentados apontam para o papel da sequência GGIALAG presente no receptor de procineticina 2 na infecção de células epiteliais pelo *Trypanosoma cruzi* e a modificação, como conseqüência dessa interação, de proteínas do parasita por fosforilação. Estes dados, aliados ao fato de PKR2 estar amplamente expresso em diversos tecidos, em especial tecidos classicamente alvos preferenciais de *T. cruzi*, sugerem que o receptor de procineticina 2 seja mais uma via utilizada pelo parasita durante o processo de invasão.

# Referências

Abreu, A.P., Trarbach, E.B., de Castro, M., Frade-Costa, E.M., Versiani, B., Matias-Baptista, M.T., Garmes, H.M., Mendonca, B.B., Latronico, A.C. (2008). Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4113–4118.

Abuin, G., Colli, W., de Souza, W., and Alves, M. J. (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, 229 – 237.

Abuin, G., Freitas-Junior, L.H., Colli, W., Alves, M.J.M., Schenkman, S. (1999). Expression of trans-sialidase and 85kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the posttranscriptional level by labile protein factors. *J Biol Chem*; 274: 13041-47.

Almeida-de-Faria, M., Freymuller, E., Colli. W., Alves, M.J.M. (1999). *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an intracellular epimastigotelike form. *Exp Parasitol* 92: 263-74.

Alves, M.J.M., Abuin, G., Kuwajima, V. J., and 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.

Alves, C.R., Albuquerque-Cunha, J. M., Mello, C. B., Garcia, E.S., Nogueira, N.F., Bourguingnon, S.C., de Souza, W., Azambuja, P., Gonzalez, M.S. (2007). *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, vol. 116, no. 1, pp. 44–52,.

Alves, M.J., Colli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life* 59:274-9.

Alves, M.J.M. e Colli, W. (2008). Role of the gp85/Trans-Sialidase Superfamily of Glycoproteins in the Interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Molecular Mechanisms of Parasite Infection*.

Alves, M.J.M., Mortara, R. (2009). A century of research: what we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 76-88.

Andrade, L.O., Andrews, N.W. (2004). Lysosomal fusion is essencial for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* 200(9): 1135-1143.

Andrade, L.O., Andrews, N.W. (2005). The *Trypanosoma cruzi* host cell interplay: location, invasion and retention. *Nat Rev Microbiol*; 3: 819-23.

Andrade, S.G., Grimaud, J.A., Stocker-Guerret, S. (1989). Sequential change of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J *Trop Med Hyg*; 40: 252-60.

Andrews, N.W., C.K. Abrams, S.L. Slatin, and G. Griffiths. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane poreforming activity at low pH. *Cell*. 61:1277.

Andrews, N.W., Colli, W. (1982). Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J Protozool.* 29(2):264-9.

Araújo-Jorge, T.C., Waghabi, M.C., Soieiro, M., Keramidas, M., Bailly, S., Feige, J.J. (2008). Pivotal role of TGF- $\beta$  in infectious heart disease: the case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19: 405-13.

Bockaert, J., Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO* J 18:1723–1729

Boulberdaa, M., Turkeri, G., Urayama, K., Dormishian, M., Szatkowski, C., Zimmer, L., Messaddeq, N., Laugel, V., Dollé, P., Nebigil, C.G. (2011). Genetic inactivation of prokineticin receptor-1 leads to heart and kidney disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (4):842-50.

Bullock, C.M., Li, J.D., Zhou, Q.Y. (2003). Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins, and identification of prokineticin receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 65: 582–588.

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.* 7;72:248-54.

Brenchley, R., Tariq, H., McElhinney, H., Szöor, B., Huxley-Jones, J., Stevens, R., Matthews, K., Tabernero, L. (2007). The TriTryp phosphatoma: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics*; 8: 434.

Burleigh, B.A. (2005) Host cell signaling in *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? Sci STEK; 293: p.36.

Burleigh, B.A., Woolsey, A.M. (2002). Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*; 4: 701-11.

Burleigh, B.A., Andrews, N.W. (1995). A120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca2+-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 5172–5180.

Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P., Andrews, N.W. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. *J Cell Biol* 136: 609–620.

Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Frasch, A.C.C., di Noia, J.M. (2006). Trypanosoma surface mucins: host dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*; 4: 229-36.

Calvet, C.M., Toma, L., De Souza, F.R., Meirelles, M. de N., Pereira, M.C. (2003). Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*. 50(2):97-103.

Calvet, C.M., Meuser, M., Almeida, D. (2004). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: Role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitol* 107(1-2):20-30.

Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen.,s.sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Men Inst Oswaldo Cruz*,1:159-218.

Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M., Zhou, Q.Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*;417:405–410.

Chuenkova, M.V., Pereira, M. (2000). A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. *Mol Biol Cell*; 11:1487-98.

Chuenkova, M.V., Furnari, F.B., Cavenee, W.K., Pereira, M. (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: 9936-41.

Chuenkova, M.V., PereiraPerrin, M. (2005). A synthetic peptide modeled on PDNF, Chagas' disease parasite neutrophic factor, promotes survival and differentiation of neuronal cells through TrkA receptor. *Biochemistry*; 44: 15685-94.

Claser, C., Curcio, M., de Mello, S.M., Silveira, E.V., Monteiro, H.P., Rodrigues, M.M. (2008) Silencing cytokeratin 18 gene inhibits intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes. *BMC Cell Biol.* 17;9:68

Coimbra, V.C., Yamamoto, D., Khusal, K.G., Atayde, V.D., Fernandes, M.C., Mortara, R.A., Yoshida, N., Alves, M.J., Rabinovitch, M. (2007). Enucleated L929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. *Infect Immun*; 75: 3700-06.

Colli, W. (1993). Trans-sialidase: A unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Faseb J* 7 (13):1257-1264.

Costales, J.A., Daily, J.P., Burleigh, B.A. (2009). Cytokine-dependent and – independent gene expression changes and cell cycle block revealed in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells by comparative mRNA profiling. *BMC Genomics*; 10: 252-69.

Coura, J.R. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 39 (Suppl. 3): 113-117.

Coura, J.R., Junqueira, A.C.V., Fernandes, O., Valente, S.A.S., Miles, M.A. (2002). Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18: 171-176.

Cross, G.A.M. e Takle, G. (1993). The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol*. 47:385-411.

Cuevas, I.C., Cazzulo, J.J., Sanchez, D.O. (2003). Gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: Surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect Immun* 71 (10):5739-5749.

De Lederkeremer, R.M., Agusti, R. (2009). Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. Adv *Carbohydr Chem Biochem*; 62: 311-66.

de Noya, B.A., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L, Paiva, M., Rivas, L., Castro, J., Márques, J., Mendoza, I., Acquatella, H. Torres, J. e Noya, O. (2010). Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *The Journal of Infectious Diseases*; 201(9).

De Souza, W. (2002). Basic cell biology os *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*; 8(4): 269-285.

De Souza, W., Carvalho, T.M.U., Barrias, E.S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology* 15;12:e29.

Dias, J.C.P. (2007). Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad. Saúde Pública do Rio de Janeiro*, 23 Sup 1:S13-S22.

Dias, W.B., Fajardo, F.D., Graça-Souza, A.V., Freire-de-Lima, L., Vieira, F., Girard, M.F., Bouteille, B., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L. Todeshini, A.R. (2008) Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 10(1):88-99

Dorsch, M., Qiu, Y., Soler, D., Frank, N., Duong, T., Goodearl, A., O'Neil, S., Lora, Fraser, C.C. (2005). PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *J Leukoc Biol*;78:426–434.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson. D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A., Blandin, G., Westenberger, S., Haas, B., Caler,

E., Cerqueira, G., Arner, E., Aslund, L., Bontempi, E., Branche, C., Bringaud, F., Campbell, D., Carrington, M., Crabtree, J.S., Darban, H., Edwards, K., Englund, P., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, C., Kindlund, E., Klingbeil, M.M., Kluge, S., Koo, H.L., Lacerda, D., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J., Ochaya, S., Pai, G., Parsons, M., Pettersson, U., Pop, M., Luis Ramirez, J., Salzberg, S., Tammi, M., Tarleton, R.L., Teixeira, S.M., Van Aken, S., Wortman, J., Stuart, K.D., Andersson, B., Anapuma, A., Attipoe, P., Burton, P., Cadag, E., Franco da Silva, J., de Jong, P., Fazelinia, G., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., Nelson, S., Osoegawa, K., Pentony, M., Rinta, J., Robertson, L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Vogt, C., Ward, P., Wickstead, B., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309 (5733):409-415.

Epting, Conrad L., Coates, Bria M. e Engman, David M. (2010). Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 126(3):283-91.

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(2):552-557.

Fouts, D.L., Ruef.J., Ridley P.T., Wrightsman, R.A., Peterson, D.S., Manning, J.E. (1991). Nucleotide sequence and transcription of a trypomastigote surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 46(2):189-200.

Franco, F.R., Paranhos-Bacalla G.S., Yamauchi L.M., Yoshida, N., da Silveira, J.F. (1993). Characterization of a cDNA clone encoding the carboxy-terminal domain of a 90-kilodalton surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infec Immun* 61(10):4196-4201.

Frasch, A.C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 16(7):282-286.

Gentil, L.G., Cordero, E.M., do Carmo, M.S., dos Santos, M.R.M, da Silveira, J.F. (2009). Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*; 109: 152-58.

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

Giordano, R., Chammas, R., Veiga, S. S., Colli, W., and Alves, M. J. M. (1994b). *Trypanosoma cruzi* binds to laminin in a carbohydrate-independent way. *Braz J Med Res* 27(9):2315-2318.

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

Gonçalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., de Souza, W., Alves, M.J., Zingales, B., Colli, W. (1991). *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp Parasitol* 72: 43-53.

Guilini, C., Urayama, K., Turkeri, G., Dedeoglu, D. B., Kurose, H., Messaddeq, N, e Neibigil, C. G. (2009). Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:844-852.

Hall, B.F., Webster, P., Ka, M.A., Joiner, K.A., Andrews, N.W. (1992). Desialylation of lysosomal membrane glycoprotein by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. *J Exp Med*; 176: 313-25.

Hem, S., Gherardini, P.F., y Fortéa, J.O., Hourdel, V., Morales, M.A., Watanabe, R., Pescher, P., Kuzyk, M.A., Smith, D., Borchers, C.H., Zilberstein, D., Helmer-Citterich, M., Namane, A., Späth, G.F. (2010) Identification of *Leishmania*-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analysis. Proteomics 10; 3868-3883.

Herrera, E.M., Ming, M., Ortega-Barria, E. e Pereira, M.E. (1994). Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 65(1):73-83.

Hu, W.P., Zhang, C., Li, J.D., Luo, Z.D., Amadesi, S., Bunnett, N., Zhou, Q.Y. (2006). Impaired pain sensation in mice lacking prokineticin 2. *Mol Pain*;2:35. 12.

Jacobs, T., Erdmann, H., Fleischer, B. (2010). Molecular interaction of Siglecs (sialic acid-binding Ig-like lectins) with sialylated ligands on *Trypanosoma cruzi. Eur J Cell Biol*; 89: 113-16.

Kahn, S.J., Nguyen D., Norsen J., Wleklinski, M., Granston, T., Kahn, M. (1999). *Trypanosoma cruzi*: antibodies to the surface glycoprotein superfamily differentiate subsets of the 85-kDa surface glycoproteins and confirm simultaneous expression of variant 85-kDa surface glycoproteins. *Exp Parasitol* 92(1):48-56.

Katzin, A. M., and Colli, W. (1983) Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*. An N-acetyl-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochim. Biophys. Acta* 727, 403–411.

Keramidas, M., Faudot, C., Cibiel, A., Feige, J. J., and Thomas, M. (2008) J.(2008). Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombina variegata 8 on steroidogenic adrenocortical cells. *Endocrinol.* 196, 473–482

Kisliouk, T., Podlovni, H., Spanel-Borowski, K., Ovadia, O., Zhou, Q.Y., Meidan, R. (2005). Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology* 146: 3950–3958.

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

LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G. A., Peale, F., Gurney, A., Killan, K. J., and Ferrara, N. (2001) Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412, 877-884.

LeCouter, J., Lin, R., Tejada, M., Frantz, G., Peale, F., Hillan, K.J., Ferrara, N. (2003). The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;100:2685–2690.

LeCouter, J., Zlot, C., Tejada, M., Peale, F., Ferrara, N. (2004). Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA*;101:16813–16818.

Li, J.D., Hu, W.P., Boehmer, L., Cheng, M.Y., Lee, A.G., Jilek, A., Siegel, J.M., Zhou, Q.Y. (2006). Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci*;26:11615–11623.

Li, M., Bullock, C.M., Knauer, D.J., Ehlert, F.J., Zhou, Q.Y. (2001). Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol.*;59(4):692-8.

Lin, D.C., Bullock, C.M., Ehlert, F.J., Chen, J.L., Tian, H., Zhou, Q.Y. (2002). Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/EG-VEGF. *J Biol Chem* 277:19276–19280

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(22):19382-9.

Magdesian, M.H., Tonelli, R.R., Fessel, M.R., Silveira, M.S., Schumacher, R.I., Linden, R., Colli, W., Alves, M.J. (2007). A conserved domain of the gp85/trans-sialidase family activates host cell extracellular signal-regulated kinase and facilitates *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Cell Res.* 1;313(1):210-8.

Maldonado-Pérez, D., Evans, J., Denison, F., Millar, R., Jabbour, H.N. (2007). Potential roles of the prokineticins in Reproduction. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.18 No.2, 66-72.

Marroquin-Quelopana, M., Oyama, S., Pertinhez, T.A., Spisni, A., Aparecida Juliano, M., Juliano, L., Colli, W., Alves, M.J. (2004). Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein mapping the aminibinding site. *Biochem Biophys Res Commun*; 325: 612-18.

Marsango, S., di Patti, M.C.B., Barra, D., Miele, R. (2010). Evidence that prokineticin receptor 2 exists as a dimer in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* 

Martucci, C., Franchi, S., Giannini, E., Tian, H., Melchiorri, P., Negri, L., Sacerdote, P. (2006). Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *Br J Pharmacol*; 147:225–234.

Masuda, Y., Takatsu, Y., Terao, Y., Kumano, S., Ishibashi, Y., Suenaga, M., Abe, M., Fukusumi, S., Watanabe, T., Shintani, Y., Yamada, T., Hinuma, S., Inatomi, N., Ohtaki, T., Onda, H., Fujino, M. (2002). Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293:396–402.

Matsumoto, S., Yamazaki, C., Masumoto, K.H., Nagano, M., Naito, M., Soga, T., Hiyama, H., Matsumoto, M., Takasaki, J., Kamohara, M., Matsuo, A., Ishii, H., Kobori, M., Katoh, M., Matsushime, H., Furuichi, K., Shigeyoshi, Y. (2006). Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103:4140–4145.

Melchiorri, D., Bruno, V., Besong, G., Ngomba, R.T., Cuomo, L., De Blasi, A., Copani, A., Moschella, C., Storto, M., Nicoletti, F., Lepperdinger, G., Passarelli, F. (2001). The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways. *Eur J Neurosci*;13:1694–1702.

Melo-Jorge, M., PereiraPerrin, M. (2007). The Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi* exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts. *Cell Host Microbe*; 1: 251-61.

Mendonça-Previato, L., Todeschini, A.R., Heise, N., Previato, J.O. (2005). Protozoan parasite-specific carbohydrate structures. *Curr Opin Struct Biol.*;15(5):499-505.

Moncayo, A., Silveira, A.C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 17-30.

Moody, T.N., Ochieng, J., Villalta, F. (2000). Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matriz mediated by human galectin-3. FEBS Lett. 31;470(3):305-8.

Moreno, S.N.J., Silva, J., Vercesi, A.E. (1994). Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J Exp Med*; 180: 1535-40.

Moro, A., Ruiz-Cabello, F., Fernandez-Cano, A., Stock, R.P., González, A. (1995). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. *Embo J.* 14(11):2483-2490.

Mortara, R.A., Andreoli, W.K., Fernandes, M.C., da Silva, C.V., Fernandes, A.B., L'Abbate, C., da Silva, S. (2008). Host cell actin remodeling response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. *Subcell Biochem*; 47: 101-09.

Mucci, J., Risso, M.G., Leguizamón, M.S., Frasch, A.C.C., Campetella, O. (2006). The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cell Microbiol*; 8: 1086-95.

Murta, A.C., Persechini, P.M., Padron, T.S., Souza, W., Guimarães, J.A., Scharfstein, J. (1990). Structural and functional identification of gp57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol* 43: 27–38.

Nakayasu, E.S., Gaynor, M.R., Sobreira, T.J.P., Ross, J.A., Almeida, I. C. (2009) Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. Proteomics; 9(13): 3489–3506.

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Melchiorri, P. (2007). Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sci*;81:1103–1116. 19.

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Colucci, M., Margheriti, F., Melchiorri, P., Vellani, V., Tian, H., De Felice, M., Porreca, F. (2006). Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci*;26:6716–6727.

Nett, I.R.E., Martin, D.M., Miranda-Saavedra, D., Lamont, D., Barber, J.D., Mehlert, A., Ferguson, M.A.J. (2009) The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African Sleeping Sickness. Molecular & Cellular Proteomics 8; 1527-1538.

Nde, P.N., Simmons, K.J., Kleshchenko, Y.Y., Pratap, S., Lima, M.F., Villalta, F. (2006). Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks Trypanosoma cruzi infection. *Infect Immun*; 74: 1643-8.

Ng, K.L., Li, J.D., Cheng, M.Y., Leslie, F.M., Lee, A.G., Zhou, Q.Y. (2005). Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science*; 308:1923–1927.

Ngan, E.S., Lee, K.Y., Sit, F.Y., Poon, H.C., Chan, J.K., Sham, M.H., Lui, V.C., Tam, P.K. (2007). Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta* 1773: 536–545.

Ngan, E.S.W. e Tam, P.K.H. (2008). Prokineticin-signaling pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 1679–1684.

Noé, G., de Gaudenzi, J.G., Frasch, A.C. (2008). Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol Biol*; 9: 107.

Nogueira, N.F.S., Gonzalez, M.S., Gomes, J.E., de Souza, W., Garcia, E.S., Azambuja, P., Nohara, L.L., Almeida, I.C., Zingales, B., Colli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, vol. 116, no. 2, pp. 120–128.

Ouaissi, M.A., Afchain, D., Capron, A., Grimaud, J.A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature* 308(5957):380-2.

Ouaissi, M.A., Cornette, J., Capron, A. (1985). *Trypanosoma cruzi*: Modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. *Eur J Immunol* 15(11):1096-1101.

Palenchar, J.B., Bellofatto, V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*.;146(2): 135-4.

Paiva, C.N., Souto-Padrón, T., Costa, D.A., Gattass, C.R. (1998). High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitol* 117: 483–490.

Pande, J., Szewczyk, M.M., Grover, A.K. (2010). Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv*.;28(6):849-58.

Parsons, M., Worthey, E.A., Ward, P.N., Mottram, J.C. (2005). Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*; 6: 127.

Pinho, R.T., Vannier-Santos, M.A., Alves, C.R., Marino, A.P.M.P., Castello Branco, L.R.R., Lannes-Vieira, J. (2002). Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. *Acta Trop*; 83: 103-15.

Podlovni, H., Ovadia, O., Kisliouk, T., Klipper, E., Zhou, Q.Y., Friedman, A., Alfaidy, N., Meidan, R. (2006). Differential expression of prokineticin receptors by endothelial cells derived from different vascular beds: a physiological basis for distinct endothelial function. *Cell Physiol Biochem* 18: 315–326.

Prosser, H.M., Bradley, A., Chesham, J.E., Ebling, F.J., Hastings, M.H., Maywood, E.S. (2007). Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. Proc *Natl Acad Sci USA*;104:648–653.

Rassi Jr, A., Rassi, A. e Marin-Neto, J. A., 2009. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 104(Suppl. I): 152-158.

Rubin-de-Celli, S.S., Uemura, H., Yoshida, N., Shenkman, S. (2006) Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. Cell Microb 8; 1888-1898.

Ruiz, R.C., Favoreto Jr S., Dorta M.L., Oshiro, M.E., Ferreira, A.T., Manque, P.M., Yoshida, N. (1998). Infectivity os *Trypanosoma cruzi* associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca2+ signaling activity. *Ciochem J* 330(Pt 1):505-511.

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(Pt 1):129-137.

Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M.M.A., Lima, A.P.C.A., Morrot, A., Juliano, L., Müller-Esterl, W. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. *J Exp Med* 192: 1289–1299.

Schenkman, S., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. (1991a). Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect Immun*; 59: 645-54.

Schenkman, S., Jiang, M., Hart, G.W. e Nussenxweig V. (1991b) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, Vol. 65, 1117-125.

Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M.E.A. e Nussenzweig, V. (1994) Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase. *Annu R.ev. Microbiol.* 48:499-523.

Silber, A.M., Tonelli, R.R., Lopes, C.G., Cunha-e-Silva, N., Torrecilhas, A.C., Schumacher, R.I., Colli, W., Alves, M.J. (2009). Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*; 168: 102-08.

Silber, A.M., Colli, W., Ulrich, H., Alves, M.J.M., Pereira, C.A. (2005). Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas disease. *Curr Drugs Targets Infect Disord*; 5: 53-64.

Simmons, K.J., Nde, P.N., Kleschchenko, Y.Y., Lima, M.F., Villalta, F. (2006). Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks Trypanosoma infection. *FEBS Lett*, 580: 2365-70.

Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228(4705):1315-7.

Sodré, C.L., Chapeaurouge, A.D., Kalume, D.E., Mendonça Lima, L., Perales, J., Fernandes, O. (2009) Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. Arch Microbiol 191; 117-184.

Soga, T., Matsumoto, S., Oda, T., Saito, T., Hiyama, H., Takasaki, J., Kamohara, M., Ohishi, T., Matsushime, H., Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579:173–179.

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 beta-galactopyranosyl residues in a sequential ordered mechanism. *J Biol Chem.* 13;279(7):5323-8

Tonelli, R.R., Giordano, R.J., Barbu, E.M., Torrecilhas, A.C., Kobayashi, G.S., Langley, R.R., Arap, W., Pasqualini, R., Colli, W., Alves, M.J. (2010) Role of the gp85/transsialidases in Trypanosoma cruzi tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. *PLoS Negl Trop Dis.* 2;4(11):e864

Tonelli, R.R., Silber, A.M., Almeida-de-Faria, M., Hirata, I.Y., Colli, W., Alves, M.J.M. (2004). L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*; 6: 733-41.

Turner, C.W., Lima, M.F., Villalta, F. (2002). *Trypanosoma cruzi* uses a 45-kDa mucin for adhesion to mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 11; 290(1):29-34.

Ulrich, H., Magdesian, M.H., Alves, M.J.M., Colli, W. (2002). *In vitro* selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem*; 277:20756-62.

Urayama, K., Dedeoglu, D.B., Guilini, C., Frantz, S., Ertl, G., Messaddeq, N., Nebigil, C.G. (2009). Transgenic myocardial overexpression of prokineticin receptor-2 (GPR73b) induces hypertrophy and capillary vessel leakage. *Cardiovasc Res* 81: 28–37.

Urayama, K., Guilini, C., Messaddeq, N., Hu, K., Steenman, M.m Kurose, H., Ert, G., Nebigil, C.G. (2007). The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *FASEB J*.;21(11): 2980-93.

Urayama, K., Guilini, C., Turkeri, G., Takir, S., Kurose, H., Messaddeq, N., Dierich, A., Nebigil, C.G. (2008). Prokineticin receptor-1 induces neovascularization and epicardial derived progenitor cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;28: 841–849.

Velge, P., Ouaissi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A. (1988). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* 97 (Pt 2):255-68.

Villalta, F., Scharfstein, J., Ashton, A.W., Tyler, K.M., Guan, F., Mukherjee, S., Lima, M.F., Alvarez, S., Weiss, L.M., Huang, H., Machado, F.S., Tanowitz, H.B. (2009).

Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitol Res*; 104: 1251-60.

Vray, B., Camby, I., Vercruysse, V., Mijatovic, T., Bovin, N.V., Ricciardi-Castagnoli, P., Kaltner, H., Salmon, I., Gabius, H.J., Kiss, R. (2004). Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology*, 14: 647-57.

Waghabi, M.C., Keramidas, M., Bailly, S., Degrave, W., Mendonça-Lima, L., Soeiro M. de, N., Meirelles M. de, N., Paciornik, S., Araújo-Jorge, T.C., Feige, J.J. (2005). Uptake of host cell transforming growth factor-beta by Trypanosoma cru*zi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol*; 167: 993-1003.

Williams-Blangero, S., VandeBerg, J.L., Banglero, J., Corrêa-Oliveira, R. (2003). Genetic epidemiology of Chagas' disease. *Front Biosci* 8:337-345.

Woolsey, A.M., Sunwoo, L., Peterson, C.A., Brachmann, S.M., Cantley, L.C., Burleigh, B.A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell Sci* 116: 3611-3622.

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

Yoshida, N. (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int*, 57: 105-09.

Yoshida, N. (2009). Molecular mechanisms of Trypanosoma cruzi infection by oral route. Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 104(Suppl. I): 101-107.

Zhou, Q.Y. (2006). The prokineticins: a novel pair of regulatory peptides. *Mol. Interv.* 6(6):330-8.

## ANEXOS

#### 1. A técnica de *Phage display*

Estudos preliminares realizados no laboratório sugeriam que havia outro(s) ligante(s) da Tc85-11. Para tal investigação, foi escolhida a técnica denominada *phage display*. Esta técnica consiste na construção de uma biblioteca de peptídeos exógenos aleatórios na superfície de bacteriófagos filamentosos, que podem ser utilizados em ensaios de *panning/biopannig*. Atualmente tem sido utilizada em trabalhos de mapeamento de epítopos e análise de interações proteína-proteína. Ligantes isolados através desta técnica podem ser utilizados para validação de alvos terapêuticos, desenho de novas drogas e de vacinas, além de poder ser utilizada em conjunto com outros métodos (revisto em Pande, Szewczyk e Grover, 2010).

Assim, Renata Tonelli e Úrsula Urias utilizaram uma biblioteca circular de peptídeos aleatórios do tipo CX<sub>7</sub>C, expressos na superfície do fago filamentoso M13, gentilmente cedida por R. Pasqualini (**Figura A1**).



**Figura A1. (a)** Arquitetura do fago filamentoso (M13, f1, fd) (Smith, 1985). **(b)** Mapa do sítio de clonagem do fago.

Através de "*panning*" utilizando esta biblioteca de peptídeos à proteína recombinante rTc85.45 (um clone de Tc85), foi possível identificar a seqüência GGIALAG, que apresenta ligação específica e de maneira dose-dependente à rTc85.45. Utilizando análise de alinhamento por *Blastn* à sequência GGIALAG, foi selecionado um possível candidato a ligante da Tc85 nas células hospedeiras, o já descrito na literatura receptor de procineticina 2 (PKR2). Adicionalmente, ensaios preliminares utilizando o motivo GGIALAG indicaram como possível sítio de ligação na Tc85, o domínio H3.3p.

### 2. Primers utilizados

Sequência	Pares de primers
PKR1 humano	CGGGATCCATGGAGACCACCATGGGGTTC (PKR1atgBamHI)
	CCCTCGAGTTATTTTAGTCTGATGCAGTCCACC (PKR1stopXhol)
PKR1 humano	CTGGTCCACAGGCCAGAT (PKR1int5')
(primers internos)	ACGGATGAAGTGCCAAACAG (PKR1int3')
PKR2 humano	CGGGATCCATGGCAGCCCAGAATGGAAAC (PKR2atgBamHI)
	CCCTCGAGTCACTTCAGCCTGATACAGTCC (PKR2stopXhol)
PKR2 humano	CAGATCTGGCCACAGAAGAT (PKR2int5')
(primers internos)	CTGGATGGTGTCCATTCTCA (PKR2int3')
PKR1 camundongo	AAAAGCTTATGGAGACCACTGTCGGGGGCT (PKR1-Fw(HindIII))
	AAGAATTCTTATTTCAGTCGGATGCAGTCCACC (PKR1-Rev(EcoRI))
	CGGGATCCATGGAGACCACTGTCGGGGCT (cPKR1atgBamHI)
	CCCTCGAGTTATTTCAGTCGGATGCAGTCCACC (cPKR1stopXhol)
PKR2 camundongo	AAAAGCTTATGGGACCCCAGAACAGAAAC (PKR2-Fw(HindIII))
	CCCTCGAGCTACTTTAGTCTGATACAATCCACC (PKR2-Rev (Xhol))
Actina	AGGAAGAGGATGCGGCAGTGG (FwD)
	CGAGGCCCAGAGCAAGAGAG (Rev)

Tabela A1. Sequência de nucleotídeos dos pares de primers utilizados nas reações de PCR e RT-PCR.

#### 3. Mapa dos vetores utilizados



**Figura A2. Mapa do vetor pTrcHis C** (Invitrogen), com seus principais sítios de restrição, onde foi inserida a sequência do H3.3p, região interna da Tc-85, conjugado a uma cauda de histidina.



**Figura A3. Mapa circular do vetor pCR2.1** (Invitrogen), onde foram clonadas as sequências de PKR1 e PKR2 pelo grupo de Shun-ichiro Matsumoto (Functional Genomics Molecular Medicine Research Labs – Japan).



Figura A4. Mapa circular do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) com seus principais sítios de restrição.



**Figura A5. Mapa circular do vetor pCDNA3.0**<sup>®</sup> (Invitrogen) com seus principais sítios de restrição. O plasmídeo utilizado contém uma sequência que codifica para um flag (sequência de aminoácidos MDYKDDDDY) inserida no sítio HindIII, sendo por isso chamado pcDNA3.0 5 F.



**Figura A6. Mapa do vetor pET28a**<sup>(+)</sup>. A seta preta larga corresponde ao sítio de clonagem/expressão do plasmídeo, e a sua seqüência de bases está detalhada abaixo do mapa. Em destaque estão enumeradas as seqüências que diferem nos plasmídeos pET28b<sup>(+)</sup> e pET28c(+). Fonte: Novagen.

## SÚMULA CURRICULAR

#### DADOS PESSOAIS

Nome: Ketna Guilhermino Khusal Local e data de nascimento: São Paulo, 31 de Janeiro de 1986.

### EDUCAÇÃO

Colégio Salesiano Santa Teresinha, São Paulo, até 2003.

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), São Paulo, 2004 a 2007. Graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Médica

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2008 a 2011. Mestrado em Bioquímica, Instituto de Química.

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Faculdade de Economia, Administração, Contabilidade e Ciências Atuariais – Universidade de São Paulo (FEA-USP).

Graduação em Administração de Empresas, São Paulo, desde 2010.

### OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Agência CNPq, Março/2008 a Fevereiro/2010.

#### PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Coimbra, V.C., Yamamoto, D., **Khusal, K.G.**, Atayde, V.D., Fernandes, M.C., Mortara, R.A., Yoshida, N., Alves, M.J., Rabinovitch, M. (2007). Enucleated L929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. *Infect Immun*; 75: 3700-06.

**Khusal, K.G.**, Okuda, K., Carvalho, C., Real, F., Coimbra, V., Rabinovitch, M. É possível prolongar a sobrevida de células artificialmente enucleadas?

Anais do XV Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP - PIBIC 2007, São Paulo. http://www.unifesp.br/prograd/pibic2007/anais.htm

Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP – PIBIC 2006, p.28 Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP - PIBIC 2005. http://www.unifesp.br/prograd/pibic2005/pdfs/ciencias-basicas-moleculares.pdf

**Khusal, K.G.**, Rabinovitch, M. (2008). Is it possible to extend the survival of artificial enucleated cells? XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular (Congresso, Apresentação de Trabalho).

Khusal, K. G., Mattos, E., Tonelli, R., Colli, W., Alves, M.J.M. Invasion of host cells by *Trypanosoma cruzi*: a new putative receptor. Apresentação Oral/Pôster no XXVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ XXXVII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease, 2010. (Congresso). Prêmio Walter Colli.